

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA BREZOVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NEŽA BREZOVEC

**MUTACIJE NA PODENOTI 23S RIBOSOMSKE RIBONUKLEINSKE KISLINE
PRI *HELICOBACTER PYLORI*, POVEZANE Z ODPORNOSTJO NA
KLARITROMICIN, IN NJIHOVA RAZŠIRJENOST V SLOVENIJI**

**MUTATIONS IN THE 23S RIBOSOMAL RIBONUCLEIC ACID SUBUNIT OF
HELICOBACTER PYLORI ASSOCIATED WITH CLARITHROMYCIN
RESISTANCE AND THEIR PREVALENCE IN SLOVENIA**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. dr. Sama Jeverice, dr. med., na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo MF UL, v sodelovanju z Laboratorijem za diagnostiko aerobnih in anaerobnih infekcij ter Laboratorijem za molekularno bakteriologijo in mikologijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Darku Černetu, mag. farm., ki mi je omogočil opravljanje magistrske naloge s področja, ki me je zanimalo, njegovo dostopnost in pripravljenost pomagati. Prav tako iskrena hvala somentorju asist. dr. Samu Jeverici, dr. med. za prijaznost, vse strokovne nasvete ter pomoč pri zasnovi in izvedbi naloge. Hvala tudi Tjaši in ostalim sodelavkam na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo MF UL, ki so mi svetovale s praktičnimi nasveti. Na koncu hvala tudi družini, Samu in prijateljem, ki so mi stali ob strani skozi čas študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Darka Černeta, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorja asist. dr. Sama Jeverice, dr. med.

Neža Brezovec

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
KLJUČNE BESEDE, KEY WORDS.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD.....	1
1.1 ZGODOVINSKI PREGLED	1
1.2 TAKSONOMIJA HP	1
1.3 MIKROBIOLOGIJA HP	2
1.4 EPIDEMIOLOGIJA	3
1.4.1 RAZŠIRJENOST V SVETU.....	3
1.4.2 RAZŠIRJENOST V SLOVENIJI.....	3
1.4.3 PRENOS OKUŽBE.....	3
1.5 PATOLOGIJA	3
1.5.1 PEPTIČNA RAZJEDA	4
1.5.2 RAK ŽELODCA	5
1.5.3 MALT LIMFOM.....	5
1.5.4 ZUNAJ ŽELODČNE BOLEZNI, KI JIH POVZROČA HP.....	5
1.6 DIAGNOSTIKA	6
1.7 ZDRAVLJENJE	7
1.7.1 ANTIBIOTIKI.....	8
1.7.2 PPI	8
1.7.3 BIZMUTOVE SOLI.....	9
1.8 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE	9
1.8.1 PRIDOBIVANJE IN MEHANIZMI ODPORNOSTI.....	9
1.9 MAKROLIDNI ANTIBIOTIKI	10

1.9.1	MEHANIZMI ODPORNOSTI PRI MAKROLIDIH	11
1.9.2	MAKROLIDNA ODPORNOST PRI HP	11
1.9.3	23S rRNA	12
1.10	POVEZAVA MUTACIJ Z ODPORNOSTJO	13
1.11	TESTIRANJE ODPORNOSTI	14
1.11.1	FENOTIPSE METODE	14
1.11.2	GENOTIPSE METODE	14
2	NAMEN DELA	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	RUTINSKO DELO S HP	16
3.2	IZBIRA VZORCEV	18
3.3	ODMRZOVANJE IN KULTIVACIJA	19
3.4	IDENTIFIKACIJA	20
3.5	IZOLACIJA DNA	21
3.6	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	22
3.7	OCENA PODVOJENE DNA	24
3.7.1	Priprava agaroznega gela	24
3.7.2	Gelska elektroforeza	24
3.7.3	Odčitavanje rezultatov z gela	25
3.8	SEKVENCIRANJE	26
3.8.1	Čiščenje produkta PCR	26
3.8.2	Sekvenčna reakcija	26
3.8.3	Čiščenje produkta sekvenčne reakcije	28
3.8.4	Sekvenciranje	28
3.9	ANALIZA SEKVENC	29
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1	VZORCI	30

4.2	ANALIZA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA.....	32
4.3	PRIMERJAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ REFERENČNIH SEVOV	35
4.4	MUTACIJE.....	36
4.5	MUTACIJI A2142G, A2143G	37
4.6	ODPORN IZOLATI HP BREZ MUTACIJ A2142G, A2143G.....	38
4.7	HETEROZIGOTI	39
5	SKLEP.....	42
6	LITERATURA.....	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Bakteriološka gojišča, ki jih uporabljamo za osamitev bakterije <i>Helicobacter pylori</i> iz vzorcev biopsije želodčne sluznice, in njihova sestava.	17
Preglednica II: Sestava reakcijske mešanice za PCR.	23
Preglednica III: Program za PCR.	23
Preglednica IV: Program za čiščenje PCR produkta.	26
Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice za sekvenčno reakcijo.	27
Preglednica VI: Program za sekvenčno reakcijo.	28
Preglednica VII: Porazdelitev števila pacientov po spolu, starostnih skupinah ter številu predhodno zdravljenih okužb s HP.	31
Preglednica VIII: Rezultati analize nukleotidnih zaporedij.	32
Preglednica IX: Razlike v dušikovih bazah na mestih nukleotidnega zaporedja pri treh referenčnih, na klaritromicin občutljivih sevih HP.	35
Preglednica X: Pogostost pojavljanja mutacij in porazdelitev po posameznih vrednostih MIK za klaritromicin.	36
Preglednica XI: Razširjenost mutacij A2142G in A2143G pri na klaritromicin odpornih izolatih HP.	37
Preglednica XII: Na klaritromicin odporna izolata HP brez mutacij na mestih 2142 ali 2143 s pripadajočimi MIK za klaritromicin in prisotnimi mutacijami.	39
Preglednica XIII: Heterozigotne mutacije izolatov HP na mestih 2142 in 2143 s pripadajočimi MIK za klaritromicin.	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomija bakterije <i>Helicobacter pylori</i> (6).....	1
Slika 2: Bakterija <i>Helicobacter pylori</i> . Povzeto po referenci (9).....	2
Slika 3: Potek okužbe s <i>Helicobacter pylori</i> ter možni izidi.....	4
Slika 4: Osnovna shema postopanja pri zdravljenju okužbe s <i>Helicobacter pylori</i> glede na prevalenco odpornosti na klaritromicin (Kla ^R) in metronidazol (Met ^R) v okolju. Povzeto po (27).	7
Slika 5: Mehanizmi odpornosti pri bakterijah.....	10
Slika 6: Kemijska struktura klaritromicina ³⁶	11
Slika 7: Zgradba bakterijskega ribosoma. Prirejeno po (39).....	13
Slika 8: (A) Sekundarna struktura 23S in 5S rRNA pri <i>Escherichia coli</i> . Dostopno na (45). (B) Mesta mutacij na domeni V 23S rRNA pri <i>Helicobacter pylori</i> . Prirejeno po (26).....	13
Slika 9: Prikaz števila izbranih vzorcev pri posameznih vrednostih MIK za klaritromicin.	18
Slika 10: Levo: razmaz homogeniziranega tkiva želodčne sluznice; Desno: razmaz precepljenih kolonij bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	19
Slika 11: Prikaz števila analiziranih nukleotidnih zaporedij izolatov pri posameznih vrednostih MIK za klaritromicin.	32
Slika 12: Prikaz odvisnosti števila mutacij A2142G in A2143G od MIK za klaritromicin.	38

POVZETEK

Helicobacter pylori je bakterija, ki je splošni javnosti najbolj poznana kot povzročiteljica peptične razjede, igra pa pomembno vlogo tudi pri nastanku želodčnega raka in nekaterih drugih boleznih. Okužbo zdravimo kombinirano, običajno z dvema ali več antibiotiki ter zaviralcem protonske črpalke. S problematiko odpornosti na antibiotike in posledično neučinkovitim zdravljenjem se srečujemo vedno pogosteje. Eden ključnih antibiotikov, ki se uporablja v terapiji okužbe s *H. pylori*, je klaritromicin, zaskrbljujoče pa je dejstvo, da uspešnost zdravljenja z njim mnogokrat več ne dosega niti 80 %. Znano je, da so pri razvoju odpornosti na klaritromicin pri *H. pylori* v večini primerov odgovorne točkaste mutacije 23S podenote ribosomske RNA, ki zmanjšajo afiniteto vezave antibiotika na tarčno mesto. V nalogi nas je zanimala pojavnost teh mutacij na področju Slovenije in njihova korelacija z odpornostjo na klaritromicin. Izvedli smo raziskavo, v katero smo vključili 140 vzorcev bolnikov okuženih s *H. pylori*, ki jih hranijo na Inštitutu za Mikrobiologijo in Imunologijo v Ljubljani. Iz vzorcev smo osamili bakterije, izolirali njihov DNA, z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili preučevan odsek nukleotidnega zaporedja ter izvedli sekvenciranje. Dobljene odseke smo nato analizirali in jih primerjali z odsekom referenčnega seva *H. pylori*, ki je občutljiv na klaritromicin. Razlike v nukleotidnem zaporedju smo opredelili kot mutacije potencialno odgovorne za razvoj odpornosti ter jih v nadaljevanju skušali povezati z vrednostmi minimalne inhibitorne koncentracije za klaritromicin, ki so bile vzorcem predhodno rutinsko določene. Našli smo 23 različnih mutacij. Pri 67 % analiziranih sekvenc, se je pojavljala substitucija A2143G, pri 19 % T2182C, pri 18 % pa A2142G. Ostale mutacije so bile prisotne pri manj kot 5 % analiziranih sekvenc. Povezavo z odpornostjo na klaritromicin smo uspeli dokazati le pri mutacijah A2142G in A2143G, pri čemer je mutacija A2142G korelirala z najbolj odpornimi sevi. Ovrednotili smo zanesljivost uporabljenih genotipskih metod za odkrivanje odpornosti *H. pylori* na klaritromicin v primerjavi s fenotipskimi metodami, ki temeljijo na bakterijski kulturi. Zaključili smo, da so genotipske metode z določevanjem mutacij zanesljive, ne pa popolnoma, saj pri 3 % fenotipsko opredeljenih odpornih sevih nismo našli mutacij A2142G ali A2143G, ki sta trenutno edini dokazan genotipski pokazatelj odpornosti na klaritromicin.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium commonly known as the main cause of peptic ulceration. However, it plays an important role in development of gastric cancer and some other diseases. The treatment of the infection usually consists of combining two or more antibiotics and a proton pump inhibitor. The prevalence of antibiotic resistance rates has been increasing which results in more treatment failures. Clarithromycin is one of the main antibiotics used in the treatment of *H. pylori* infection, but its cure rates have dropped significantly, sometimes below 80 %. It is known that in *H. pylori*, clarithromycin resistance is usually due to point mutations in the 23S subunit of ribosomal RNA, which lead to decrease in antibiotic binding. Our aims were to present the prevalence of these mutations in Slovenia and associate them with clarithromycin resistance. In the present study, we investigated 140 samples from different patients infected with *H. pylori* stored at the Institute of Microbiology and Immunology in Ljubljana. Bacteria were cultured from the samples, then DNA isolation was performed, followed by PCR amplification of the studied nucleotide sequence and sequencing. The obtained sequences were analysed and compared to the reference sequence of clarithromycin susceptible *H. pylori* strain. We defined the differences found as mutations responsible for clarithromycin resistance and tried to associate them with the minimal inhibitory concentration values of clarithromycin previously routinely tested. 23 different mutations were identified. 67 % of the analysed sequences contained substitution A2143G, 19 % T2182C and 18 % A2142G. Other mutations were present in less than 5 % of sequences. Our results confirmed the association between the A2142G, A2143G mutations and clarithromycin resistance, A2142G mutations correlating with the most resistant strains. Reliability of the genotypic methods used was evaluated, comparing them to the phenotypic methods based on bacterial culture. We concluded that the genotypic methods are reliable, but not perfectly. In the 3 % of the phenotypically resistant strains no A2142G or A2143G mutations, currently the only proven resistance-associated genotypic markers, were found.

KLJUČNE BESEDE

Helicobacter pylori, klaritromicin, odpornost, mutacije

KEY WORDS

Helicobacter pylori, clarithromycin, resistance, mutations

SEZNAM OKRAJŠAV

A	adenin
bp	bazni par
C	citozin
<i>cagA</i>	(<i>angl.</i> cytotoxin-associated gene A)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid)
EUCAST	Evropska komisija za testiranje protimikrobne občutljivosti (<i>angl.</i> European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
G	gvanin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
I	intermediaren (<i>angl.</i> intermediate)
Kla	klaritromicin
Kla ^R	odpornost na klaritromicin
MALT	limforetikularno tkivo v sluznici (<i>angl.</i> mucosa associated lymphoid tissue)
Met ^R	odpornost na metronidazol
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (<i>angl.</i> messenger ribonucleic acid)
PBS	(<i>angl.</i> phosphate buffered saline)
PPI	zaviralec protonske črpalke (<i>angl.</i> proton pump inhibitor)
R	odporen (<i>angl.</i> resistant)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (<i>angl.</i> ribosomal ribonucleic acid)
S	občutljiv (<i>angl.</i> susceptible)
T	timin
VacA	vakuolizirajoči citotoksin A (<i>angl.</i> vacuolating cytotoxin A)

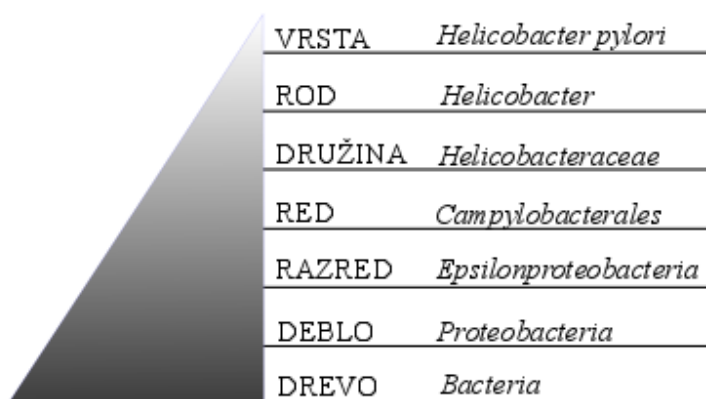
1 UVOD

1.1 ZGODOVINSKI PREGLED

Čeprav je bakterija *Helicobacter pylori* (HP) prisotna v evoluciji človeka že vsaj 50.000 let (1), za njeno odkritje upoštevamo leto 1982, ko sta avstralska znanstvenika Robin Warren in Barry Marshall uspešno osamila njene kolonije iz želodčne biopsije. V nadaljevanju sta dokazala, da je okužba s to bakterijo glavni vzrok večine peptičnih razjed in gastritisov. To dejstvo predstavlja mejnik v zdravljenju teh bolezni, saj so do takrat vzrok njihovega nastanka pripisovali predvsem stresu in nezdravemu življenjskemu slogu. Za svoje odkritje sta leta 2005 prejela Nobelovo nagrado za medicino (2).

1.2 TAKSONOMIJA HP

HP je bila zaradi nekaj podobnih lastnosti bakterijam iz rodu *Campylobacter* ob odkritju sprva poimenovana *Campylobacter pyloridis*, zaradi slovnične pravilnosti kasneje *Campylobacter pylori*. Leta 1989 so nato ugotovili, da uvrstitev v rod *Campylobacter* ni ustrezna, ter jo uvrstili v nov rod *Helicobacter* (3). Danes ta rod obsega več kot 35 vrst, ki jih zaradi visoke specifičnosti za določen organ, v grobem delimo na tiste, ki kolonizirajo želodec in tiste, ki kolonizirajo jetra (4,5). Celotna taksonomija HP je predstavljena na Sliki 1.

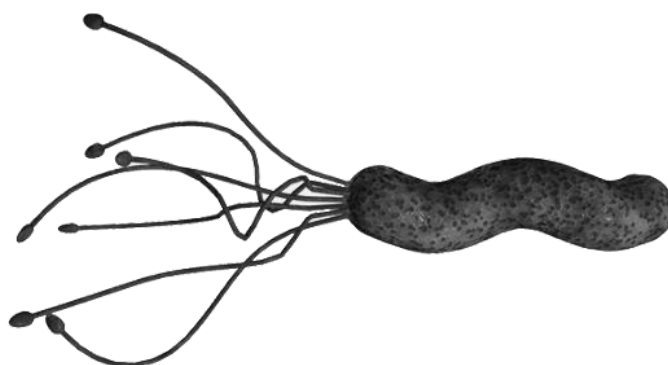


VRSTA	<i>Helicobacter pylori</i>
ROD	<i>Helicobacter</i>
DRUŽINA	<i>Helicobacteraceae</i>
RED	<i>Campylobacterales</i>
RAZRED	<i>Epsilonproteobacteria</i>
DEBLO	<i>Proteobacteria</i>
DREVO	<i>Bacteria</i>

Slika 1: Taksonomija bakterije *Helicobacter pylori* (6).

1.3 MIKROBIOLOGIJA HP

HP je gramnegativna spiralna bakterija, včasih paličaste ali kokoidne oblike, ki meri 2,5–3,5 μm v dolžino ter 0,5–1,0 μm v širino (Slika 2). Na enem izmed koncev ji značilno izraščajo polarni bički, ki ji omogočajo dobro gibljivost (7). V neugodnih razmerah se lahko spremeni v obliko koka, kar ji olajša preživetje, vendar se v kokoidni obliki ne deli in jo je zato takrat nemogoče kultivirati (8).



Slika 2: Bakterija *Helicobacter pylori*. Povzeto po referenci (9).

HP je mikroaerofilna bakterija, kar pomeni, da ji ustreza okolje z nizko koncentracijo O_2 (2–5 %). Poleg tega v okolju potrebuje tudi nizke koncentracije CO_2 (5–10 %), visoko vlažnost in temperaturo 34–40 °C. Raste in razmnožuje se le v območju pH 5,5–8,0, najbolje v nevtralnem, preživi pa tudi kratka obdobja v okolju s pH < 4 (10,11).

Bakterija kolonizira sluznico želodca, ki ji predstavlja dovolj stabilne pogoje in omejeno konkurenco z ostalimi bakterijami. Da lahko preživi v tako kislem okolju, je razvila številne prilagoditvene mehanizme. Proizvaja encim ureazo, ki hidrolizira sečnino do ogljikovega dioksida in amonijaka. Slednji zniža kislost njenega lokalnega mikrookolja in ji omogoča preživetje. Ostali dejavniki, ki ji še olajšujejo kolonizacijo želodčne sluznice, so adhezini – molekule, ki sodelujejo pri pritrditvi na sluznico, in bički, ki omogočajo kemotaksično gibanje v smeri manj kislega okolja (12). Poleg ureaze HP proizvaja še katalazo in oksidazo, vse tri encime izkoriščamo za identifikacijo.

1.4 EPIDEMIOLOGIJA

1.4.1 RAZŠIRJENOST V SVETU

Razširjenost HP se glede na geografska področja v svetu zelo razlikuje. Podatki iz leta 2013 kažejo, da imajo področja južne in vzhodne Evrope, južne Amerike ter Azije prevalenco okužene populacije pogosto nad 50 %, medtem ko je prevalenca okužbe v severni Evropi ter severni Ameriki običajno nižja in z leti upada predvsem na račun boljše higiene ter vse pogostejšega zdravljenja. V splošnem velja pravilo, da je razširjenost okužbe obratno sorazmerno povezana s socialno ekonomskim statusom prebivalstva, kar se navezuje predvsem na življenjske razmere v času njihovega otroštva (14).

1.4.2 RAZŠIRJENOST V SLOVENIJI

V raziskavi iz leta 2005 so ugotovili, da je razširjenost okužbe s HP v Sloveniji 25,1 %, kar je primerljivo z ostalimi razvitimi evropskimi državami. Višja je v starejši populaciji, kar najverjetneje odraža večjo pojavnost okužbe v preteklosti, ne pa novih okužb v starosti. Delež okuženih je namreč v primerjavi z letom 1990, ko je znašal 51,6 %, danes za dobro polovico nižji (15,16).

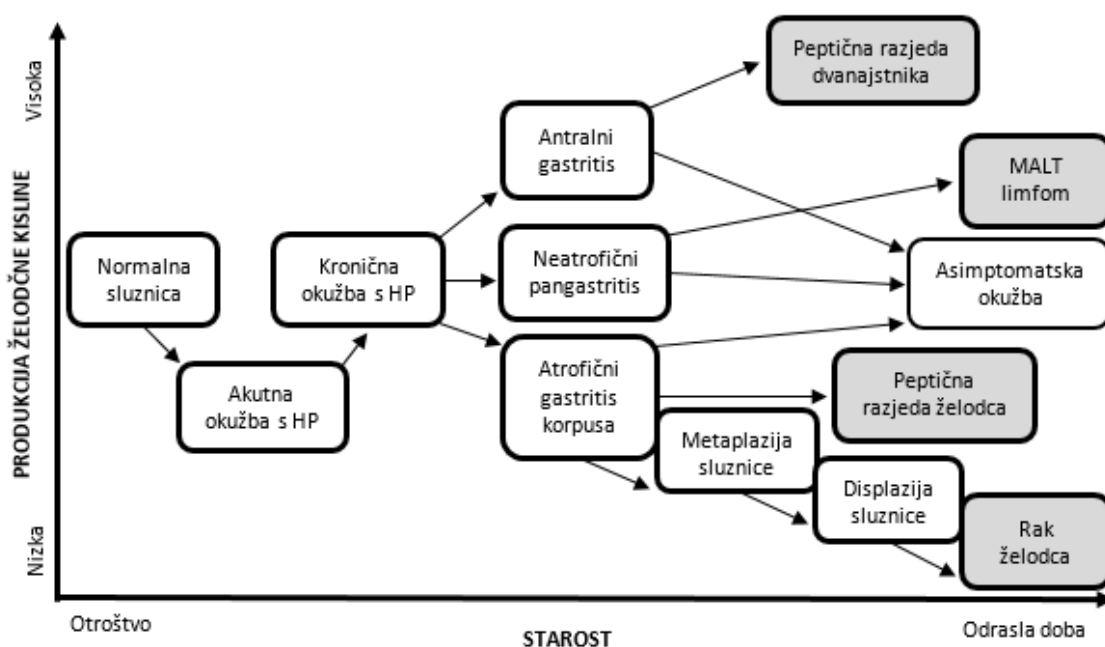
1.4.3 PRENOS OKUŽBE

Področje prenosa okužbe ni popolnoma raziskano, najverjetneje pa gre bodisi za oralno-oralno pot bodisi za fekalno-oralno pot prenosa. V večini primerov se okužimo v zgodnjem otroštvu, običajno so vir bližnji družinski člani, obstaja pa tudi verjetnost prenosa okužbe iz okolja, npr. s pitjem kontaminirane vode (14).

1.5 PATOLOGIJA

HP pri vseh okuženih povzroči akutni gastritis, katerega simptomi so običajno nespecifični (občutek polnosti, slabost, bruhanje) in prehodne narave, zato se diagnostika v tem obdobju redko izvaja. Akutna okužba običajno preide v kronični aktivni gastritis, ki navadno vztraja vse življenje, če bolnika ne zdravimo, in lahko vodi do različnih kliničnih izidov. Večina okuženih nikdar ne razvije simptomatike, v 10–15 % pride do peptične razjede, v približno 1 % do raka želodca, še v manjšem deležu pa se izrazi MALT limfom (17) (Slika 3). O izidu okužbe odločajo virulentni dejavniki bakterijskega seva HP, lastnosti gostitelja (imunski sistem, genski polimorfizmi, produkcija želodčne kisline) ter dejavniki okolja (kajenje,

uživanje alkohola, terapija z nesteroidnimi antirevmatiki ali zaviralci protonske črpalke in drugi) (18). HP izloča številne snovi, ki imajo pomembno vlogo pri razvoju okužbe. V zgodnji fazi igrajo veliko vlogo adhezini, ki omogočajo pritrditev na epiteljske celice želodčne sluznice, encimi fosfolipaze in proteaze, ki razgrajujejo zaščitno sluz, ter ureaza, ki posredno prek amonijaka zagotavlja lokalno ustrezen pH za preživetje ter obenem okvarja epiteljske celice. Znana virulentna dejavnika sta še CagA (*angl.* cytotoxin-associated gene A) ter VacA – vakuolizirajoči citotoksin (*angl.* vacuolating cytotoxin A). Prisotnost gena za CagA ter polimorfna oblika s1/m1 gena za VacA sta povezana z večjo incidenco peptične razjede ter raka želodca (12,16).



Slika 3: Potek okužbe s *Helicobacter pylori* ter možni izidi.

1.5.1 PEPTIČNA RAZJEDA

Peptična razjeda je ostro omejena poškodba sluznice dvanajstnika, redkeje želodca ali požiralnika, ki nastane zaradi škodljivega delovanja želodčne kisline ter pepsina, in za katero je značilno, da sega skozi mišično plast sluznice (19,12). Raziskave so že kmalu po odkritju HP pokazale, da je bakterija prisotna pri 95 % razjed na dvanajstniku in pri 85 % razjed na želodcu, zato lahko rečemo, da je okužba v večini primerov nujen, ampak še vedno ne zadosten razlog za razvoj razjede, saj se ta razvije le pri približno 10–15 % okuženih. Razjede se najpogosteje pojavijo na mestih, kjer je vnetje sluznice najintenzivnejše. Pri

okuženih, ki imajo normalno ali povišano izločanje želodčne kisline, je vnetje lokalizirano pretežno v antrumu želodca in / ali proksimalnih delih duodenuma (antralno predominantni gastritis). Pri okuženih, ki imajo nižjo produkcijo kisline, je vnetje razširjeno pretežno v korpusu želodca (korpus predominantni gastritis). Peptična razjeda je pogostejša v primeru antralno predominantnega gastritisa in redkejša, kadar je vnetje pretežno v korpusu želodca (Slika 3) (18).

1.5.2 RAK ŽELODCA

Kljub temu, da v svetu incidenca in smrtnost raka na želodcu upadata, ta še vedno ostaja velik javno-zdravstveni problem, posebno v Aziji (20). Svetovna zdravstvena organizacija ga po številu povzročenih smrti uvršča na tretje mesto takoj za pljučnim rakom in rakom jeter (21). Okužba s HP je glavni dejavnik tveganja za razvoj raka želodca in je zato uvrščena med karcinogene I. razreda. Tveganje za razvoj raka na želodcu je večje v prisotnosti bolj virulentnih sevov HP, ki so značilni predvsem za področje Azije (22,12).

1.5.3 MALT LIMFOM (*angl.* mucosa associated lymphoitic tissue)

V želodčni sluznici navadno ne srečamo limfatičnega tkiva, pri okužbi s HP pa je to vedno prisotno. Znano je tudi, da so skoraj vsi bolniki z MALT limfomom HP pozitivni (23). Zaradi relativne redkosti tega limfoma, natančna pojavnost pri okuženih s HP ni natančno znana, vendar je najverjetneje manjša od 1 % (24).

1.5.4 ZUNAJ ŽELODČNE BOLEZNI, KI JIH POVZROČA HP

HP je bil od odkritja znan povzročitelj želodčnih bolezni, danes pa spoznavamo tudi njegovo vlogo pri zunaj želodčnih boleznih. Raziskane so predvsem povezave z idiopatsko trombocitopenično purpuro, sideropenično anemijo ter pomanjkanjem vitamina B12 v telesu. Raziskovali so tudi vzročne povezave z različnimi kardiovaskularnimi, nevrološkimi, dermatološkimi in respiratornimi boleznimi, vendar bi bilo zaradi kontroverznih izsledkov teh raziskav za nedvomne dokaze potrebno področja dodatno preučiti (25).

1.6 DIAGNOSTIKA

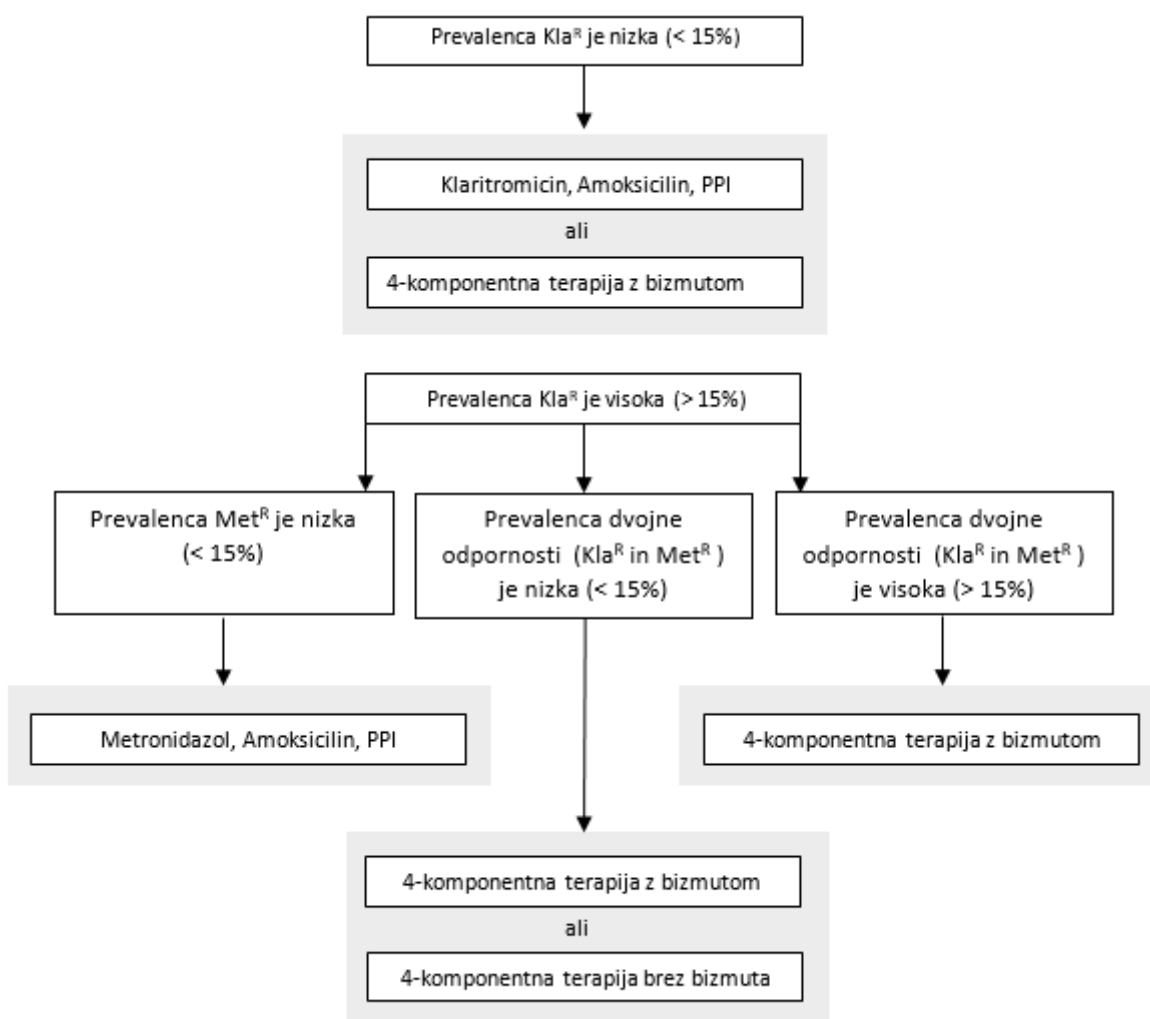
Za diagnostiko okužbe s HP imamo na voljo različne metode, ki jih delimo na invazivne in neinvazivne. Invazivne metode temeljijo na vzorcu tkiva želodčne sluznice, ki ga pridobimo s pomočjo biopsije pri endoskopskem pregledu. Pri tem postopku je potrebno odvzeti vzorce iz antruma in korpusa želodca, saj je lokalna porazdelitev bakterije pomembna kot prognostični dejavnik izida bolezni. Biopsijo želodca lahko uporabimo za kulturo bakterije, histologijo ali hitri ureazni test. Pri neinvazivnih metodah okužbo dokazujemo iz krvi s serološkimi metodami, iz izdihanega zraka po obroku označenega ogljika z urea dihalnim testom ter iz blata z antigenskim testiranjem.

V rutinski diagnostiki se največkrat poslužujemo histologije, urea dihalnega testa in testiranja antigena v blatu, medtem ko se pri večjih epidemioloških študijah pogosto odločamo za serologijo z dokazovanjem specifičnih protiteles. Kultura in antibiogram v trenutnem diagnostičnem algoritmu običajno prideta na vrsto po enkratnem ali večkratnem neuspešnem zdravljenju okužbe, ki je običajno posledica odpornosti HP na antibiotike.

V izogib lažno negativnim rezultatom diagnostičnih metod je, razen pri serologiji, potrebno prekiniti zdravljenje z antibiotiki ter inhibitorji protonske črpalke vsaj 2 tedna pred preiskavo, saj je drugače število bakterij lahko znižano pod mejo detekcije (18,26).

1.7 ZDRAVLJENJE

Okužbo s HP zdravimo kombinirano, običajno z dvema ali več antibiotiki, zaviralcem protonske črpalke (*angl.* proton pump inhibitor – PPI) in včasih bizmutovimi spojinami. V priporočilih petega Maastricht konsenza so podane smernice za zdravljenje (Slika 4).



Slika 4: Osnovna shema postopanja pri zdravljenju okužbe s *Helicobacter pylori* glede na prevalenco odpornosti na klaritromicin (Kla^R) in metronidazol (Met^R) v okolju. Povzeto po (27).

Dolga leta je veljala za glavno terapijo izbora (I. linija) klasična trojna 7-dnevna terapija s klaritromicinom (2-krat dnevno 500 mg), amoksicilinom (2-krat dnevno 1000 mg) in PPI v običajnem odmerjanju, pri čemer se lahko v primeru alergije na penicilinske antibiotike amoksicilin zamenja z metronidazolom (2-krat dnevno 400/500 mg). Zaradi vse večje odpornosti HP na klaritromicin danes ta režim zdravljenja mnogokrat ne dosega niti 80 % uspešnosti ozdravitve, zato novejšie smernice priporočajo drugačno zdravljenje v primeru,

ko je odpornost na klaritromicin v lokalnem okolju > 15 %. V poštev pridejo trojna terapija z metronidazolom, amoksicilinom in PPI, 4-komponentna terapija z bizmutom, metronidazolom, tetraciklinom in PPI ter 4-komponentna terapija brez bizmuta, ki vključuje zdravljenje s klaritromicinom, amoksicilinom, metronidazolom in PPI. Na področjih, kjer je dvojna odpornost na klaritromicin in metronidazol > 15 %, se priporoča 4-komponentna terapija z bizmutom, PPI in kombinacijo tudi drugih antibiotikov (amoksicilin, tetraciklin, furazolidon, rifabutin). V kolikor je zdravljenje s I. linijo režimov neuspešno, sledi II. linija zdravljenja, če niti ta ni uspešna, tedaj je priporočljivo izvesti teste na občutljivost antibiotikov in zdravljenje usmeriti (27,28). V zadnjem obdobju se čedalje pogosteje poslužujemo usmerjenega zdravljenja že v I. liniji, saj se je to v številnih metaanalizah izkazalo za bolj učinkovito (29).

Zaradi pogostega neuspešnega zdravljenja okužbe je po končanem zdravljenju nujno potrebno opraviti diagnostično kontrolo uspeha zdravljenja. V ta namen se lahko uporabita dva neinvazivna testa, urea dihalni test ali dokaz antigena HP v blatu. Še vedno so deljena mnenja o tem, koliko časa po končanem zdravljenju je potrebno izvesti tak test, nekateri priporočajo 4 tedenski odlog, drugi po svetujejo testiranje po 6–8 tednih (28,30).

1.7.1 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so naravni produkti mikroorganizmov ali njihovim produktom sintetični analogi, ki ubijajo druge mikroorganizme ali zavirajo njihovo rast s selektivno toksičnostjo (31). V širšem pomenu k njim uvrščamo tudi sintezne spojine z antimikrobnim delovanjem t. i. kemoterapevtike. Pri zdravljenju okužbe s HP se najpogosteje srečamo s klaritromicinom (makrolid), amoksicilinom (β -laktam), metronidazolom (nitroimidazol), levofloksacinom (kinolon), tetraciklinom ter rifabutinom (28).

1.7.2 PPI

Zaviralci protonske črpalke so zdravila, ki zavirajo nastajanje želodčne kisline v parietalnih celicah sluznice želodca, tako da se nepovratno vežejo na protonske črpalke. Najpomembnejši predstavniki skupine so omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, esomeprazol in rabeprazol. Pri zdravljenju HP jih uporabljamo iz več razlogov. Z zaviranjem izločanja želodčne kisline zvišajo pH vrednost želodčnega soka na 5–7, kar ugodno vpliva na stabilnost kislinsko nestabilnih antibiotikov, npr. klaritromicina, poleg tega pa višji pH spodbudi HP k razmnoževanju, kar bakterijo naredi bolj občutljivo za delovanje

antibiotikov. Imajo tudi direkten zaviralni učinek na samo bakterijo, vendar so za ta učinek potrebni zelo visoki odmerki. Dodaten ugodni učinek PPI predstavlja lajšanje stranskih učinkov samega zdravljenja, kar se odraža v boljši adherenci bolnikov (32–34).

1.7.3 BIZMUTOVE SOLI

Bizmutove soli uporabljamo v medicini že od 19. stoletja, največkrat prav za zdravljenje bolezni prebavil. Koloidni bizmutov subcitrát ter bizmutov subsalicilat sta splošno uporabljeni učinkovini pri zdravljenju okužbe s HP. Mehanizem delovanja bizmutovih soli je kompleksen in vključuje tako zaviranje sinteze beljakovin in ATP kakor tudi bakterijske celične stene (35,36).

1.8 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE

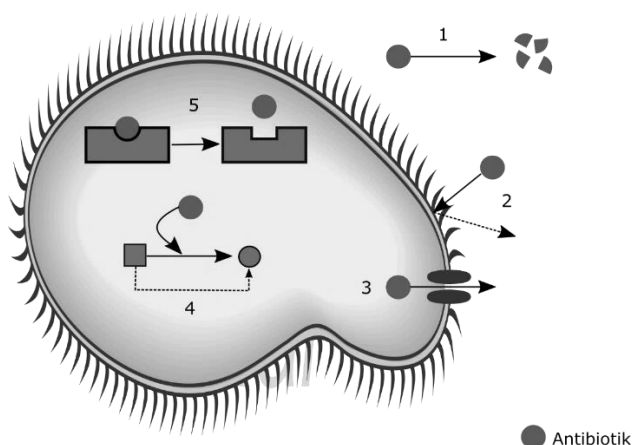
Antibiotiki so ob prihodu na trg pred več kot 50 leti veljali za čudežna zdravila. A zaradi prekomerne in neustrezne uporabe je prišlo pri bakterijah do razvoja odpornosti, ki danes poleg slabe adherence bolnikov predstavlja največji problem zdravljenja okužbe s HP. Pri bakteriji HP govorimo o dveh tipih protimikrobne odpornosti. Primarna odpornost je prisotna že pred prvim zdravljenjem okužbe, medtem ko je sekundarna odpornost prisotna po enkratnem ali večkratnem neuspešnem zdravljenju okužbe (31). Pri obeh tipih gre za pridobivanje mutacij ob stiku bakterije z antibiotikom. Pri zdravljenju z antibiotiki se manjša odporna subpopulacija namnoži in preraste prevladujočo občutljivo populacijo, ki jo prisotnost antibiotika ubije. Temu se lahko delno izognemo z višjimi odmerki antibiotikov, daljšim časom zdravljenja ali uporabo kombinirane terapije (30). Raziskava, ki je v letih 2008–2009 v 18 evropskih državah preučevala primarno odpornost na antibiotike pri zdravljenju okužbe s HP, je pokazala, da največjo težavo predstavljajo odpornosti na klaritromicin, metronidazol ter levofloksacin, pri ostalih antibiotikih pa je stopnja odpornosti zanemarljiva (37).

1.8.1 PRIDOBIVANJE IN MEHANIZMI ODPORNOSTI

Bakterijam razmnoževanje s podvajanjem ne predstavlja veliko možnosti za pridobivanje genetske raznolikosti, zato so razvile drugačne mehanizme s katerimi ustvarjajo raznolikost znotraj vrste. Bakterija lahko postane odporna na antibiotike na dva načina, lahko pridobi genski material od bakterije, ki je na antibiotik že odporna, ali pa pride do spremembe v njenem lastnem genetskem zapisu. Te spremembe imenujemo mutacije in jih ločimo na

substitucije, delecije in insercije. Pridobivanje genskega materiala od zunaj je med bakterijami zelo pogosto in v večini primerov odgovorno za razvoj odpornosti. Obstajajo trije različni mehanizmi prenosa genov, konjugacija, kjer se genski material prenese ob neposrednem stiku dveh baterij, transdukcija, kjer genski material prinese v bakterijo bakteriofag ter transformacija, kjer bakterija vključi genski material iz svojega okolja (38,39).

Poznamo pet različnih mehanizmov odpornosti, ki so prikazani na Sliki 5. To so produkcija encimov za inaktivacijo antibiotika – 1, zmanjšanje prepustnosti celične membrane bakterije za antibiotik – 2, aktivno črpanje antibiotika iz bakterijske celice – 3, sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik – 4, ter sprememba strukture tarčnega mesta za antibiotik – 5 (39).

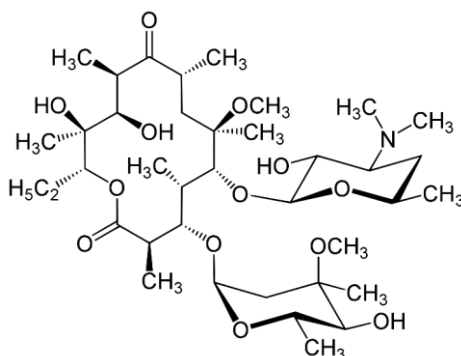


Slika 5: Mehanizmi odpornosti pri bakterijah.

1.9 MAKROLIDNI ANTIBIOTIKI

Makrolidni antibiotiki, ki so ime dobili po značilnem 14-, 15- ali 16-členskem laktonskem obroču, so bili odkriti leta 1952. Prvi znani predstavnik je bil eritromicin, danes so poznani še številni drugi polysintetski analogi s širšim spektrom delovanja (azitromicin, klaritromicin (Slika 6), diritromicin, roksitromicin, telitromicin), ki imajo boljšo farmakokinetiko in farmakodinamiko ter omogočajo manj pogosto odmerjanje. Makrolidi veljajo za ene izmed varnejših antibiotikov v splošni uporabi. Delovanje makrolidov je bakteriostatično in temelji na zaviranju sinteze bakterijskih beljakovin. Molekule antibiotika se vežejo na 23S podenoto

ribosomske RNA, ki je del 50S podenote ribosoma, in s tem preprečujejo podaljševanje peptidne verige (31,40).



Slika 6: Kemijska struktura klaritromicina ³⁶.

1.9.1 MEHANIZMI ODPORNOSTI PRI MAKROLIDIH

Pri makrolidih srečamo več različnih mehanizmov pridobljene odpornosti. Ta je v največji meri posledica prisotnosti encimov rRNA metilaz, ki jih imajo nekatere bakterije. Ti encimi so odgovorni za pripenjanje metilnih skupin na specifične adeninske konce bakterijske 23S podenote rRNA, kar nekoliko zmanjša njeno učinkovitost pri sintezi proteinov, obenem pa rRNA zaradi spremenjene oblike postane slabša tarča delovanja makrolidov. Drugi znan mehanizem odpornosti predstavljajo izlivne črpalke, ki so lahko prisotne na bakterijski membrani, in aktivno črpajo molekule antibiotika iz celice. To ohranja nizke znotrajcelične koncentracije zdravilne učinkovine, kar omogoča skoraj nemoteno delovanje ribosomov. Pogost mehanizem odpornosti predstavlja tudi encimska sprememba molekul antibiotika v neaktivno obliko. V povezavi z makrolidi je trenutno poznanih 18 inaktivacijskih encimov, ki so po načinu delovanja esteraze, liaze, transferaze in fosforilaze. Mutacije so tudi pogost vzrok odpornosti. Znane so mutacije na bakterijski 23S podenoti rRNA in sicer na mestih A2058 in A2059 (štetje komplementarno bakteriji *Escherichia coli*), ki povzročijo približno za 10000-krat slabšo vezavo makrolidov na tarčno mesto in privedejo do zmanjšane občutljivosti bakterije za antibiotik (31,40).

1.9.2 MAKROLIDNA ODPORNOST PRI HP

Med makrolidi se za zdravljenje okužbe s HP najpogosteje uporablja klaritromicin. EUCAST na podlagi minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) opredeljuje HP na klaritromicin občutljivo pri $MIK \leq 0,25$ mg/L oz. odporno pri $MIK > 0,5$ mg/L (41).

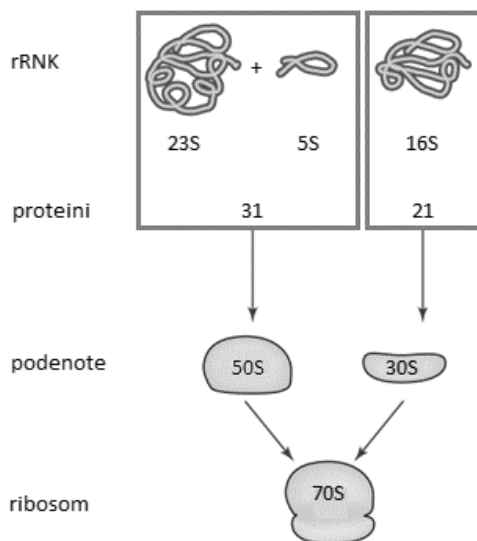
Najbolj raziskan mehanizem odpornosti HP na klaritromicin so mutacije domene V 23S rRNA, ki zmanjšajo afiniteto vezave antibiotika na ribosom. Prvi odkriti mutaciji sta bili substituciji adenina (A) v gvanin (G) na mestih 2142 in 2143 (komplementarni mestom 2058 in 2059 *E. coli*), kasneje so bile odkrite še številne druge mutacije (A2142C, T2182C, A2144G, A2116G, A2144T, A2115G, G2111A, C2147G, G1939A, T1942C). V splošnem literatura navaja, da se pri na klaritromicin odpornih sevih HP v večini srečamo z mutacijami A2142C, A2142G in A2143G, ki so tudi dokazano povezane z odpornostjo, medtem ko tega za ostale mutacije še ne moremo dokončno trditi. Mutacija A2142G v primerjavi z drugimi korelira z višjimi MIK-i za klaritromicin (MIK > 64 mg/L). Raziskave omenjajo tudi nekatere mutacije izven domene V 23S rRNA, ki se pojavljajo pri HP (T2717C, T2289C, G2224T, C2245T), vendar njihova vloga pri razvoju odpornosti ostaja še nejasna (42,43).

Pri sekvenciranju bakterijskega genoma HP so odkrili, da ta vsebuje dve kopiji gena 23S rRNA. Mutacije se večinoma pojavijo na obeh kopijah gena – homozigotne mutacije, redkeje na eni kopiji gena – heterozigotne mutacije (40). Pokazali so, da je mutacija ene kopije gena dovolj, da se izrazi odpornost na klaritromicin (44).

Novejši izsledki navajajo še nekatere druge mehanizme odpornosti na klaritromicin pri HP. To so spremembe v genih hp1048 (*infB*) in hp1314 (*rpl22*), prisotnost membranskih izlivnih črpalk ter vloga membranskih proteinov OMP. Včasih je vzrok odpornosti na klaritromicin tudi t. i. navzkrižna odpornost makrolidov, ki se lahko pojavi pri uporabi katerihkoli antibiotikov makrolidnega tipa za zdravljenje okužb v preteklosti pacienta (42).

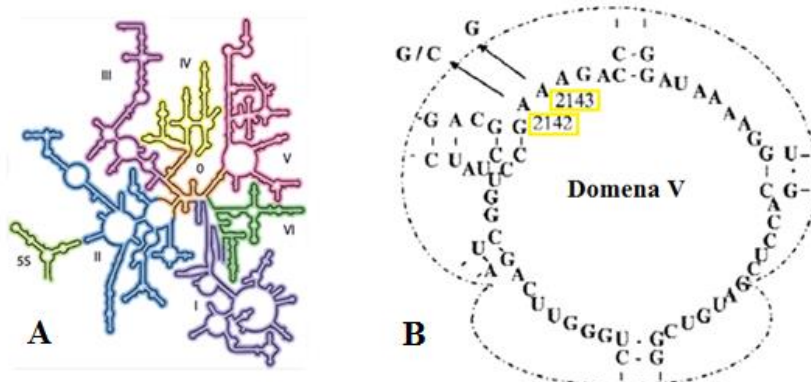
1.9.3 23S rRNA

Ribosom je kompleksen makromolekulski organel, ki ga sestavljajo proteini ter RNA. Njegova naloga je prevajanje genskega zapisa z mRNA v nastajajočo polipeptidno verigo in prav zaradi svoje pomembne vloge za organizem je odlična tarča za številne protimikrobne učinkovine. Bakterijski ribosom sestoji iz dveh podenot, manjše 30S ter večje 50S podenote. 30S podenota je zgrajena iz 16S rRNA ter 21 ribosomskih proteinov, 50S podenota pa iz 5S in 23S rRNA ter 31 ribosomskih proteinov (Slika 7) (40).



Slika 7: Zgradba bakterijskega ribosoma. Prirejeno po (39).

23S ribosomska RNA sestavlja 7 domen, ki jih označujemo z rimskimi številkami 0, I, II, III, IV, V in VI. Mutacije, ki so dokazano odgovorne za makrolidno odpornost, najdemo na domeni V rRNA, na mestih 2142 in 2143 (Slika 8) (31).



Slika 8: (A) Sekundarna struktura 23S in 5S rRNA pri *Escherichia coli*. Dostopno na (45). (B) Mesta mutacij na domeni V 23S rRNA pri *Helicobacter pylori*. Prirejeno po (26).

1.10 POVEZAVA MUTACIJ Z ODPORNOSTJO

Pri na antibiotike odpornih bakterijskih sevih lahko najdemo več mutacij, ki pa niso vse nujno vzrok odpornosti. Za dokaz povezave med mutacijo in odpornostjo se poslužujemo metod genskega inženiringa. V ustreznih laboratorijskih pogojih občutljive seve brez mutacij, t. i. divje tipe (*angl.* wild types), pripravimo do transformacije. Bakterijam dodamo

odsek nukleotidnega zaporedja s preučevano mutacijo, ki ga vključijo v svoj genski zapis. V kolikor se nato bakterija iz prej občutljive spremeni v odporno, s tem dokažemo, da je za odpornost odgovorna prav preučevana mutacija (39,46).

1.11 TESTIRANJE ODPORNOSTI

Določanje občutljivosti bakterij za protimikrobne učinkovine nam pomaga pri izbiri ustreznega zdravljenja – usmerjeno zdravljenje. Pri tem se poslužujemo bodisi fenotipskih bodisi genotipskih metod.

1.11.1 FENOTIPSKE METODE

Osnova fenotipskih metod je določanje minimalne inhibitorne koncentracije, najnižje koncentracije protimikrobnega sredstva, ki še zavira rast preiskovanega mikroorganizma. Glede na MIK vrednosti mikroorganizem opredelimo kot občutljiv (S; *angl.* susceptible), delno odporen (I; *angl.* intermediate) ali odporen (R; *angl.* resistant) (41). Fenotipske metode delimo na difuzijske in dilucijske. Pri difuzijskih metodah učinkovina potuje skozi trden medij predhodno inokuliran z mikroorganizmom in ustvarja gradient, ki pada z razdaljo. Pri odčitavanju nas zanima mejna koncentracija, od katere mikroorganizem ne raste več. Za nanos učinkovine uporabljamo papirnate diske impregnirane z antibiotiki ter Eteste, katerih posebnost je gradientna impregniranost s številčnimi vrednostmi koncentracij, ki omogoča lažjo kvantifikacijo MIK. Pri dilucijskih metodah se pripravijo tekoči ali trdni mediji z naraščajočimi koncentracijami protimikrobne učinkovine, katerim se nato doda standardna suspenzija mikroorganizmov. MIK se določi iz gojišča z najnižjo koncentracijo učinkovine, kjer mikroorganizmi niso porasli (47).

1.11.2 GENOTIPSKE METODE

V primerih, ko je poznana povezava med fenotipsko in genotipsko odpornostjo, se lahko pri testiranju občutljivosti za protimikrobne učinkovine poslužujemo molekularnih metod. Za določanje makrolidne odpornosti pri HP pride najprej v poštev pomnožitev izbranega nukleotidnega zaporedja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR; *angl.* polymerase chain reaction), nato pa uporaba sekvenciranja, pirosekvenciranja, določanja polimorfizma dolžin pomnoženih fragmentov (RFLP; *angl.* restricted fragment length polymorphism), spremljanje produkta v realnem času in druge ustrezne metode (26).

2 NAMEN DELA

Mutacije na 23S podenoti ribosomske RNA so glavni mehanizem odpornosti HP na klaritromicin. Iz literature vemo, da so z višjimi MIK klaritromicina najpogosteje povezane mutacije A2142G, A2142C in A2143G. Njihova razširjenost v svetu se precej razlikuje, za področje Slovenije pa podatkov še nimamo na voljo. Za testiranje občutljivosti HP za klaritromicin večinoma uporabljamo fenotipske metode, ki so zamudne in lahko trajajo tudi več dni. Z uporabo molekularnih metod bi lahko ta postopek lahko bistveno skrajšali. Namen magistrske naloge je:

2.1 Opredeliti razširjenost mutacij 23S podenote rRNA, ki so dokazano ali potencialno odgovorne za odpornost HP na klaritromicin v Sloveniji.

Naključnemu naboru izolatov HP osamljenih v Sloveniji in z različno stopnjo odpornosti na klaritromicin – različnimi MIK klaritromicina, bomo sekvencirali odsek 23S rRNA in ga primerjali z referenčnim odsekom bakterijskega seva HP, ki je občutljiv za klaritromicin.

2.2 Najti morebitne korelacije med posameznimi mutacijami in stopnjo odpornosti (MIK) na klaritromicin.

Najdene mutacije bomo primerjali s predhodno določenimi MIK klaritromicina.

2.3 Opredeliti zanesljivost uporabe genotipskih metod za ugotavljanje odpornosti HP na klaritromicin v primerjavi s fenotipskimi metodami.

Pri tem bomo preverili, ali se pri vseh na podlagi MIK določenih odpornih sevih HP pojavljajo mutacije na 23S rRNA, ki jih lahko odkrijemo z obstoječimi diagnostičnimi testi, in ali se iste mutacije pojavljajo le pri odpornih sevih.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RUTINSKO DELO S HP

Pri sumu na okužbo s HP preiskovancem v ustreznih zdravstvenih ustanovah z biopsijo odvzamejo vsaj 1 košček tkiva antruma oziroma boljše 2 koščka antruma in 2 koščka korpusa želodca. Tkiva v transportnem gojišču Portagerm pylori (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija) pošljejo na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (MF UL). Transport traja največ 2–4 dni pri sobni temperaturi ali v hladilniku pri 4 °C. Tkiva najprej homogeniziramo v 1 mL fosfatnega pufra PBS. Po 0,5 mL homogenata naneseemo na vsakega izmed treh različnih selektivnih gojišč, PYL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francija), HHP ter HHP + A (Preglednica I), preostanek pa shranimo v kriovialah na -70 °C. Bakteriološka gojišča inkubiramo v mikroaerofilnih pogojih (6 % O₂, 7,2 % CO₂, 3,6 % H₂, 83,3 % N₂) pri 37 °C in jih pregledujemo za prisotnost rasti tipičnih kolonij na 2–3 dni, skupaj do 14 dni. Porasle kolonije identificiramo morfološko, s pregledom mikroskopskega preparata obarvanega po Gramu ter z uporabo biokemičnih testov ureaze, oksidaze in katalaze. Osamljenim bakterijam na gojišču ISO določimo občutljivost za antibiotike amoksicilin, klaritromicin, metronidazol, tertaciklin, levofloksacin in rifampicin. Za določanje občutljivosti za metronidazol dodatno uporabimo agar dilucijsko metodo s koncentracijo metronidazola v gojišču 8 mg/L. Pri vseh se za nacepljanje uporablja vatirana palčka namočena v inokulum z vrednostjo približno 3 McF. Nacepljena gojišča inkubiramo v mikroaerofilnih pogojih 3 dni in odčitamo rezultat. Občutljivost bakterijskega izolata izrazimo z MIK (mg/L) in jo pretvorimo v kategorijo občutljiv (S), intermediaren (I) ali odporen (R) na podlagi EUCAST standarda.

Preglednica I: Bakteriološka gojišča, ki jih uporabljamo za osamitev bakterije *Helicobacter pylori* iz vzorcev biopsije želodčne sluznice, in njihova sestava.

GOJIŠČE	SESTAVA (za približno 60 plošč)
<p>HHP (HP agar s humano krvjo)</p>	<p>Bacto agar (Becton Dickson, ZDA) 18 g Natrijev klorid (Merck, Nemčija) 5 g Pepton iz caseina (Merck, Nemčija) 10 g Glukoza (Merck, Nemčija) 2 g Kvasni ekstrakt (Becton Dickson, ZDA) 5 g Mesni ekstrakt (Merck, Nemčija) 2 g KOH (9,09 %) 7 mL Hemin raztopina (0,05 %) 10 mL L-Cystein raztopina (3 %) 10 mL Vitamin K1 raztopina (0,1 %) 1 mL Destilirana voda 900 mL Humani eritrociti – koncentrat (ZTK, Ljubljana) 100 mL Konjski serum (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA) 100 mL</p>
<p>HHP + A (HP agar s humano krvjo in antibiotiki)</p>	<p>Bacto agar (Becton Dickson, ZDA) 18 g Natrijev klorid (Merck, Nemčija) 5 g Pepton iz caseina (Merck, Nemčija) 10 g Glukoza (Merck, Nemčija) 2 g Kvasni ekstrakt (Becton Dickson, ZDA) 5 g Mesni ekstrakt (Merck, Nemčija) 2 g KOH (9,09 %) 7 mL Hemin raztopina (0,05 %) 10 mL L-Cystein raztopina (3 %) 10 mL Vitamin K1 raztopina (0,1 %) 1 mL Destilirana voda 900 mL Humani eritrociti – koncentrat (ZTK, Ljubljana) 100 mL Konjski serum (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA) 100 mL Vankomicin (10 mg/mL) 1 mL Nistatin (1 mg/mL) 1 mL Trimetoprim (5 mg/mL) 1 mL</p>
<p>ISO (ISO Sensitest s konjsko krvjo)</p>	<p>ISO-sensitest agar (Oxford CM, Velika Britanija) 31,4 g Destilirana voda 1000 mL Defibrinirana konjska kri 100 mL</p>
<p>ISO + M (ISO Sensitest s konjsko krvjo in metronidazolom)</p>	<p>ISO-sensitest agar (Oxford CM, Velika Britanija) 31,4 g Destilirana voda 1000 mL Defibrinirana konjska kri 100 mL Metronidazol (8 mg/mL) 1 mL</p>

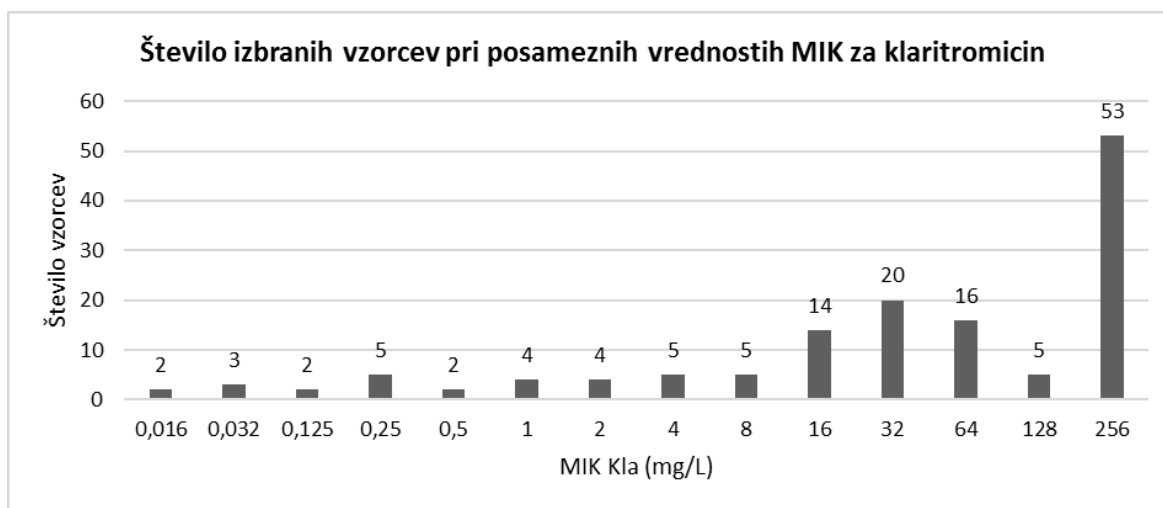
3.2 IZBIRA VZORCEV

3.2.1 Material in oprema

- program za randomizacijo (48).

3.2.2 Potek dela

V sklopu magistrske naloge smo za delo uporabili na HP pozitivne vzorce homogeniziranega tkiva želodčne sluznice, ki jih globoko zamrznjene pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hranijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo MF UL, v Laboratoriju za diagnostiko aerobnih in anaerobnih infekcij. Homogenat je bil shranjen znotraj rutinskega postopka ugotavljanja okužbe s HP. Med 2422 vzorci, katerih tkivo je bilo preiskovancem odvzeto med leti 2009 in 2016 in poslano na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, smo jih naključno izbrali 140 z dvema pogojema. Prvi pogoj je bil, da 14 vzorcev vsebuje na klaritromicin občutljive in zmerno občutljive seve HP ($\text{MIK} < 1$). Drugi pogoj pa, da ostalih 126 vzorcev vsebuje na klaritromicin odporne seve HP ($\text{MIK} \geq 1$) v celotnem obsegu vrednosti MIK klaritromicina, posamezna vrednost MIK pa predstavlja vsaj 4 izolate (Slika 9). Po končanem izboru smo preverili, da je naš nabor vzorcev reprezentativen, tako da smo primerjali porazdelitev deleža vzorcev po vrednostih MIK pred in po izboru.



Slika 9: Prikaz števila izbranih vzorcev pri posameznih vrednostih MIK za klaritromicin.

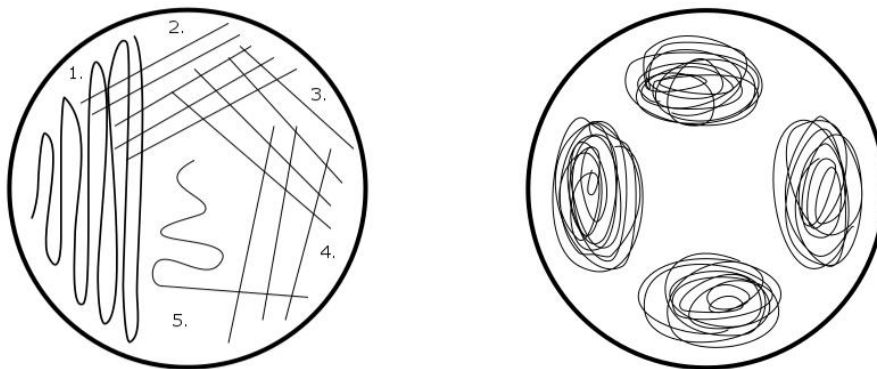
3.3 ODMRZOVANJE IN KULTIVACIJA

3.3.1 Material in oprema

- gojišča HHP (Preglednica I),
- destilirana voda,
- sterilne cepilne zanke iz polistirena, velikosti 1 μL in 10 μL (Starstedt, Nemčija),
- sterilne petrijevke iz polistirena,
- staničevina,
- sistem za generiranje mikroaerofilne atmosfere s pripadajočimi posodami (Anoxomat, Advanced Instruments, Inc., ZDA),
- inkubator 37 °C.

3.3.2 Potek dela

Zamrznjene vzorce smo odmrznili v petih serijah (28, 20, 33, 30, 29 vzorcev). Na gojišče HHP ogreto na sobno temperaturo smo s cepilno zanko nanesti 10–20 μL vzorca in ga z novo zanko razmazali po površini gojišča kot prikazuje Slika 10 levo. Gojišče smo pokrili z ustreznim pokrovom in ga skupaj z ostalimi zaprli v posodo z mikroaerofilnimi pogoji ustvarjenimi z Anoxomatom ter ustrezno vlažnostjo, ki smo jo dosegli z dodatkom petrijevke, v kateri je bil z vodo prepojen košček staničevine. Po 3 dneh inkubacije pri 37 °C smo posode odprli ter preverili rast kolonij HP. Poraslim kolonijam smo morfološko preverili identiteto in jih precepili na novo gojišče HHP kot je prikazano na Sliki 10 desno. V primerih, kjer rasti iskanih kolonij ni bilo opaziti, smo inkubacijo pod enakimi pogoji podaljšali še za naslednje 3 dni ter nato ponovno preverili rast. Precepljene kolonije smo inkubirali pod enakimi pogoji kot pred tem dodatne 3 dni.



Slika 10: Levo: razmaz homogeniziranega tkiva želodčne sluznice; Desno: razmaz precepljenih kolonij bakterije *Helicobacter pylori*.

3.4 IDENTIFIKACIJA

3.4.1 Material in oprema

- test za določanje oksidaze (BBL DrySlide Oxidase, Becton Dickson, ZDA),
- 3 % raztopina H₂O₂,
- epruvete napolnjene z medijem s sečnino in indikatorjem fenol rdečim (49),
- predmetna stekelca,
- sterilne cepilne zanke iz polistirena, velikosti 1 µL (Starstedt, Nemčija),
- hladilnik 4 °C.

3.4.2 Potek dela

Po koncu inkubacije smo posode odprli, preverili rast na gojiščih ter identificirali kolonije HP morfološko ter s pomočjo testov za dokaz prisotnosti ureaze, oksidaze in katalaze. Vsa gojišča z identificiranimi kolonijami HP smo shranili v hladilnik pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.4.2.1 Dokaz oksidaze

Prisotnost oksidaze smo dokazali z uporabo komercialno dostopnega oksidaznega testa. S cepilno zanko smo zajeli osamljeno bakterijsko kolonijo in jo podrgnili ob podlago, ki se je ob prisotnosti oksidaze obarvala indigo modro.

3.4.2.2 Dokaz katalaze

Na predmetno stekelce smo kanili kapljico raztopine H₂O₂. S cepilno zanko smo zajeli osamljeno bakterijsko kolonijo ter jo potopili v kapljico. V primeru prisotne katalaze so takoj začeli izhajati mehurčki.

3.4.2.3 Dokaz ureaze

S cepilno zanko smo zajeli osamljeno bakterijsko kolonijo ter jo podrgnili ob pripravljen medij s sečnino in dodatkom indikatorja fenol rdeče. V primeru prisotne ureaze se je medij po nekaj minutah obarval rožnato.

3.5 IZOLACIJA DNA

3.5.1 Material in oprema

- reagent InstaGene Matrix (Bio-Rad, ZDA),
- voda brez nukleaz (Nuclease free water, Qiagen, Nemčija),
- sterilne epice iz polipropilena, velikosti 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija),
- sterilne cepilne zanke iz polistirena, velikosti 1 μ L (Starstedt, Nemčija),
- pipeti, velikosti 10–100 μ L in 100–1000 μ L (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete, velikosti 100 μ L, 1000 μ L (Neptune Scientific, ZDA),
- vibracijski mešalnik (Vibromix 10, Tehnica, Domel, Slovenija),
- centrifugirka (MiniSpin, Eppendorf, Nemčija),
- termostresalnik (Thermomixer, Eppendorf, Nemčija),
- hladilnik 4 °C.

3.5.2 Potek dela

V epico smo odpipetirali 100 μ L vode brez nukleaz. S cepilno zanko smo zajeli za približno 1 μ L bakterijskih kolonij HP z gojišča ter jih prenesli v vodo. Enako smo ponovili z ostalimi vzorci. Epice smo nato centrifugirali 3 minute pri 13400 obratih na minuto, da so se bakterije posedle. Supernatant smo odpipetirali in zavrgli. K usedlini smo dodali 100 μ L reagenta InstaGene Matrix in premešali na vibracijskem mešalniku na visoki hitrosti približno 5 sekund. Epice smo zatem postavili v termoblok in jih ob stresanju inkubirali najprej 20 minut pri 56 °C, nato pa še 10 minut pri 96 °C. Sledilo je centrifugiranje 3 minute pri 13400 obratih na minuto, da se je DNA ločila od ostalih komponent. 80 μ L supernatanta, v katerem se je zbrala DNA, smo prenesli v novo epico in jo v škatli skupaj z ostalimi shranili v hladilniku pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

3.6.1 Material in oprema

- voda brez nukleaz (Nuclease free water, Qiagen, Nemčija),
- reakcijska mešanica za PCR (HotStarTaq Plus Master Mix, Qiagen, Nemčija), ki vsebuje DNA polimerazo, dNTP-je ter PCR pufer z $MgCl_2$,
- oligonukleotidni začetnik HP_23S_846_F: CCTCCCgACTgTTTACCAA, koncentracije 50 μM (TIB Molbiol, Nemčija),
- oligonukleotidni začetnik HP_23S_2920_R: CgCTCACACATCTACCCT, koncentracije 50 μM (TIB Molbiol, Nemčija),
- vzorci izolirane DNA HP,
- kontrolni vzorec DNA HP,
- sterilne epice iz polipropilena, velikosti 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija),
- pipeti, velikosti 1–10 μL in 10–100 μL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete, velikosti 10 μL , 100 μL (Neptune Scientific, ZDA),
- mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami (4titude, Velika Britanija),
- samolepilna folija za pokrivanje mikrotitrne plošče,
- komora z laminarnim pretokom zraka (SMBC 122, Iskra PIO, Slovenija),
- vibracijski mešalnik (Vibromix 10, Tehnica, Domel, Slovenija),
- ciklični termostat (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, ZDA).

3.6.2 Potek dela

S PCR smo želeli pomnožiti specifičen, 1024 bp dolg odsek nukleotidnega zaporedja na 23S podenoti rRNA HP. Na tem odseku se, glede na izsledke predhodnih raziskav, nahajajo bistvene mutacije, ki so odgovorne za odpornost bakterije na klaritromicin. Priprava vzorcev in sama izvedba PCR sta potekali v ločenih prostorih, da smo čimbolj zmanjšali možnost kontaminacije. Vse večkomponentne reagente smo pred uporabo stresali za nekaj sekund na vibracijskem mešalniku, da smo dosegli homogenost. V najčistejšem prostoru smo v epici pripravili reakcijsko mešanico za več vzorcev hkrati in dodali za en vzorec presežka reagentov zaradi morebitnih izgub. Sestava reakcijske mešanice je podana v Preglednici II.

Preglednica II: Sestava reakcijske mešanice za PCR.

REAGENT	VOLUMEN REAGENTA ZA POSAMEZEN VZOREC (μL)
Voda brez nukleaz	10,0
Reakcijska mešanica za PCR	12,5
Oligonukleotidni začetnik HP_23S_846_F: CCTCCCgACTgTTTACCAA	0,25
Oligonukleotidni začetnik HP_23S_2920_R: CgCTCACACATCTACCCT	0,25
Vzorec izolirane DNA	2,0
SKUPAJ	25,0

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo stresali na vibracijskem mešalniku nekaj sekund in jo nato razpipetirali v vdolbinice mikrotitrne plošče, po 23 μL v vsako. V naslednjem, manj čistem prostoru, smo v vsako vdolbinico dodali po 2 μL drugega vzorca izolirane DNA. Vedno smo dodali še pozitivno in negativno kontrolo. Po končanem pipetiranju smo mikrotitrsko ploščo pokrili s plastično folijo, jo nekajkrat stresli, dali v ciklični termostat ter nastavili program za PCR, ki je naveden v Preglednici III.

Preglednica III: Program za PCR.

STOPNJA	T ($^{\circ}\text{C}$)	ČAS	ŠTEVILO CIKLOV
Začetna aktivacija	95	5 min	1
Denaturacija	94	30 s	25
Prileganje	58	30 s	
Podaljševanje	72	1 min	
Končno podaljševanje	72	5 min	1
Ohlajanje	10	Poljubno dolgo	1

3.7 OCENA PODVOJENE DNA

Po poteku PCR smo s pomočjo gelske elektroforeze preverili, ali se je DNA uspešno namnožila.

3.7.1 Priprava agaroznega gela

3.7.1.1 Material in oprema

- Agarosa (Agarose for routine use, Sigma-Aldrich, ZDA),
- 1X pufer TAE (Tris, acetat, EDTA),
- barvilo SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- pipeta, velikosti 1–10 μL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipeto, velikosti 10 μL (Neptune Scientific, ZDA),
- kovinska žlička,
- merilni valj,
- steklena erlenmajerica s pokrovom,
- model za gel s pripadajočimi glavnički,
- precizna tehtnica,
- mikrovalovna pečica.

3.7.1.2 Potek dela

V erlenmajerico smo zatehtali 0,5 g agaroze, dodali 50 mL 1X pufera TAE, rahlo pomešali in pokrito segrevali v mikrovalovni pečici približno 3 minute, oziroma dokler se vsa agarosa ni raztopila. Raztopini smo dodali 5 μL barvila SYBR Safe DNA Gel Stain, jo premešali in jo vlili v model za gel s pripadajočimi glavnički. Po približno 30 minutah, ko se je gel strdil, smo odstranili glavničke in gel je bil pripravljen za uporabo.

3.7.2 Gelska elektroforeza

3.7.2.1 Material in oprema

- 1X pufer TAE (Tris, acetat, EDTA),
- raztopina nanašalnega reagenta ter barvil (CoralLoad Concentrate, Qiagen, Nemčija),
- pipeti, velikosti 10–100 μL in 100–1000 μL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete, velikosti 10 μL , 100 μL (Neptune Scientific, ZDA),

- parafilm,
- kadička za elektroforezo s pokrovom,
- elektroforezni sistem (Amersham pharmacia biotech, Velika Britanija).

3.7.2.2 Potek dela

Gel smo postavili v kadičko za elektroforezo napolnjeno s pufrom TAE. Na parafilm smo nanесли kapljico raztopine CoralLoad Concentrate z volumnom 3 μL , ji dodali 10 μL produkta PCR in vse skupaj dobro premešali s pipeto. Mešanico smo nato nanесли v odprtino v gelu. Enako smo ponovili še za ostale produkte. Kadičko smo pokrili ter izvedli elektroforezo pri napetosti 150 V 20 minut.

3.7.3 Odčitavanje rezultatov z gela

3.7.3.1 Material in oprema

- UV-transluminator (Bio-Rad, ZDA),
- Fotodokumentacijski sistem (Gel Doc XR, Bio-Rad, ZDA).

3.7.3.2 Potek dela

Gel smo vzeli iz kadičke, ga položili v transluminator ter opazovali pod UV svetlobo. S pomočjo fotodokumentacijskega sistema smo dobili sliko gela z lisami, ki so prikazovale potovanje PCR produktov. Lise smo primerjali s pozitivno kontrolo in tako določili, na kateri razdalji se nahaja naš produkt. V kolikor se lisa za določen vzorec na ustrezni razdalji ni pojavila, je to pomenilo, da se iskani odsek nukleotidnega zaporedja ni pomnožil. V teh primerih smo PCR ponovili, tako da smo dodatek vzorca izolirane DNA razredčili 10-krat. S tem smo pri nekaterih neuspelih poskusih rešili problem inhibicije PCR zaradi previsoke koncentracije izolirane DNA v vzorcu.

3.8 SEKVENCIRANJE

S sekvenciranjem smo želeli prikazati nukleotidno zaporedje pomnoženih odsekov rRNA.

3.8.1 Čiščenje produkta PCR

3.8.1.1 Material in oprema

- mešanica 2 hidrolitičnih encimov (ExoSAP-IT, Affymetrix, ZDA),
- pipeta, velikosti 1–10 μL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete, velikosti 10 μL (Neptune Scientific, ZDA),
- mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami (4titude, VB),
- samolepilna folija za pokrivanje mikrotitrne plošče,
- ciklični termostat (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, ZDA).

3.8.1.2 Potek dela

Produkte PCR, ki so se ustrezno namnožili, smo v dvojniku odpipetirali v vdolbinice mikrotitrne plošče, po 5 μL v vsako. Dodali smo po 1,5 μL mešanice hidrolitičnih encimov ExoSAP-IT, ki produkt očisti odvečnih reagentov. Mikrotitrsko ploščo smo pokrili s folijo ter postavili v ciklični termostat s programom za čiščenje, ki je naveden v Preglednici IV.

Preglednica IV: Program za čiščenje PCR produkta.

STOPNJA	T (°C)	ČAS	ŠTEVILO CIKLOV
Aktivacija encimov	37	15 min	1
Inaktivacija encimov	85	15 min	1
Ohlajanje	10	Poljubno dolgo	1

3.8.2 Sekvenčna reakcija

3.8.2.1 Material in oprema:

- voda brez nukleaz (Nuclease free water, Qiagen, Nemčija),
- sekvenčni pufer (BigDye Terminator v3.1 5 X Sequencing Buffer, Applied Biosystems, ZDA),
- sekvenčni terminator (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100, Applied Biosystems, ZDA),

- oligonukleotidni začetnik HP_23S_846_F:CCTCCCgACTgTTTACCAA, koncentracije 50 μ M (TIB Molbiol, Nemčija),
- oligonukleotidni začetnik HP_23S_2920_R: CgCTCACACATCTACCCT, koncentracije 50 μ M (TIB Molbiol, Nemčija),
- pipeta, velikosti 10–100 μ L (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete, velikosti 100 μ L (Neptune Scientific, ZDA),
- sterilne epice iz polipropilena, velikosti 1,5 mL (Eppendorf, Nemčija),
- samolepilna folija za pokrivanje mikrotitrne plošče,
- ciklični termostat (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, ZDA),
- vibracijski mešalnik (Vibromix 10, Tehnica, Domel, Slovenija).

3.8.2.2 Potek dela

V epicah smo pripravili dve reakcijski mešanici za več vzorcev hkrati, dodali smo za 1 vzorec presežka reagentov. Sestava je prikazana v Preglednici V. Vsaka izmed reakcijskih mešanic je vsebovala drugi oligonukleotidni začetnik.

Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice za sekvenčno reakcijo.

REAGENT	VOLUMEN REAGENTA ZA POSAMEZEN VZOREC (μ L)
Voda brez nukleaz	8,7
Sekvenčni pufer	3,0
Sekvenčni terminator	2,0
Oligonukleotidni začetnik	1,3
SKUPAJ	15,0

V vdolbinice mikrotirske plošče z vzorci po čiščenju smo odpipetirali po 15 μ L na vibracijskem mešalniku pretresene reakcijske mešanice, tako da je vsak izmed vzorcev v dvojniku prejel mešanico z drugim oligonukleotidnim začetnikom. Ploščo smo pokrili s folijo in dali v ciklični termostat s programom za sekvenčno reakcijo, ki je naveden v Preglednici VI.

Preglednica VI: Program za sekvenčno reakcijo.

STOPNJA	T (°C)	ČAS	ŠTEVILO CIKLOV
Inkubacija	96	1 min	1
Denaturacija	96	10 s	25
Prileganje	50	5 s	
Podaljševanje	60	4 min	
Ohlajanje	10	Poljubno dolgo	1

3.8.3 Čiščenje produkta sekvenčne reakcije

3.8.3.1 Materiali in oprema

- komplet BigDye X Terminator Purification Kit, ki vsebuje SAM solution in XTerminator solution (Applied Biosystems, ZDA),
- pipeta, velikosti 10–100 μL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete, velikosti 100 μL (Neptune Scientific, ZDA),
- centrifuga (Centrifuge 5430, Eppendorf, Nemčija),
- vibracijski mešalnik (MixMate, Eppendorf, Nemčija).

3.8.3.2 Potek dela

Po končani sekvenčni reakciji je sledilo čiščenje produkta. V vdolbinice mikrotitrne plošče z vzorci smo odpipetirali po 90 μL raztopine SAM solution in 20 μL raztopine XTerminator solution. Raztopina XTerminator odstrani odvečne obarvane terminalne dNTP-je in proste soli, raztopina SAM pa izboljša delovanje reagenta XTerminator in stabilizira produkt po čiščenju. Ploščo smo pokrili s folijo ter stresali na vibracijskem mešalniku 30 min s hitrostjo 2000 obratov na minuto. Po končanem stresanju smo ploščo centrifugirali 2 minuti pri 1000 obratih na minuto.

3.8.4 Sekvenciranje

3.8.4.1 Material in oprema

- sekvenator (Genetic Analyzer 3500, Applied Biosystems, ZDA).

3.8.4.2 Potek dela

S plošče smo po čiščenju odstranili folijo, jo postavili v sekvenator in uporabili program StdSeq_BDX_50_POP7. Avtomatski sistem je izvedel kapilarno elektroforezo in sekvenciranje s fluorescenco, ki temelji na principu metode po Sangerju.

3.9 ANALIZA SEKVENC

3.9.1 Material in oprema:

- program CLC Main Workbench 7.7.1 (CLC Bio, Qiagen, Danska).

3.9.2 Potek dela

Pridobljene sekvence nukleotidnega zaporedja 23S rRNA za posamezen vzorec smo združili in analizirali v programu CLC Main Workbench 7.7.1. Primerjali smo jih z nukleotidnim zaporedjem referenčnega seva ATCC 26695, ki je dostopen v bazi NCBI pod šifro NC_000915.1 (50) in predstavlja divji tip HP. Vse razlike smo si zabeležili in v nadaljevanju ocenili, ali gre za razvoj odpornosti na klaritromicin pomembno mutacijo ali ne, ter skušali najti korelacijo z minimalno inhibitorno koncentracijo za klaritromicin. Pri tem so nam bili v pomoč že objavljeni članki, ki so navajali najdene mutacije, in še druge dostopne sekvence nukleotidnega zaporedja divjih tipov sevov HP. Za oštevilčenje mest nukleotidnega zaporedja smo uporabili štetje po Taylorju (51).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V sklopu magistrske naloge smo raziskali odpornost bakterijskih sevov HP na klaritromicin pri slovenskih pacientih. Naredili smo statistični pregled demografskih karakteristik pacientov in vzorcev vključenih v raziskavo, analizirali smo nukleotidna zaporedja posameznih sevov HP, poiskali mutacije ter jih ovrednotili kot potencialne za razvoj odpornosti. Obenem smo primerjali zanesljivost genotipskih metod za določanje občutljivosti na klaritromicin z uveljavljenimi fenotipskimi metodami.

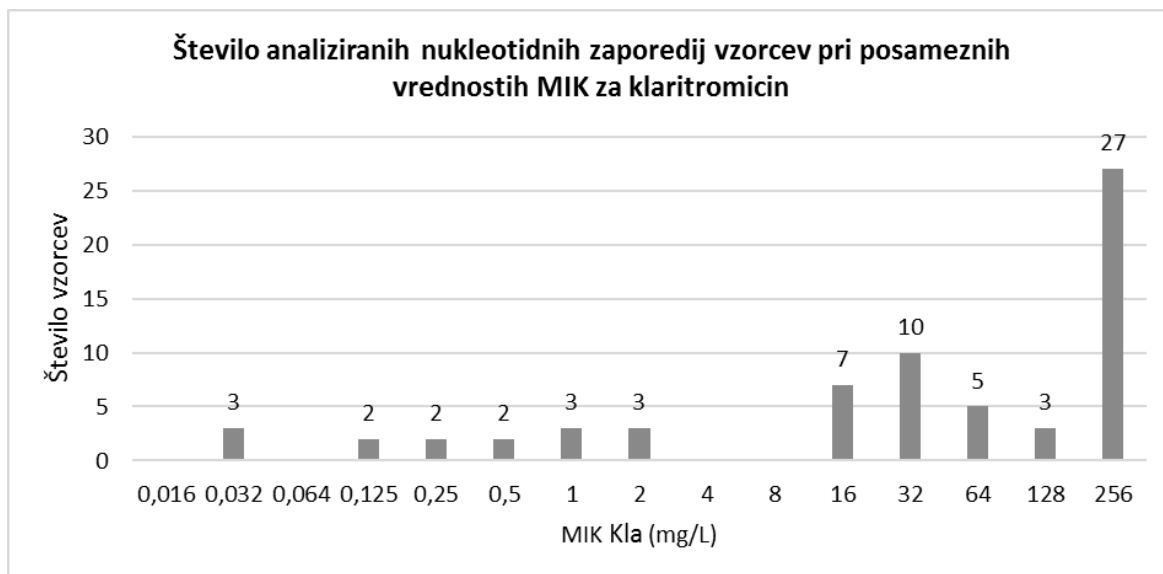
4.1 VZORCI

V raziskavo smo vključili vzorce 140 pacientov zdravljenih v slovenskih ustanovah, starih med 3 in 86 let. Njihove karakteristike so zbrane v Preglednici I. Največji delež okuženih predstavlja populacija pacientov od 41–70 let. Razlog za to je lahko večja verjetnost okužbe v preteklosti, kar je odraz nekoč slabših socialno ekonomskih razmer (18). Zanimivo je, da je kar 75 % vključenih pacientov ženskega spola. To si lahko razložimo kot posledico slabše uspešnosti predhodnih kombiniranih terapij proti HP, v katere je pogosto vključen tudi metronidazol, ki se veliko uporablja pri zdravljenju ginekoloških težav in je zato stopnja odpornosti pri ženskah višja (29). V prid trditvi, da predstavlja okužba s HP pri nas veliko težavo, govori dejstvo, da je kar 82 % vseh vključenih v raziskavo predhodno že prejelo terapijo za zdravljenje okužbe s HP, 14 % pacientov pa celo več kot trikrat. Visoke številke sekundarne odpornosti so po drugi strani lahko tudi posledica dejstva, da se testiranje občutljivosti na antibiotike izvaja pogosteje pri predhodno neuspešnih poskusih zdravljenja, zato imamo v naboru manj primerov primarne odpornosti in več sekundarne (28). Moramo se zavedati, da odpornost na klaritromicin ni vedno posledica neuspešnega zdravljenja okužbe s HP, ampak tudi ostalih infekcij (npr. respiratornih), pri katerih se uporabljajo antibiotiki makrolidnega tipa. Ta pojav imenujemo navzkrižna odpornost (42).

Preglednica VII: Porazdelitev števila pacientov po spolu, starostnih skupinah ter številu predhodno zdravljenih okužb s HP.

PARAMETER	ŠTEVILO PACIENTOV	DELEŽ PACIENTOV (%)
Spol		
M	35	25
Ž	105	75
Starostne skupine		
≤ 20 let	8	6
21-30 let	5	4
31-40 let	12	9
41-50 let	30	21
51-60 let	39	28
61-70 let	33	23
≥ 71 let	13	9
Število predhodnih zdravljenj za <i>Helicobacter pylori</i>		
0	12	9
1/2/3	96	68
> 3	20	14
Ni podatka	12	9

Iz 140 izbranih vzorcev smo pri 85 uspeli kultivirati kolonije HP in izolirati njihov DNA. Z verižno reakcijo s polimerazo smo uspešno pomnožili želen odsek nukleotidnega zaporedja pri 78 izolatih ter na koncu s sekvenciranjem uspeli pridobiti nukleotidna zaporedja 67 izolatov za nadaljnjo analizo. Nabor analiziranih vzorcev je v primerjavi z začetnim naborom ostal reprezentativen glede na vrednosti MIK za klaritromicin, pri čemer je 87 % vzorcev vsebovalo na klaritromicin odporne seve HP (Slika 11).



Slika 11: Prikaz števila analiziranih nukleotidnih zaporedij izolatov pri posameznih vrednostih MIK za klaritromicin.

4.2 ANALIZA NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA

Po analizi približno 1000 baznih parov dolgega nukleotidnega zaporedja izolatov med mestoma 1900 in 2900 in primerjavi z referenčnim sevom ATCC 26695 (v NCBI bazi NC_000915.1) smo za posamezen vzorec izpisali vse razlike v baznih parih. Rezultati so predstavljeni v Preglednici VIII. V prvih dveh stolpcih so številčno poimenovani vzorci s pripadajočimi minimalnimi inhibitornimi koncentracijami za klaritromicin. V prvi vrstici so navedene vse razlike, ki smo jih našli po primerjavi z referenčnim sevom nukleotidnega zaporedja HP. Navedeno je mesto razlike, prva črka predstavlja dušikovo bazo na referenčni, zadnja črka pa na analizirani sekvenci vzorca. Enice v tabeli pomenijo prisotnost navedene spremembe na določenem mestu, črka H pa, da je bila sprememba prisotna le na eni kopiji odseka 23S rRNA.

Preglednica VIII: Rezultati analize nukleotidnih zaporedij. V prvi vrstici so navedene vse razlike, ki smo jih našli po primerjavi z referenčnim sevom nukleotidnega zaporedja HP. Navedeno je mesto razlike, prva črka predstavlja dušikovo bazo na referenčni, zadnja črka pa na analizirani sekvenci vzorca. Enice v tabeli pomenijo prisotnost navedene spremembe na določenem mestu, črka H pa, da je bila sprememba prisotna le na eni kopiji odseka 23S rRNA.

N	MIK Kla (mg/L)	A2142G	A2143G	T2182C	G2864A	T2179C	A1904G	G1940A	A2089G	C2195T	C2288T	C2244T	T2264C	C2245T	C2288T	A2300G	C2305A	T2320C	C2561T	C2695A	C2760T	C2773T	C2858T
1	0,5																						1
7	2		1		1																		
8	1		1		1																		
10	0,031				1																		
11	1		1		1																		
12	256		1		1			1				1			1								
13	256	1			1																H		
14	64		1		1				1								1					1	
15	256	1		1	1																		
17	256	1			1																		
20	128		1																				
21	256		1											1									
24	2		1					1															
27	2		1		1																		
29	0,25		1		1																		
30	32		1	1												1							
31	0,031			1																			
35	16		1	1																			
39	0,125																						
42	256	1		1	1																		
43	1																				1		
44	256	1																					
45	64		1		1																		
47	256	1			1																		
48	32		1																				
49	128		1		1																	1	
51	32		1		1																		
53	256				1																		
56	256		1																				
59	32		1																				
61	256		1																				
65	16		1		1																		
66	0,25				1	H																	
67	256	1																					
68	32		1																				
69	256		1	1																			
71	256		1	1												1							
75	256	1			1									1									
77	64		1	1																			
80	16		1																				
82	16		1																				
83	32		1													1							
86	16		1																			1	
88	0,125																						
89	64		1		1					H													
95	256		1	1																			
99	64		1	1																			

N	MIK Kla (mg/L)	A2142G	A2143G	T2182C	G2864A	T2179C	A1904G	G1940A	A2089G	C2195T	C2288T	C2244T	T2264C	C2245T	C2288T	A2300G	C2305A	T2320C	C2561T	C2695A	C2760T	C2773T	C2858T	
100	256		1																					
101	256	1			1																			
103	256		1																					1
105	256	H	H																1					
106	256		1		1																			
108	16		1		1																			
112	32		1																					
119	256		1																					
121	256		1								1													
126	256	H																				1		
127	256		1																					
128	128		1	1									1											
129	32		1	1																				
131	32		1																					
133	0,5																							
134	256	1																						
136	256		1																					
137	16		1																					
138	32		1																					

Skupno smo ugotovili 22 različnih mutacij (A1904G, G1940A, A2089G, **A2142G**, **A2143G** T2179C, **T2182C**, C2195T, **C2288T**, C2244T, T2264C, C2245T, C2288T, A2300G, C2305A, T2320C, C2561T, C2695A, C2760T, C2773T, C2858T, G2864A). Pri 25 primerih analiziranih sekvenc smo našli po eno mutacijo, pri 39 več kot eno, pri 3 pa nobene. Izmed vseh smo štiri mutacije v odebeljenem tisku zasledili tudi v literaturi, ostalih omenjenih v literaturi (G1939A, T1942C, A2115G, T2117C, G2141A, A2142C, A2142G, A2143G A2144T, T2182C, G2223A, G2224T, C2245T, C2288T, T2289C T2711C, T2717C) pa mi nismo našli (42,43). Opazili smo, da je med izsledki objavljenih raziskav velika raznolikost opisanih mutacij. Najverjetneje je razlog to, da so bile pri raziskavah uporabljene različne metode za detekcijo mutacij, ki niso vedno pokrile celotnega odseka nukleotidnega zaporedja, ki smo ga preučevali mi. Druga razlaga bi lahko bila razlika v lokalni epidemiologiji med področji, kjer so raziskave potekale (52).

4.3 PRIMERJAVA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ REFERENČNIH SEVOV

Preglednica IX: Razlike v dušikovih bazah na mestih nukleotidnega zaporedja pri treh referenčnih, na klaritromicin občutljivih sevih HP (NC_00915.1, U27270.1, NC_000921.1).

Številka mesta razlike	Oznaka referenčnega seva		
	NC_00915.1	U27270.1	NC_000921.1
2244	C	T	C
2345	C	-	C
2618	A	A	T
2783	T	-	T
2808	T	-	T
2850	G	-	G
2864	G	A	G

Pri primerjavi treh v raziskavah najpogosteje uporabljenih referenčnih sevov HP (NC_00915.1, U27270.1 in NC_000921.1), ki so občutljivi na klaritromicin, se je izkazalo, da je med njimi na odseku med mestoma 1900 in 2900 sedem razlik (Preglednica IX). Po variacijah najbolj odstopa sev U27270.1, kjer so prisotne substitucije in delecije, medtem ko se ostala dva med seboj razlikujeta le v eni substituciji. Te variacije v nukleotidnem zaporedju so odraz genetske raznolikosti med divjimi tipi sevov HP, kar je najverjetneje posledica dejstva, da je evolucija v vejah razvoja potekala različno na posameznih področjih v svetu (1). Odkritja razlik znotraj skupine na klaritromicin občutljivih sevov so nam pomagala, da smo iz nabora mutacij, ki smo jih našli s primerjavo z referenčnim sevom NC_00915.1, izločili mutaciji C2244T in G2864A, saj se je izkazalo, da gre le za variaciji, ki na razvoj odpornosti na klaritromicin ne vplivata. Izločitev variacije G2864A je podkrepilo še dejstvo, da se je ta pojavljala v več kot 35 % primerov analiziranih sevov pri vseh vrednostih MIK za klaritromicin, tako pri občutljivih kot pri odpornih.

4.4 MUTACIJE

Najdene spremembe, ki smo jih opredelili kot mutacije potencialno odgovorne za odpornost na klaritromicin, smo po pogostosti pojavljanja razvrstili v Preglednici X ter prikazali, kolikokrat se vsaka mutacija pojavi pri posameznih vrednostih MIK za klaritromicin.

Preglednica X: Pogostost pojavljanja mutacij in porazdelitev po posameznih vrednostih MIK za klaritromicin (S – občutljiv, I – intermediaren, R – odporen).

Mutacija	MIK Kla (mg/L)											Skupna vsota	
	S			I	R								
	0,03	0,125	0,25	0,5	1	2	16	32	64	128	256		
A2143G			1		2	3	7	10	5	3	15	46	
T2182C	2						1	2	2	1	5	13	
A2142G											12	12	
C2760T										1	2	3	
C2695A				1	1							2	
C2288T								1			2	3	
C2245T											2	2	
C2858T											1	1	
C2561T											1	1	
T2179C			1									1	
G1940A											1	1	
A1904G						1						1	
A2089G									1			1	
C2305A									1			1	
A2300G								1				1	
C2773T									1			1	
C2195T									1			1	
T2320C							1					1	
T2264C										1		1	

Potem ko smo zbrali in analizirali mutacije potencialno odgovorne za odpornost na klaritromicin, smo dobili naslednje izsledke. Najpogosteje, pri 69 % analiziranih sekvenc, smo našli substitucijo A2143G, pri 19 % substitucijo T2182C, pri 18 % pa substitucijo A2142G. Ostale mutacije so se pojavljale pri manj kot 5 % analiziranih sekvenc. Literatura navaja, da so za več kot 90 % na klaritromicin odpornih sevov HP odgovorne mutacije A2142G, A2142C ali A2143G (53,42,52), kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. Pri 97 % (n=56) vseh odpornih sevov smo našli mutaciji A2142G in / ali A2143G. Mutacije A2142C v našem naboru vzorcev nismo zaznali.

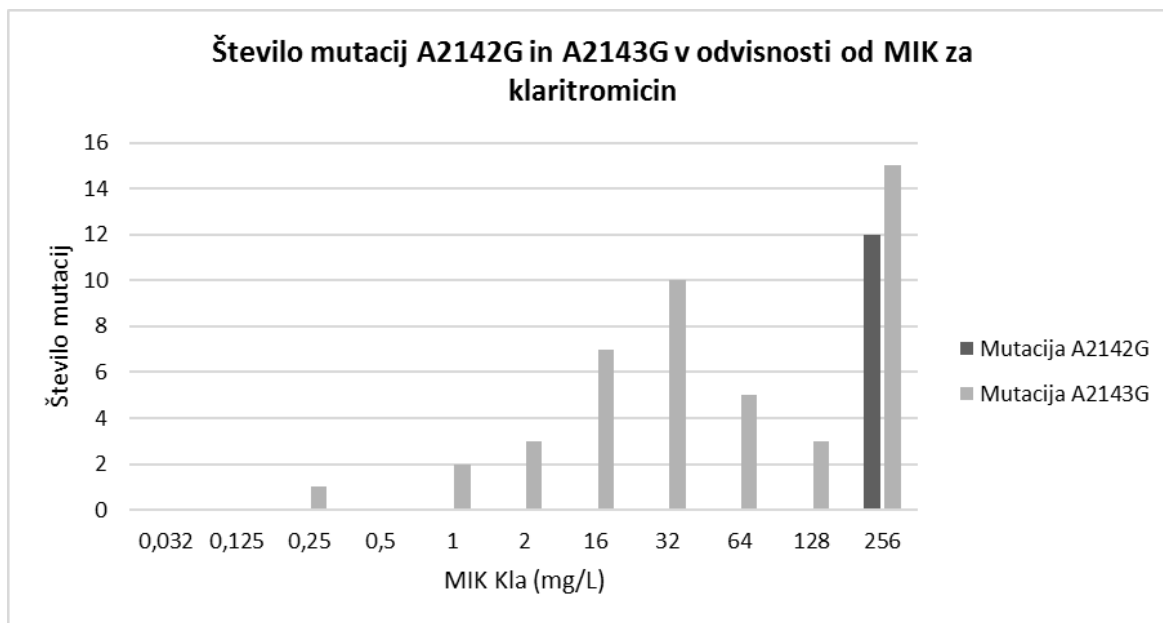
Zanimala nas je korelacija med posameznimi mutacijami in odpornostjo na klaritromicin, zato smo preverili porazdelitev mutacij po MIK za klaritromicin. Pričakovano smo našli povezavo z odpornostjo na klaritromicin pri mutacijah A2143G in A2142G. Za mutacijo T2182C, kljub veliki razširjenosti ne moremo reči, da je potencialno odgovorna za razvoj odpornosti, saj se pojavlja tako pri odpornih kakor tudi pri občutljivih sevih. O tem so si tudi mnenja v objavljeni literaturi zelo različna, nekateri so potrdili povezavo z odpornostjo, drugi pa poročajo o enakih rezultatih, kot smo jih dobili mi (42). Zaradi majhnega števila primerov ostalih mutacij morebitnih povezav z odpornostjo nismo mogli predvideti.

4.5 MUTACIJI A2142G, A2143G

Do sedaj so raziskovalci z naravno transformacijo enotno dokazali povezavo z odpornostjo na klaritromicin le pri mutacijah A2142G in A2143G (53), zato smo se mi s podrobnejšo analizo osredotočili predvsem nanju. Med 58 na klaritromicin odpornimi sevi smo pri 56 primerih (97 %) našli vsaj eno izmed obeh mutacij. Mutacija A2143G je bila prisotna pri 45 (78 %) sevih, mutacija A2142G pa pri 12 (21 %) sevih. V enem primeru (2 %) sta bili prisotni obe mutaciji. Pri ostalih 2 primerih (3 %) so bile bodisi prisotne druge mutacije bodisi na analiziranem nukleotidnem odseku nismo našli nobene razlike pri primerjavi z referenčnim odsekom (Preglednica XI).

Preglednica XI: Razširjenost mutacij A2142G in A2143G pri na klaritromicin odpornih izolatih HP (Število odpornih izolatov = 58).

MUTACIJA	ŠTEVILO IN DELEŽ NA KLARITROMICIN ODPORNIH IZOLATOV HP
A2142G	11 (19 %)
A2143G	44 (76 %)
A2142G in A2143G	1 (2 %)
Ostalo	2 (3 %)



Slika 12: Prikaz odvisnosti števila mutacij A2142G in A2143G od MIK za klaritromicin.

Iz rezultatov na Sliki 12 je razvidno, da je bila mutacija A2142G prisotna le pri najbolj odpornih izolatih HP, pri katerih je MIK za klaritromicin znašala 256 mg/L ali več, tudi v podatkih iz literature je ta povezava zelo jasna (42). Prisotnost te mutacije pri sevu HP lahko za pacienta pomeni večjo verjetnost neuspešnega zdravljenja ter ponovitev bolezni (54). Mutacija A2143G se je pojavljala pri odpornih izolatih ne glede na MIK, v enem primeru pa tudi pri občutljivem izolatu (MIK za klaritromicin = 0,25 mg/L). Slednji rezultat je presenetljiv, vendar ga lahko razložimo kot posledico mešane populacije občutljivih in odpornih sevov HP v vzorcu. V študiji izvedeni leta 2013 v Franciji so pokazali, da navadno večina bakterijske populacije vsebuje občutljive genotipe, kar kaže na to, da se mutacije in z njimi odpornost pojavijo spontano in ostajajo pri majhnem deležu populacije, vse dokler ne pride do aplikacije antibiotika, na katerega je odpornost razvita. Antibiotik učinkuje le na občutljive seve, medtem ko odporni ostanejo in postanejo večinska populacija (55).

4.6 ODPORNI IZOLATI HP BREZ MUTACIJ A2142G, A2143G

Za dva odporna izolata, pri katerih nismo našli mutacij na mestih 2142 in 2143, ostaja vprašanje vzroka odpornosti nepojasnjeno (Preglednica XII). Obstaja možnost, da so za odpornost odgovorne mutacije zunaj preiskovanega nukleotidnega odseka ali pa povsem drugi mehanizmi odpornosti (42,56).

Preglednica XII: Na klaritromicin odporna izolata HP brez mutacij na mestih 2142 ali 2143 s pripadajočimi MIK za klaritromicin in prisotnimi mutacijami (N – številčna oznaka vzorca).

N	MIK Kla (mg/L)	MUTACIJA
43	2	C2695A
53	256	Ni mutacij na območju 1900 - 2900

4.7 HETEROZIGOTI

Pri analizi nukleotidnih zaporedij smo našli 5 primerov heterozigotnih mutacij, to pomeni, da je bila mutacija prisotna le na eni kopiji 23S podenote rRNA, na drugi kopiji pa spremembe ni bilo. Podrobneje smo pogledali dva primera heterozigotnih mutacij A2142G in A2143G in opazili, da oba pripadata na klaritromicin odpornim sevom HP (Preglednica XIII). Literatura navaja, da se odpornost izrazi tudi, če je mutacija, ki povzroči odpornost, prisotna le na eni kopiji 23S rRNA, kar smo v naši raziskavi potrdili (44). Ker se heterozigotnost mutacij pojavlja razmeroma redko, lahko določitev različnih dušikovih baz na določenem mestu nukleotidnega zaporedja pri istem vzorcu razložimo tudi s heterogenostjo populacije HP. V raziskavi iz leta 2009 so pokazali, da je bilo več kot 30 % sevov HP v vzorcih pravzaprav mešanica različnih genotipov. Vzrok temu so pripisali bodisi sobivanju več različnih sevov v sami želodčni sluznici bodisi prisotnosti mutiranih in divjih tipov alelov v istem sevu (54, 55).

Preglednica XIII: Heterozigotne mutacije izolatov HP na mestih 2142 in 2143 s pripadajočimi MIK za klaritromicin (N – številčna oznaka vzorca, H – prisotnost heterozigotne mutacije).

N	MIK Kla (mg/L)	A2142G	A2143G
105	256	H	H
126	256	H	/

Največja omejitev, s katero smo se srečali pri praktičnem delu, je bil majhen nabor vzorcev, pri katerih smo na koncu analizirali nukleotidna zaporedja. Vzrok temu je bil velik osip števila vzorcev pri posameznih korakih dela. S težavo smo se srečali že pri sami kultivaciji kolonij HP iz vzorca homogeniziranega želodčnega tkiva pacientov. Od začetnih 140 vzorcev smo uspeli pridobiti kulturo HP le pri 85, kar pomeni 61 % uspešnost. V literaturi opozarjajo, da je izolacija HP iz vzorcev bioptično odvzetega tkiva želodčne sluznice

težavna ter včasih neuspešna (18). Manjši osip vzorcev je bil zato pričakovan, nismo pa predvideli, da bo ta zaradi procesa zamrzovanja in odtalitve vzorcev še toliko večji. HP je namreč izredno občutljiva bakterija, ki potrebuje pazljivo rokovanje pri ustreznih pogojih (26). Nekaj osipa števila vzorcev smo imeli še pri izvedbi PCR in sekvenciranju, na koncu pa smo uspeli pridobiti nukleotidna zaporedja za analizo 67 vzorcev, kar predstavlja 48 % celokupno uspešnost. Kljub težavam je bil končni nabor vzorcev še vedno reprezentativen v primerjavi z začetnim naborom.

Pri teoretičnem delu smo se soočali z manjšo težavo številčenja mest nukleotidnega zaporedja 23S podenote rRNA, kjer smo iskali mutacije odgovorne za odpornost na klaritromicin. V literaturi smo opazili vsaj štiri načine številčenja, obenem pa so bili za primerjavo uporabljeni različni referenčni sevi HP, neenotnost je zato nekoliko otežila delo. Mi smo uporabljali številčenje po Taylorju, ki številči od mesta začetka transkripcijskega zaporedja 23S rRNA (51), za referenco pa sev ATCC 26695 (dostopen v NCBI bazi kot NC_000915).

Z namenom opredelitve zanesljivosti molekularnih metod za ugotavljanje odpornosti na klaritromicin pri HP smo rezultate uveljavljenih fenotipskih metod, ki temeljijo na kultivacijski diagnostiki z določanjem MIK, primerjali z rezultati genotipskih metod, pri katerih določamo mutacije v nukleotidnem zaporedju. Ugotovili smo, da je mogoče z genotipsko metodo, ki smo jo uporabili, odkriti 97 % primerov odpornih sevov HP. Ob predpostavki, da je odpornost na klaritromicin odvisna le od mutacij A2142G in A2143G, smo med 67 vzorci našli 56 primerov odpornih. Obenem smo pri istem naboru vzorcev z določitvijo MIK našli 58 primerov odpornosti. Čeprav imajo fenotipske metode določanja občutljivosti kar nekaj slabosti, se pri nas v rutini HP še vedno uporabljajo. Kot največji minus bi izpostavili potrebo po kultiviranju bakterijskih kolonij, za kar smo pokazali, da je včasih zelo težavno in zahteva veliko spretnosti. Poleg tega so metode s kultivacijo le semi-kvantitativne in tudi zelo časovno potratne, kar za genotipske metode ne velja, saj jih lahko izvajamo direktno iz bioptičnega vzorca (58). Molekularne metode za namen odkrivanja odpornosti na klaritromicin so vsekakor dobrodošle, saj bi lahko precej olajšale delo in skrajšale sam proces diagnostike v rutini. Menimo, da naši rezultati potrjujejo možnost zanesljive uporabe molekularnih metod določanja odpornosti na klaritromicin v slovenski populaciji izolatov HP, saj na podlagi mutacij A2142G in A2143G le v 3 % nismo

uspeli ugotoviti prisotne odpornosti na klaritromicin. Za potrditev klinične uporabnosti teh metod so še potrebne dodatne raziskave, ne smemo pa pozabiti tudi na spremljanje uspešnosti zdravljenja po njihovi uporabi.

5 SKLEP

Pri magistrski nalogi smo prišli do zaključkov, da predstavlja odpornost na klaritromicin pri HP veliko težavo, saj so izidi zdravljenja okužbe velikokrat neuspešni. Za razvoj odpornosti na klaritromicin sta dokazano odgovorni mutaciji A2142G in A2143G locirani na 23S podenoti ribosomske RNA, ki smo ju našli pri 97 % fenotipsko odpornih sevov HP. Povezava z odpornostjo je bila jasno vidna, obenem pa smo dokazali tudi povezavo mutacije A2142G z najbolj odpornimi sevi, katerih minimalna inhibitorna koncentracija za klaritromicin je znašala 256 mg/L ali več, kar je bilo omenjeno tudi v literaturnih virih. Med ostalimi ugotovljenimi mutacijami je po pogostosti izstopala še mutacija T2182C, pri kateri pa nismo mogli dokazati povezave z odpornostjo, saj je bila prisotna tako pri odpornih kot občutljivih izolatih. Našli smo tudi 5 heterozigotnih mutacij, kar pomeni, da je bila mutacija na določenem mestu prisotna le na eni kopiji gena. Potrdili smo, da se te mutacije izražajo dominantno in se fenotipsko kažejo z odpornostjo na klaritromicin. Največjo težavo pri izvedbi naloge je predstavljala pridobitev izolatov iz bioptov želodčne sluznice. Postopek kultivacije iz globoko zamrznjenih vzorcev bioptično pridobljenega tkiva želodčne sluznice se je izkazal za zahtevnega, uspešnost je znašala le 61 %, zato bi bilo v prihodnje vredno razmisliti o novih metodah shranjevanja in kultivacije HP, da bi se zvišala možnost preživetja večjega deleža populacije v vzorcu. Menimo, da smo z našo bazično raziskavo postavili temelje za redno klinično uporabo genotipskih metod odkrivanja odpornosti HP na klaritromicin. Potrebujemo pa dodatne klinične raziskave, ki bodo naše rezultate prevedle v rutinsko klinično prakso.

6 LITERATURA

1. Atherton JC, Blaser MJ: Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 2009; 119: 2475–87.
2. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html [dostop 9. 6. 2016].
3. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, et al.: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397–405.
4. Boyanova L, Mitov I, Vladimirov B: *Helicobacter pylori*, Caister Academic Press, Norfolk, 2011: 9–15.
5. Solnick JV, Schauer DB: Emergence of Diverse *Helicobacter* Species in the Pathogenesis of Gastric and Enterohepatic Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 59–97.
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=210> [dostop 13. 6. 2016].
7. Madigan MT, Brock TD: *Brock biology of microorganisms*, 12. ed., Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, 2009: 1172.
8. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ: Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 3423–27.
9. <http://www.helico.com> [dostop 13. 10. 2016].
10. Stingl K, Altendorf K, Bakker EP: Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* 2002; 10: 70–4.

11. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G: Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2002; 123: 187–95.
12. Atherton JC: The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 63–96.
13. Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9: 1–6.
14. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F: Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2014; 19: 1–5.
15. Gubina M, Tepeš B, Ihan A, Logar J, Wraber B, Poljanec J, et al.: Prevalenca protiteles proti bakteriji *Helicobacter pylori* v Sloveniji v letu 2005. *Zdr Vestn* 2006; 75: 169–73.
16. Jeruc J: *Helicobacter pylori* in z njim povezane bolezni. *Med Razgledi* 2010; 49: 433–43.
17. Suerbaum S, Josenhans C: *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 441–52.
18. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 449–90.
19. Adamič Š, Arnež ZM, Balažic J, Baraga A, Bilban M, Bonač I, et al.: Slovenski medicinski slovar, Zdravniška zbornica Slovenije, Ljubljana, 2014.
20. Fuccio L, Zagari RM, Eusebi LH, Laterza L, Cennamo V, Ceroni L, et al.: Meta-analysis: Can *Helicobacter pylori* Eradication Treatment Reduce the Risk for Gastric Cancer? *Ann Intern Med* 2009; 151: 121–8.
21. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [dostop 25. 6. 2016].
22. Graham DY: *Helicobacter pylori* Update: Gastric Cancer, Reliable Therapy, and Possible Benefits. *Gastroenterology* 2015; 148: 719–31.

23. Eidt S, Stolte M, Fischer R: *Helicobacter pylori* gastritis and primary gastric non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 1994; 47: 436–9.
24. Parsonnet J, Isaacson PG: Bacterial infection and MALT lymphoma. *N Engl J Med* 2004; 350: 213–5.
25. Franceschi F, Tortora A, Gasbarrini G, Gasbarrini A: *Helicobacter pylori* and Extragastric Diseases. *Helicobacter* 2014; 19: 52–8.
26. Megraud F, Lehours P: *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 280–322.
27. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al.: Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 2017; 66: 6–30.
28. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al.: Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut* 2012; 61: 646–64.
29. Jeverica S, Tepeš B, Ihan A, Skvarc M: Primarna odpornost bakterije *Helicobacter Pylori*. *Zdr Vestn* 2010; 79: 25–30.
30. Graham DY, Fischbach L: *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 2010; 59: 1143–53.
31. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry, 7. ed., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013: 1500.
32. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG: *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 699–709.
33. Vakil N: *H. pylori* Treatment: New Wine in Old Bottles? *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 26–30.

34. Marcus EA, Inatomi N, Nagami GT, Sachs G, Scott DR: The effects of varying acidity on *Helicobacter pylori* growth and the bactericidal efficacy of ampicillin. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 972–9.
35. Chiba N: Effects of In Vitro Antibiotic Resistance on Treatment: Bismuth-Containing Regimens. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 885–9.
36. Lambert JR, Midolo P: The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 27–33.
37. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, et al.: *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013; 62: 34–42.
38. Vakil N, Megraud F: Eradication Therapy for *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 985–1001.
39. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology, 26. ed., McGraw-Hill Medical, New York, 2013: 864.
40. White DG, Alekshun MN, McDermott PF, Levy SB: *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy*, American Society for Microbiology, Washington DC, 2005: 570.
41. <http://www.eucast.org> [dostop 13. 6. 2016].
42. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J: *Helicobacter pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter* 2016; 21: 349–63.
43. Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TTH, Kwon DH, et al.: Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 1796–803.
44. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, Griffy MV, Beyer J, Flamm RK, et al.: Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 477–80.

45. <http://www.jbsdonline.com/c4320/c4322/secondary-structure-and-domain-architecture-23s-and-5s-rnas-p18685.html> [dostop 13. 10. 2016].
46. Vandembroucke-Grauls MJE, Kusters JG: Explaining the Bias in the 23S rRNA Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2749–51.
47. Kumar S: *Essentials of microbiology*, 1. ed., Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, 2016: 627.
48. <https://www.randomizer.org> [dostop 6. 5. 2016].
49. Christensen WB: Urea Decomposition as a Means of Differentiating Proteus and Paracolon Cultures from Each Other and from Salmonella and Shigella Types. *J Bacteriol* 1946; 52: 461–6.
50. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [dostop 15. 6. 2016].
51. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K: Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2621–8.
52. Ducournau A, Bénéjat L, Sifré E, Bessède E, Lehours P, Mégraud F: *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 715–8.
53. Ribeiro ML, Vitiello L, Miranda MC, Benvengo YH, Godoy AP, Mendonca S, et al.: Mutations in the 23S rRNA gene are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Brazil. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003; 2: 11.
54. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, et al.: Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 283–6.
55. Megraud F: *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374–84.

56. Trespalacios AA, Otero W, Caminos JE, Mercado MM, Ávila J, Rosero LE, et al.: Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Bogotá D.C., Colombia. *J Microbiol* 2013; 51: 448–52.
57. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, et al.: Evaluation of a New Test, GenoType HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3600–7.
58. Lascols C, Lamarque D, Costa J-M, Copie-Bergman C, Le Glaunec J-M, Deforges L, et al.: Fast and Accurate Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* and Identification of Clarithromycin Resistance Mutations in *H. pylori* Isolates from Gastric Biopsy Specimens by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4573–7.