

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Vladimir Lj. Milivojević

**PROCENA UTICAJA REZISTENCIJE NA  
ANTIBIOTIKE I CYP450 POLIMORFIZMA NA  
EFIKASNOST ERADIKACIJE *HELICOBACTER  
PYLORI* INFEKCIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023. godine

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Vladimir Lj. Milivojević

**ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF  
ANTIBIOTIC RESISTANCE AND CYP450  
POLYMORPHISM ON THE EFFICACY OF  
*HELICOBACTER PYLORI* INFECTION  
ERADICATION**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

Prof. Dr Miodrag Krstić

Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije  
Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Doc. Dr Branislava Medić

Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Predsednik:

1. Prof. Dr Lazar Ranin

Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

Članovi:

2. Prof. Dr Ljiljana Bukarica

Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Medicinski Fakultet Univerziteta u Beogradu

3. Prof. Dr Aleksandar Nagorni

Klinika za gastroenterologiju i hepatologiju Univerzitetskog Kliničkog Centra Niš  
Medicinski Fakultet Univerziteta u Nišu

Datum odbrane: ..... .09.2023.god.

## ZAHVALNICA:

Izradi ove doktorske teze su svojim znanjem, zalaganjem, podrškom, razumevanjem, strpljenjem doprineli moji učitelji, saradnici, kolege, prijatelji i moja porodica.

Zahvaljujem se svom mentoru Prof. dr Miodragu Krstiću na ukazanom poverenju, ličnoj i profesionalnoj podršci, kao i na vremenu i trudu koji je uložio tokom izrade ove teze. Zahvaljujem se Prof. dr Tomici Milosavljeviću, idejnom tvorcu ove doktorske disertacije, čoveku koji motiviše svojom energijom, naučnim i etičkim principima, koji inspiriše na napredak i lično usavršavanje. Njegovo znanje, sistematičnost, doslednost i posvećenost *Helicobacter pylori* infekciji mi je uspešno preneo i prenosi i trudiću se da to poverenje opravdam. Komentoru Doc. dr Branislavi Medić Brkić koja je pokazala entuzijazam, podršku, znanje i dala mi korisne savete da rad na tezi bude značajno lakši. Prof. dr Lazaru Raninu koji mi je pružio veliku podršku tokom svih faza izrade ove teze. Zahvaljujem se na izuzetno korisnim savetima i sugestijama kao i na stručnoj pomoći. Prof. dr Ljiljani Gojković Bukarici, na ukazanom poverenju, izdvojenom vremenu, pozitivnoj energiji i dragocenim savetima. U završnoj fazi izrade pomogao je korisnim sugestijama i savetima i značajno doprineo da teza dobije ovakav finalni oblik član komisije Prof. dr Aleksandar Nagorni kome se od srca zahvaljujem. Zahvaljujem se Doc. dr Dušanu Kekiću na velikoj pomoći u svim fazama izrade teze, na izdvojenom vremenu, energiji, trudu, strpljivosti, razumevanju i nesebičnoj podršci. Neizmernu zahvalnost dugujem dr Ivanu Skadriću na pomoći u laboratorijskom radu, dostupnosti, podsticajima i savetima. Zahvaljujem se svim članovima kolektiva Klinike za gastroenterologiju i hepatologiju, kao i Urgentnog Centra Univerzitetskog kliničkog centra Srbije koji su svojim zalaganjem u granicama svojih mogućnosti doprineli izradi ove teze. Posebna zahvalnost Odeljenju Urgentne gastroenterologije i Opšte Intenzivne internističke Nege. Zahvalnost dugujem svim članovima kolektiva Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Instituta za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Zahvaljujem se svojim prijateljima i kumovima na razumevanju, vedrom duhu i podršci. Posebnu zahvalnost dugujem dr Ivanu Rankoviću na prijateljstvu, bratstvu, uspešnoj saradnji i sveukupnom razmevanju i podršci. Najveću podršku, ljubav, razumevanje, veru i pomoć svih ovih godina pružali su mi moji roditelji Radica i Ljubodrag, brat Aleksandar, kao i moja supruga Ana i sinovi Andrija, Viktor i Damjan. Njima od srca posvećujem ovaj rad.

*„Ništa nije nemoguće za onoga ko ima volju pokušati“ – Aleksandar Veliki*

## **PROCENA UTICAJA REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE I CYP450 POLIMORFIZMA NA EFIKASNOST ERADIKACIJE *HELICOBACTER PYLORI* INFEKCIJE**

**Uvod:** S obzirom da je bakterija *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) prepoznata kao karcinogen I reda neophodno je adekvatno lečenje infekcije. Cilj našeg istraživanja bio je utvrđivanje učestalosti *H. pylori* infekcije, stope rezistencije na antibiotike i prisustvo i odnos potencijalnih prediktora uspeha lečenja.

**Metodologija:** U prospektivnoj intervencionalnoj studiji je obuhvaćeno 415 bolesnika, od kojih su 180 bili *H. pylori* pozitivni. Svim *H. pylori* pozitivnim bolesnicima je urađena gornja endoskopija uz uzimanje biopsija sluznice radi određivanja antibiotske rezistencije, primenom PCR tehnike. Na osnovu rezultata rezistencije bolesnici su dobijali *tailored made* terapiju. Ispitivano je postojanje polimorfizma gena, tačkastih mutacija i kolonizacija gljivicom iz roda *Candida*.

**Rezultati:** Prevalenca *H. pylori* infekcije iznosila je 43%. *H. pylori* pozitivni bolesnici su više živeli na selu ( $p<0.01$ ), imali viši nivo CRP-a ( $p<0.01$ ), niži nivo gvožđa ( $p<0.01$ ), feritina ( $p<0.01$ ) i češće atrofični gastritis ( $p=0.01$ ). Ukupna stopa izlečenja iznosila je 86%, kod „naïve“ 93%, a u drugoj liniji terapije 83%. Najčešći terapijski režimi u prvoj liniji bila su četvorostruka terapija sa i bez bizmuta (79%). U drugoj liniji terapije, najčešće su propisivani trojna terapija bazirana na levofloksacinu i Pylera® (84%). Stopa rezistencije na klaritromicin iznosila je 55%, a rezistencija na fluorohinolone bila je 50%. Većina *H. pylori* pozitivnih bolesnika bili su heterozigoti za polimorfizam gena CYP450 (82%). *Candida* je izolovana kod 9% ispitivanih.

**Zaključci:** Prevalenca *H. pylori* je visoka. Ukupna stopa izlečenja dala je zadovoljavajuće rezultate. Izbor terapije, visoka stopa antibiotske rezistencije, CYP450 polimorfizam, komplijansa bolesnika, prisustvo *Candide* neki su od faktora koji mogu remetiti uspeh terapije.

**Ključne reči:** *Helicobacter pylori*, rezistencija, CYP polimorfizam, *tailored made* terapija, *Candida*

**Naučna oblast:** medicina

**Uža naučna oblast:** medicinska farmakologija

**UDK broj:**

## ASSESSMENT OF THE INFLUENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND CYP450 POLYMORPHISM ON THE EFFICACY OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION ERADICATION

**Introduction:** Given that the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is recognized as a carcinogen of the first order, adequate treatment of the infection is necessary. The aim of our research was to determine the frequency of *H. pylori* infection, the rate of antibiotic resistance and the presence and relationship of potential predictors of treatment success.

**Methodology:** The prospective interventional study included 415 patients, of which 180 were *H. pylori* positive. All *H. pylori* positive patients underwent an upper endoscopy with mucosal biopsies to determine antibiotic resistance, using the PCR technique. Based on the results of resistance, the patients received tailored therapy. The existence of gene polymorphism, point mutations and colonization by *Candida* fungi were examined.

**Results:** The prevalence of *H. pylori* infection was 43%. *H. pylori* positive patients lived more in the countryside ( $p<0.01$ ), had higher levels of CRP ( $p<0.01$ ), lower levels of iron ( $p<0.01$ ), ferritin ( $p<0.01$ ) and were more often diagnosed with atrophic gastritis ( $p=0.01$ ). The overall cure rate was 86%, 93% in the "naïve" group, and 83% in the second line of therapy. The most common first-line treatment regimens were quadruple therapy with and without bismuth (79%). In the second line of therapy, triple therapy based on levofloxacin and Pylera® were the most often prescribed regimen (84%). The rate of resistance to clarithromycin was 55%, and resistance to fluoroquinolones was 50%. The majority of *H. pylori* positive patients were heterozygotes for the CYP450 gene polymorphism (82%). *Candida* was isolated in 9% of the examined.

**Conclusion:** The prevalence of *H. pylori* is high. The overall eradication rate gave satisfactory results. Choice of therapy, high rate of antibiotic resistance, CYP450 polymorphism, patient compliance, presence of *Candida* are some of the factors that can affect the success of therapy.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, resistance, CYP polymorphism, tailored made therapy, *Candida*

**Scientific field:** Medicine

**Specific scientific field:** Medical pharmacology

**UDK number:**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Istorijat .....	1
1.2. Mikrobiologija .....	1
1.3. Epidemiologija .....	2
1.3.1. Epidemiološke karakteristike <i>H. pylori</i> infekcije u svetu .....	2
1.3.1. Epidemiološke karakteristike <i>H. pylori</i> infekcije u Srbiji.....	3
1.3.2. Transmisija.....	3
1.4. Patogeneza .....	3
1.5. Klinička slika .....	5
1.5.1. Gastritis .....	5
1.5.2. Ulkusna bolest ( <i>peptic ulcer disease</i> , PUD) .....	5
1.5.3. Funkcionalna dispepsija.....	6
1.5.4. Gastro-ezofagealna refluksna bolest (GERB).....	6
1.5.5. Karcinom želuca .....	7
1.5.6. MALT ( <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> ) limfom.....	8
1.5.7. Ekstragastrične manifestacije <i>H. pylori</i> infekcije .....	8
1.6. Dijagnostika infekcije .....	9
1.6.1. Neinvazivni testovi .....	9
1.6.1.1. Urea izdisajni test.....	9
1.6.1.2. <i>H. pylori</i> serologija .....	10
1.6.1.3. Fekalni antigen test .....	10
1.6.2. Invazivni testovi.....	10
1.6.2.1. Ureaza test.....	10
1.6.2.2. Histologija.....	11
1.6.2.3. <i>H. pylori</i> bakterijska kultura .....	11
1.6.2.4. Polymerase chain reaction, PCR test .....	13
1.7. Terapija .....	14
1.7.1. Dvojna terapija.....	14
1.7.2. Trojna terapija .....	14
1.7.3. Četvorostruka terapija .....	15
1.7.4. Terapija druge linije izbora .....	19
1.7.5. Terapija treće linije izbora .....	19
1.7.6. <i>Maastricht VI</i> konsenzus.....	20
1.7.7. Evropski registar <i>H. pylori</i> infekcije ( <i>Helicobacter pylori</i> European Registry, Hp-EuReg) i pozicija Srbije .....	20
1.8. Izazovi u eradikaciji <i>H. pylori</i> .....	21
1.8.1. Antibiotička rezistencija.....	22
1.8.2. Polimorfizam gena .....	24

1.8.3. Ko-egzistencija sa gljivicom iz roda <i>Candida</i> .....	25
1.8.4. Biofilm .....	26
1.8.5. Komplikacija bolesnika .....	27
2. CILJEVI .....	28
3. METODE .....	29
3.1. Izbor ispitanika i uzimanje uzoraka .....	29
3.2. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije .....	29
3.3. Postavljanje dijagnoze <i>H. pylori</i> infekcije .....	29
3.4. Procena aktivnosti hroničnog gastritisa .....	30
3.5. Izolacija bakterijske DNK .....	30
3.6. Identifikacija i molekularna detekcija rezistencije <i>H. pylori</i> na fluorohinolone i klaritromicin .....	30
3.7. Ispitivanje odnosa CYP450 polimorfizma i ishoda terapije .....	30
3.8. Identifikacija <i>Candida</i> .....	30
3.9. Dobijanje podataka o socio-demografskim, antropometrijskim, kliničkim karakteristikama .....	31
3.10. Dobijanje podataka o <i>H. pylori</i> infekciji .....	31
3.11. Dobijanje podataka o laboratorijskim analizama .....	31
3.12. Statistička analiza .....	31
4. REZULTATI: .....	32
4.1. Karakteristike ispitivane grupe: .....	32
4.2. Podaci o broju prethodnih terapijskih pokušaja lečenja .....	38
4.3. Stopa rezistencije određivana PCR metodom .....	38
4.4. Polimorfizam u genima za CYP450 .....	41
4.5. Ishod lečenja .....	41
4.6. Korelacija između stopa rezistencije i histopatoloških dijagnoza .....	42
4.7. <i>Candida</i> spp. i <i>H. pylori</i> infekcija: .....	44
4.7.1 Real-time PCR detekcija DNK <i>Candida</i> vrsta iz gastričnih biopsija .....	44
4.7.2 Statistička obrada udruženosti između prisustva <i>Candida</i> spp. u gastričnoj biopsiji i demografskih, kliničkih i histopatoloških parametara: .....	45
4.7.3 Statistička procena povezanosti između otkrivenih mutacija gena kod <i>H. pylori</i> pozitivnih povezanih sa rezistencijom na antibiotike i demografskim, kliničkim i histološkim parametara .....	49
4.8. Genetička osnova rezistencije na fluorohinolone i klaritromicin .....	52
4.9. Terapijski režimi .....	54
4.10. First line terapija (tailored made): propisivani režimi i efikasnost .....	54
4.11. Second line terapija (tailored made): propisivani režimi i efikasnost .....	56
4.12. Komplikacija, neželjeni efekti i adjuvantna terapija .....	57
5.0. DISKUSIJA .....	58
<b>6.0. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>69</b>
7.0. LITERATURA .....	70



## 1. UVOD

### 1.1. Istorijat

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ko-egzistirala je sa čovekom još od paleolita (1). Iako otkrivena tek u drugoj polovini 20. veka, sada je poznato da je *H. pylori* kolonizovala i inficirala ljudsku vrstu još u periodu ranog Kamenog doba, na području današnje Afrike (2). Paralelno sa migracijom čoveka, dešavala se i migracija ovog patogena, te se izolati tzv. azijskog soja mogu naći na tlu Afrike, evropskog na tlu Južne i Severne Amerike (2). Brojne studije sprovedene na genetskom materijalu prezerviranih izolata govore u prilog činjenici da je većina ljudske populacije bila inficirana ovom bakterijom još pre 20. veka. Veliki broj naučnika širom sveta pokušao je da poveže i dokaže ulogu tzv. „spiralne bakterije“ u patogenezi bolesti želuca. Prvi, konkretan korak ka otkrivanju ove bakterije napravio je poljski naučnik *Jaworski* na Univerzitetu u Krakovu 1899. godine, otkrivši prisustvo spiralne bakterije u ljudskom želucu (3). Pre toga (1893. godine) *Bizzozero* je otkrio postojanje spiralnih organizama u želucu psa (4). U tom smislu, dalje istraživanje nastavljeno je u Japanu, gde je sprovedena studija o „spirohetama“ u želucu mamala, od strane *Kasaija* i *Kobayashija* (5). Drugi značajni doprinos dali su *Kimura* i *Takemoto* u oblasti histologije mukoze želuca (6). Iako specifični patogen nije identifikovan, u Kini je antiulkusna terapija antibiotikom furazolidinom uspešno primenjivana, a dr *Yao Shi* je bio nadomak otkrića *H. pylori* primenom elektronske mikroskopije (2). Ipak, tek 80-tih godina 20. veka zvanično je dokazano prisustvo spiralne bakterije i neosporna korelacija između njenog prisustva u mukozi želuca i postojanja gastritisa i ulkusne bolesti.

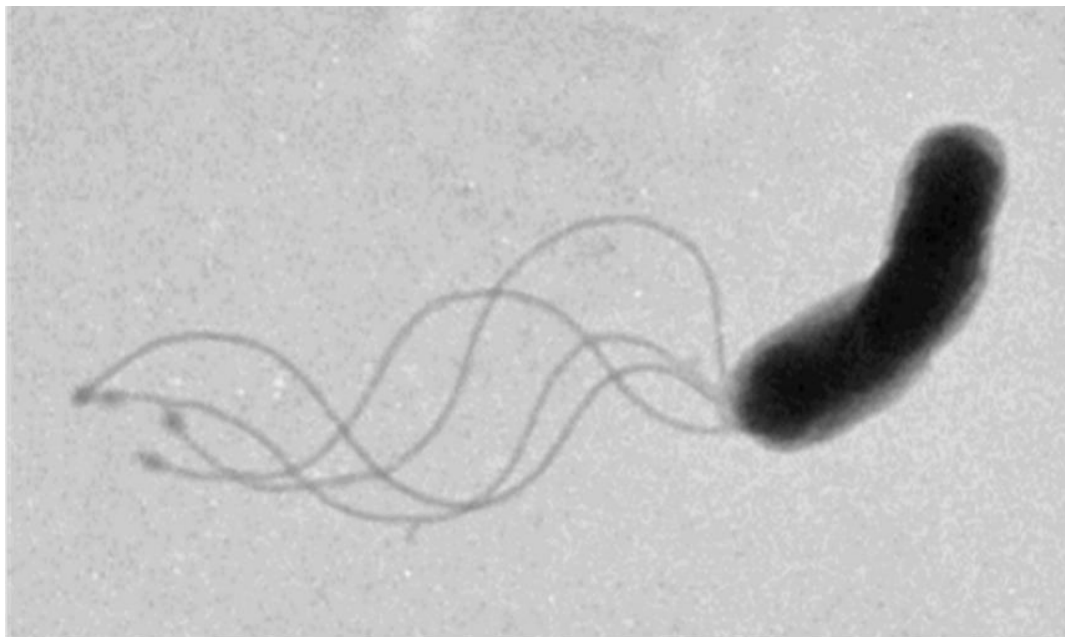
*H. pylori* je otkrivena 1979. godine, kultivisana 1982. godine, a nekoliko decenija kasnije (2005. godine) naučnici *Robin Warren* i *Barry Marshall* dobili su Nobelovu nagradu u oblasti medicine, za ovo otkriće (2). Naime, oni su ispitivanjem biopsija 100 ispitanika sa simptomima bolesti želuca, dokazali prisustvo ove, do tada neidentifikovane bakterije u blizini zona inflamacije unutar mukoze želuca. Ustaljenost verovanja da je isključivo životni stil uzročnik ulkusne bolesti, bila je toliko čvrsta, da je *Marshall* 1985. godine, ciljano inficirao sebe, a u pokušaju da i na ličnom primeru pruži konkluzivne dokaze prethodno iznete tvrdnje (2).

Inicijalno, „nova“ bakterija nosila je naziv „*Campylobacter-like* organism“, potom je preimenovana u *Campylobacter pylori*, da bi 1989. godine bila svrstana u rod *Helicobacter*, od kada nosi naziv *Helicobacter pylori* (7).

### 1.2. Mikrobiologija

*Helicobacter* rod čini više od 35 vrsta bakterija (8). Za čoveka najznačajnija, *H. pylori*, je spiralna, gram-negativna bakterija, prosečne dužine 3,5 mikrona i širine 0,5 mikrona. To je sporo-rastući mikroorganizam sa mogućnošću kultivacije na krvnom agaru ili selektivnoj sredini poput *Skirrow*-ljeve gde zahteva inkubaciju u trajanju od 7-10 dana, pri temperaturi 37°C, u prisustvu 5% kiseonika (8). Spiralni oblik i obložene flagele mu obezbeđuju bolju mobilnost kroz mukusni sloj želuca. Nakon što su *Tomb* i saradnici 1997. godine otkrili ceo *H. pylori* genom, istraživanja u ovoj oblasti dodatno su intenzivirana (9). U zavisnosti od biohemijskih karakteristika, ova bakterija se dalje može kategorizovati na oksidaza, katalaza i ureaza pozitivne (10). Ureaza je značajan faktor u preživljavanju i daljoj kolonizaciji gastrične mukoze. Eksperimentalna delecija ureaza gena čini *H. pylori* onespособljenom za kolonizaciju gastrične mukoze. Funkcija ovog enzima je da poveća pH mikrosredine stvaranjem amonijaka (NH<sub>3</sub>) iz uree i obezbeđivanje azota, neophodnog za bakterijsku sintezu proteina (10). Ureaza je intracelularni enzim koji se vezuje za spoljašnju membranu drugih bakterija nakon lize same *H. pylori*. Ovi nekovalentno vezani proteini mogu onemogućavati funkciju IgA usmerene protiv *H. pylori* (10). Ipak, činjenica da svi klinički izolati produkuju ureazu, ukazuje na to da je kliničko ispoljavanje bolesti uslovljeno dodatnim patogenim faktorima. Dosadašnja klinička i laboratorijska istraživanja pokazala su da najkonzistentniji uticaj na patogenost *H. pylori*

imaju citotoksin-udruženi gen A (*cytotoxin-associated gene A*, CagA) i vakuolirani citotoksin gen A (*vacuolating cytotoxin gene A*, VacA) (11). Oba ova faktora se mogu detektovati u izolatu asimptomatskih nosilaca. Njihov doprinos u *H. pylori*-udruženoj patologiji je posebno istraživani u oblasti kancerogeneze i razvoja karcinoma želuca kao i uloge *H. pylori* u istoj (12). Dodatno, glavna determinanta kliničkog ispoljavanja simptoma zavisi i od imunskog fenotipa inficirane osobe.



Slika 1. Prikaz *Helicobacter pylori* transmisijomom elektronskom mikroskopijom (TEM)  
Slika dr Jennifer Tsang (dostupno na <https://mib.uga.edu/directory/people/timothy-hoover>)

Danas najdokumentovaniji patogeni faktor *H. pylori* je CagA. Mada još uvek nedovoljno istražen, aktuelno dostupni podaci ukazuju da ovaj protein sa karakteristikama fosfataze, ima sposobnost da u target ćelijama menja status aktivnosti proteina i transkripcionih faktora poput NFκB (12). Sa druge strane, VacA indukuje vakuolizaciju epitelijalnih gastričnih ćelija (12).

### 1.3. Epidemiologija

#### 1.3.1. Epidemiološke karakteristike *H. pylori* infekcije u svetu

Smatra se da je gotovo pola svetske populacije zaraženo *H. pylori* (13). Infekcija se češće javlja i lakše stiče u ranijoj životnoj dobi u zemljama u razvoju, u odnosu na zemlje zapadnog sveta (13). Ipak, infekcija *H. pylori* ne dovodi uvek do razvoja simptoma i bolesti. U gotovo 10% inficiranih dolazi do pojave gastro-duodenalnih bolesti (GDB), najpre ulkusnih bolesti (*peptic ulcer disease*, PUD), a u 1-2% razvija se karcinom želuca (10). Iako se infekcija univerzalno vezuje za pojavu gastritisa, razvoj kliničke slike, endoskopski nalaz i ishod zavise od niza činilaca, poput virulencije infektivnog soja, osetljivosti domaćina i faktora sredine (12).

Prevalenca *H. pylori* varira u zavisnosti od geografskog područja. Ukupna prevalenca na tlu Afrike je 79.1%, uz variranje od 40.9% (Egipat) do čak 87.7% u Nigeriji (13,14). U zemljama u razvoju, prevalenca infekcije visoka je u svim starosnim grupama, sa procentom zaraženih >80% čak i u dečijem uzrastu. Sa druge strane, razvijene zemlje beleže pad u prevalenci infekcije *H. pylori*. Disparitet u prevalenci u odnosu na socioekonomski razvoj notira se i na evropskom i američkom kontinentu, sa prevalencijom od 62.8% u Istočnoj Evropi, dok je prevalenca u zemljama Zapadne Evrope 34.3%. Prevalenca u Severnoj Americi iznosi 37.1%; dok je značajno viša u Južnoj i

Centralnoj Americi i iznosi 53% (13,14). Smatra se da socioekonomski status i životni uslovi primarno diktiraju stepen rizika od infekcije.

### 1.3.1. Epidemiološke karakteristike *H. pylori* infekcije u Srbiji

Imajući u vidu dominantan uticaj socioekonomskih faktora na prevalencu *H. pylori* infekcije, jasno je da je prevalenca iste u Istočnoj Evropi daleko veća u odnosu na zemlje na severu kontinenta. Na osnovu trenutno dostupnih podataka prevalenca *H. pylori* infekcije u Hrvatskoj i Sloveniji 53% tj. 51%, respektivno (13). Prema podacima iz 2002. godine, prevalenca *H. pylori* u Srbiji iznosila je 45-55%, što je u skladu sa prijavljenim stopama infekcije u zemljama u okruženju (15). Ipak, treba napomenuti da još uvek ne postoji opsežnija epidemiološka studija sprovedena u našoj zemlji koja bi dala ažurirane i u ovom trenutku relevantnije podatke. Kontroverzu je unela studija iz 2018. godine u kojoj je iznet podatak o znatno većoj stopi prevalencije *H. pylori* infekcije u Srbiji (88%) (13). Međutim, imajući u vidu nejasne izvore ove informacije, iste treba tumačiti oprezno i u kontekstu konfliktnosti iznetih tvrdi i epidemioloških podataka iz zemalja u okruženju. Svakako, neophodni su noviji i pouzdaniji podaci iz adekvatno dizajniranih studija, a u cilju pravilnog tumačenja i praćenja trendova u prevalenciji same infekcije.

### 1.3.2. Transmisija

Pouzdaniji izvori infekcije *H. pylori* još uvek su nedovoljno poznati, s toga su podaci o transmisiji infekcije još uvek limitirani. Fekalna animalna *H. pylori* još uvek je najčešće navođen izvor, a kao primarni vid transmisije navodi se konzumiranje higijenski neispravne vode i hrane, dok se sekundarnom transmisijom smatra intra-familijarni prenos (16,17). Putevi prenošenja mogu biti oro-oralni, gastro-oralni ili feko-oralni, a na terenu nedostatka adekvatnih sanitarnih uslova uz izolovanje *H. pylori* DNK u vodi (17). Kao animalni izvor za prenošenje infekcije navode se miševi, dok se hrana smatra samo sredstvom, ali ne i izvorom infekcije (16).

Bolje razumevanje intra-familijarne transmisije *H. pylori* infekcije počelo je otkrivanjem i razvojem tehnike multi-lokusnog sekvenciranja genskog materijala (*multi-locus sequence typing*, MLST) (18). Ova tehnologija omogućila je evaluaciju genomskog profila različitih izolata *H. pylori* unutar inficiranih porodica. MLST-om se može identifikovati originalni *H. pylori* izolat kojim je inficirana tzv. nulta osoba (18).

U kontekstu transmisije, pokazano je da oralna duplja može biti rezervoar *H. pylori*, kao i da su se vaginalne gljivice pokazale kao značajan primarni rezervoar, unutar kojih su izolovani sojevi *H. pylori*, što može objasniti transmisiju ovog patogena na neonatuse (19).

Kada je u pitanju dojenje kao oblik vertikalne transmisije, meta analize su pokazale da ono može imati protektivnu ulogu (20). Ipak, nakon što su *Kitagawa* i saradnici otkrili prisustvo DNK *H. pylori* u majčinom mleku u 6.1% ispitanica, što može biti objašnjeno potencijalnom kontaminacijom, ostala je debata i još uvek otvoreno pitanje, da li dojenje ima protektivnu ulogu ili predstavlja dodatni potencijalni put prenošenja infekcije *H. pylori* (21,22).

### 1.4. Patogeneza

U patohistološkom pogledu, *H. pylori* primarno kolonizuje gastričnu mukozu sa posledičnim razvojem gastritisa. Ipak, razvoj infekcije u kliničkom smislu zavisi od međusobne interakcije bakterije, domaćina i faktora spoljašnje sredine. Većina osoba ostaje asimptomatski prenosilac, 10-20% razvija PUD, dok <2% će u daljoj kaskadi razviti karcinom želuca (23).

Inicijalni proces kolonizacije dominantno je omogućen prisustvom flagela koje svojom aktivnošću omogućavaju prodiranje bakterije u mucinozni sloj želuca (24). Sekundarno, niz hemotaksičnih faktora poput mucina, natrijum-bikarbonata (NaHCO<sub>3</sub>), uree i sl., stimuliše motilitet *H. pylori*.

Dodatno, aktivnost *H. pylori* ureaze doprinosi kolonizaciji mukoze (25). Kataliza hidrolize uree do nivoa ugljen-dioksida (CO<sub>2</sub>) i amonijaka (NH<sub>3</sub>) omogućava da oni kao puferske supstance doprinose atenuaciji acidoze želudačne sredine. Sa druge strane, hidrogenaza kao deo signalne kaskade aktivira alternativni put koji omogućava iskorišćavanje molekularnog hidrogena kao izvora energije za *H. pylori* (25).

Adhezioni molekuli (adhezini) i receptori na površini gastričnih ćelija, takođe igraju značajnu ulogu u interakciji bakterije i domaćina (26). Jedan od najznačajnijih adhezina je BabA (*blood group antigen binding adhesin A*). Pokazano je da sojevi sa visokom ekspresijom BabA gena imaju veću virulencu i izazivaju PUD i adenokarcinom želuca (26). Nakon kolonizacije, *H. pylori* indukuje proces inflamacije, pre svega na nivou mukoze antruma i tela želuca. Ovaj hronični aktivni gastritis je osnovni patohistološki mehanizam za dalji razvoj i održavanje *H. pylori* uslovljenih gastro-duodenalnih oboljenja (26). Kao najpoznatiji faktor virulence *H. pylori* izdvojio se CagA, čija translokacija biva pokrenuta nakon interakcije adhezina-površinski receptori ćelija domaćina (27). CagA je bakterijski protein koji dovodi do specifičnih modifikacija u morfologiji epitelnih ćelija i promene njihovog polariteta. Sekundarno, dolazi do aktivacije proinflamatornih medijatora na nivou gastričnih ćelija (27).

Postoje i drugi faktori virulence koji se vezuju za povećanu sposobnost *H. pylori* u narušavanju gastrične homeostaze. Među njima, važnu ulogu igra i VacA, čiji gen je nađen u genomu gotovo svih sojeva. VacA promovise stvaranje acidoznih vakuola u citoplazmi epitelijalnih ćelija (28). Posledično dolazi do destabilizacije integriteta citoplazmatske membrane, mitohondrija i drugih endomembranoznih struktura i finalno kolabiranja ćelija. Dodatno, ovaj protein ima ulogu i u promovisanju supresije imunskog odgovora domaćina, facilitacije imunske tolerancije i stimulaciji održavanja *H. pylori* infekcije kroz modulaciju aktivnosti T-ćelija i antigen-prezentujućih ćelija (26). Ovaj niz promena dodatno podstiče održavanje gastritisa i doprinosi razvoju drugih oboljenja, pre svega PUD-a i karcinoma (26,28).

Retko, *H. pylori* može dovesti do razvoja akutnog gastritisa, kada uzrokuje tranzitornu dispepsiju i hipohlorhidriju tj. redukciju sekrecije hlorovodonične kiseline (29). U većini slučajeva dolazi do perzistentne kolonizacije i prolongirane redukcije u sekreciji kiseline, što posledično dovodi do izraženije inflamacije, stvarajući na taj način začarani krug koji za posledicu ima dalje održavanje infekcije *H. pylori* (29). Naime, nizak pH i kisela sredina imaju supresorno dejstvo na rast *H. pylori*. Pokazano je da u bolesnika sa normalnom sekrecijom kiseline, kolonizacija *H. pylori* i znaci hroničnog gastritisa najpre se uočavaju u regiji antruma, gde je istovremeno prisutna značajna atrofija parijetalnih ćelija (30). U uslovima izraženije atrofije ćelija i ahlorhidrije, znaci gastritisa se šire i finalno dolazi do razvoja pangastritisa uz supresiju funkcije parijetalnih ćelija (29,30).

Drugi značajni faktor virulence jeste protein DupA (*duodenal ulcer promoting gene A*) koji omogućava jaku acidorezistenciju bakterije uz promovisanje produkcije interleukina-8 (IL-8) u antralnoj mukozi želuca (31). IL-8 stimuliše inflamatorne procese i infiltraciju polimorfonuklearnih leukocita te na taj način doprinosi daljem razvoju gastritisa i duodenalnog ulkusa (31). Zanimljivo je da je opservirana korelacija između ekspresije dupA gena i pojave ulkusa, u azijskoj populaciji, dok isto nije uočeno među pripadnicima bele rase (32).

OipA (*outer inflammatory protein A*) je protein spoljašnje membrane koji ima ulogu kako u procesu adhezije, tako i u daljoj inflamaciji posredstvom IL-8 (33). Dodatno, OipA doprinosi promenama u ćelijskoj proliferaciji i redukciji intercelularnih veza (33,34).

GGT je N-terminalni nukleofilni hidrolaza enzim, čijom produkcijom *H. pylori* katalizuje konverziju glutamina u glutaman i NH<sub>3</sub> kao i hidrolizu glutaciona u glutaman (35). Ova aktivnost omogućava produkciju slobodnih radikala koji povećavaju oksidativni stres (*reactive oxygen species*, ROS) i poput NH<sub>3</sub>, indukuju ćelijsku apoptozu i nekrozu (35). Dodatno, studije su pokazale da ovaj enzim

inhibiše T-ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju dendritskih ćelija. Hiperaktivnost GGT-a je uočena u bolesnika sa PUD-om u odnosu na bolesnike sa drugim gastro-duodenalnim bolestima (35).

Kao reakcija na prisustvo *H. pylori*, dolazi do kompleksnog odgovora imunskog sistema domaćina, kako urođenog tako i stečenog (36). Nakon inicijalnog kontakta sa patogenom, niz *H. pylori* antigena poput lipoteihoične kiseline, lipoproteina, lipopolisaharida, DNK, RNK, se vezuje za receptore gastričnih ćelija, uključujući toll-like receptore (*toll-like receptors*, TLR) i to: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 koji se nalaze na površini epitelijalnih ćelija, dok se TLR10 nalazi u intracelularnim vezikulama (36). Ova interakcija dovodi do aktivacije sekundarnih signalnih puteva, pre svega NF- $\kappa$ B i oslobađanja proinflamatornih citokina. Dodatno, aktivacijom CagA proteina, dolazi do dalje potencijacije proinflamatornog procesa. Posledično, mukoza biva infiltrisana neutrofilima i mononuklearima, rezultujući u produkciji azot-oksida (NO) i ROS-a (37). Sa aspekta stečenog imuniteta, dolazi do aktivacije, dominantno CD4+ ali i CD8+ ćelija (36,37). Studije su pokazale da se citokinski profil u *H. pylori* pozitivnih bolesnika zasniva dominantno na Th1 ćelijskom odgovoru sa povišenim nivoom interferona  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor-nekrotišućeg faktora (TNF), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, koji imaju proinflamatornu ulogu i IL-10 koji ima ulogu u ograničavanju procesa zapaljenja (37). Sa aspekta produkcije imunoglobulina, IgM specifična antitela mogu se detektovati do četiri nedelje nakon infekcije. U hroničnoj infekciji, serumski IgA i IgG su usmereni ka nizu antigena dalje indukujući inflamatorni proces (37). Ova inflamacija je asimptomatska u većine osoba sa *H. Pylori*, ali ipak povećava rizik od razvoja PUD-a kao i daljeg razvoja karcinoma želuca.

## 1.5. Klinička slika

Većina bolesnika sa *H. pylori* infekcijom ostaje asimptomatska ili sa neprepoznatim simptomima. Kao posledica interakcije patogen-domaćin-faktori spoljašnje sredine, infekcija *H. pylori* može se prezentovati nizom (ne)specifičnih simptoma koji su zajednički činoci različitim bolestima gastrointestinalnog trakta. Smatra se da je pojava određenih ekstra-gastričnih simptoma (neuroloških, dermatoloških, kardiovaskularnih, hematoloških, metaboličkih) vezana za postojanje *H. pylori* infekcije. Tok infekcije je varijabilan i posledica međusobne interakcije prethodno pomenutih činilaca.

### 1.5.1. Gastritis

Akutna infekcija *H. pylori* može rezultirati razvojem, često neprepoznatih, simptoma poput bola u epigastrijumu, mučnine i povraćanja, koji iako kratkotrajni, dovode do značajne inflamacije cele gastrične mukoze. Gastritis se definiše kao inflamacija epitelnih ćelija želuca praćena oštećenjem mukoze (38). Infekcija *H. pylori* praćena je oštećenjem gastrin-produkujućih G ćelija, somatostatin-produkujućih D ćelija i parijetalnih ćelija (38). Hipergastrinemija koja ima centralno mesto u patogenezi gastritisa, u slučaju infekcije *H. pylori* može biti posledica direktnog delovanja na same G ćelije posredstvom stimulativnog efekta proinflamatornih citokina ili kao posledica oštećenja D ćelija i smanjene sekrecije somatostatina koji negativno utiče na sekreciju gastrina (38). Još uvek nije poznato da li inicijalna infekcija može biti praćena spontanom rezolucijom i ukoliko da, koliko često i u zavisnosti od čega se ovo dešava (38). U slučaju perzistentnih infekcija, uočena je značajna korelacija između distribucije i stepena težine gastritisa sa kliničkim fenotipom (29). Antralni gastritis povećava produkciju gastrične kiseline na nivou parijetalnih ćelija i dovodi do metaplazije u duodenumu i rizika od razvoja duodenalnog ulkusa (29,30). Alternativno, predominantno gastritis tela želuca se vezuje za razvoj gastrične atrofije, ulkusa želuca i intestinalne metaplazije. Ove premaligne lezije su povezane sa rizikom od razvoja distalnog adenokarcinoma želuca (30). Drugi uočeni faktori rizika su prekomerno konzumiranje soli, pušenje, pozitivna porodična anamneza za karcinom želuca i nizak socio-ekonomski status (30).

### 1.5.2. Ulkusna bolest (*peptic ulcer disease*, PUD)

Dijagnoza PUD-a prvi put je postavljena 1850. godine. Pre 19. veka ova bolest se smatrala retkom (39). Farmakoterapijske mogućnosti bile su limitirane i hirurška intervencija bila je prva opcija lečenja sve do 60-ih godina prošlog veka. Uzrok ove bolesti bio je nepoznat sve do otkrivanja *H.*

*pylori* (39). U tada sprovedenim istraživanjima, *H. pylori* je izolovana kod čak 95% bolesnika sa duodenalnim tj. 85% bolesnika sa ulkusom želuca. Celoživotni rizik od razvoja PUD-a u osoba sa *H. pylori* infekcijom je tri do 10 puta veći u odnosu na neinficirane osobe (23). Konačno, sa eradikacijom *H. pylori*, pronađen je, za sada, najefikasniji način lečenja ove bolesti. Pokazano je da u endoskopijom-potvrđenim ulkusnim bolestima, rekurentnost infekcije *H. pylori* iznosi 6% u prethodno eradikovanih osoba, dok kod prethodno nelečenih učestalost PUD-a iznosi 67% (23). Ipak, ostaje nepoznanica zašto određeni procenat eradikovanih bolesnika ipak razvije PUD u daljem periodu dugog praćenja.

### 1.5.3. Funkcionalna dispepsija

Funkcionalna dispepsija prema ROMA IV kriterijumu, se definiše kao jedan ili više simptoma vezanih za gornje partije gastrointestinalnog trakta koji traju unazad tri meseca, sa početkom simptoma ne dužim od šest meseci unazad (40). Simptomi podrazumevaju: osećaj postprandijalne nadutosti, ranu sitost, bol i/ili osećaj žarenja u predelu epigastrijuma.

U cilju evaluacije povezanosti dispepsije i *H. pylori* infekcije, Kjoto globalni konsenzus (*Kyoto Global Consensus*) je još 2015. godine definisao pojam tzv. *H. pylori*-povezane dispepsije i to kao odsustvo simptoma u trajanju od šest do 12 meseci nakon eradikacije infekcije (41). Ovaj interval je uzet kao značajan jer je pokazano da vreme koje je potrebno da ponovo dođe do razvoja simptoma dispepsije, ukoliko se ne sprovede eradikaciona terapija jeste upravo šest meseci (41).

Iako je povezanost između funkcionalne dispepsije i *H. pylori* infekcije predmet brojnih istraživanja, rezultati su još uvek konfliktni. Još 1997. godine, *Talley* i saradnici su u kohorti bolesnika sa funkcionalnom dispepsijom, utvrdili prisustvo *H. pylori* infekcije u čak 60% bolesnika (42). Ipak, učestalost funkcionalne dispepsije u grupi neinficiranih nije se značajno razlikovala u odnosu na *H. pylori* pozitivne. U velikoj randomizovanoj studiji na primarnom nivou zdravstvene zaštite, uočeno je da je eradikacija *H. pylori* infekcije dovela do rezolucije simptoma u 49% bolesnika, u odnosu na 36.5% u kontrolnoj grupi (43). U populaciji osoba sa *H. pylori*-povezanim dispepsijom, praćenih sedam godina nakon primarne eradikacije, uočena je redukcija od 25% u broju poseta gastroenterologu, a zbog simptoma dispepsije (44).

Prema najnovijim preporukama *Maastricht VI* konsenzusa, eliminacija *H. pylori* kao infektivnog patogena, sprovodi se kod svih kod kojih je potvrđena infekcija, uz ranije važeću strategiju *test and treat* za sve koji imaju simptome dispepsije (45). Ipak, manje je poznato zašto kod nekih inficiranih bolesnika sa simptomima dispepsije, nakon eradikacije, ipak neće doći do dugotrajne rezolucije simptoma (42).

### 1.5.4. Gastro-ezofagealna refluksna bolest (GERB)

Gastro-ezofagealna refluksna bolest (GERB) je jedno od najčešćih stanja u gastroenterologiji, sa osećajem žarenja u grudima kao glavnim simptomom (46). Od 2006. godine ne postoji univerzalno prihvaćena definicija za ovu bolest (47). Prema deklaraciji iz Montreala, GERB se definiše kao stanje koje nastaje kada refluks želučastog sadržaja dovede do razvoja neprijatnih simptoma i/ili komplikacija (48). Imajući u vidu nespecifičnost simptoma, preklapanje GERB-a sa drugim bolestima gornjih partija gastrointestinalnog trakta, nije retkost.

Odnos između *H. pylori* infekcije i razvoja GERB-a predmet je debate i kontroverzi. *Labenz* i saradnici su 1997. godine izneli hipotezu da eradikacija *H. pylori* dovodi do pojave refluksne bolesti (49). Sa druge strane *Maastricht VI* preporuke jasno govore da eradikacija *H. pylori* nije od kliničkog značaja u pogledu smanjena sekrecije gastrične kiseline, koja je u osnovi patogeneze GERB-a (45).

Neke populacione studije pokazale su da pad u prevalenci *H. pylori* infekcije prati pad u učestalosti ulkusne bolesti uz porast incidence refluksnog ezofagitisa (50). Osnova za ovu tvrdnju leži u činjenici

da *H. pylori* igra značajnu ulogu u gastričnoj atrofiji, koja pak, predstavlja ključni protektivni mehanizam u sprečavanju oštećenja ćelija jednjaka kiselim želudačnim sadržajem, a imajući u vidu da atrofija parijetalnih ćelija želuca sekvencijalno smanjuje sekreciju gastrične kiseline (51). Vodeći se ovom pretpostavkom, studija-slučajeva sprovedena u Južnoj Koreji, zemlji sa visokom prevalencom atrofičnog gastritisa, pokazala je pozitivnu korelaciju između *H. pylori* seropozitivnosti i smanjenog rizika od nastanka erozivnog gastritisa (52). Sa druge strane, u Iranskoj studiji sprovedenoj 2017. godine nije uočena značajna razlika u učestalosti *H. pylori* infekcije u GERB grupi u odnosu na kontrolu (53).

Uloga eradikacione terapije u nastanku ili egzacerbaciji postojećeg GERB-a, takođe, je predmet kontroverze. U prilog tvrdnji da će eliminacija infekcije potencirati razvoj GERB-a govori činjenica da primena inhibitora protonske pumpe (*proton pump inhibitors*, PPI) u post-eradikacionom periodu može dovesti do tzv. rebound hipersekrecije gastrične kiseline, te da će *H. pylori*-uzrokovan antralni gastritis, koji dovodi do kompenzatorne hipergastrinemije, dodatno doprineti pogoršanju simptoma u osoba sa GERB-om, kod kojih je već prisutno oštećenje donjeg ezofagealnog sfinktera (54).

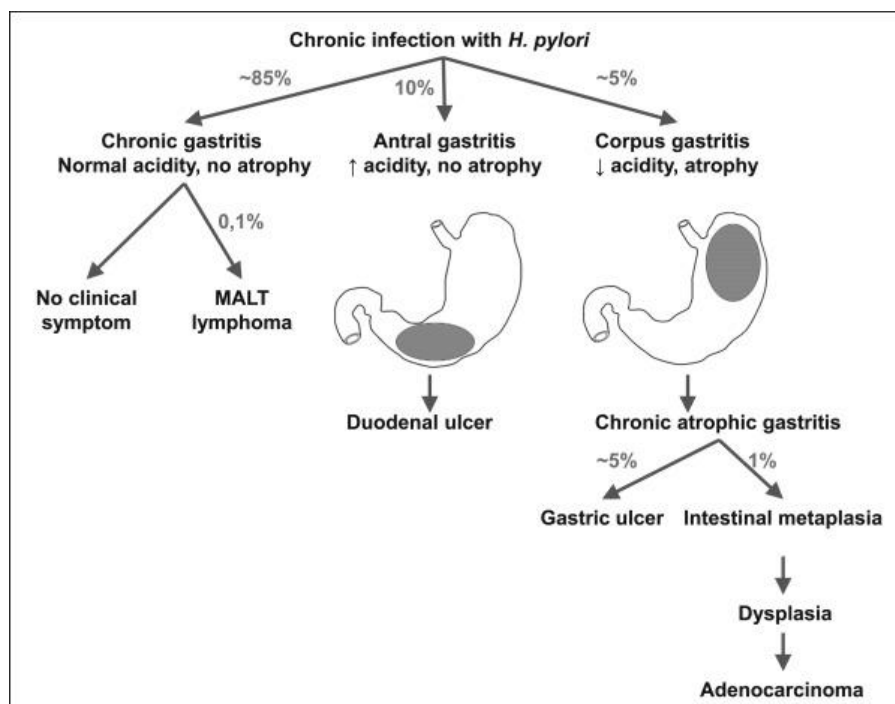
Iako *Maastricht VI* preporuke govore da eradikacija *H. pylori* ostvaruje neutralno dejstvo na pojavu GERB-a, nivo dokaza za ove tvrdnje je nizak, ukazujući na neopodnost dalje evaluacije ovog kompleksnog odnosa (45). Svakako, jasno je da samo prisustvo *H. pylori* infekcije ima negativnu korelaciju sa razvojem refluksne bolesti.

### 1.5.5. Karcinom želuca

Epidemiološke studije pokazale su postojanje jake pozitivne korelacije između *H. pylori* infekcije i adenokarcinoma želuca (55). *H. pylori* prepoznat je kao kancerogeni patogen prvog reda (56). Seropozitivnost *H. pylori*, bez obzira na prisustvo simptoma infekcije, udružen je sa dvostrukim rizikom od razvoja distalnog adenokarcinoma (57). Sa patohistološkog aspekta, adenokarcinom želuca može biti difuzni, sa izraženom hereditarnom komponentom i intestinalni, koji se češće javlja sporadično i na čiju incidencu veći uticaj imaju faktori sredine poput ishrane, pušenja, konzumiranja alkohola i infekcija *H. pylori* (58). Maligna transformacija mukoze želuca nastaje nakon niza konsektivnih promena, počevši od hroničnog aktivnog gastritisa - hroničnog atrofičnog gastritisa – intestinalne metaplazije – displazije koja u daljoj kaskadi dovodi do razvoja invazivnog adenokarcinoma (59). *H. pylori* može indukovati proces i nastanak hroničnog gastritisa, ali može i potencirati dalju progresiju patohistoloških promena i nezavisno od drugih faktora rizika, doprineti nastanku karcinoma želuca (55).

Uprkos jasnoj povezanosti između karcinoma želuca i *H. pylori* infekcije, još uvek ne postoje dovoljno čvrsti dokazi koji pokazuju da eradikacija ovog patogena smanjuje incidencu karcinoma želuca (60). Nedostatak dokaza uzrokovan je predominantno (ne)etičnošću studija koje bi, podrazumevale, uskraćenje eradikacione terapije *H. pylori* pozitivnim ispitanicima uz naknadno neophodan dug period praćenja (60). Za sada su dostupne svega dve randomizovane kontrolisane intervencione studije koje su kao primarni cilj imale razvoj adenokarcinoma. *Wong* i saradnici su u studiji sprovedenoj na 1630 inficiranih bolesnika, pokazali da u periodu praćenja od 7.5 godina, nije bilo statistički značajne razlike u incidenci adenokarcinoma želuca između eradikovane i neeradikovane grupe ispitanika. Treba napomenuti da nijedan ispitanik sa histološkom slikom prekancerogene lezije, u daljem toku nije razvio karcinom (61). Istovetno, velika prospektivna posteradikaciona studija nakon 14 godina praćenja, pokazala je da u trenutku razvoja karcinoma, nije bilo značajne infiltracije mukoze inflamatornim ćelijama, ukazujući da uspešna eradikacija nije apsolutna zaštita od razvoja karcinoma želuca (62). Sa druge strane, japanska studija sa periodom praćenja od tri godine, pokazala je značajno veću učestalost karcinoma želuca u grupi neeradikovanih u odnosu na one kod kojih je sprovedena terapija eliminacije *H. pylori* (63).

Uprkos jasnom stavu naučne javnosti da je *H. pylori* povezana sa razvojem hroničnog aktivnog i atrofičnog gastritisa, kao prekanceroznih lezija u razvoju karcinoma želuca, mišljenja su podeljena kada je u pitanju uticaj eradikacione terapije na incidencu samog karcinoma (64). Pretpostavlja se da u kaskadi kancerogeneze, postoji tzv. „*point of no return*“ promena na nivou mukoze kada eliminacija infekcije više nema uticaj na dalju evoluciju maligne bolesti (64). Ipak preporuke *Maastricht VI* konsenzusa nedvosmisleno govore da je eradikaciona terapija apsolutno indikovana kod svih *H. pylori* pozitivnih bolesnika (45).



Slika 2. Gastrične manifestacije hronične *H. pylori* infekcije

(Mégraud F, Bessède E, Varon C. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma. Clin Microbiol Infect. 2015 Nov;21(11):984-90)

### 1.5.6. MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) limfom

Patogeneza MALT limfoma još uvek nije u potpunosti poznata, ali smatra se da uključuje *H. pylori* infekciju i specifične faktore virulencije poput genetskih faktora domaćina u smislu genskog polimorfizma proinflamatornih citokina, poput TNF i IL-1 $\beta$  (65). MALT predstavlja ektranodalnu marginalnu zonu B ćelijskog limfoma koja nastaje u mukoznoj barijeri kao deo normalnog odgovora stečenog imunskog odgovora na hronični imunoinflamatorni stimulus, pre svega indukovano hroničnom *H. pylori* infekcijom (65,66).

### 1.5.7. Ekstragastrične manifestacije *H. pylori* infekcije

Povezanost *H. pylori* infekcije sa bolestima gornjih partija gastrointestinalnog trakta je dobro poznata. Ekstenzija uticaja bakterije na organizam domaćina nastavlja da bude predmet istraživanja, imajući u vidu da određeni patogeni kroz lokalno dejstvo, mogu ostvarivati sistemske efekte (67).

Sideropenijska anemija (*iron-deficiency anaemia*, IDA) je jedno od ekstra-gastričnih oboljenja kod kojeg je utvrđena višeslojna povezanost sa *H. pylori* infekcijom i kod kojeg se savetuje eradikacija, a prema konsenzusu iz *Maastrichta*, kao i prema hematološkim smernicama za lečenje IDA (45,68,69). Jedan od glavnih uzroka nastanka anemije u *H. pylori* infekciji jeste posledica krvarenja uslovljenog postojanjem ulkusa (70). Ipak, anemija se može javiti i u nekrvarećih bolesnika sa intaktnom



mukozom (71). Jedan od potencijalnih mehanizama jeste poremećaj apsorpcije gvožđa (Fe) na nivou enterocita i njegovo oslobađanje od strane makrofaga stimulacijom aktivacije hepcidina (72). *Yokota* i saradnici primetili su učestaliji polimorfizam gena za sintezu neutrofil-aktivirajućeg proteina od strane sojeva *H. pylori* izolovanih kod bolesnika sa sideropenijskom anemijom (73). Dodatno, oštećenje sluznice želuca uzrokovano *H. pylori* i porast pH sredine istog može dovesti do poremećaja u transformaciji  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  i tako remetiti njegovu apsorpciju (74). Istovremeno, indukcijom proinflammatoryh citokina, *H. pylori* promovise dalji razvoj inflamacije niskog stepena, tzv. *low grade inflammation*, koja u daljoj kaskadi stvara supstrat za razvoj i/ili pogoršanje drugih bolesti (75). Pokazano je da eradikacija *H. pylori* dovodi do reverzije sideropenijske anemije u čak 75% bolesnika (76).

Primarna imuna trombocitopenija (PIT, prethodno idiopatska trombocitopenična purpura) još jedna je hematološka bolest koja se dovodi u korelaciju sa *H. pylori* infekcijom. Smatra se da je to, najverovatnije, posledica molekulske mimikrije uzrokovane faktorom virulence *H. pylori*, lipopolisaharidom (77). Pokazano je da uspešna eradikacija dovodi do povećanja nivoa trombocita u bolesnika sa konkomitantnom infekcijom i PIT-om za 26-100% (78). *Maastricht VI* konsenzus savetuje testiranje na prisustvo *H. pylori* u bolesnika sa PIT-om (45).

Uticaj i povezanost *H. pylori* u neurološkim oboljenjima je neosporna. Ipak, precizna uloga još uvek nije razjašnjena. Naime, pokazano je da eradikacija infekcije dovodi do poboljšanja simptoma Alzheimer-ove bolesti u osoba koji imaju *H. pylori* infekciju (79). Dodatno, u cerebrospinalnoj tečnosti izolovana su IgG *H. pylori* antitela (80). Smatra se da je osnovi patofiziološkog mehanizma proinflammatory stanje koje indukuje sama bakterija (81). U tom smislu, *H. pylori* se dovodi u vezu i sa nizom metaboličkih poremećaja, pre svega insulinskom rezistencijom, metaboličkim sindromom, tipom 2 dijabetesa (82,83).

Odnos između inflamatorne bolesti creva (*inflammatory bowel disease*, IBD) i *H. pylori* predstavlja kontroverzu. Još uvek nema uniformnog mišljenja da li ovaj patogen ima protektivno ili štetno dejstvo na egzacerbaciju bolesti (84). Iranska studija u ispitivanju prevalencije *H. pylori* infekcije u bolesnika sa IBD, nije utvrdila korelaciju između ove dve bolesti (85). Sa druge strane pokazano je da eradikacija *H. pylori* potencira pogoršanje simptoma ulceroznog kolitisa (UC) (85). Smatra se da bakterija svojim faktorima virulence aktivira Th1 celularni imunitet, koji sekundarno stimuliše dalju aktivaciju specifičnih i nespecifičnih imunskih procesa koji posledično dovode do oštećenja sluznice (86). Sa druge strane, u studijama na animalnim modelima i prekliničkim istraživanjima, predložena je teorija da određeni sojevi *H. pylori* produkuju peptide koji ostvaruju protektivno dejstvo na inflamiranu sluznicu intestinalnog trakta (87). Ove diskrepance u rezultatima mogu biti posledica izražene fenotipske varijabilnosti različitih sojeva *H. pylori*, izolovanih u kliničkim istraživanjima (88).

## **1.6. Dijagnostika infekcije**

Postoji veliki broj testova, različite senzitivnosti, specifičnosti, dostupnosti i praktičnosti primene, kako u svakodnevnom kliničkom radu, tako i u naučne svrhe, a u cilju postavljanja dijagnoze *H. pylori* infekcije.

### **1.6.1 Neinvazivni testovi**

#### **1.6.1.1. Urea izdisajni test**

Urea izdisajni test (*urea breath test*, UBT) zasniva se na hidrolizi uree od strane *H. pylori* uz produkciju  $CO_2$  i  $NH_3$  (89). Obeleženi  $CO_2$  izotop se unosi preko usta, *H. pylori* oslobađa obeleženi  $CO_2$ , što se posledično detektuje u izdisajnom uzorku (90). Najčešće korišćeni testovi jesu ne-

radioaktivni  $^{13}\text{C}$  i radioaktivni  $^{14}\text{C}$  test. Oba testa se sprovode u trajanju od 15-20 minuta sa sličnim stepenom preciznosti. Preferenca lekara kada je u pitanju  $^{13}\text{C}$  UBT zasniva se na neradioaktivnom izotopu, iako je korišćena doza radijacije prilikom izvođenja  $^{14}\text{C}$  testa minimalna (90). Senzitivnost i specifičnost UBT-a je 88-95% tj. 95-100%, respektivno (89,91). Kako bi se izbegli lažno negativni rezultati, bolesnicima se savetuje obustava antibiotske terapije u minimalnom trajanju od četiri nedelje, kao i dvonedeljna obustava uzimanja PPI i preparata na bazi soli bizmuta (91). Smatra se da je ovaj efekat posledica supresije *H. pylori*, koji je prvi put ilustrovan kada su 93 bolesnika sa potvrđenom infekcijom lečena lanzoprazolom (30mg/dan) u trajanju od 28 dana, nakon čega je kontrolni UBT pokazao negativan rezultat u 33% lečenih (92). Naknadnim testiranjem, 3., 7. i 14. dana od obustave terapije lanzoprazolom, 91%, 97% i 100% bolesnika imalo je pozitivan nalaz na prisustvo *H. pylori* (92).

#### **1.6.1.2. *H. pylori* serologija**

Serološko testiranje zasnovano na ELISA tehnologiji za detekciju IgG antitela predstavlja neinvazivni i lako dostupni test, široke upotrebne vrednosti u primarnom nivou zdravstvene zaštite (92). Ipak, zabrinutost u pogledu preciznosti ovog načina testiranja, umnogome je ograničila njegovu upotrebu. Iako ima relativno visoku senzitivnost (85-90%), varijabilnost u pogledu specifičnosti (76-96%) predmet su debate, da li serološko testiranje može dati pouzdane rezultate (92,93). IgG ELISA testiranjem se ne može sa sigurnošću isključiti aktivna infekcija u odnosu na raniju infekciju (93). Dodatno, pokazano je da je pozitivna prediktivna vrednost ovog testa u područjima sa relativno niskom prevalencom *H. pylori* infekcije, loša. Imajući to u vidu, UBT predstavlja daleko bolju alternativu (94).

#### **1.6.1.3. Fekalni antigen test**

Prisustvo *H. pylori* u uzorku stolice inficiranih bolesnika dovelo je do razvoja fekalnih test uzoraka (*stool antigen test*, SAT). Komercijalno dostupni enzimski imunoesej testovi predstavljaju jedan od najčešće korišćenih u primarnoj dijagnozi infekcije (91,92,94). Evaluacija preciznosti testa sprovedena je u više studija poređenjem sa UBT ili gornjom endoskopijom (95). Senzitivnost i specifičnost testa je 94% tj. 86%, respektivno. SAT predstavlja pouzdan izbor i u posteradikacionoj potvrdi uspešnosti terapije (93,95). Lažno pozitivni rezultati opisani su u onih sa aktivnim krvarenjem iz gornjih partija digestivnog trakta, najverovatnije uzrokovani unakrsnom reakcijom sa komponentama krvi (95, 96). Ograničenost ovog testa, baš kao i UBT-a uzrokovana je korišćenjem ureaze kao markera prisustva mikroorganizma. Ovo je pokazano ispitivanjem uspešnosti eradikacije 60 bolesnika sa biopsijom-potvrđenom infekcijom, lečenih bizmutom ili lanzoprazolom, kod kojih je konfirmacioni posteradikacioni SAT pokazao lažnu negativnost u 25% bolesnika lečenih lanzoprazolom tj. 15% bolesnika koji su bili na terapiji bizmutom (96). Premda su ove vrednosti niže u odnosu na vrednosti notirane korišćenjem UBT-a (testiranim u sličnim okolnostima), oba testa zahtevaju adekvatnu pre- i posteradikacionu pripremu u smislu obustave antibiotika i PPI terapije, a u cilju dobijanja adekvatnih rezultata, slično urea izdisajnom testu (92,93).

#### **1.6.2. Invazivni testovi**

Invazivni testovi zasnivaju se na sprovođenju ezofagogastroduodenoskopije (EGDS) i postavljanje dijagnoze *H. pylori* infekcije primenom ureaza testa, histologije ili bakterijske kulture.

##### **1.6.2.1. Ureaza test**

Brzi ureaza test (*rapid urease test*, RUT) je popularan invazivni test za detekciju *H. pylori* (92). Uzete biopsije antruma mogu se testirati na ureaznu aktivnost korišćenjem više sličnih tehnika približno

slične dijagnostičke preciznosti (97). Najčešći komercijalno dostupni testovi su *CLO-test*, *PyloriTek* i *Hp-fast*. Među njima, najčešće korišćeni je *CLO-test* (*Campylobacter-Like Organism*, Ballard Medical, Draper, UT). Ovom tehnikom, jedan ili dva uzorka tkiva postavljaju se na podlogu tzv. agar, koja sadrži ureu i pH reagens. Ureaza svojom aktivnošću razlaže ureu uz oslobađanje NH<sub>3</sub> i menjanje pH podloge, koja prelazi u alkalnu, što rezultira promenom boje (narandžasta prelazi u roze boje). Ova tehnika testiranja omogućava dobijanje rezultata najranije jedan sat nakon uzorkovanja (97). Studije su pokazale da povećanje broja uzetih uzoraka sa jedan na četiri, povećava senzitivnost testa, koja iznosi 90-95%, dok je specifičnost 95-100% (93,97). Ipak, lažno negativni rezultati mogu se javiti u bolesnika koji su u skorije vreme imali gastrointestinalno krvarenje ili koristili antisekretornu terapiju poput PPI, H<sub>2</sub> antagonista, antibiotika ili preparata sa bizmutom (92). U ovom slučaju, uzimanje većeg broja tkivnih uzoraka povećava senzitivnost testa i najbolji je način prevazilaženja ovog problema. Ipak, ureaza negativan test u bolesnika na antisekretornoj terapiji, ne isključuje automatski postojanje *H. pylori* infekcije (92,97).

### 1.6.2.2. Histologija

Histologija se smatra zlatnim standardom u pogledu direktne detekcije *H. pylori* (92). Osim što je brža i efikasnija metoda od RUT-a, histologijom se omogućava dobijanje informacija o postojanju znakova gastritisa ili intestinalne metaplazije (92). Preciznost histopatološke dijagnoze *H. pylori* zavisi od broja uzetih biopsija i lokacije sa kojih su iste uzete (98). Ukoliko je uzeta dovoljna količina uzorka sa adekvatnog mesta, dijagnoza se može postaviti i iz jednog bioptata. Ipak, imajući u vidu razlike u distribuciji *H. pylori* unutar mukoze želuca, a u cilju osiguravanja neophodne preciznosti, praksa je da se uzima više uzoraka iz područja antruma i korpusa želuca (99).

Dva najčešće korišćena bojenja su hematoksilin i eozin (H&E), u cilju detekcije inflamatornih ćelija i Gjemza bojenje, za evaluaciju prisustva patogena (98).

Prednost ovog testa u odnosu na RUT jeste direktna detekcija *H. pylori* uz istovremeno otkrivanje eventualnih displazija i metaplazija (99). Sa druge strane, osnovno ograničenje jeste podložnost subjektivnosti gastroenterologa i patologa u pogledu uzorkovanja i dalje obrade materijala, respektivno (99). Dodatno, interpretaciju otežava uzimanje anti-sekretorne terapije. Svakako treba napomenuti da je senzitivnost histologije, u ovim uslovima, veća od senzitivnosti invazivnog ureaza testa (93). Senzitivnost ovog testa može se povećati korišćenjem specifičnih bojenja poput Giemsa ili imuno bojenja (93,98).

### 1.6.2.3. *H. pylori* bakterijska kultura

Istorijski, kultivisanje *H. pylori* iz uzoraka biopsija želuca predstavljalo je izazov, dovodeći do visoke specifičnosti i niske senzitivnosti ovog dijagnostičkog testa (92). Ova procedura sprovodi se u specijalizovanim laboratorijama i nije rutinska metoda detekcije infekcije (91). Upotrebnu vrednost ima kako u naučne svrhe tako i u situacijama neuspeha prethodne eradikacione terapije.

Iako je kultura skup, komplikovan i dugotrajan test, ispitivanje antibiotske senzitivnosti primenom ovog testa, ima značajnu korist u kliničkoj praksi, a u svetlu visokih stopa antibiotske rezistencije *H. pylori*. Dodatno, izolacija *H. pylori* ima svoje mesto u istraživanjima genotipske i fenotipske rezistencije (91).

Komplikovanost procesa kultivisanja *H. pylori* zasniva se na specijalnim uslovima koje ovaj patogen zahteva, u pogledu mikroaerobne sredine (80-90% N<sub>2</sub>, 5-12% CO<sub>2</sub>, 5-10% O<sub>2</sub>) neophodne za rast, inkubacionog perioda od 5-7 dana pri temperaturi 37 °C (100). Primenjivane podloge mogu biti selektivne i neselektivne i to: *H. pylori* agar, Wang agar, Wilkins-Chalgren, Columbia i krvni agar. Antibiotici se koriste kako bi sprečili rast drugih bakterija. Nakon uzimanja biopsija, zasejavanje *H. pylori* mora se sprovesti brzo. Većina transportnih medijuma dozvoljava čuvanje uzoraka do 24h, na

temperaturi od 4 °C, dok se čuvanje izolata *H. pylori* vrši u uslovima temperature od – 80 °C. Noviji transportni medijumi poput GESA medijuma omogućavaju čuvanje uzoraka do 10 dana (100).

Rezultati procesa zasejavanja zavise od veštine i iskustva mikrobiologa, kvaliteta uzorkovanog tkiva, izlaganja aerobnoj sredini i od korišćenog transportnog medijuma (91). Takođe, pouzdanost rezultata podložna je uticaju gustine samog patogena u tkivu atrofičnog gastritisa (ukoliko je on prisutan), konzumiranog alkohola, krvarenja, primeni antibiotika i druge anti-sekretorne terapije (91).

Tabela 1. Pregled dostupnih testova u cilju postavljanja dijagnoze *H. pylori* infekcije uz pojedinačnu senzitivnost i specifičnost istih

Neinvazivni testovi	Prednost	Mana	Senzitivnost	Specifičnost
Urea izdisajni test	Visoka pozitivna i negativna prediktivna vrednost Može se koristiti pre i nakon eradikacije infekcije	Zahteva posebnu pripremu (lažno negativan u slučaju primene PPI, antibiotika ili preparata bizmuta). Zahteva veći broj zdravstvenog osoblja u cilju sprovođenja testa	>95%	>95%
Fekalni antigen test	Visoka pozitivna i negativna prediktivna vrednost Može se koristiti pre i nakon eradikacije infekcije	Može biti neprijatan za pacijenta. Zahteva posebnu pripremu (lažno negativan u slučaju primene PPI, antibiotika ili preparata bizmuta).	96%	97%
Serologija	Široko dostupan, ekonomski povoljan	Pozitivan rezultat može biti refleksija prethodne, a ne akutne infekcije. Ne može se koristiti kao posteradikacioni konfirmacioni test	85-90%	76-90%
PCR (stolica)	Mogućnost detekcije mutacija i antibiotske rezistencije, ne zahteva endoskopiju	Nije široko dostupan, uspeh zavisi od koncentracije <i>H. pylori</i> u stolici, skup, varijabilna senzitivnost	25-100%	100%
<b>Invazivni testovi</b>				
Ureaza test	Rezultati brzo dostupni, ne zahteva	Zahteva endoskopiju, manje precizan nakon ili	90%	93%

	patohistološku verifikaciju	tokom korišćenja PPI		
Histologija	Visoka senzitivnost i specifičnost, pogotovo pri korišćenju specijalnih i imuno bojenja. Omogućava vizualizaciju gastrične mukoze	Skup (troškovi endoskopije i patohistološke evaluacije), podložan interindividualnim varijacijama tumačenja od strane endoskopiste, zahteva iskusnog endoskopistu, preciznost uslovljenja primenom PPI i antibiotika	95%	99%
Bakterijska kultura	Specifičnost 100%, omogućava određivanje antibiotske senzitivnosti	Varijabilna senzitivnost, zahteva obučeno osoblje i adekvatno opremljene laboratorije, skup	55-100%	100%
PCR (biopsija)	Visoka senzitivnost i specifičnost. Moguća detekcija i mutacija i antibiotske rezistencije	Zahteva obučeno osoblje i adekvatno opremljene laboratorije, postoji rizik od kontaminacije. Proces duže traje.	95-100%	95-100%

PPI- proton pump inhibitors, PCR- polymerase chain reaction

#### 1.6.2.4. Polymerase chain reaction, PCR test

Primena molekularnih tehnika u detekciji infektivnih agenasa napravila je dramatične promene u kliničkoj evaluaciji i terapiji infektivnih bolesti. Polimerazna lančana reakcija (*polymerase chain reaction*, PCR) ima široku primenu u infektologiji, kako u detekciji patogena tako i u genotipizaciji, evaluaciji antibiotske rezistencije i epidemiološkim istraživanjima (91). PCR tehnika u postavljanju dijagnoze *H. pylori* infekcije spada u invazivne i neinvazivne dijagnostičke metode (101). Kao uzorci mogu se koristiti želudačni sok i bioptirani materijal, u sklopu invazivnih procedura ili uzorak fecesa ili pljuvačke, kada se ovaj proces smatra neinvazivnim.

Senzitivnost i specifičnost PCR-a je jako visoka, >95%, što ga čini trenutno najpouzdanijim dijagnostičkim testom (101). PCR omogućava pouzdane, brze i automatske rezultate, koji za razliku od ostalih testova, nisu podložni uticaju eventualnog gastrointestinalnog krvarenja (91,101).

U cilju uspešne ciklične amplifikacije, neophodan je adekvatan izbor gena. Najčešće korišćeni geni su ujedno i najistraživaniji faktori virulencije *H. pylori* i to: VacA, CagA, UreA, GlmM, 16SrRNK,

23SrRNK (102). U cilju povećanja specifičnosti i uspešnosti testa, pogotovo ukoliko se kao uzorak ne uzima biopat tkiva želuca, koriste se dva ili više target gena za amplifikaciju (103)

Razvoj i primena PCR tehnike omogućila je detekciju *H. pylori* i u uslovima spoljašnje sredine, poput vode za piće i higijenski neispravnog povrća (104). Na ovaj način, indirektno, primena PCR-a može doprineti redukciji infekcije *H. pylori*, imajući u vidu da loši sanitarni uslovi predstavljaju faktor rizika za razvoj infekcije (104).

Pored svih benefita ove relativno nove dijagnostičke metode, glavna mana iste jeste cena i iskustvo koji su neophodni u cilju njene adekvatne primene. Dodatno, lažno pozitivni rezultati mogu biti posledica detekcije DNK fragmenta prethodno eradikovanih bakterija (103,105).

## **1.7. Terapija**

Dostupan je veliki broj studija i smernica kada je u pitanju eradikacija *H. pylori* infekcije. Veći deo literature i preporuka nastao je u dobro razvijenim zemljama sa relativno skromnim doprinosom od strane slabije razvijenih i zemalja u razvoju (106,107). Osnovni principi antibiotske terapije sa preporukom o univerzalnoj aplikaciji su dostupni, ipak, lokalni problemi i ograničenja predstavljaju izazov u lečenju ove infekcije i doprinose varijabilnim statističkim podacima kada je eradikacija u pitanju (107).

Terapija *H. pylori* je heterogena, uslovljena nizom različitih faktora i često u diskrepanci sa zvaničnim smernicama (108). Pored zvaničnih preporuka, danas se primenjuje veliki broj različitih terapijskih režima koji predstavljaju „standardnu“ lokalnu i/ili regionalnu terapiju (45). Generalno, eradikaciona terapija *H. pylori* infekcije zasniva se na primeni antibiotika uz PPI i uz moguću suplementaciju probioticima (45). Lekovi izbora su klaritromicin, amoksisilin, metronidazol, antibiotici iz grupe fluorohinolona, tetraciklin. Dodatno, mogu se primenjivati i preparati na bazi bizmuta. Unutar lekova iz grupe PPI najčešći izbor su lanzoprazol, rabeprazol, ezomeprazol uz ograničenu dostupnost novijeg antisekretornog leka, vonoprazana (kalijum-kompetitivni inhibitor sekrecije želudačne kiseline) (45). Uspešnom eradikacijom smatra se eliminacija *H. pylori* u >90% tretiranih. Isključivo posmatrajući potentnost samih lekova, nezavisno od drugih modulišućih faktora domaćina, infektivnog agensa i spoljašnje sredine, uspešnost terapije zavisi od vrste i broja izabranih antibiotika, vrste antisekretornih lekova, načina primene, doze i dužine trajanja terapije (45).

### **1.7.1. Dvojna terapija**

Dvojna terapija zasnovana na primeni jednog antibiotika, dominantno amoksicilina uz PPI, nije deo preporuka za eradikaciju *H. pylori* (45,109,110). Ipak, heterogenost studija i razlike u metodologiji i samoj populaciji uključenih, dovele su do konfliktnih rezultata kada je primena ovog režima u pitanju. Naime, studije sprovedene, dominantno u azijskim zemljama, pokazale su visoku komplijantnost bolesnika kada je ovaj terapijski protokol u pitanju, uz zadovoljavajuću stopu eradikacije (111). Sa druge strane, istraživanja sprovedena na više hiljada stanovnika Evrope, pokazala su da čak i 14-dnevna terapija sa visokim dozama amoksicilina, nije dovela do uspešne eradikacije ovog patogena (112).

### **1.7.2. Trojna terapija**

U mnogim zemljama sveta, tradicionalna trojna terapija, PPI uz amoksisilin i klaritromicin (PPI-A+C) je još uvek terapija prvog izbora (45). Ova terapijska kombinacija je prva široko-priznata opcija koja je usledila nakon niza manje uspešnih trojnih terapijskih režima (108).

Glavna determinanta uspešnosti terapija jeste rezistencija na klaritromicin (45). Rastuća stopa rezistencije na antibiotike i trenutni podaci variraju u zavisnosti od geografskog područja (45,108,113). U područjima gde je primena klaritromicina visoka, očekuje se i visoka stopa

rezistencije na isti. Prema globalno prihvaćenom pragu tj. stopi rezistencije koja se smatra visokom, jesu vrednosti >15% (113). Pokazano je da u onim zemljama gde je rezistencija na klaritromicin >15%, stopa eradikacije, pri primeni PPI-A+C režima, ne prelazi 90% (45,114). U tom smislu, u poslednjih nekoliko decenija prisutni su napori usmereni ka napuštanju primene ovog modaliteta.

Dužina trajanja terapije još je jedan od faktora uspešnosti eradikacije (45,114). Pokazano je da 10-dnevna i 14-dnevna PPI-A+C terapija daje bolje rezultate u odnosu na sedam dana lečenja (115). Zagovornici ove opcije oslanjaju se na podatke iz dostupnih meta analiza koje ukazuju da dodatnih nedelju dana terapije, povećava stopu eradikacije za gotovo 10% (108). S tim u vezi, 7-dnevna trojna terapija gotovo je u potpunosti napuštena, sa izuzetkom primene u zemljama trećeg sveta, gde zbog loših ekonomskih uslova, dužina trajanja terapije ima značajnu ulogu u broju bolesnika kojima će uopšte biti omogućeno lečenje (108).

U cilju povećanja stope eradikacije, postavljena je hipoteza da veće doze antibiotika i PPI lekova doprinose boljoj uspešnosti izlečenja. S tim u vezi, velike opservacione studije su pokazale da visoka doza PPI (40mg/dan) u odnosu na standardnu dozu (20mg/dan) zaista doprinosi boljoj eradikaciji (45).

Ipak, pokazano je da bez obzira na dužinu trajanja terapije i dozu lekova, u područjima visoke rezistencije na klaritromicin (>15%), neće doći do optimalne eradikacije (>90%) (114).

### 1.7.3. Četvorostruka terapija

Prema aktuelnim svetskim preporukama (*The Maastricht VI/ Florence Consensus Report, Toronto Consensus, American College of Gastroenterology Clinical Guideline*) četvorostruka terapija sa preparatom bizmuta (*bismuth quadruple therapy, BQT*) ili konkomitantna ne-bizmut četvorostruka terapija (*non bismuth quadruple therapy, nonBQT*) predstavljaju prvu liniju izbora u eradikaciji *H. pylori* u uslovima visoke rezistencije na klaritromicin (>15%) (45). BQT se sastoji od PPI, bizmuta i dva antibiotika. Tradicionalno, to su najčešće metronidazol i tetraciklin. U poslednje vreme, drugi antibiotici poput amoksicilina i tinidazola su takođe uključivani u ovu kombinaciju (116). NonBQT podrazumeva PPI i tri antibiotika, najčešće amoksicilin, metronidazol i klaritromicin, ali moguće su i druge kombinacije. Iskustva iz svakodnevne kliničke prakse tj. tzv. *real world evidence* studija, su pokazala da u Evropi, obe terapijske opcije daju zadovoljavajuće rezultate, sa stopom eradikacije >90% (45).

Najčešće primenjivana i najviše istraživana je tradicionalna BQT kombinacija koja sadrži metronidazol. Preparat bizmuta (soli bizmuta) ima lokalno dejstvo i svoj baktericidni efekat ostvaruje posredstvom, još uvek nedovoljno istraženog, mehanizma koji uključuje bakterijski zid i periplazmatski prostor i inhibiciju sinteze adenzin trifosfata (ATP), adherencu za gastrični mukozni sloj (117). Još uvek nije prijavljeno postojanje rezistencije na bizmut (117,118). Bizmut subcitrat i bizmut subsalicilat su dve komercijalno dostupne formulacije (118). Bizmut subcitrat dostupan je kao nezavisna formulacija ali i u kombinaciji sa drugom dva leka, u okviru tri-u-jedan kapsule Pylere® (119). Pokazano je da baktericidna svojstva bizmuta u kombinaciji sa tetraciklinom imaju aditivno dejstvo koje prevazilazi visoku stopu rezistencije *H. pylori* na metronidazol (119). Dodatna prednost ovog terapijskog režima jeste mogućnost izbegavanja primene klaritromicina, pogotovo u sredinama gde preeradikaciona provera osetljivosti na antibiotike nije dostupna (45,119).

Sproveden je značajan broj studija sa primarnim ciljem utvrđivanja optimalne dužine trajanja BQT kao i uloge PPI i metronidazola u efikasnosti iste, pogotovo u regijama sa visokom rezistencijom na metronidazol (110). U velikoj meta analizi, koja je ispitivala efikasnost, neželjene efekte i adherencu vezanu za prvu liniju eradikacije primenom BQT, pokazano je da 7-dnevna terapija ima značajno manju efikasnost u odnosu na terapiju trajanja 10-14 dana. Naime, 10-dnevna tj. 14-dnevna BQT

ostvarila je stepen eradikacije >85% u svim ispitivanim regijama, uključujući i one sa visokom stopom rezistencije na metronidazol (116).

Istovremeno, pokazano je da, u komparaciji sa tradicionalnom trojnom terapijom, ova terapijska opcija daje bolje rezultate čak i pri 7-dnevnoj primeni (120). Ipak, imajući u vidu visoku stopu rezistencije na metronidazol i često izostanak mogućnosti ispitivanja rezistencije na antibiotike, smernice ukazuju da je optimalna dužina terapije 14 dana (45).

S obzirom da BQT podrazumeva četiri leka, u cilju smanjenja opterećenosti količinom lekova i povećanju komplijanse bolesnika, danas je dostupna i tzv. tri-u-jedan, kapsula Pylera®, gde se u jednoj kapsuli nalazi kombinacija metronidazola, tetraciklina i bizmuta, uz odvojeno uzimanje PPI (119).

U studiji koja je obuhvatala više od 6000 ispitanika, pokazana je zadovoljavajuća efikasnost (>90%) Pylera® kapsule, kako u prvoj, tako i u drugoj liniji eradikacije (119). Zadovoljavajući rezultati postignuti su nezavisno od visoke rezistencije na metronidazol uz, naizgled, odsustvo uticaja stope rezistencije na klaritromicin. Dodatno, ova terapijska opcija postiže optimalne rezultate čak i pri dužini trajanja od 10 dana, ukazujući da međusobna interakcija antibiotika u kapsuli uspeva da prevaziđe rastuću antibiotsku rezistenciju na „tradicionalne antibiotike“ (119).

Iako se primenom ove kapsule smanjuje opterećenje brojem konzumiranih lekova, Pylera® zahteva višekratnu primenu u toku dana (4x/24h), što može uticati na komplijansu, pogotovo, u onih bolesnika sa većim brojem komorbiditeta. Ipak, podaci iz evropskog registra o *H. pylori* (*Helicobacter pylori* European Registry, HpEuReg) ukazuju da je komplijansa pri primeni ovog terapijskog režima >95% (121).

Ograničena dostupnost bizmuta i tetraciklina u nekim zemljama, limitira široku primenu ove terapijske opcije (108,119,121).

U uslovima nedostatka podataka ili podatka o visokoj stopi rezistencije na klaritromicin, uz istovremeno nedostupnost BQT, prva terapijska opcija je konkomitantna nonBQT terapija (45). NonBQT uključuje sekvencijalnu, konkomitantnu i hibridnu terapiju (110). Konkomitantna četvorostruka terapija podrazumeva istovremenu primenu tri antibiotika, najčešće amoksicilin, metronidazol i klaritromicin uz primenu PPI (122). Sekvencijalna terapija podrazumeva 7-dnevnu primenu amoksicilina i PPI, nakon čega se sedam dana primenjuje metronidazol, klaritromicin i PPI (122). Hibridna terapija podrazumeva 14 dana primene amoksicilina i PPI uz primenu metronidazola i klaritromicina prvih ili drugih sedam dana (u tom slučaju se radi o tzv. reverznoj hibridnoj terapiji) (122). Strukturno, suštinska razlika između ovih terapijskih režima leži u dužini ekspozicije određenim antibioticima, dok su sam broj i vrsta antibiotika identični.

Osnovni nedostatak nonBQT terapijske opcije jeste neizbežna primena barem jednog „neželjenog antibiotika“, klaritromicina i/ili metronidazola (123). U uslovima niske rezistencije na klaritromicin, diskutabilna je prednost ove terapije u odnosu na standardnu trojnu terapiju (45). Ipak, imajući u vidu globalno rastuću antibiotsku rezistenciju, smatra se da ukoliko ne postoji podatak o stopi rezistencije na klaritromicin, treba izbegavati trojnu eradikacionu terapiju. U slučaju dualne rezistencije (na klaritromicin i metronidazol) terapija izbora je BQT (45).

Interpretacija rezultata studija komparacije efikasnosti različitih modaliteta nonBQT terapijske opcije zahteva poseban oprez, imajući u vidu heterogenost metodologije u pogledu dužine trajanja terapije. Pokazano je da 10-14-dnevna konkomitantna nonBQT ostvaruje bolje rezultate u odnosu na sekvencijalnu terapiju istog trajanja (124). Ova superiornost može se objasniti dužom ekspozicijom određenim antibioticima (124).



Uticaj dužine trajanja terapije na efikasnost određenog terapijskog režima još uvek je predmet debate. Naime, prospektivna randomizovana studija sprovedena u Grčkoj u kohorti od 364 ispitanika, nije pokazala značajnu razliku u efikasnosti konkomitantne četvorostruke terapije u pogledu dužine trajanja iste (10-dnevna vs 14-dnevna terapija) uz suboptimalnu efikasnost u oba slučaja (125). Sa druge strane, podaci iz kliničke prakse u Italiji ukazali su da se primenom 14-dnevne konkomitantne nonBQT ostvaruje optimalna i značajno bolja efikasnost u odnosu na isti terapijski režim, ali u trajanju od 10 dana (126). Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz HpEuReg-a gde je prikazana značajna superiornost 14-dnevne terapije u odnosu na 10-dnevnu (121).

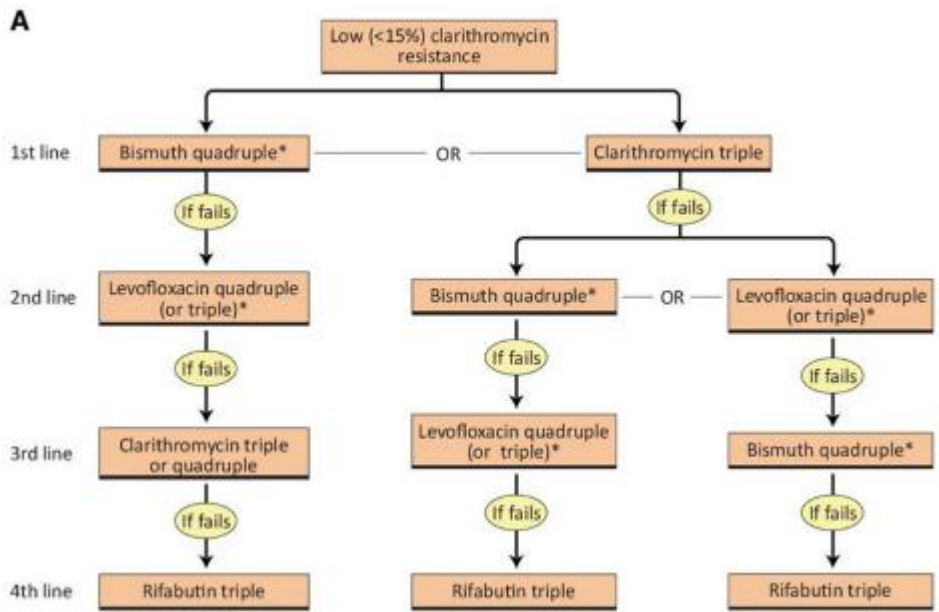
U cilju optimalizacije efikasnosti eradikacije *H. pylori*, postavljena je hipoteza da doza PPI ima ulogu u ishodu lečenja. Pokazano je da PPI ispoljavaju *in vitro* baktericidno dejstvo (127). *In vivo*, antisekretorni lekovi utiču na dejstvo antibiotika kroz mehanizam podizanja intragastrične pH, što u daljoj kaskad utiče na „prodiranje“ antibiotika kroz mukusni sloj do mukoze, njihovu stabilnost i antibakterijsku aktivnost (127,128). Elevacija pH stimuliše replikaciju bakterija, te je čini osetljivom na dejstvo antibiotika. Odgovor na primenu PPI umnogome zavisi od kapaciteta tj. brzine kojom se ovi lekovi metabolišu na nivou jetre. Ovaj proces zavisi od citohrom 2C19 enzima (*cytochrome 2C19*), koji metaboliše ovu grupu lekova kao i od njegovog polimorfizma (CYP2C19) (129). Pokazano je da u odnosu na azijsku populaciju, bela rasa ima veću prevalencu enzima koji vrše tzv. brzi metabolizam (*extensive metabolizers*) PPI, što sekundarno utiče na efikasnost eradikacione terapije (129).

Podršku hipotezi o uticaju doze PPI na efikasnost terapije dali su izveštaji opservacionih studija fokusiranih na efikasnost primene trostruke, klaritromicin ili metronidazol-dominantne terapije, u kojima je pokazano da primena omeprazola u visokim dozama (80mg/dan) ostvaruje značajno bolje (i optimalne) rezultate u odnosu na primenu standardne doze (40mg/dan) (130). Uticaj doze PPI na efikasnost četvorostruke terapije i dalje je predmet debate, primarno uzrokovane nedostatkom konzistentnih studija dizajniranih tako da omoguće adekvatnu komparaciju. Na osnovu trenutno dostupnih dokaza, smatra se da doza PPI nema značajnog udela u efikasnosti BQT. Sa druge strane, standardna i visoka doza antisekretornih lekova u nonBQT modalitetu ostvaruje bolje rezultate u odnosu na lečenje istim modalitetom uz primenu niskih doza PPI (130). Primena visokih doza lanzoprazola (40mg/dan), rabeprazola (40mg/dan) i ezomeprazola (80mg/dan) omogućava postizanje relativno dugotrajne i stabilne supresije želudačne kiseline, nezavisno od CYP2C19 genotipa (131).

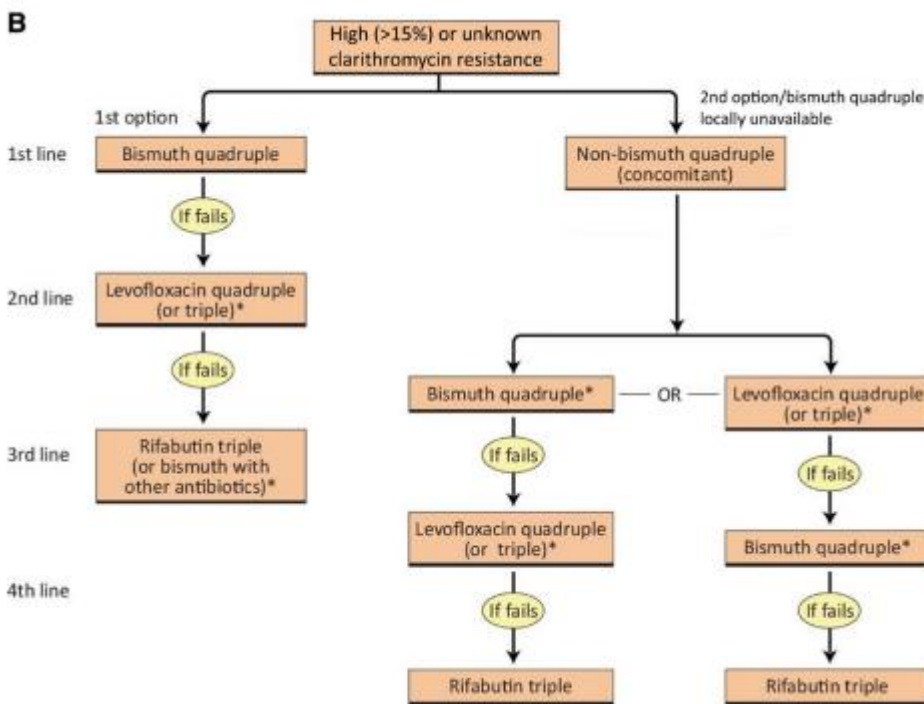
Optimalna eradikacija *H. pylori* zahteva dugotrajnu inhibiciju sekrecije gastrične kiseline, sa stvaranjem sredine pH vrednosti 6-7, pogotovo tokom noćnih sati. Trenutno dostupni, tradicionalni, antisekretorni lekovi, nemaju sposobnost supresije želudačne kiseline 24h (132).

Noviji antisekretorni lekovi iz grupe blokatora agonista kalijumskih kanala (*potassium-channel agonists blocker*, P-CAB) sa svojim jedinstvenim farmakokinetiskim karakteristikama, predstavljaju korak napred ka prevazilaženju problema inhibicije aktivnosti parijetalnih ćelija (133). Vonoprazan, najpoznatiji lek iz ove grupe, ima stabilan i dugotrajan antisekretorni profil, nezavistan od CYP2C19 genotipa (134). U Japanu je komercijalno dostupan od 2015. godine i deo je trojne terapije (uz amoksicilin i klaritromicin) koja se koristi kao prva linija eradikacije, sa sličnim profilom komplikacije i neželjenih efekata u odnosu na standardnu trojnu terapiju (133). Kada je u pitanju efikasnost, velika meta analiza, sa obuhvatanjem 16 studija, pokazala je superiornost ove kombinacije u odnosu na standardnu trojnu terapiju, kako u prvoj, tako i u drugoj liniji lečenja (134). Osnovna prednost, za koju se smatra da je zasluga primene vonoprazana, jeste visoka stopa eradikacije u bolesnika sa *H. pylori* sojevima rezistentnim na klaritromicin (135).

Konačno, prema izveštaju HpEuReg-a, konkomitantnu nonBQT karakteriše veća komplikacija uz zanemarljivu razliku u učestalosti i težini neželjenih efekata, s toga predstavlja terapiju izbora u prvoj liniji eradikacije, u slučaju nedostupnosti BQT, a u uslovima visoke ili nepoznate stope rezistencije na klaritromicin (116).



Slika 3. Algoritam terapije *H. pylori* infekcije u slučaju niske stope rezistencije na klaritromicin (Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. Gut. 2022 Aug 8:gutjnl-2022-327745)



Slika 4. Algoritam terapije *H. pylori* infekcije u slučaju visoke (ili nepoznate) stope rezistencije na klaritromicin (Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. Gut. 2022 Aug 8:gutjnl-2022-327745.)

#### 1.7.4. Terapija druge linije izbora

Kako je prethodno izneto, kao prva linija terapije, još uvek (mada sa tendencijom opadanja) najčešće se propisuje standardna trostruka terapija, koja mahom ne daje zadovoljavajuće rezultate. Alternativne kombinacije obuhvataju BQT ili nonBQT, konkomitantnu ili sekvencijalnu, sa značajno većom uspešnošću, pogotovo u zemljama zapadnog sveta (110). Ipak, uzimajući u obzir, dominantno, rastuću antibiotsku rezistenciju, u uslovima perzistentne *H. pylori* infekcije, prvi eradikacioni pokušaj, neće uvek dati zadovoljavajuće rezultate.

Izbor adekvatne terapije nakon primarnog neuspeha predstavlja vodeći izazov, imajući u vidu da neeradikovani bakterijski sojevi postaju manje osetljivi na sledeću terapijsku opciju, mehanizmom prostog preživljavanja već prethodno rezistentnih sojeva ili razvojem *de novo* rezistencije (136). U tom smislu, u idealnim uslovima, odabir druge linije terapije bio bi vođen rezultatima ispitivane antibiotske osetljivosti tj. rezistencije (136,137). Ukoliko ne postoje uslovi za ispitivanjem iste, odluka o terapiji bazira se na lokalnim epidemiološkim podacima, anamnestičkim podacima o prethodnoj upotrebi antibiotika kao i na ličnom iskustvu samog lekara (137).

U slučaju neuspeha eradikacije primenom terapije bazirane na klaritromicinu (standardne trojne ili nonBQT), empirijska primena druge linije terapije predstavlja veliki izazov, imajući u vidu prethodnu primenu tri najčešće korišćena antibiotika, klaritromicin, metronidazol i amoksicilin (45). Ponavljanje iste terapijske kombinacije nema praktičnog značaja, imajući u vidu očekivanu visoku antibiotsku rezistenciju (137). Ponavljanje standardne trojne terapije, nakon njenog primarnog neuspeha, daje efikasnost u eradikaciji u svega 47% (45). U tom slučaju, kao druga linija najčešće se primenjuje BQT. Velika meta analiza, sa 30 komparativnih studija, pokazala je da primena BQT u drugoj liniji terapije daje zadovoljavajuće rezultate (efikasnost >90%), uz relativno jednaku učestalost neželjenih efekata (119). Alternativno, levofloksacin trojna ili četverostruka terapija (uz dodavanje bizmuta) pokazale su se uspešnim u drugoj liniji terapije (121). Na osnovu podataka iznetih u čak 26 randomizovanih kliničkih studija, četverostruka levofloksacin-bazirana terapija, u trajanju od najmanje 10 dana, pokazala je neinferiornost u pogledu efikasnosti uz notiranu bolju tolerabilnost u odnosu na BQT (138). Bizmut ispoljava sinergistično dejstvo sa antibioticima, na taj način facilitirajući i prevazilazeći rezistenciju na klaritromicin i levofloksacin (139). Dodatni značaj ove terapijske opcije vidljiv je u slučaju dvojne rezistencije, na klaritromicin i metronidazol (137).

Nažalost, u poslednjih nekoliko godina primetan je porast rezistencije na fluorohinolone (140). Ova činjenica dodatno je otežala, već izazovan proces eradikacije perzistentne *H. pylori* infekcije. Kao alternativne metode, postoji mogućnost primene dvoje terapije sa visokim dozama PPI i amoksicilina (141). Ova terapijska opcija dala je uspešne rezultate dominantno u azijskim zemljama. Imajući u vidu vremenski-zavisno baktericidno dejstvo amoksicilina, efikasnost terapije uslovljena je frekvencom doziranja. Direktnom komparacijom primene amoksicilina u tri tj. četiri dnevne doze, značajno bolje rezultate dala je terapija podeljena u više dnevnih (4x vs 3x) doza amoksicilina (141). Visoka efikasnost notirana je i kod vonoprazan-amoksicilin terapijske kombinacije (133,141).

Izuzetno, u slučaju prethodnog neuspeha ili nedostupnosti bizmut-bazirane terapije, dvojne ili trojne rezistencije, zadovoljavajuće rezultate u eradikaciji *H. pylori* daje trojna terapija zasnovana na rifabutinu (142,143). Ipak, imajući u vidu neutropeniju kao neželjeno dejstvo primene ovog leka, treba biti oprezan kod doziranja istog (143).

#### 1.7.5. Terapija treće linije izbora

Poznato je da su antibiotska rezistencija i komplijansa bolesnika osnovne determinante uspeha eradikacije *H. pylori* infekcije. Primena terapije treće linije izbora implicira prethodnu (neuspešnu) primenu većeg broja antibiotika, perzistentnih multi-rezistentnih sojeva *H. pylori* te u tom smislu predstavlja najveći terapijski izazov. Iskustva iz svakodnevne kliničke prakse evropskih gastroenterologa, pokazala su lošu adherentnost u pogledu optimizacije primenjivanih terapijskih

modaliteta (116). Naime, svega 56% terapija propisano je u trajanju od 14 dana, 53% sa visokom dozom PPI, dok je ponavljanje primene klaritromicina nakon dva terapijska neuspeha bilo zastupljeno u čak 73% slučajeva (116).

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, efikasna eradikacija (>90%) postignuta je primenom 14-dnevne četverostruke terapije sa bizmutom, 10-dnevne tri-u-jedan kapsule Pylera® i 14-dnevne terapije sa levofloksacinom (144).

U cilju maksimizacije uspeha trenutno dostupnih terapijskih režima, a u uslovima empirijske primene istih, neophodna je optimizacija u propisivanju i adherentnost u primeni istih (130).

### **1.7.6. Maastricht VI konsenzus**

Značajan progres u lečenju *H. pylori* infekcije i reevaluacija ključnih aspekata u pogledu kliničkog značaja *H. pylori* infekcije napravljeni su i izneti u šestoj ediciji Maastricht/Florence konsenzusa (Maastricht/Florence 2021 Consensus Report) uz uključivanje 41 eksperta iz 29 zemalja (45). Holistički pristup kroz podeljenost u pet radnih grupa omogućio je sagledavanje ovog kompleksnog problema iz više uglova uz iznošenje rezultata svih pojedinačnih radnih grupa i zajedničkog glasanja u cilju donošenja zaključaka i dokaza različite jačine, sa ciljem formiranja smernica najvećeg stepena relevantnosti sa mogućnošću globalne primenjivosti (45).

*Maastricht* konsenzus omogućava sublimaciju svih dostupnih, relevantnih randomizovanih kliničkih studija, meta analiza i sistemskih pregleda, te subsekventno iznošenje preporuka i smernica u pogledu dijagnoze i lečenja.

Nedvosmisleno, u slučaju pojave simptoma dispepsije nepoznate etiologije, kod osoba mlađih od 50 godina, indikovano je testiranje na prisustvo *H. pylori* i to primenom neinvazivnih dijagnostičkih testova, tzv. *test and treat* strategija (45). Kod osoba starijih od 50 godina, sa simptomima dispepsije i sa prisutnim alarmnim simptomima (anemija, krvarenje, palpabilna masa u trbuhu, gubitak u telesnoj masi, disfagija), potrebna je endoskopska evaluacija (145). Potvrda dijagnoze *H. pylori* zahteva eradikaciju iste. Mesec dana nakon sprovedene eradikacione terapije, neophodno je sprovesti posteradikacioni potvrđni test uspešnosti primenjenog terapijskog režima (45).

Fokus novog *Maastricht* konsenzusa jeste odgovorna primena antibiotika u skladu sa osetljivošću *H. pylori* na iste. Ukoliko postoji mogućnost, savetuje se testiranje antibiotske rezistencije uz izbegavanje primene onih, na koje postoji visoka rezistencija, >15%. Zvanično, dostupno je više invazivnih i neinvazivnih metoda procene antibiotske rezistencije. U slučaju nemogućnosti pre-terapijske procene antibiotske rezistencije, izbor se zasniva na podacima o lokalnoj rezistenciji (45).

Terapija prve linije izbora podrazumeva četverostruku BQT (u vidu tri-u-jedan kapsule Pylera® odnosno tradicionalne kombinacije) ili ukoliko ista nije dostupna, konkomitantnu nonBQT (45). Neuspeh prvog pokušaja eradikacije, zahteva promenu antibiotika. Terapija druge linije može biti levofloksacin-bazirana terapija (trojna ili četverostruka) ili četverostruka terapija sa bizmutom (ukoliko nije primenjena kao prvi izbor). Nakon dva neuspela pokušaja eradikacije, od esencijalne je važnosti provera osetljivosti na antibiotike, te izbor adekvatne terapije (45,137). Najčešće su to levofloksacin ili rifabutin-bazirana terapija (138,143).

### **1.7.7. Evropski registar *H. pylori* infekcije (*Helicobacter pylori* European Registry, Hp-EuReg) i pozicija Srbije**

Kompleksnost lečenja *H. pylori* infekcije ogleda se kroz veliki broj terapijskih modaliteta, protokola i modulišućih faktora na ishod lečenja. Podaci iz kliničkih studija će uvek biti predmet dilema i kontroverzi uzimajući u obzir heterogenost u dizajnu istih i nemogućnost sprovođenja jedne velike randomizovane studije koja bi mogla simultano evaluirati sve postojeće terapijske opcije.

Alternativno, meta analize mogu izneti prihvatljive, sublimirane podatke, uz analizu i komparaciju podataka iz različitih studija. Ipak, podaci kliničkih istraživanja ne mogu se uvek ekstrapolirati na svakodnevnu kliničku praksu, najviše usled heterogenosti bolesnika koji nisu uvek reprezentovani u strogo kontrolisanim randomizovanim studijama. Dodatno, implementacija zvaničnih preporuka je često otežana i uslovljena nizom, dominantno socio-ekonomskih faktora, te njihova potpuna penetracija, nažalost, nastupi suviše kasno.

Evropski registar o terapiji *Helicobacter pylori* (*European Registry on Helicobacter pylori*, Hp-EuReg) nastao je 2013. godine (116). Cilj ovog projekta bio je da u realnom vremenu donese informacije iz svakodnevne kliničke prakse gastroenterologa širom Evrope kada je u pitanju dijagnoza i lečenje *H. pylori* infekcije. Heterogenost evropske populacije diktira heterogenost u prevalenci *H. pylori*, stope antibiotske rezistencije i, najvažnije, heterogenost primenjivanih terapijskih modaliteta (116). Sa preko 60.000 uključenih iz više od 30 zemalja i preko 300 gastroenterologa, ovaj registar predstavlja najambiciozniji projekat kada je evaluacija lečenja *H. pylori* u pitanju.

Srbija je deo Hp-EuReg-a od njegovog osnivanja, 2013. godine (146). Prema podacima iz registra, a na osnovu prikupljenih podataka iz 10 različitih kliničkih centara širom Srbije, terapija prve linije izbora u Srbiji je 14-dnevna konkomitantna nonBQT uz primenu visokih doza PPI (146). Step en eradikacije ovog modaliteta iznosi >95%. U skladu sa preporukama iz *Maastricht* konsenzusa, kao najčešća terapija druge linije jeste levofloksacin-bazirana terapija ili tri-u-jedan kapsula Pylera®, koja je ujedno i najčešća treća opcija u slučaju prethodnih neuspeha u eradikaciji (146). Komplementarnost zvaničnih preporuka i primenjivanih terapijskih opcija u našoj zemlji, ohrabruje da u svetlu sve većih izazova u eradikaciji *H. pylori*, brza i tačna implementacija može dati zadovoljavajuće rezultate.

### **1.8. Izazovi u eradikaciji *H. pylori***

Eradikacija *H. pylori* nastavlja da bude globalni izazov lekarima na svim nivoima zdravstvene zaštite. Osim što predstavlja infektivni agens, te kao takva, zahteva lečenje bez obzira na prisustvo simptoma, *H. pylori* ima značajno mesto u patogenezi mnogih gastrointestinalnih bolesti uz potvrđenu ulogu u procesu kancerogeneze kada je karcinom želuca u pitanju i povezanost sa brojnim ekstraintestinalnim bolestima (64). Imajući u vidu kompleksan odnos između domaćina, patogena i spoljašnje sredine uz modulišući efekat niza drugih faktora, jasno je da proces eradikacije zahteva holistički pristup i simultano delovanje na više faktora rizika.

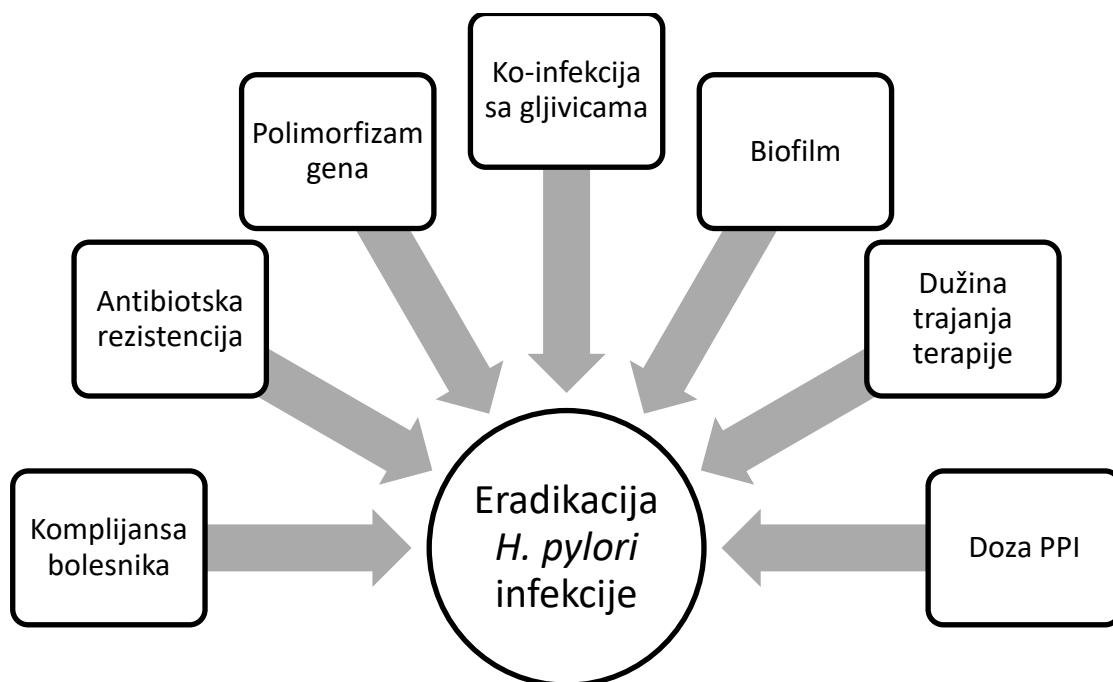


Figura 1. Faktori koji utiču na uspeh eradikacione terapije *H. pylori* infekcije

PPI- proton pump inhibitors

### 1.8.1. Antibiotiska rezistencija

Antibiotiska rezistencija jedna je od glavnih determinanti ishoda lečenja *H. pylori* infekcije (147). U poslednjih nekoliko godina primetan je pad stope eradikacije simultano sa povećanjem stope antibiotiske rezistencije (136). Neadekvatna i prekomerna primena antibiotika u tretiranju drugih infekcija, ponavljanje istih terapijskih protokola nakon primarnog neuspeha u eradikaciji, neki su od faktora koji simultano doprinose antibiotskoj rezistenciji i lošem ishodu lečenja (148).

Monitoring antibiotiske rezistencije na evropskom nivou sprovodi se od 1998. godine uz ispitivanje osetljivosti *H. pylori* na antibiotike koji se u različitim režimima koriste u pokušaju eradikacije, dominantno klaritromicin, metronidazol i levofloksacin, uz amoksicilin i tetraciklin, čija stopa rezistencije ima stabilno nizak stepen (149). Velika evropska opservaciona studija sa više od 1200 ispitanika iz 24 različita zdravstvena centra i 18 zemalja, ispitivala je rezistenciju *H. pylori* na klaritromicin, metronidazol i levofloksacin (149). Rezultati objavljeni 2018. g. ukazali su na izrazito visoku rezistenciju na sva tri antibiotika i to: klaritromicin 24%, levofloksacin 15% i metronidazol 35%. Istovremeno, uočen je značajan trend porasta rezistencije u prethodne dve decenije, od 1998. do 2018. godine. Visoke stope antibiotiske rezistencije pratile su pad u uspešnosti eradikacije (<90%) uz nezadovoljavajući trend propisivanja terapijskih režima koji su bili u koliziji sa rezultatima stope antibiotiske rezistencije (23,149). Uprkos tome što je rezistencija na klaritromicin uočena još 90-ih godina prošlog veka, sa jasno uočenim padom u efikasnosti u predstojećim decenijama, trostruka klaritromicin-bazirana terapija nastavlja da bude najčešće propisivani terapijski režim i to u regiji zapadne i jugozapadne Evrope (>50%) i severne Evrope (>60%) (116). Rastuća stopa rezistencije beleži se na globalnom nivou i to: rezistencija na klaritromicin u Italiji i Japanu iznosi ~30%, Turskoj ~40%, Kini ~50% dok je u Severnoj Evropi nešto niža (~15%) (147). Prema preliminarnim podacima iz Srbije od pre nekoliko godina, a dostupnim u Hp-EuReg registru primarna rezistencija na klaritromicin iznosi 23%, a na levofloksacin 8% (146). Dvojna ili trojna rezistencija tj. rezistencija na dva ili antibiotika jednog terapijskog modaliteta dodatno otežava i smanjuje uspešnost lečenja (130). Rezistencija je dodatno potencirana primenom istih antibiotika u drugoj ili trećoj liniji izbora, a nakon primarnog eradikacionog neuspeha (130,137). Primena levofloksacina u terapiji rezistentnih

*H. pylori* sojeva povećava rizik za terapijski neuspeh čak osam puta, dok je u slučaju primene metronidazola taj rizik uvećan tri puta (149).

Značaj antibiotske rezistencije kao globalnog problema prepoznat je i od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) koja je klaritromicin-rezistentnu *H. pylori* postavila kao prioritetnu u smislu daljeg istraživanja antibiotske rezistencije. S tim u vezi, antibiotska rezistencija ima centralno mesto u kreiranju nacionalnih i internacionalnih vodiča i terapijskih algoritama (109).

Postizanje optimalne eradikacije tj. maksimalne terapijske efikasnosti uz minimalne neželjene efekte podrazumeva poznavanje antibiotske rezistencije targetiranog soja *H. pylori* (107). Lokalna heterogenost u dostupnosti antibiotika i njihovo nekritičko propisivanje u lečenju drugih infekcija diktira stepen antibiotske rezistencije tj. osetljivosti *H. pylori* na primenjenu antibiotsku terapiju. Empirijska terapija koja uzima u obzir lokalne stope infekcije može biti bolji prediktor uspešnosti terapije. U tom smislu, lokalni obrasci rezistencije i stepen efikasnosti u kontekstu specifičnog okruženja i okoline su od ključnog značaja u formiranju optimalnog terapijskog modaliteta i njihove primene u „realnim okolnostima“ (107). Empirijska terapija bez prethodnog uvida u antibiotsku rezistenciju, potencira neadekvatnu primenu jednog i/ili više antibiotika i doprinosi dodatnom porastu globalnog problema antibiotske rezistencije (121,137). S tim u vezi, ispitivanje antibiotske osetljivosti *H. pylori* prepoznato je kao potencijalno rešenje prethodno pomenutog problema.

U dosadašnjoj kliničkoj praksi, detekcija antibiotske rezistencije uglavnom se bazirala na metodi bakterijske kulture tj. kultivisanja uzoraka bioptata uzetih tokom sprovođenja gornje endoskopije, a u cilju dijagnostikovanja prisustva *H. pylori*. Na ovaj način, moguće je utvrditi rezistenciju tj. osetljivost na sve primenjene antibiotike (147,148). Alternativno, poslednjih godina, postali su dostupni i testovi zasnovani na PCR tehnici detekcije tačkastih mutacija koje dovode to rezistencije *H. pylori*. Ovo metodom moguće je utvrditi rezistenciju na klaritromicin i fluorohinolone (150). Prednost PCR tehnike zasniva se na uštedi vremena (kultivisanje sojeva *H. pylori* traje najmanje 10 dana) i jednostavnijem uzorkovanju, s obzirom da konvencionalni metod zasnovan na kulturi zahteva značajnu količinu uzorka koju je, uglavnom, teško dobiti nakon neuspeha eradikacije prve linije terapije, te nemogućnost izolacije u velikom broju slučajeva (137,150).

Imajući u vidu potencijalni benefit individualizovanog pristupa u tretiranju *H. pylori* infekcije, zasnovanog na proceni antibiotske rezistencije, postavlja se pitanje, u kom trenutku tokom procesa lečenja bi trebalo primeniti testove procene antibiotske osetljivosti. Preporuke *Maastricht V* i *Maastricht VI* konsenzusa potenciraju neuspeh prve linije terapije kao trenutak kada bi trebalo primeniti neku od dostupnih metoda procene antibiotske rezistencije (45,151). Ipak, podaci zasnovani na dokazima koji bi potkrepljivali ovaj stav još uvek su predmet debate. Još 2010. godine, meta analiza sprovedena od strane *Wenzhena* i saradnika, ukazala je na prednost trostruke individualizovane terapije, u odnosu na trostruku empirijsku terapiju (152). Dodatno, *Chen* i saradnici su u velikoj meta analizi koja je uključivala randomizovane i nerandomizovane kliničke studije, utvrdili značajno bolji ishod prve i druge linije individualizovane terapije u odnosu na empirijsku (153). Sa druge strane, do sada najveća meta analiza, sa preko 40 randomizovanih studija, sprovedena od strane *Gisberta* i saradnika, dala je kontroverzne rezultate (137,154). Naime, primena terapijskih protokola u skladu sa najnovijim preporukama aktuelnih internacionalnih vodiča (a koja se zasniva na konkomitantnoj četvorostrukoju terapiji sa ili bez bizmuta), nije bila inferiornija u odnosu na tzv. „tailored“ terapiju zasnovanu na bakterijskoj kulturi. Treba naglasiti da velika većina dosadašnjih „head to head“ studija se odnosila na prvu linije terapije. Dostupni podaci za drugu i treću terapijsku liniju, iako oskudni, dali su slične rezultate u smislu nedostizanja statistički značajne razlike komparacijom ova dva terapijska pristupa (153). Ipak, zajednički nedostatak svih ovih studija jeste relativno mali broj ispitanika u kojih je ispitivana osetljivost na antibiotike u odnosu na ukupan broj tretiranih (148). Većina studija ispitivala je rezistenciju na svega 50-60% ispitanika. Drugi kontroverzni aspekt primene individualizovanog principa lečenja jeste ekonomska isplativost tj. potencijalno dodatno opterećenje finansijskog sistema države, a imajući u vidu kompleksnost

procedure i neophodnost invazivnog pristupa pri proceni osetljivosti *H. pylori* na antibiotsku terapiju, koji bi se inače izbegao primenom neinvazivnih dijagnostičkih testova (137). Ipak, dosadašnje studije pokazale su da, imajući u vidu heterogenost internacionalnih zdravstvenih sistema, nije moguće doneti uniformni stav (155). Potencijalna procena antibiotske rezistencije iz uzorka stolice, kao neinvazivnog testa, predstavlja budućnost, kako u pogledu testiranja većeg broja bolesnika, tako i sa aspekta ekonomske isplativosti (137,156).

Pored mogućnosti kreiranja individualizovanih terapijskih režima, dodatna prednost primene testova procene osetljivosti na antibiotike jeste utvrđivanje i dalje praćenje stope antibiotske rezistencije, smanjenje neadekvatne i nekritičke primene antibiotika i indirektni globalni doprinos smanjenu rastuće stope rezistencije. Ipak, pitanje pravovremenog trenutka u kojem je opravdano sprovođenje testova osetljivosti ostaje predmet dilema i kontroverzi. Stav *Maastricht VI* konsenzusa jeste da se rutinsko testiranje primenjuje kod prethodno nelečenih bolesnika, isključivo u visoko-specijalizovanim centrima i na taj način omogućiti utvrđivanje antibiotske rezistencije i njen efekat na stopu eradikacije (45). Najbolji primer značaja procene antibiotske rezistencije u smislu lokalno-specifičnih razlika u osetljivosti *H. pylori* sojeva jeste činjenica da standardna trojna klaritromicin-bazirana terapija (koja u većini regijama beleži suboptimalnu efikasnost), u severnoj Evropi i nekim delovima centralne Evrope (Slovenija), zahvaljujući niskoj stopi rezistencije na klaritromicin (<15%), beleži zadovoljavajuće stope eradikacije (>90%) (116). U svakodnevnoj kliničkoj praksi, ukoliko je to moguće, savetuje se procena rezistencije nakon neuspeha prve terapijske linije, a u cilju izbegavanja primene istih antibiotika, što je, kako je prethodno pomenuto, dodatni kontributor rastućoj rezistenciji na antibiotike (45).

### 1.8.2. Polimorfizam gena

Poznato je da uprkos zvaničnim preporukama, eradikaciona terapija *H. pylori* podrazumeva veliku heterogenu grupu, sa više od 20 terapijskih režima. Ipak, zajednički činilac većine modaliteta jeste PPI. Ovi antisekretorni lekovi vrše ireverzibilnu inhibiciju H/K-ATP-azne pumpe i koriste se u bolestima poput GERB-a i PUD-a (157). Farmakokinetika i farmakodinamika ovih lekova razlikuje se u zavisnosti od toga da li pripadaju lekovima prve ili druge generacije (158). Najpoznatiji predstavnici su omeprazol i lanzoprazol kao lekovi prve tj. ezomeprazol, rabeprazol i pantoprazol kao predstavnici druge generacije PPI. Stepem u kojem se ovi lekovi metabolišu na nivou jetre umnogome diktira njihovu efikasnost (158).

Visoko polimorfni CYP2C19 enzim pripada CYP450 grupi enzima, zaslužan za metabolizam i eliminaciju prve generacije PPI, omeprazola i lanzoprazola (~80%), uz manju aktivnost CYP3A4 (159). Za razliku od njih, PPI druge generacije, ezomeprazol i rabeprazol su manje zavisni od ovog enzima (159,160). Rabeprazol se metaboliše do nivoa *teater*-rabeprazol jedinjenja, u dominantno neenzimskom procesu, koji je minimalno zavistan od CYP2C19 aktivnosti (159).

Pokazano je da polimorfni CYP2C19 fenotipovi mogu uticati na ishod lečenja *H. pylori*, a na terenu metabolizma PPI (159). Poznata su tri alela CYP2C19 gena, koja se eksprimiraju kroz nekoliko fenotipova. Kao klinički značajni izdvajaju se: ekstenzivni ili normalni metabolizatori (*extensive metabolizer*, EM), intermediarni metabolizatori (*intermediate metabolizer*, IM), loši metabolizatori (*poor metabolizer*, PM) i ultra-brzi metabolizatori (*ultra-rapid metabolizer*, UM) (161). UM i EM metabolišu PPI velikom brzinom te su s toga potrebne veće doze ovog leka u cilju postizanja istog efekta tj. terapijske doze kao pri primeni u osoba sa IM i PM. Nakon administracije standardnih doza PPI prve generacije, IM i PM postižu veću maksimalnu koncentraciju (C<sub>max</sub> 2-6x veća) u krvi uz 3-14x veću AUC (area under curve) u odnosu na osobe sa CYP2C19 EM (162). Istraživanja su pokazala da produženo vreme ekspozicije uz veću postignutu koncentraciju PPI kod IM i PM, je povezano sa boljom supresijom sekrecije gastrične kiseline, što u daljoj kaskadi rezultira povećanjem intragastrične pH i boljim terapijskim ishodom (162,163). S toga se smatra da osobe sa CYP2C19 IM i PM polimorfizom ima genetsku tj. terapijsku prednost u odnosu na osobe sa EM.



U kliničkoj praksi, osobe sa EM dominantno proizvode više aktivne enzime koji brže metabolišu PPI, ograničavaju bioraspoloživost ovog leka te ultimativno smanjuju antisekretorni efekat istog (164). Sa druge strane, osobe sa IM i PM, sporije razlažu PPI, prolongirajući na taj način njegovu funkciju. Prevalence genetskog i fenotipskog polimorfizma CYP2C19 varira u zavisnosti od geografskog područja, te su tako CYP2C19 IM i PM zastupljeniji u azijskim zemljama, dok je u Evropi predominantno prisutan CYP2C19 EM polimorfizam (164,165).

Stepen i jačina uticaja CYP2C19 polimorfizma kao i njegova interakcija sa drugim modulišućim faktorima, na ishod lečenja *H. pylori* još uvek je predmet debate. *Zhao* i saradnici su u velikoj meta analizi, sa uključenih sedam randomizovanih kontrolisanih i 22 opservacione studije, potvrdili značajan uticaj CYP2C19 EM fenotipa na ishod eradikacije u omeprazol- terapijskim režimima. Kontrastno, primećeno je da u kohorti rabeprazol-bolesnika nije bilo razlika u ishodu lečenja u odnosu na postojanje CYP2C19 polimorfizma. Uticaj genetske varijacije više je prisutan u trojnim terapijskim modalitetima. Smatra se da dodavanjem bizmuta u terapiju, koji se dominantno metaboliše na nivou bubrega, te svoje baktericidno dejstvo ostvaruje inhibicijom enzima proteaze, urokinaze i fosfolipaze, koji pak nisu pod dejstvom CYP2C19 enzima, može predstavljati protektivni mehanizam u populaciji sa visokom prevalencom CYP2C19 genetskog polimorfizma.

Istovremeno, u odnosu na dužinu trajanja terapije, primećeno je da su 7-dnevni omeprazol-terapijski režimi u osoba sa CYP2C19 EM fenotipom imali manju efikasnost u eradikaciji *H. pylori* infekcije u odnosu na isti terapijski režim primenjen 14 dana (164). U tom smislu, optimizacija terapije povećanjem dužine trajanja iste, pogotovo u uslovima primene PPI prve generacije, ima opravdanu primenu.

Treba napomenuti da je velika većina dostupnih studija proistekla iz istraživanja sprovedenih u azijskim zemljama gde, u kontekstu, genotipa nema puno interpopulacionih varijacija. Prevalenca genetskog polimorfizma u istočno-azijskim zemljama (Kina, Japan, Južna Koreja) iznosi 13-23% sa predomnacijom CYP2C19 PM fenotipa, dok je prevalenca istog fenotipa u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) <6% (164). Na, trenutno dostupnom, malom broju studija i manjoj uzoračkoj populaciji pokazani su konfliktni rezultati kada je u pitanju uticaj CYP2C19 polimorfizma na terapijski ishod. Svakako, nedvosmisleno je da CYP2C19 EM fenotip (koji je dominantno zastupljen u zemljama zapadnog sveta) uzrokuje manju efikasnost PPI (164). Ipak, prolongiranje terapija uz povećanje doze PPI, pokazalo se kao potencijalni protektivni mehanizam kojim bi se premostila limitirana antisekretorna funkcija PPI.

Uloga vonoprazana kao relativno novog antisekretornog leka, koji manjim delom podleže metabolizmu CYP2C19 enzima uz produženo i potentnije antisekretorno dejstvo, u populaciji sa prisutnom CYP2C19 EM varijacijom gena, predstavlja potencijalno rešenje problema (166). Svakako, dopunska istraživanja tek predstoje.

### **1.8.3. Ko-egzistencija sa gljivicom iz roda *Candida***

Tek relativno skoro je otkriveno da *H. pylori* ima sposobnost ponašanja fakultativno intracelularnog patogena, kada je izolovana iz eukariotskih ćelija poput epitelnih ćelija želuca, makrofaga i dendritskih imunskih ćelija (167). Nedavno je fluorescentnom mikroskopijom, potvrđeno prisustvo *H. pylori* u vakuolama gljivica iz roda *Candida* uz izolovanje *H. pylori* specifičnih gena i proteina iz ćelija gljivica (168). Ulazak *H. pylori* unutar gljivičnih ćelija obezbeđuje ovom patogenu protekciju u odnosu na delovanje antibiotika i nepovoljnu intragastričnu sredinu (169). Za razliku od *H. pylori*, *Candida* je rezistentna na, za *H. pylori*, nepovoljne životne uslove, te može preživeti na temperaturi iznad 40°C i razvijati se u sredinama čija je pH vrednosti između 2-10 (170). Dodatno, pokazano je da je kolonizacija gastrične mukoze *Candidom* povezana sa nizom bolesti gornjih partija gastrointestinalnog trakta (167). Ova sinergistička i endosimbiotska veza između *H. pylori* i *Candida* uočena je ne samo na nivou gastrične mukoze, već i u uzorcima izolovanim iz oralnog i vaginalnog

brisa (171). Vakuolizacija *H. pylori* ne odvija se samo u unutrašnjoj sredini. Izolati sa internalizovanom *H. pylori* uočeni su i na površini namirnica i hranljivih materija, sugerišući da ovaj adaptivni mehanizam ima značajnu ulogu i u procesu transmisije *H. pylori* infekcije (167).

Iako je dugo smatrano da se samo *H. pylori* može izolovati iz želuca, sada je poznato da želudac kolonizuje  $10^2$ – $10^4$  CFU (colony-forming units)/mL ne samo bakterijskih, već i patogenih drugih vrsta (167). *Candida* predstavlja najčešće izolovan rod, dok *Candida albicans* (*C. albicans*) predstavlja najčešće izolovanu vrstu (169).

Prisustvo *Candide* povezano je sa većim stepenom atrofije želudačne mukoze kao i prisustvom hroničnog atrofičnog gastritisa (172). *Zwolinska* i saradnici ustanovili su da *Candida* u značajnoj meri kolonizuje mukozu želuca, te je ista izolovana u čak 54% bolesnika sa atrofičnim gastritisom (173).

Pored direktne zaštite, kolonizacija *Candidom* povezana je sa razvojem crevne disbioze, koja dodatno potencirana primenom antibiotika, u daljoj kaskadi doprinosi deterioraciji i vulnerabilnosti gastrične mukoze (171,174). Takođe, pokazano je da primena PPI favorizuje gljivičnu kolonizaciju, s obzirom da povećanje intragastične pH stvara sredinu koja ne utiče na preživljavanje *Candide*, dodatno potencirajući protektivni mehanizam koji ko-egzistencija ove gljivice i *H. pylori* pruža samoj bakteriji (175,176).

Evaluacija prirode i dubine odnosa između *H. pylori* i drugih mikroorganizama može biti jedan od novih načina suzbijanja infekcije *H. pylori*. *C. albicans* može potencirati ekspresiju određenih faktora virulencije i rasti i dalju kolonizaciju *H. pylori*, te na taj način promovisati dalju patogenezu i transmisiju bolesti. U tom smislu, ovaj sinergistički odnos potencijalno predstavlja novu metu za prevenciju, dijagnozu i lečenje *H. pylori* infekcije

#### 1.8.4. Biofilm

Poznato je da *H. pylori* ima sposobnost sekrecije proteina, polisaharida, ekstracelularne DNK i drugih molekula, na taj način stvarajući ekstracelularne polimerne substance (*extracellular polymeric substances*, EPS) koje međusobno adheriraju i stvaraju biofilm (177). Formiranje biofilma omogućava *H. pylori* protekciju od nepoželjnih uslova mikrosredine želuca, te tako povećava njenu rezistenciju do čak 1000x (178). Samo formiranje biofilma prolazi kroz nekoliko faza, od kolonizacije i adhezije bakterija, rasta, maturacije i finalno međusobne adhezije i formiranja EPS (179).

Način na koji biofilm pruža zaštitu *H. pylori* nije u potpunosti rasvetljen (180). Mehanička barijera koju stvara EPS predložena je kao potencijalni mehanizam (181). Naime, antibiotici svoje baktericidno dejstvo ostvaruju targetiranjem proteinskih struktura unutar same bakterije. Formirani EPS okružuje bakterije i usmeren je ka lumenu želuca, na taj način onemogućavajući prodiranje antibiotika i imunskih ćelija domaćina. Dodatno, EPS ima negativno naelektrisanje, a neki antibiotici su pozitivno naelektrisni, komponente biofilma formiraju prirodnu barijeru, dodatno limitirajući efekat antibiotika (181,182).

Kako joj samo ime kaže, *H. pylori* ima spiralni oblik. Međutim, u nepovoljnim životnim uslovima, nedostatku hranljivih materija, nepovoljnoj pH mikrosredine, delovanju antibiotika, bakterija formira biofilm i prelazi u svoju “uspavanu” kokoidnu formu (182). Antibiotici svoje baktericidno dejstvo mogu ostvarivati samo dok se bakterija nalazi u fazi replikacije i spiralnoj formi. Kokoidna *H. pylori* nalazi se u dubokom sloju biofilma, nedostupna delovanju antibiotika. Perzistentne forme *H. pylori* odolevaju delovanju, za njih, štetnih noksia i po redukciji koncentracije antibiotika, vraćaju se u svoj kulturabilni oblik i nastavljaju dalju kolonizaciju, na taj način izbegavajući efekat antibiotika (182).

Konačno, bliska povezanost bakterija u biofilmu, omogućava rezistentnim sojevima da posredstvom horizontalne transmisije mutiranih gena, dovode do dalje propagacije i širenja rezistencije na antibiotike (183).

### **1.8.5. Komplijansa bolesnika**

U idealnim uslovima proces eradikacije *H. pylori* infekcije, sa preterapijskom pripremom u smislu obustavljanja terapije PPI i antibiotika, samom eradikacijom i posteradikacionom konfirmacijom, trajeće gotovo 10 nedelja. Pritom, treba napomenuti da, u svetlu rastuće antibiotske rezistencije, nekritične primene antibiotika, učestalosti neuspeha prvog pokušaja eradikacije, ovaj proces se prolongira i nekada može trajati mesecima. Za to vreme, progresija patogenetskih procesa na nivou mukoze želuca, od inicijalno asimptomatske kliničke slike, može progredirati do izraženih simptoma udruženih sa PUD-om, GERB-om i u krajnjem slučaju karcinomom želuca.

Komplijansa bolesnika smatra se jednim od najvažnijih determinanti uspešnosti eradikacione terapije (137). Imajući u vidu heterogenost terapijskih protokola, broja tableta koje je neophodno konzumirati na dnevnom nivou, dužinu trajanja terapije i stopu neuspeha prve linije terapije, održavanje zadovoljavajućeg nivoa komplijanse u bolesnika sa *H. pylori* infekcijom predstavlja veliki izazov.

Istraživanja su pokazala da je veći stepen komplijanse u bolesnika sa kraćim trajanjem terapije, manjim opterećenjem brojem "pilula" kao i u onih sa manjim brojem i težinom prijavljenih neželjenih efekata (184,185). U tom smislu, kapsula Pylera® pokazala se kao najoptimalniji izbor jer daje visoko zadovoljavajuće rezultate (efikasnost >95%) pri dužini terapije od 10 dana, tri-u-jedan strukturisanoj kapsuli kao i manjem broju prijavljenih neželjenih efekata (119).

## 2. CILJEVI

Ciljevi ovog rada su bili:

1. Utvrditi učestalost *H. pylori* infekcije u opštoj populaciji.
2. Utvrditi uticaj različitih epidemioloških i kliničkih činilaca na učestalost infekcije (životne dobi, pola, navika pušenja, konzumiranja alkohola, socio-ekonomskih uslova života, pridruženih bolesti).
3. Uporediti učestalost infekcije utvrđene PCR tehnikom sa zlatnim standardom tj. histopatološkom analizom uzetih biopsija.
4. Pokazati stepen primarne i sekundarne rezistencije na klaritromicin i levofloksacin metodom PCR.
5. Detektovanje najčešćih mutacija na klaritromicin i fluorohinolone, određenih metodom PCR.
6. Detektovanje ko-egzistencije *H. pylori* i gljivice iz roda *Candida*.
7. Utvrditi povezanost antibiotske rezistencije *H. pylori* sa prisustvom *Candide*
8. Utvrditi uticaj prisustva *Candide* sa histopatološkim i kliničkim karakteristikama *H. pylori* infekcije
9. Utvrditi uticaj CYP450 plimorfizma na stopu eradikacije

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Izbor ispitanika i uzimanje uzoraka

Sprovedena je prospektivna intervenciona studija sa vremenom praćenja bolesnika u trajanju od 18 meseci. Studijom su obuhvaćeni bolesnici koji dolaze na redovne ambulantne preglede sa dispeptičkim tegobama i u sklopu čije dijagnostike će se kod onih kojima je neinvazivni test na prisustvo *H. pylori* infekcije pozitivan raditi ezofagogastroduodenoskopija sa uzimanjem biopsija iz regije antruma, korpusa i angulusa želuca u cilju histopatološke dijagnostike i utvrđivanja statusa *H. pylori* infekcije i daljih molekularnih, mikrobioloških i genetičkih analiza u skladu sa modifikovanom Sidnejskom klasifikacijom.

Studija je sprovedena na Univerzitetском Kliničkom Centru Srbije, Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju, Odsek gornje endoskopije, Poliklinike Univerzetskog Kliničkog Centra Srbije i Odeljenju Urgentne gastroenterologije i hepatologije, Urgentnog Centra u Beogradu, kao i u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju i DNK laboratoriji Instituta za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Studija je odobrena na sednici Etičkog odbora Univerzetskog Kliničkog Centra Srbije u septembru 2018. godine. Svi bolesnici su potpisivali informisani pristanak za učešće u istraživanju.

#### 3.3. Kriterijumi za uključivanje i isključivanje iz studije

U studiju je uključeno 415 bolesnika među kojima je bilo 180 *H. pylori* pozitivnih starosti od 18-85 godina koji su potpisali informisani pristanak da učestvuju u istraživanju. Kriterijumi za uključivanje su bili: starosna dob iznad 18 godina, simptomi vezani za bolesti gornjih partija gastrointestinalnog trakta (mučnina, nelagodnost u epigastrijumu, dispepsija, gubitak u telesnoj masi, povraćanje itd.). Kriterijumi za isključivanje bili su: starosna dob manja od 18 godina, akutno gastrointestinalno krvarenje, malignitet gastrointestinalnog trakta i druge lokalizacije, alergija na pomenute antibiotike, korišćenje antibiotika u poslednja 2 meseca, trudnoća i dojenje.

Sve analize su rađene u okviru redovnih i planiranih troškova.

#### 3.2. Postavljanje dijagnoze *H. pylori* infekcije

Gornja endoskopija je urađena videoendoskopom Olympus Exera II sa standardima visokokvalitetne gornje endoskopije uz uzimanje uzoraka sluznice po protokolu i u skladu sa Sidnejskom klasifikacijom. Tokom endoskopije svim bolesnicima je utvrđen *H. pylori* pozitivnost korišćenjem čitača, AMA RAPID UREASE TEST Expert (AMA RUT Expert manufacturer: Association of Medicine and Analysts Co LTd, Russia—distributer AD MEDICUM). Uzorci su se slali na histopatološki pregled u zatvorenim bočicama sa formalinom i u posebnim bočicama u cilju molekularne i mikrobiološke analize.

Koristeći aseptične tehnike uzorak se uzimao u adekvatnu, sterilnu posudu sa zaštitom od curenja, u zatvorenoj plastičnoj transportnoj kesi za uzorke. Posuda je adekvatno obeležena uz popunjavanje propratnog lista/uputa. Svi uzorci biopsija uzeti su pre primene terapije. Ukoliko se sa terapijom otpočelo, bolesnicima je sugerisano da se napravi pauza u trajanju od minimum dve nedelje, te da se u odnosu na pomenutu vremensku distancu i poslednju primenu antibakterijske terapije, uzima uzorak. Bolesnici koji su već bili na terapiji antibioticima, u odnosu na vremensku distancu poslednje primene terapije, pozivani su telefonskim putem u cilju sprovođenja daljeg plana dijagnostike.

Tokom procesa ezofagogastroduodenoskopije, uzorci tkiva su uzimati endoskopom, iz predela antruma, angulusa i tela želuca. U zavisnosti od lokalizacije zapaljenja i procene lekara, uzorci su

uzimati i sa drugih lokacija. Broj i učestalost uzimanja uzoraka zavisili su od kliničkog stanja bolesnika i mišljenja lekara.

U okolnostima kada je to bilo moguće, uzorci su odmah transportovani i otpočeto je sa laboratorijskom obradom (u okviru 6 sati). Ukoliko se uzorak obrađuje u roku od 6 sati, u posudu sa uzorkom dodato je 1 ml sterilnog fiziološkog rastvora radi prevencije sušenja.

Ukoliko je transport odložen, skladištenje uzoraka vršilo se u frižideru uz održavanje adekvatne temperature sredine.

### **3.3. Procena aktivnosti hroničnog gastritisa**

Nakon što je postavljena dijagnoza gastritisa, gradacija hroničnog gastritisa je, u skladu sa modifikovanom Sidnejskom klasifikacijom, obuhvatala procenu stepena kolonizacije, inflamacije, aktivnosti i stepena atrofije sluznice želuca.

### **3.4. Izolacija bakterijske DNK**

Iz uzoraka bioptata želuca, izolacija DNK za potrebe protokola se vršila korišćenjem opreme „Tissue Protocol“; QIAamp DNK Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Izolovana DNK se čuvala na -20°C do upotrebe za amplifikaciju.

### **3.5. Identifikacija i molekularna detekcija rezistencije *H. pylori* na fluorohinolone i klaritromicin**

Radi molekularne detekcije *H. pylori* y uzorcima bioptata želuca, kao i detekcije rezistencije na fluorohinolone (mutacije *gyrA* gena) i klaritromicin (mutacije na 23SrRNA genu) korišćen je komplet-test, GenoType HelicoDR kit (Hain Lfeseience, Nehren, Germany). Nakon amplifikacije uzorka, vršila se hibridizacija na komercijalnim trakama po uputstvu proizvođača. Uzorci pacijenata koji imaju primoinfekciju *H. pylori* su analizirani molekularnom metodom čime se utvrđivala primarna rezistencija *H. pylori* na klaritromicin i fluorohinolone. Bolesnicima koji su već prethodno eradikirani određivao se stepen sekundarne rezistencije na klaritromicin i fluorohinolone.

### **3.6. Ispitivanje odnosa CYP450 polimorfizma i ishoda terapije**

Ovaj deo istraživanja je obuhvatio testiranje asocijacije između farmakogenetički značajnih varijanti citohrom P450 (CYP450) gena i ishoda terapije. Varijante iz CYP450 genske superfamilije dovedene u vezu sa metabolizmom medikamenata koji su deo standardne terapije za eradikaciju *H. pylori* su: rs2740574 u genu za SURZA4, rs1799853 i rs1057910 u genu za SUR2S9, rs4244285 i rs12248560 u genu za CYP 2C19. Genotipiziranje ovih varijanti se izvodilo metodom hidrolize fluorescentnih proba na real-time PCR platformi dostupnoj u DNK laboratoriji Instituta za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a nakon uzimanja bukalnog brisa pre endoskopske analize bolesnika.

### **3.7. Identifikacija *Candida***

Gljivice iz roda *Candida* detektovane su korišćenjem RT-PCR protokola. Ekstrahovana DNK iz uzoraka gastričnih bioptata amplifikovana je korišćenjem Mastercycler® ep Gradient S realplex RT-PCR sistema (Eppendorf) i QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen). U cilju detekcije *Candida* korišćeni su sledeći prajmeri i to: 5.8S-1F5'-CAA CGG ATC TCT TGG TTC TC-3' i 28S-1R 5'-CGG GTA GTC CTA CCT GAT TT-3'. Vrsta *Candida* identifikovana je na osnovu dobijenih i referentnih profila krivulje otapanja. Uzorci su testirani na prisustvo više vrsta *Candida*, uključujući *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*. Kao pozitivne kontrole korišćeni su: *C. albicans*

ATCC24433, *C. tropicalis* ATCC23705 i *C. parapsilosis* ATCC24574. Analiza krivulje otapanja sprovedena je postepenim povećanjem temperature od 65°C do 95 °C brzinom od 1.5 °C/min.

### **3.8. Dobijanje podataka o socio-demografskim, antropometrijskim, kliničkim karakteristikama**

Podaci o polu, starosnoj dobi, mestu življenja (selo ili grad), životnim navikama (pušenje, konzumiranje alkohola, navike u ishrani), prisustvo komorbiditeta (arterijska hipertenzija, aterosklerotska kardiovaskularna oboljenja, dijabetes, hronična opstruktivna bolest pluća/astma, hronična bolest bubrega, anemija) i hroničnoj terapiji (NSAIL, ASA, statini), podatak o prethodnim alergijama, hirurškim zahvatima, dobijeni su formulisanjem upitnika. Pitanja su koncipirana tako da budu jasna i nedvosmislena. Ponuđeno je više odgovora, sa mogućnošću zaokruživanja više tačnih odgovora.

### **3.9. Dobijanje podataka o *H. pylori* infekciji**

Podaci o simptomima vezanim za tegobe gornjih partija gastrointestinalnog trakta (prisustvo osećaja žarenja, dispepsija), prethodne eradikacije, alergije na primenjene lekove, podaci o potencijalnim neželjenim reakcijama na primenjeno lečenje (mučnina, povraćanje, disgeuzija, dispepsija, bol u trbuhu, astenija, anoreksija), težina prijavljenih neželjenih događaja, dobijeni su formulisanjem upitnika. Pitanja su koncipirana tako da budu jasna i nedvosmislena. Ponuđeno je više odgovora, sa mogućnošću zaokruživanja više tačnih odgovora.

### **3.10. Dobijanje podataka o laboratorijskim analizama**

Laboratorijske analize uzimate su ujutru u 08h, nakon 12h gladovanja, u natašte uslovima i podrazumevale su deo standardne laboratorijske dijagnostike i to: krvna slika, biohemijske analize (sa markerima nivoa gvožđa, nosača i rezervi (Fe, TIBC, UIBC, feritin), proinflamatorni markeri.

### **3.11. Statistička analiza**

Statistička analiza je urađena metodama deskriptivne i analitičke statistike. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćene su mere centralne tendencije (aritmetička sredina), mere varijabiliteta (standardna devijacija) i relativni brojevi.

Testiranje postavljenih hipoteza vršeno je primenom: Studentovog t testa, Mann-Whitney test-a, Wilcoxonovog testa, ANOVA i MANOVA testa, Hi-kvadrat testa za evaluaciju značajnosti razlike učestalosti kategorijalnih varijabilni, Fisher-ov test tačne verovatnoće.

Varijable koje su se pokazale statistički značajnim u univarijabilnim modelima bile su uključene u multivarijantni model.

Značajnost razlike normalno distributivnih kontinuiranih varijabli bila je ispitivana uz pomoć analize varijanse.

Testiranje postavljenih hipoteza vršilo se na nivou statističke značajnosti od 0.05.

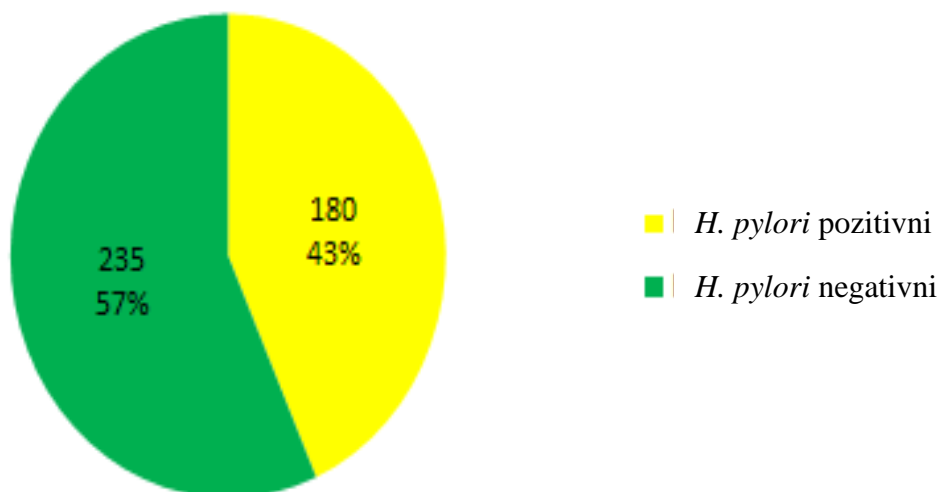
Obrada statističkih podataka vršila se primenom SPSS 20.0 for Windows (Chicago, IL) i MATLAB softver-a.

## 4. REZULTATI:

### 4.1. Karakteristike ispitivane grupe:

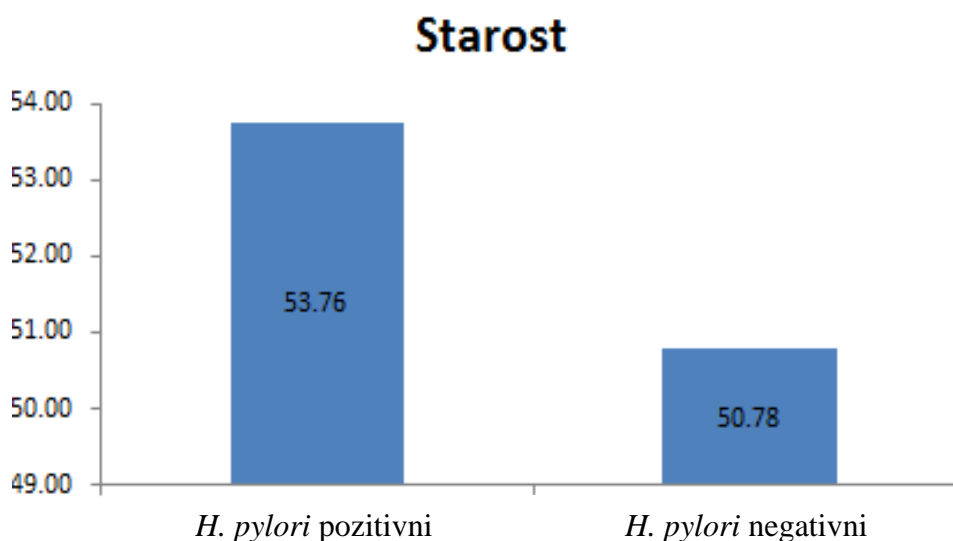
U našem istraživanju uzorak je činilo 415 bolesnika, od čega je 180 (43,37 %) bolesnika bilo pozitivno na *H. pylori*, a 235 (56,63 %) bilo negativno (grafik 1).

### Učestalost *H. pylori* infekcije



Grafik 1: Učestalost *H. pylori* infekcije:

Prosečna starost bolesnika u celom uzorku bila je  $53,76 \pm 14,94$ , dok je u *H. pylori* pozitivnoj grupi bila  $50,78 \pm 14,94$ . (grafik 2).

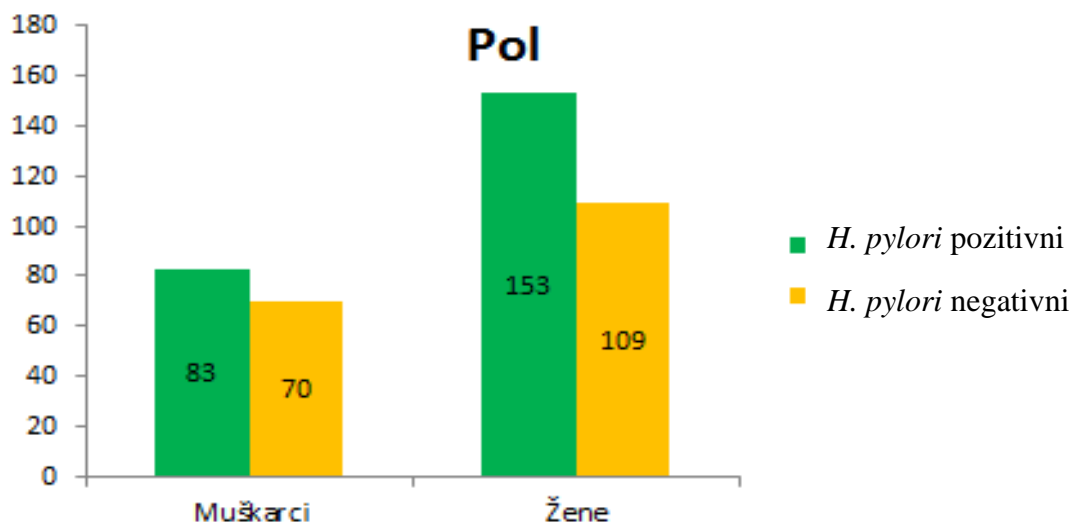


Grafik 2: Prosečna starost bolesnika (*H. pylori* pozitivni/*H. pylori* negativni)

Ženski pol je bio zastupljeniji i u celom uzorku – 262 (63,13%), i u *H. pylori* pozitivnoj grupi – 109 (60,89%), dok je muškaraca u celom uzorku bilo 153 (36,87%), a u *H. pylori* pozitivnoj grupi 70

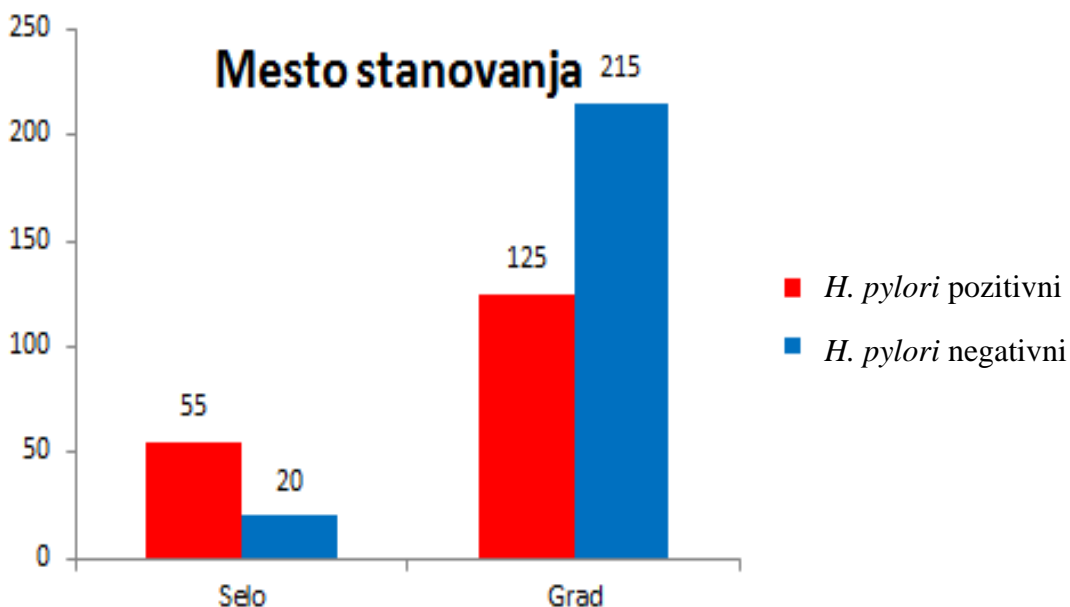


(39,11%). Nije uočena značajna razlika u polu između *H. pylori* pozitivnih i negativnih bolesnika ( $p=0,41$ ) (grafik 3).



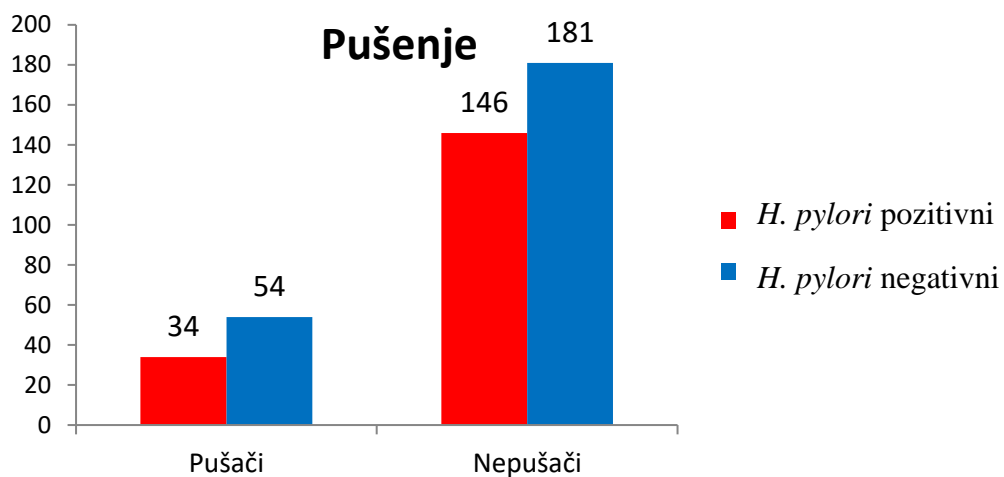
Grafik 3: Distribucija bolesnika prema polu:

Prema geografskim odrednicama u celom uzorku, 75 (18,07 %) bolesnika živelo je na selu (*H. pylori* pozitivnih bilo je 55 bolesnika – 73,33 %), dok je 340 (81,93%) bolesnika živelo u gradu (*H. pylori* pozitivnih bilo je 125 bolesnika – 53,19%). Uočena je statistički značajna razlika u oboljevanju od *H. pylori* infekcije zavisno od života na selu/gradu ( $p<0,01$ ) (grafik 4).



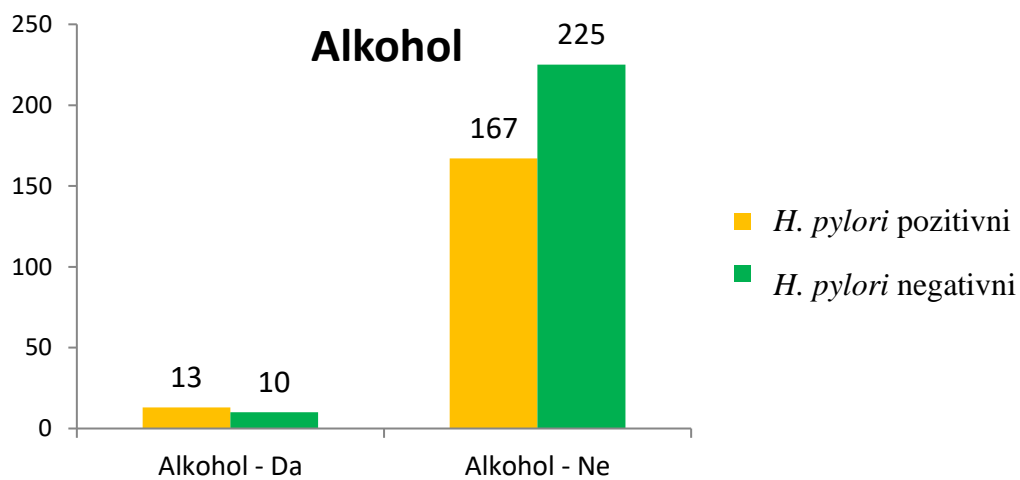
Grafik 4: Distribucija bolesnika prema mestu stanovanja

U celom uzorku 88 (21,20%) bolesnika bili su pušači, a 327 (78,80%) nisu bili pušači. U *H. pylori* pozitivnoj grupi 34 (18,89%) su pušili cigarete, dok 146 (81,11%) nisu bili pušači (grafik 5).



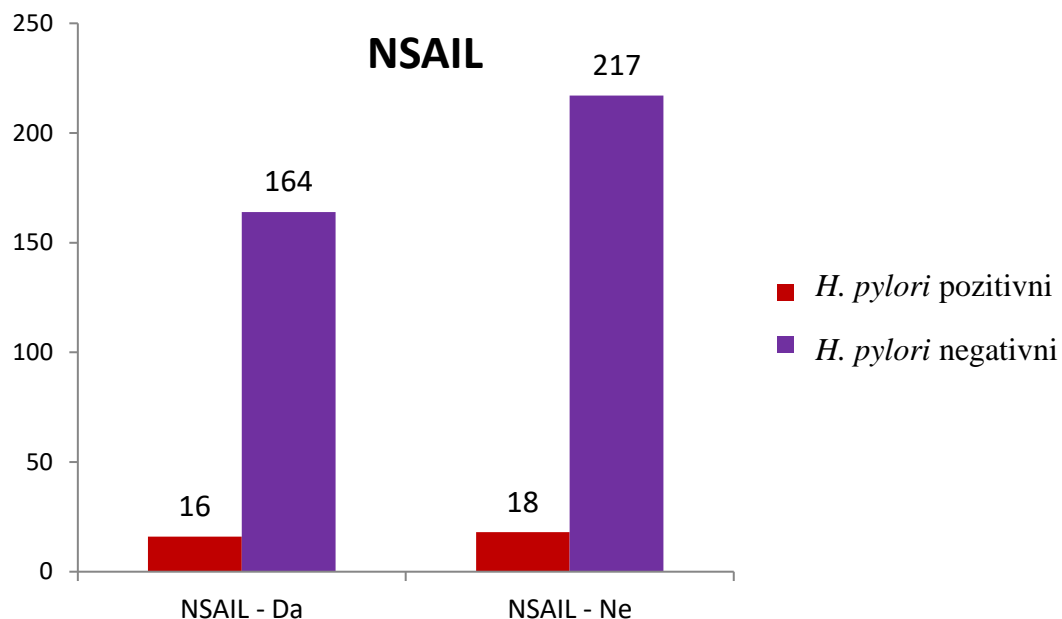
Grafik 5: Grafički prikaz učestalosti navike pušenja zavisno od *H. pylori* statusa.

Alkohol je konzumiralo 23 (5,54%) bolesnika u celom uzorku, dok je u *H. pylori* pozitivnoj grupi alkohol konzumiralo 13 bolesnika (7,22%) (grafik 6).



Grafik 6: Upotreba alkohola

U celom uzorku 34 (8,19%) bolesnika je uzimalo NSAIL, dok je u *H. pylori* pozitivnoj grupi NSAIL uzimalo 16 (8,94%). (grafik 7).



Grafik 7: Grafički prikaz učestalosti upotrebe NSAIR zavisno od *H. pylori* statusa.

Nije uočena značajna razlika u pušačkom statusu ( $p=0.31$ ), konzimuranju alkohola ( $p=0.19$ ), kao ni upotrebi NSAIR ( $p=0.72$ ), između *H. pylori* pozitivnih i negativnih bolesnika.

Analizirane su prosečne vrednosti hemoglobina, serumskog gvožđa, feritina i C-reaktivnog proteina u celom uzorku, kao i u grupama zavisno od *H. pylori* statusa, što je prikazano u tabeli 2. Uočena je značajna razlika u vrednostima hemoglobina, serumskog gvožđa, feritina i C-reaktivnog proteina poredeći bolesnike u *H. pylori* pozitivnoj i negativnoj grupi – za sve parametre p vrednost je bila manja od 0,01. Takođe, analizirana je prediktivna moć ovih biomarkera, modelom logističke regresije, u predikciji ishoda izlečenja *H. pylori* infekcije kod bolesnika uključenih u ovo istraživanje, što je predstavljeno u tabeli 3. Hemoglobin, vrednost serumskog gvožđa i feritina pokazali su se kao mogući, ali slabi pozitivni prediktori ishoda, dok je C- reaktivni protein pokazao moguću negativnu prediktivnu moć, za predikciju eradikacije *H. pylori* u ovom uzorku.

Tabela 2: Prosečne vrednosti hemoglobina, serumskog gvožđa, feritina i C-reaktivnog proteina u celom uzorku, *H. pylori* pozitivnoj i negativnoj grupi

	Ceo uzorak	<i>H. pylori</i> negativni	<i>H. pylori</i> pozitivni	<i>H. pylori</i> pozitivni vs. negativni (p vrednost)
Hemoglobin	122,14±15,45	124,89±14,97	118,56±15,38	<b>p&lt;0,01</b>
Serumsko gvožđe	10,59±5,96	12,21±5,38	8,48±6,05	<b>p&lt;0,01</b>
Feritin	117,08±90,55	139,52±94,54	87,78±75,87	<b>p&lt;0,01</b>
CRP	5,41±6,71	4,64±6,78	6,40±6,51	<b>p&lt;0,01</b>

\*CRP - C-reaktivni protein

Tabela 3. Hemoglobin, serumsko gvožđe, feritin i C-reaktivni protein kao prediktori ishoda terapije *H. pylori*.

	P vrednost	OR („odds ratio”)	95% interval poverenja
Hemoglobin	0,001	1,06	1,02-1,09
Serumsko gvožđe	0,016	1,16	1,01-1,36
Feritin	0,031	1,01	0,99-1,01
CRP	0,009	0,93	0,88-0,98

\*CRP - C-reaktivni protein

U grupi bolesnika koji su bili *H. pylori* pozitivni 84 (46,92%) nije imalo prateće komorbiditete, kardiovaskularne komorbiditete imalo je 52 (29,05%) bolesnika, dijabetes melitus 32 (17,87%), pulmološke komorbiditete imalo je 17 (9,5%) bolesnika, nefrološke je imalo 8 (4,5%) bolesnika, neurološke 4 (2,2%) bolesnika, dok je druge komorbiditete imalo 10 bolesnika (5,58%). Najčešći komorbiditeti i u celom uzorku kao i u *H. pylori* negativnoj grupi, takođe su bile kardiovaskularne bolesti. Nije uočena značajna razlika u učestalosti komorbiditeta između poređenih grupa, zavisno od *H. pylori* statusa ( $p > 0,05$ ). Učestalost komorbiditeta po grupama prikazana je u tabeli 4.

Tabela 4. Prikaz pratećih komorbiditeta u celom uzorku, *H. pylori* pozitivnoj i negativnoj grupi.

Komorbiditeti	Ceo uzorak	<i>H. pylori</i> negativni	<i>H. pylori</i> pozitivni
<b>Bez komorbiditeta</b>	198 (47,71 %)	114 (48,3 %)	84 (46,92 %)
<b>Kardiovaskularne bolesti</b>	121 (29,16 %)	69 (29,24 %)	52 (29,05 %)
<b>Dijabetes melitus</b>	78 (18,9 %)	46 (19,49 %)	32 (17,87 %)
<b>Pulmološke bolesti</b>	29 (6,99 %)	12 (5,08 %)	17 (9,49 %)
<b>Neurološke bolesti</b>	13 (3,13 %)	9 (3,81 %)	4 (2,23 %)
<b>Hronična bubrežna slabost</b>	23 (5,54 %)	15 (6,36 %)	8 (4,47 %)
<b>Ostali</b>	12 (2,89 %)	2 (0,85 %)	10 (5,58 %)

Bolesnici su na endoskopske preglede najčešće upućivani sa uputnim dijagnozama dispepsije i gastroduodenitisa, učestalost svih uputnih dijagnoza je prikazana u tabeli 5.

Tabela 5. Učestalost dijagnoza pod kojim su bolesnici upućivani na endoskopski pregled.

Uputna dijagnoza	Ceo uzorak	<i>H. pylori</i> pozitivni
Dispepsija	194 (46,75 %)	78 (43,57 %)
Gastroduodenitis	105 (25,3 %)	55 (30,17 %)
Ulkusna bolest	24 (5,76 %)	14 (7,82%)
GERB	62 (14,94 %)	17 (9,5 %)
Anemija	15 (3,61 %)	9 (5,03 %)
Ostalo	15 (3,61 %)	7 (3,91 %)

\*GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

Najčešća makroskopska dijagnoza nakon endovideoskopije bio je gastroduodenitis (sa većom učestalosti u grupi *H. pylori* pozitivnih bolesnika) i izolovani gastritis, koji je bio najčešće postavljena dijagnoza nevezano od *H. pylori* statusa, dok je najčešća dijagnoza u *H. pylori* negativnoj grupi bio normalan endovideoskopski nalaz kod 70 bolesnika, dok nijedan bolesnik sa *H. pylori* infekcijom nije imao normalan endovideoskopski nalaz. Ulkusna bolest uočena je kod 12 bolesnika, od toga kod 4 bolesnika u *H. pylori* negativnoj i 8 bolesnika u *H. pylori* pozitivnoj grupi. Postojala je statistički značajna razlika u učestalosti endovideoskopskih dijagnoza zavisno od *H. pylori* statusa ( $p < 0.01$ ), takođe normalan makroskopski nalaz je bio češći u *H. pylori* negativnoj grupi ( $p < 0.01$ ), dok je ulkusna bolest bila značajno češća kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika ( $p < 0.05$ ). Učestalost svih endoskopskih dijagnoza kod bolesnika u ovom istraživanju prikazane su u tabeli 6.

Tabela 6. Učestalost endovideoskopskih dijagnoza zavisno od *H. pylori* statusa.

<b>Endoskopska dijagnoza</b>	<b>Ceo uzorak</b>	<b><i>H. pylori</i> negativni</b>	<b><i>H. pylori</i> pozitivni</b>
Gastritis	114 (27,47 %)	67 (28,81 %)	46 (25,7 %)
Duodenitis	103 (24,82 %)	53 (22,46 %)	50 (27,93 %)
Gastroduodenitis	117 (27,95 %)	41 (17,37 %)	76 (41,9 %)
Normalan nalaz	70 (16,86 %)	70 (29,66 %)	0 (0 %)
Ulkusna bolest	12 (2,89 %)	4 (1,69 %)	8 (4,47 %)

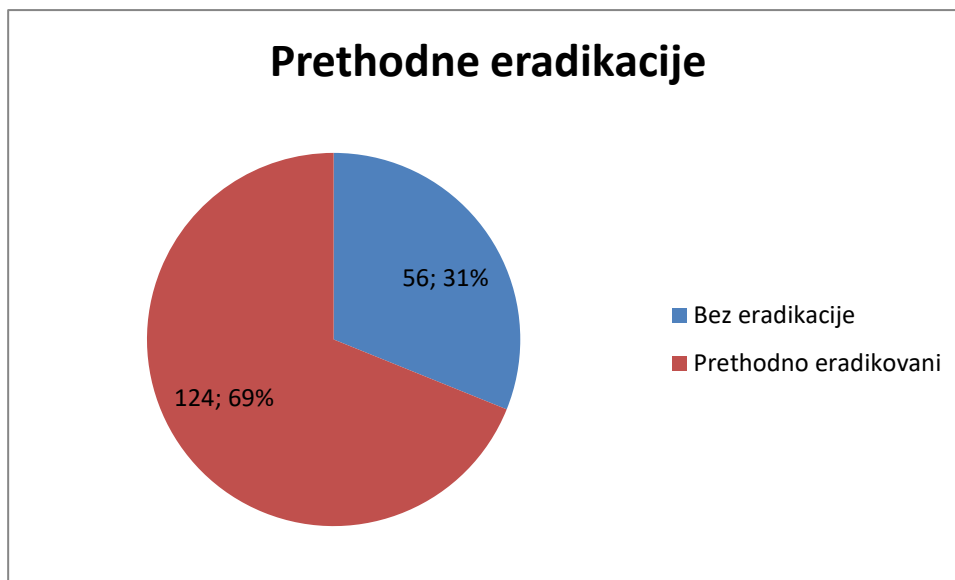
Patohistološkim pregledom uzetih politopskih biopsija želuca po protokolu, normalan patohistološki nalaz uočen je kod 41 bolesnika (9,88 %), od toga samo 1 (0,56 %) u grupi *H. pylori* pozitivnih bolesnika, što je bilo statistički značajno ( $p < 0,01$ ). Najčešća patohistološka dijagnoza bila je superficijalni gastritis u obe grupe i u celom uzorku. U grupi *H. pylori* negativnih bolesnika najređa patohistološka dijagnoza bio je atrofični gastritis sa intestinalnom metaplazijom, dok je u grupi *H. pylori* pozitivnih bolesnika najčešće bio normalni nalaz. Postojala je statistički značajna razlika u učestalosti patohistoloških dijagnoza zavisno od *H. pylori* statusa ( $p < 0,01$ ). Atrofični gastritis bio je značajno češći u grupi bolesnika sa *H. pylori* infekcijom ( $p = 0,0156$ ). Superficijalni gastritis je bio češći u grupi bolesnika pozitivnih na *H. pylori*, ali bez statističke značajnosti ( $p = 0,6556$ ). Intestinalna metaplazija je bila češća u *H. pylori* pozitivnoj grupi, međutim bez dostignutog nivoa statističke značajnosti ( $p = 0,1899$ ). Učestalosti patohistoloških nalaza kod bolesnika u ovom istraživanju prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7. Učestalost patohistoloških dijagnoza zavisno od *H. pylori* statusa.

<b>Patohistološka dijagnoza</b>	<b>Ceo uzorak</b>	<b><i>H. pylori</i> negativni</b>	<b><i>H. pylori</i> pozitivni</b>
Superficijalni gastritis	230 (55,42 %)	128 (54,66 %)	102 (56,42 %)
Atrofični gastritis	94 (22,65 %)	43 (18,22 %)	51 (28,49 %)
Atrofični gastritis sa intestinalnom metaplazijom	50 (12,05 %)	24 (10,17 %)	26 (14,52 %)
Normalan nalaz	41 (9,88 %)	40 (19,95 %)	1 (0,56 %)

#### 4.2. Podaci o broju prethodnih terapijskih pokušaja lečenja

U grupi bolesnika sa *H. pylori* infekcijom analizirana je učestalost prethodne primene eradikacione terapije, 56 (31,11%) bolesnika prethodno nije lečeno eradikacionom terapijom, a 124 (68,89%) bolesnika je prethodno dobijalo eradikacionu terapiju.



Grafik 8: Učestalost broja primenjenih terapija kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika:

Uočena je značajna razlika u ishodu terapije kod bolesnika koji su prethodno dobijali eradikacionu terapiju, značajno češće je ishod lečenja bio pozitivan, ukoliko bolesnici ranije nisu dobijali eradikacionu terapiju ( $p=0,0479$ ).

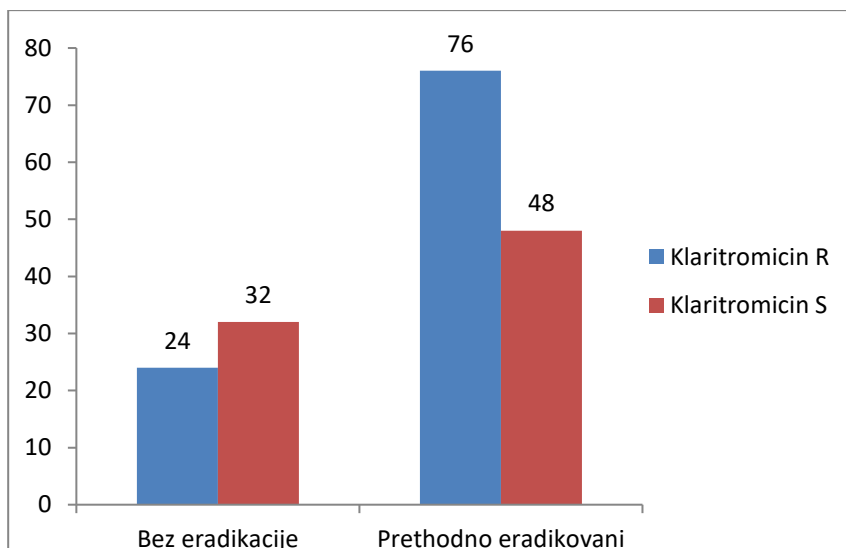
#### 4.3. Stopa rezistencije određivana PCR metodom

Takođe, analizirana je i stopa rezistencije na klaritromicin i fluorohinolone među *H. pylori* pozitivnim bolesnicima. Više od polovine bolesnika (100 bolesnika – 55,56%), bilo je rezistentno na klaritromicin, 90 (50 %) bolesnika bilo je rezistentno na fluorohinolone, dok je dualna rezistencija bila prisutna kod 69 bolesnika (38,33%). Stope rezistencije bile su veće kod bolesnika koji su prethodno dobijali eradikacionu terapiju za klaritromicin (76 bolesnika – 61,29%) vs 24 koji ranije nisu lečeni, za fluorohinolone (72 bolesnika – 58,06%) vs 18 koji ranije nisu lečeni, kao i za dualnu rezistenciju (53 bolesnika – 42,74% vs 16 bolesnika), što je prikazano u tabeli 8.

Tabela 8. Učestalost rezistencije na fluorohinolone, klaritromicin kao i rezistencije na oba antibiotika u odnosu na broj prethodno pokušanih eradikacija u *H. pylori* pozitivnoj grupi.

Rezistencija	Bez prethodne eradikacije	Prethodno eradikovani
Fluorohinoloni	18 (32,14%)	72 (58,06%)
Klaritromicin	24 (42,85%)	76 (61,29%)
Fluorohinoloni i Klaritromicin	16 (28,57%)	53 (42,74%)

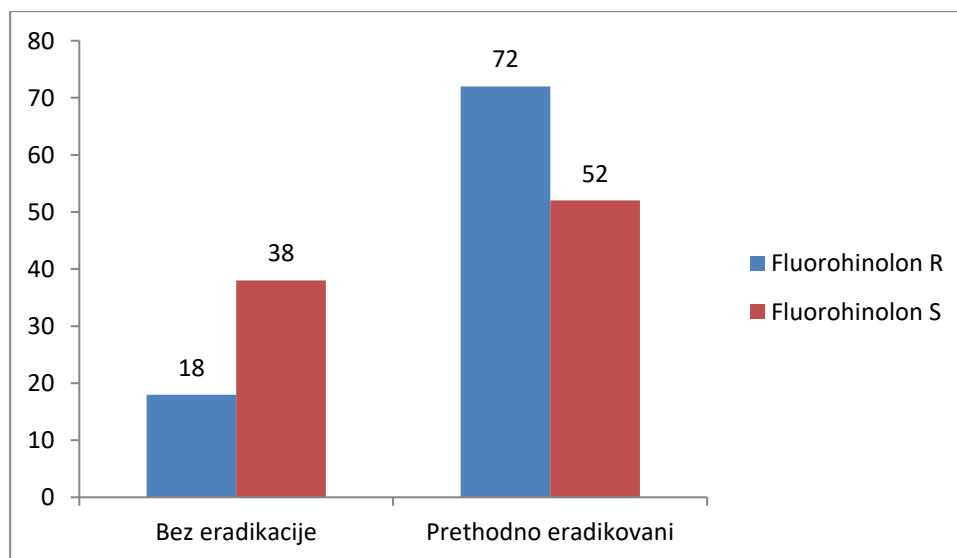
Stopa rezistencije na klaritromicin kod bolesnika koji prethodno nisu eradikovani iznosila je 42,85% (24 bolesnika), dok je 57,15% (32 bolesnika) bilo senzitivno na klaritromicin, što je grafički prikazano na grafiku 9. Uočena je značajna razlika u stopi rezistencije na klaritromicin poredeći bolesnike sa i bez prethodne primene eradikacione terapije ( $p=0,0212$ ).



\*R – rezistentni, S – senzitivni

Grafik 9: Prikaz bolesnika sa rezistencijom/senzitivnosti na klaritromicin zavisno od statusa prethodne eradikacije

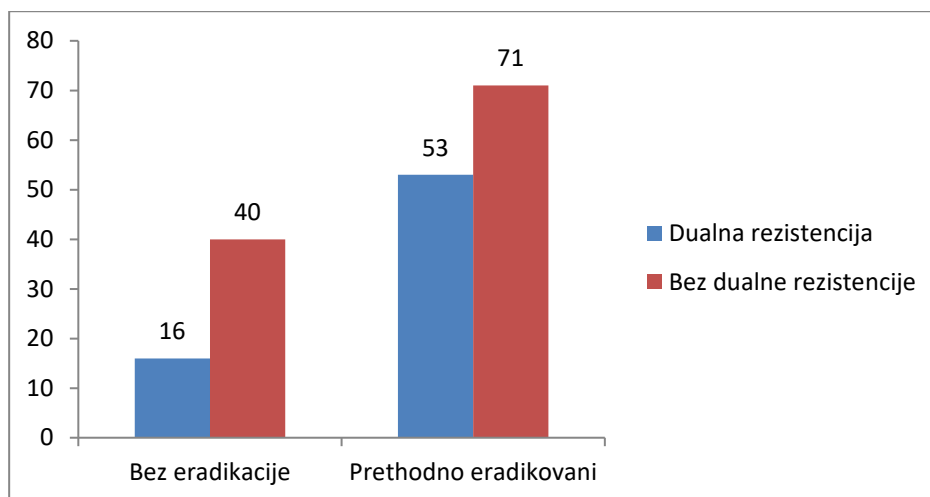
Poredeći stope rezistencije na fluorohinolone među bolesnicima koji prethodno nisu dobijali eradikacionu terapiju (18 bolesnika – 32,14%) i onih kojima je ista prethodno propisivana (72 bolesnika – 58,07%), uočena je značajna razlika u rezistenciji na fluorohinolone među ispitivanim grupama ( $p<0.01$ ). U grupi 'naïve' bolesnika senzitivno na fluorohinolone bilo je 38 bolesnika (67,85%), dok je 52 (41,93%) bolesnika bilo senzitivno na fluorohinolone, a prethodno im je propisivana eradikaciona terapija. Ovi podaci su grafički prikazani na grafiku 10.



\*R – rezistentni, S – senzitivni

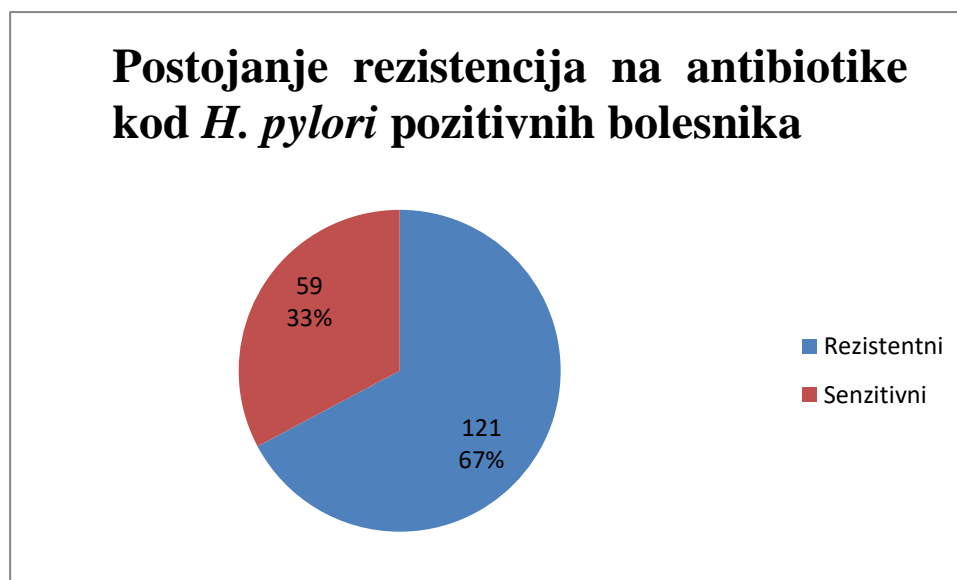
Grafik 10: Prikaz bolesnika sa rezistencijom/senzitivnosti na fluorohinolone zavisno od statusa prethodne eradikacije.

U grupi 'naïve' bolesnika dualna rezistencija je postojala kod 16 (28,57%) bolesnika, dok 36 (71,43%) nije detektovana dualna rezistencija. Među bolesnicima koji su prethodno dobijali eradikacionu terapiju, dualna rezistencija postojala je kod 53 (42,74%) bolesnika, dok ista nije uočena kod 71 (57,26%) bolesnika, što je grafički prikazano na grafiku 11. Nije uočena statistički značajna razlika u postojanju dualne rezistencije među 'naïve' i prethodno eradikovanim bolesnicima.



Grafik 11: Prikaz bolesnika sa dualnom rezistencijom zavisno od statusa prethodne eradikacije:

Kod ukupno 121 (67,22%) bolesnika detektovano je postojanje rezistencije na fluoroquinolone i/ili klaritromicin, dok kod 59 (32,78%) bolesnika nije detektovana rezistencija na ispitivane antibiotike u grupi bolesnika koji su bili *H. pylori* pozitivni (grafik 12).

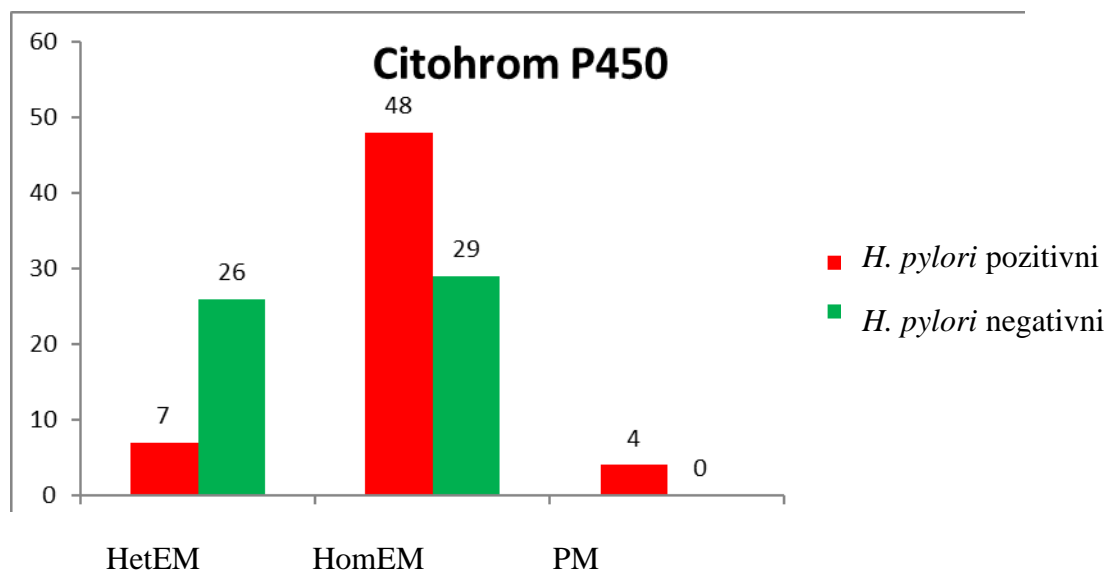


Grafik 12: Rezistencija na klaritromicin i/ili fluorohinolone među *H. pylori* pozitivnim bolesnicima.



#### 4.4. Polimorfizam u genima za CYP450

Kod ukupno 94 bolesnika ispitivan je polimorfizam u genu za citohrom P450, 77 (81,97%) bolesnika su bili homoozigoti, 13 (13,84%) heterozigoti, a 4 (4,25%) bolesnika su bili "poor metabolizer-i", 35 analiziranih bolesnika bili su *H. pylori* negativni, dok je 59 bolesnika bilo *H. pylori* pozitivno. Svi bolesnici koji su bili "poor metabolizer-i" bili su u *H. pylori* pozitivnoj grupi, poredeći sa *H. pylori* negativom grupom nije uočena značajna razlika u učestalosti "poor metabolizer-a" između ispitivanih grupa ( $p=0,293$ ). Takođe nije pronađena značajna razlika u učestalosti bilo koje varijante polimorfizma između ispitivanih grupa: homozigota ( $p=0,54$ ), heterozigota ( $p=1$ ). Učestalosti varijanti polimorfizama citohroma P450 prikazane su grafički na grafiku 13.



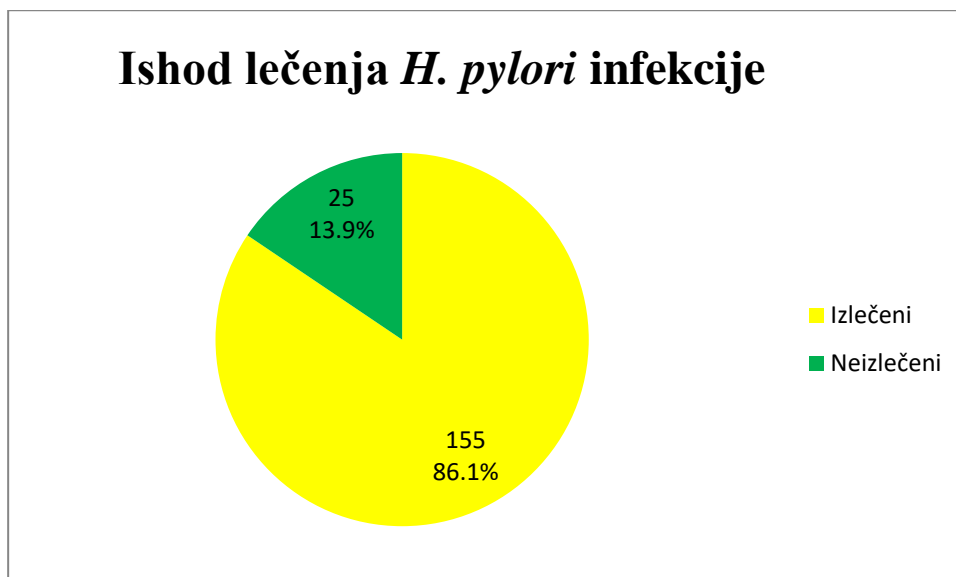
\*HetEM – heterozigoti za *extensive metabolisers*, HomEM – homozigoti za *extensive metabolisers*, PM – *poor metabolisers*

Grafik 13: Učestalost varijanti polimorfizama gena za citohrom P450 zavisno od *H. pylori* statusa.

Poređenjem rezistencije na fluorohinolone, klaritromicin i dualne rezistencije sa CYP450 nije uočena značajna razlika u učestalosti određenih CYP450 genotipa sa rezistencijom (Fluorohinoloni R –  $p=0,3544$ ; Klaritromicin R –  $p=0,2205$ ; dualna rezistencija –  $p=0,5366$ ). Nije uočena razlika u CYP450 genotipu poredeći sa statusom prethodne eradikacije bolesnika u ovom istraživanju ( $p=0,8180$ ). Takođe, poredeći ishod lečenja kod ovih bolesnika sa CYP450 genotipom nije uočena razlika vezana za ishod ( $p=0,3803$ ).

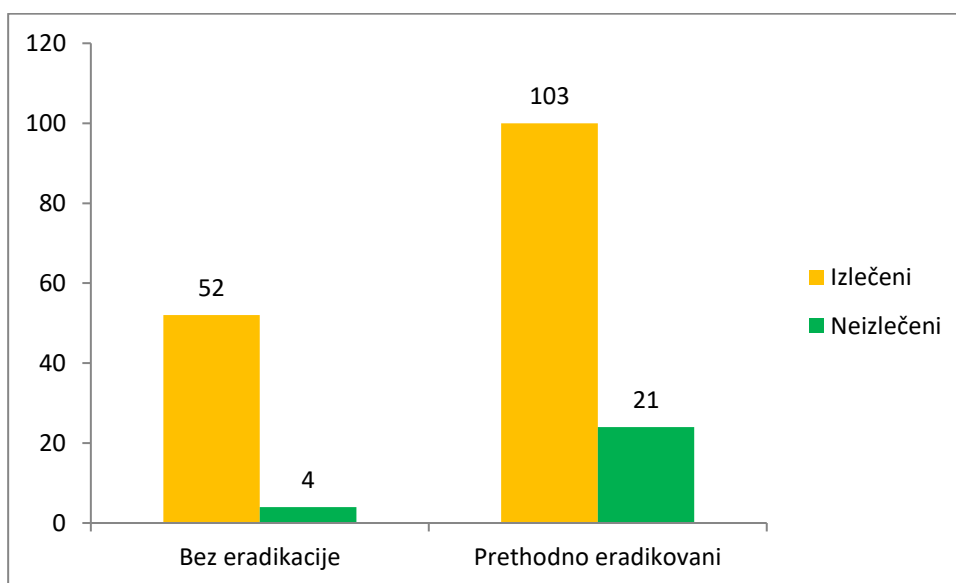
#### 4.5. Ishod lečenja

Ishod lečenja kod 155 (86,1%) bolesnika bio je pozitivan (eradikovana *H. pylori* infekcija), dok je ishod bio negativan kod 25 (13,9%) bolesnika (neuspeh terapije), što je prikazano na grafiku 14.



Grafik 14: Ishod lečenja kod bolesnika sa *H. pylori* infekcijom.

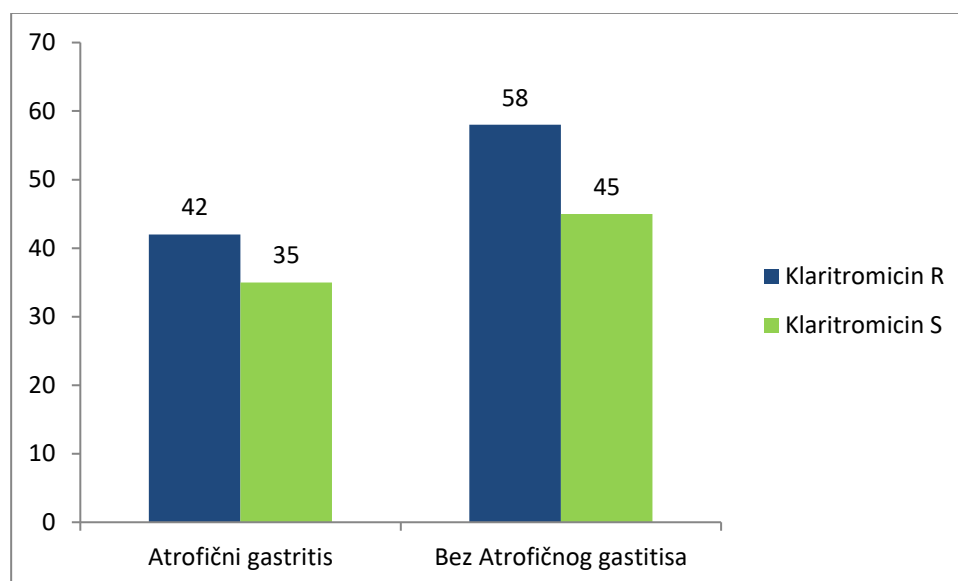
Kod 'naïve' bolesnika u ovom istraživanju primenom odgovarajućih terapijskih protokola izlečeno je 52 (92,86%) bolesnika, dok 4 (7,14%) bolesnika nije izlečeno. U grupi bolesnika koji su prethodno dobijali eradikacionu terapiju, primenom odgovarajućih terapijskih protokola izlečeno je 103 (83,1%) bolesnika, dok 21 (16,9%) bolesnik nije izlečen (grafik 15). Uočena je statistički značajna razlika u uspehu lečenja poredeći status prethodne eradikacije ( $p=0,046$ ).



Grafik 15: Grafički prikaz ishoda lečenja zavisno od statusa prethodne eradikacije:

#### 4.6. Korelacija između stopa rezistencije i histopatoloških dijagnoza

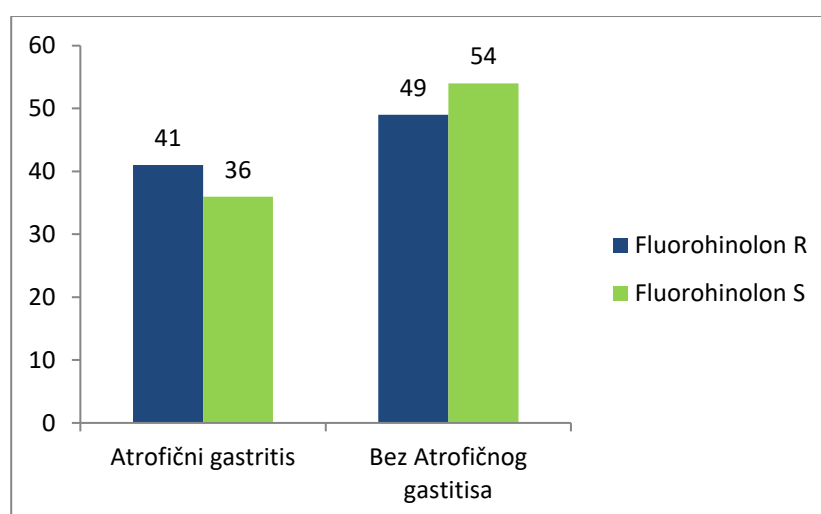
Poređena je stopa rezistencije na antibiotike u odnosu na postojanje atrofičnog gastritisa. Rezistenciju na klaritromicin imalo je 42 (54,55%) bolesnika sa atrofičnim gastritisom, dok je na klaritromicin bilo senzitivno 35 (45,45%) bolesnika. Kod bolesnika koji nisu imali atrofični gastritis, rezistentno na klaritromicin bilo je 58 (56,31%) bolesnika, dok je 45 (43,69 %) bilo senzitivno na klaritromicin (grafik 16).



\*R – rezistentni, S – senzitivni

Grafik 16: Grafički prikaz rezistencije na klaritromicin zavisno od postojanja atrofičnog gastritisa kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika.

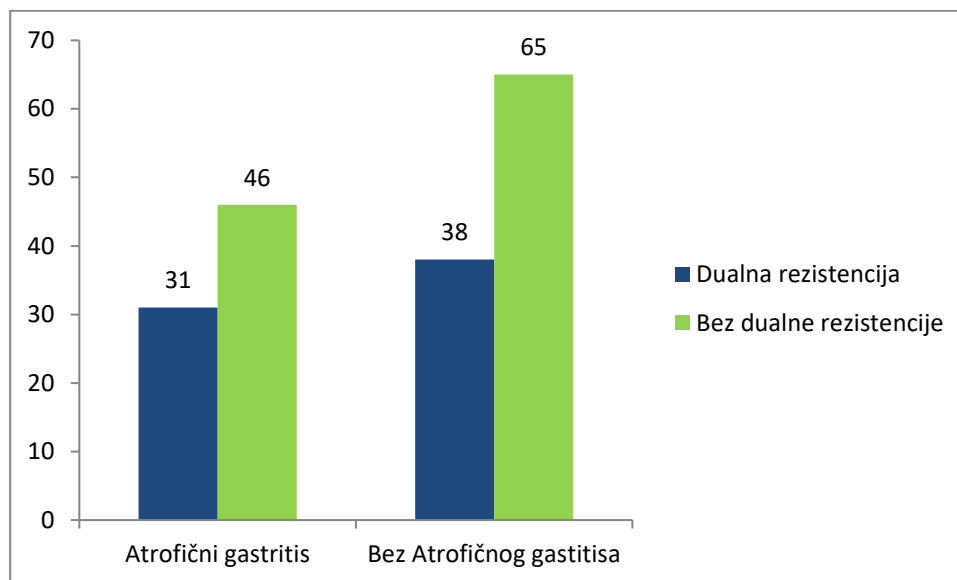
Nije uočena značajna razlika u rezistenciji na klaritromicin zavisno od postojanja atrofičnog gastritisa ( $p=0,8135$ ). Stopa rezistencije na fluorohinolone kod bolesnika sa atrofičnim gastritisom iznosila je 53,25% (41 bolesnik), senzitivno na fluorohinolone u ovoj grupi bilo je 46,75% (36 bolesnika). Fluorohinolenska rezistencija kod bolesnika u ovom istraživanju koji nisu imali atrofični gastritis bila je prisutna kod 47,57% (49 bolesnika), dok je senzitivno na fluorohinolone bilo 52,43% (54 bolesnika) – Grafik 17.



\*R – rezistentni, S – senzitivni

Grafik 17: Grafički prikaz rezistencije na fluorohinolone zavisno od postojanja atrofičnog gastritisa kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika

Nije uočena značajna razlika u rezistenciji na fluorohinolone u odnosu na postojanje atrofičnog gastritisa kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika u ovom istraživanju ( $p=0,4512$ ). Dualna rezistencija bila je prisutna kod 31 (40,26%) bolesnika sa atrofičnim gastritisom, dok je atrofični gastritis imalo 46 (59,74%) bolesnika koji nisu imali dualnu rezistenciju, što je grafički prikazano na grafiku 18. Nije uočena značajna razlika u postojanju dualne rezistencije zavisno od postojanja atrofičnog gastritisa kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika ( $p=0,6457$ ).



Grafik 18: Grafički prikaz dualne rezistencije zavisno od postojanja atrofičnog gastritisa kod *H. pylori* pozitivnih bolesnika:

#### 4.7. *Candida* spp. i *H. pylori* infekcija:

Od 123 bolesnika čiji su uzorci inicijalno analizirani, uzorci 13 bolesnika nisu uzeti u razmatranje jer su bili *H. pylori* negativni, te je analizirano 110 potvrđenih *H. pylori* pozitivnih bolesnika. Sakupljeni su klinički, demografski i laboratorijski podaci. Godine života ispitivanih bolesnika koji su ispitivani na postojanje *Candida* spp. su varirale od 21 do 91 godine starosti, sa medijanom 56 godina. Najčešći uputni razlog za pregled bio je sumnja na gastritis ( $n=74$ ; 67,3%), dispepsija ( $n=19$ ; 17,3%), ulkus želuca ili dvanaestopalačnog creva ( $n=11$ ; 10,0%), gastroezofagealna refluksna bolest (GERB) ( $n=11$ ; 10,0%). Nakon endoskopskog pregleda je rađena histopatološka analiza isečaka sluznice uz verifikaciju celularnosti, stepena atrofije i stepena inflamacije.

##### 4.7.1 Real-time PCR detekcija DNK *Candida* vrsta iz gastričnih biopsija

Postojanje *Candida* vrste je detektovano i identifikovano uz pomoć opisanog real-time PCR metoda kod 9 (8,18%) bolesnika (Tabela 10). *C. albicans*, najčešće kod 5 bolesnika (55,6 % od *Candida*-pozitivnih uzoraka), dok je *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* bila prisutna u po 2 slučaja (22,2%).

Tabela 9: Temperatura koja je korišćena za *Candida spp.* identifikaciju i broj identifikovanih vrsta

Temperature krive topljenja korišćene za <i>Candida</i> identifikaciju (°C)	<i>Candida</i> vrste	Broj <i>Candida</i> - pozitivnih bolesnika n, %
87,2 / 87,7	<i>C. albicans</i>	5, 55,6%
84,7	<i>C. tropicalis</i>	2, 22,2%
85,3	<i>C. parapsilosis</i>	2, 22,2%

#### 4.7.2 Statistička obrada udruženosti između prisustva *Candida spp.* u gastričnoj biopsiji i demografskih, kliničkih i histopatoloških parametara:

Ispitivani bolesnici koji su *H. pylori* pozitivni su bili podeljene u *Candida*-pozitivnu i *Candida*-negativnu grupu. Statistička analiza je sprovedena između *Candida*-pozitivne i *Candida*-negativne grupe u odnosu na različite parametre histopatološkog nalaza (nivo celularnosti, inflamacije, atrofije), demografske kategorije (godine, pol), broj prethodnih eradikacija i tipove mutacija kod rezistentnih bolesnika koji su prethodno detektovani pomoću PCR (Tabela 10,11,12).

Tabela 10: Prikaz demografskih karakteristika kod *Candida*-negativnih i *Candida*-pozitivnih bolesnika:

Kategorije	<i>Candida</i> – negativna grupa (n, %)	<i>Candida</i> - pozitivna grupa (n, %)	<i>P</i> vrednost
Broj bolesnika	101, 91,82%	9, 8,18%	
Srednje godine	55	66	
<40	20, 19,80%	0	0,208
40 - 50	22, 21,80%	0	
>50	59, 58,40%	9, 100%	0,012*
<b>Pol</b>			0,152
Muški	39, 38,60%	6, 66,70%	
Ženski	62, 61,40%	3, 33,30%	

\* $p < 0,05$  nivo značajnosti

Tabela 11: Prikaz broja eradikacija, antibiotske rezistencije i mutacija gena kod *Candida*-negativnih i *Candida*-pozitivnih bolesnika:

Kategorije	<i>Candida</i> – negativna grupa (n, %)	<i>Candida</i> - pozitivna grupa (n, %)	P vrednost
<b>Broj eradikacija</b>			
Naïve	27, 26,70%	1, 11,1%	0,443
>= 1 eradikacija	74, 73,3%	8, 88,9%	
>=2 eradikacije	55, 54,5%	6, 66,7%	0,729
<b>Rezistencija na antibiotike</b>			
<i>Fluorohinoloni (FLQ)</i>	50, 49,5%	2, 22,2%	0,167
<i>Klaritromicin (CLA)</i>	52, 51,5%	5, 55,6%	1
<b>Dvojna rezistencija (FLQ-R i CLA-R)</b>	32, 31,7%	1, 11,1%	0,274
<i>FLQ-S i CLA-S</i>	31, 30,7%	3, 33,3%	1
<i>FLQ-R ili CLA-R</i>	70, 69,3%	6, 66,7%	0,184
<b>Mutacije</b>			
<b>gyrA MUT</b>	41, 40,6%	1, 11,1%	0,149
<b>23S MUT</b>	51, 50,5%	5, 55,6%	1
<b>gyr87 MUT</b>	16, 15,8%	0	0,352
<b>gyr91 MUT</b>	20, 19,8%	1, 11,1%	1

\*p<0.05 nivo značajnosti

FLQ-R – rezistencija na flurohinlone, CLA-R – rezistencija na klaritromicn, MUT - mutacija

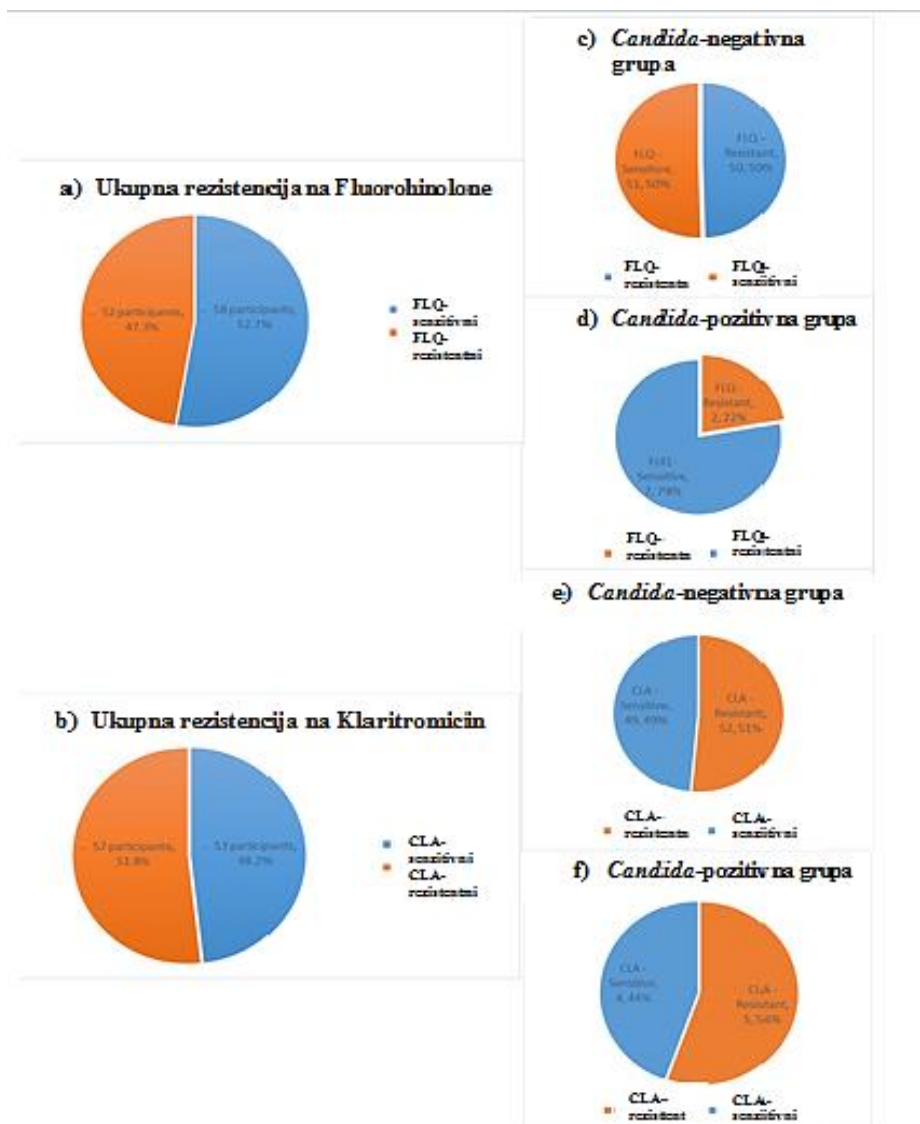
Tabela 12: Prikaz histopatoloških karakteristika kod *Candida*-negativnih i *Candida*-pozitivnih bolesnika:

Kategorije	<i>Candida</i> – negativna grupa (n, %)	<i>Candida</i> - pozitivna grupa (n, %)	P vrednost
<b>Histopatološki parametri</b>			
<b>Skor celularnosti na HP nalazu</b>			0,812
<b>0</b>	1,1,0%	/	
<b>1</b>	36,36,0%	3, 33,0%	
<b>2</b>	59,59,0%	6, 67,0%	
<b>3</b>	4,4,0%	/	
<b>Inflamatorna aktivnost</b>			0,554
<b>0</b>	8,8,0%	/	
<b>1</b>	50,50,0%	66,7%	
<b>2</b>	41,41,0%	33,3%	
<b>3</b>	1,1,0%	/	
<b>Skor atrofije na HP nalazu</b>			0,601
<b>0</b>	41,41,0%	33,3%	
<b>1</b>	51,51,0%	66,7%	
<b>2</b>	7,7,0%	/	
<b>3</b>	1,1,0%	/	

\*p<0.05 nivo značajnosti

Statistički značajno stariji bolesnici su bili u grupi koja je bila *Candida*-pozitivna sa medijanom 66 godina, u poređenju sa medijanom od 55 u *Candida*-negativnoj grupi bolesnika (p<0,05). Svi *Candida*-pozitivni bolesnici su bili stariji od 50 godina, dok je kod *Candida*-negativne grupe 59 participanata (58,4%) bilo >50 godina staro.

Rezultati testiranja rezistencije na antibiotike pokazuju visoke stope rezistencije i na klaritromicin i na fluorohinolonske lekove u *Candida*-pozitivnoj i *Candida*-negativnoj grupi, bez statistički značajne razlike među njima, kao što je prikazano u tabeli 11 i na slici 5. Najčešće uočene mutacije uključivale su 23S i gyrA mutacije, sa više od 50% bolesnika koji poseduju mutacije gena 23S u *Candida*-pozitivnim (55,6%) i *Candida*-negativnim grupama (50,5%).



Slika 5: Raspored rezistencije na CLA i FLQ među *Candida* pozitivnim i *Candida* negativnim bolesnicima

Statistička analiza pokazala je nepostojanje značajne povezanosti između prisutnosti *Candida* vrsta i bilo koje od procenjenih histopatoloških kategorija, broja eradikacija, pola i prisutnosti mutacija *H. pylori* ( $p > 0,05$ ). Skor celularnosti 2 najčešće je zabeležen u obe grupe. Informativna aktivnost u rezultatima biopsije nivoa 1 i 2 bili su najčešće uočeni, sa najvišom stopom upalne aktivnosti od 1 u *Candida*-pozitivnoj i *Candida*-negativnoj grupi. Što se tiče procene atrofije, najčešće su uočeni skorovi atrofije 0 i 1, pri čemu je većina pacijenata imala skor atrofije od 1, 51% i 66,7% za *Candida* negativne i *Candida* pozitivne bolesnike (Tabela 12).

Što se tiče kliničkih dijagnoza, među *Candida*-pozitivnim ispitanicima, najčešće dijagnostifikovane gastrointestinalne patologije uključivale su GERB, koji je otkriven u tri (33,3%) bolesnika, zatim dispepsija u dva (22,2%), gastroduodenitis u dva (22,2%) i gastritis i duodenalni ulkus u po jednog bolesnika (11,1%). Druge dokumentovane patologije, uključujući sideropenijsku anemiju, varikozitete jednjaka i dijafragmalnu herniju, nisu bile prisutne među *Candida*-pozitivnim bolesnicima. Najčešće kliničke dijagnoze kod *Candida*-negativnih bolesnika su gastritis, koji je dijagnostifikovan kod 39 bolesnika, a zatim gastroduodenitis kod 20 bolesnika. Dijagnoza gastritisa ili duodenitisa bila je češća kod *Candida* negativnih bolesnika, i to na granici značajnosti  $p = 0,056$ . Druge dijagnoze među *Candida*-negativnim bolesnicima bile su dispepsija (17 bolesnika), hronični gastritis (12 bolesnika), duodenalni ulkus (9 bolesnika), gastroezofagealni refluks (8 bolesnika),



hijatusna hernija (8 bolesnika), sekundarna sideropenijska anemija (5 bolesnika) i gastroduodenitis (2 bolesnika). Hi-kvadrat analiza nije pokazala razliku između *Candida*-pozitivnih i negativnih ispitanika u pogledu učestalosti ulkusa ( $p>0,05$ ).

#### 4.7.3 Statistička procena povezanosti između otkrivenih mutacija gena kod *H. pylori* pozitivnih povezanih sa rezistencijom na antibiotike i demografskim, kliničkim i histološkim parametara

Prisutnost genskih mutacija povezanih sa rezistencijom na fluorohinolone i klaritromicin procenjena je za kodon *gyrA*, 23S i *gyr87* i *gyr91*. Sveukupno, mutacije gena otpornosti na klase antibiotika klaritromicina i fluorohinolona pronađene su kod 57 (52,8%) odnosno 52 (47,3%) uzorka (tabela 13.).

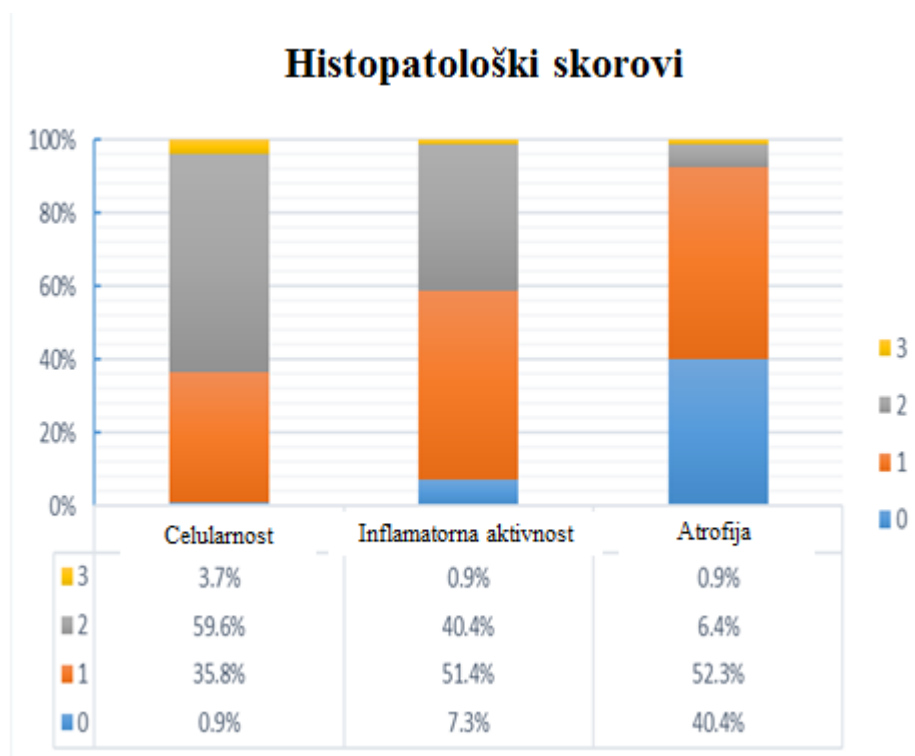
Tabela 13. Prikaz antibiotske rezistencije i mutacija među *naïve* i prethodno lečenih bolesnika:

	Ukupno	Broj lečenja		<i>P</i> vrednost
		Naïve	lečeni	
	n, %	n	n	
<b>FLQ - rezistencija</b>	52, 47,3%	7	45	0,008*
<b>CLA - rezistencija</b>	57, 52,8%	7	50	0,002*
<b>FLQ + CLA rezistencija</b>	33, 30%	4	29	0,054
<b>Mutacije</b>				
<b>23S mutacija</b>	56, 50,9%	7	49	0,002*
<b><i>gyr 91</i> mutacija</b>	21, 19,1%	3	18	0,268
<b><i>gyrA</i> mutacija</b>	42, 38,2%	5	37	0,013*
<b><i>gyr 87</i> mutacija</b>	16, 14,5%	3	13	0,757

Tabela 14. Prikaz histopatoloških skorova i muacija među *naïve* i prethodno lečenih bolesnika:

	Ukupno	Broj lečenja		P vrednost
		Naïve	lećeni	
	n, %	n	n	
<b>Histopatološki skorovi</b>				
<b>Skor atrofije</b>				0,018*
<b>0</b>	44	18	26	
<b>1</b>	57	8	49	
<b>2</b>	7	2	5	
<b>3</b>	1	0	1	
<b>Skor celularnosti</b>				0,018*
<b>0</b>	1	1	0	
<b>1</b>	39	15	24	
<b>2</b>	65	12	53	
<b>3</b>	4	0	4	
<b>Inflamatorna aktivnost</b>				0,002*
<b>0</b>	8	5	3	
<b>1</b>	56	17	39	
<b>2</b>	44	6	38	
<b>3</b>	1	0	1	

Korelacijska analiza otkrila je značajnu povezanost između rezistencije na antibiotike i broja eradikacija, sa značajno višom incidencijom 23S i gyrA mutacija uočenih u prethodno lečenih bolesnika, u poređenju sa naivnom grupom ( $p < 0,05$ ). Osim toga, primećena je značajna razlika u stopama rezistencije između bolesnika sa više od jednog pokušaja eradikacije, u poređenju sa naivnim i pacijentima sa jednom eradikacijom, za fluorohinolone, klaritromicin i dvostruku rezistenciju ( $p < 0,05$ ). Štaviše, veće stope rezistencije na antibiotike potvrđene su kod bolesnika sa neuspelim pokušajima eradikacije, za fluorohinolone ( $p = 0,008$ ) i klaritromicin ( $p = 0,002$ ), u poređenju sa prethodno nelečenom grupom, prikazano u tabeli 13. Ukupna dvojnna antimikrobna rezistencija otkrivena je kod 33 od 110 (30%) bolesnika. Uz veću incidenciju otkrivenih mutacija među ispitanicima sa rekurentnom infekcijom *H. pylori*, značajno viši rezultati celularnosti, upale i atrofije pronađeni su kod prethodno lečenih pacijenata u odnosu na naivnu grupu ( $p < 0,05$ ), kao što je prikazano u tabeli 14 i na slici 6.



Slika 6. Odnos patohistoloških karakteristika i broja eradikacija

Na slici 6 grafički je prikazan odnos broja eradikacija i patohistoloških karakteristika, gde se uočava da je inflamatorna aktivnost najviša u pacijenata sa jednom ili više eradikacija.

Zanimljivo je da je rezistencija na klaritromicin bila povezana sa rezistencijom na fluorohinolone ( $p=0,034$ ), kao što je prikazano u tabeli 15. Analiza demografskih, kliničkih i histopatoloških karakteristika kod bolesnika razdvojenih u grupe prema statusu rezistencije na antibiotike, otkrila je značajnu razliku prema spolu, sa većom incidencijom genskih mutacija povezanih sa klaritromicinom u ženskoj kohorti, u poređenju sa muškim ( $p=0,008$ ). Žene su takođe imale veću učestalost rezistencije na oba leka ( $p=0,004$ ). Nije bilo značajne razlike između rezistencije na antibiotike i ostalih parametara, uključujući starost, život u gradu ili selu, prisutnom *Candidom* i u odnosu na prisutnost gastrointestinalnih bolesti (gastritis, duodenitis i ulkusi) ( $p>0,05$ ).

Tabela 15: Rezultati Hi-kvadrat analize karakteristika AB rezistentne i AB senzitivne grupe

	<b>FLQ Rezistencija (P vrednost)</b>	<b>CLA Rezistencija (P vrednost)</b>	<b>Dualna rezistencija (P vrednost)</b>
<b>&gt;40 godina starosti</b>	0,636	1	0,787
<b>&gt;50 godina starosti</b>	0,889	0,918	0,638
<b>pol</b>	0,094	0,008*	0,004*
<b><i>Candida</i> status</b>	0,222	0,815	0,362
<b>Broj eradikacija</b>	0,001*	0,003*	0,001*
<b>Naïve vs ponavljano lečenje</b>	0,012*	0,001*	0,062
<b>Naïve i 1 vs &gt;1 eradikacija</b>	0,001*	0,001*	0,001*
<b>Skor celularnosti</b>	0,907	0,333	0,453
<b>Skor celularnosti 0 i 1 vs &gt;1</b>	0,628	0,246	0,259
<b>Inflamatorna aktivnost</b>	0,336	0,73	0,242
<b>Inflamatorna aktivnost 0 i 1 vs &gt;1</b>	0,34	0,053	0,223
<b>Skor atrofije</b>	0,001*	0,097	0,007*
<b>Skor atrofije 0 vs &gt;0</b>	0,017*	0,078	0,013*
<b>Gastritis / Duodenitis</b>	0,833	0,639	0,562
<b>Ulkusi</b>	0,295	0,462	0,237
<b>FLQ Rezistencija</b>		0,034*	

FLQ – fluorohinoloni, CLA – klaritromicin

Značajno viši rezultati atrofije primećeni su kod bolesnika sa rezistencijom na fluorohinolone ( $p=0,001$ ) i dualnom rezistencijom ( $p=0,007$ ), u poređenju sa bolesnicima sa *H. pylori* osetljivim na fluorohinolone. Nije uočena značajna razlika za mutacije gena rezistencije i druge patohistološke kriterije ( $p>0,05$ ).

#### 4.8. Genetička osnova rezistencije na fluorohinolone i klaritromicin

Ispitivanje osnove genetičke rezistencije na fluorohinolone i klaritromicin izvršeno je na 176 uzoraka bioptata želuca koji su bili pozitivni na *H. pylori*. Kao osnova rezistencije na fluorohinolone, ispitivane su tačkaste mutacije na enzimu girazi, odnosno odgovornom *gyrA* genu, i to na pozicijama

87 i 91, dok je kod osnove rezistencije na klaritromicin, ispitivana 23S RNK, tj, *rrl* gen sa najčešćim tačkastim mutacijama na pozicijama 2146 i 2147. Distribucija detektovanih mutacija među rezistentnim uzorcima *H. pylori* predstavljena je u Tabeli 16. Dominantna mutacija odgovorna za rezistenciju na fluorohinolone je bila na poziciji 87 *gyrA* gena, dovodeći do izmene aminokiseline asparagin u lizin, dok je dominantna mutacija kod rezistentnih uzoraka na klaritromicin bila substitucija adenina u guanin na poziciji 2147 *rrl* gena.

Tabela 16. Genotipske i fenotipske mutacije

Fenotip	Fluorohinoloni				Klaritromicin		
Gen	<i>gyrA 87</i>	<i>gyrA 91</i>			<i>rrl</i>		
Genotip	N87K (MUT)	D91N (MUT1)	D91G (MUT2)	D91Y (MUT3)	A2146 G (MUT1)	A2146 C (MUT2)	A2147 G (MUT3)
Izmena	Asparagin / Lizin	Asparaginska kiselina / Asparagin	Asparaginska kiselina / Glicin	Asparaginska kiselina / Tirozin	AA / GA	AA / CA	AA / AG
Σ(N/%)	26/27,4	23/24,2	19/20,0	14/14,7	25/24,3	5/4,8	81/78,6

\*MUT-mutacija

Detektovane su mutacije kod svih rezistentnih uzoraka rezistentnih na klaritromicin, dok su tačne mutacije, odnosno odgovorne izmene detektovane kod 68,4% (65/95) uzoraka rezistentnih na fluorohinolone. Kod gotovo 31,6% (30/95) uzoraka, nisu detektovane tačne izmene koje je molekularni test podržavao, a sa druge strane nisu detektovane ni divlji (osetljivi) tipovi *gyrA* alela. Većina njih (63,3%) javljala se kod korezistentnih uzoraka, dok je ostatak uzoraka (36,7%) davalo fenotip rezistentnih na fluorohinolone i osetljivost na klaritromicin. Kod 20,3% (26/128) ispitivanih uzoraka detektovani su mešani genotipovi, odnosno prisustvo ili heterorezistencije na ispitivani antibiotik ili prisustvo više od jednog rezistotipa *H. pylori*. Rezultati distribucije detektovanih mešanih genotipova uzoraka cele ispitivane populacije predstavljeni su u Tabeli 17. Najveći broj detektovanih izmena kod uzoraka rezistentnih na fluorohinolone javljalo se na poziciji 91 *gyrA* gena sa istovremeno detektovanom više od jedne mutacije. Sa druge strane, kod uzoraka rezistentnih na klaritromicin, većina mešanih genotipova se javljalo sa istovremenom detekcijom divljeg i bar jedne tačkaste mutacije na *rrl* genu. Kod 2,1% ukupne ispitivane populacije uzoraka, detektovana su istovremeno potpuno osetljiv i rezistentan genotip na fluorohinolone, odnosno istovremeno prisustvo barem dva izolata *H. pylori* u uzorku bioptata.

Tabela 17: Rezultati distribucije detektovanih mešanih genotipova uzoraka

Rezistentni na fluorohinolone			Rezistentni na klaritromicin		
Genotip	% svih uzoraka	% rezistentnih uzoraka	Genotip	% svih uzoraka	% rezistentnih uzoraka
WT 87 +MUT 87	6,3	3,4	WT + MUT (1-3)	9,1	15,5
WT 91+ MUT 91 (1-3)	7,4	4,0	>1 MUT	4,5	7,7
>1 MUT 91 (1-3)	22,1	11,9			
MUT 87 + MUT 91 (1-3)	8,4	4,5			
WT 87 + WT 91 + MUT 87 + MUT 91 (1-3)	2,1	1,1			

\*WT-divlji tip  
MUT-mutacija

#### 4.9. Terapijski režimi

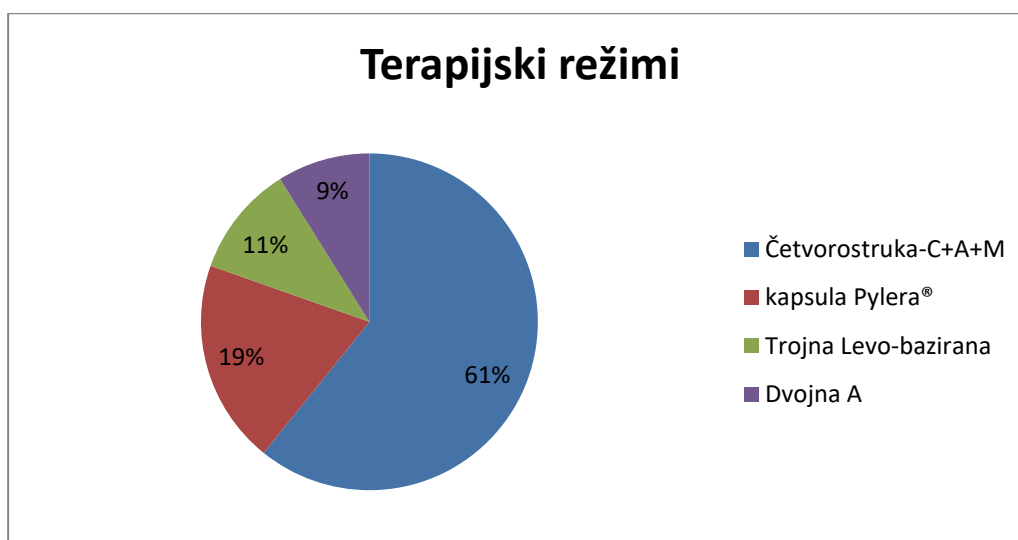
Tabela 18. Primenjeni terapijski režimi: učestalost i efikasnost

Terapijski protokoli	Prva linija lečenja (N, %)	Efikasnost prve linije (%)	Druga linija lečenja (N, %)	Efikasnost druge linije (%)
Dvojna A	5, 9%	80	5, 4%	80
Trojna Levofloksacin bazirana	6, 11%	83,3	62, 50%	83,9
Četvorostruka C+A+M	34, 61%	94	15, 12%	75
Pylera®	11, 19%	100	42, 34%	85,7

\*C – klaritromicin, A – amoksicilin, M - metronidazol

Najčešće propisivani terapijski režimi, nezavisno od linije terapije, bili su četvorostruka-C+A+M terapija, jedinstvena kapsula Pylera, trojna-levofloksacin bazirana i dvojna-A terapija. Učestalost njihove primene u različitim linijama terapije prikazana je u tabeli 18. Zadovoljavajući i optimalnu efikasnost ostvarile su samo četvorostruke terapije, bez i sa bizmutom (respektivno). U drugoj liniji lečenja, granično prihvatljivu efikasnost ostvarila je isključivo jedinstvena kapsula Pylera®.

#### 4.10. Terapija prve linije (tailored made): propisivani režimi i efikasnost



Grafik 19. Učestalost najčešće propisivanih *tailored made* terapijskih režima u prvoj liniji terapije

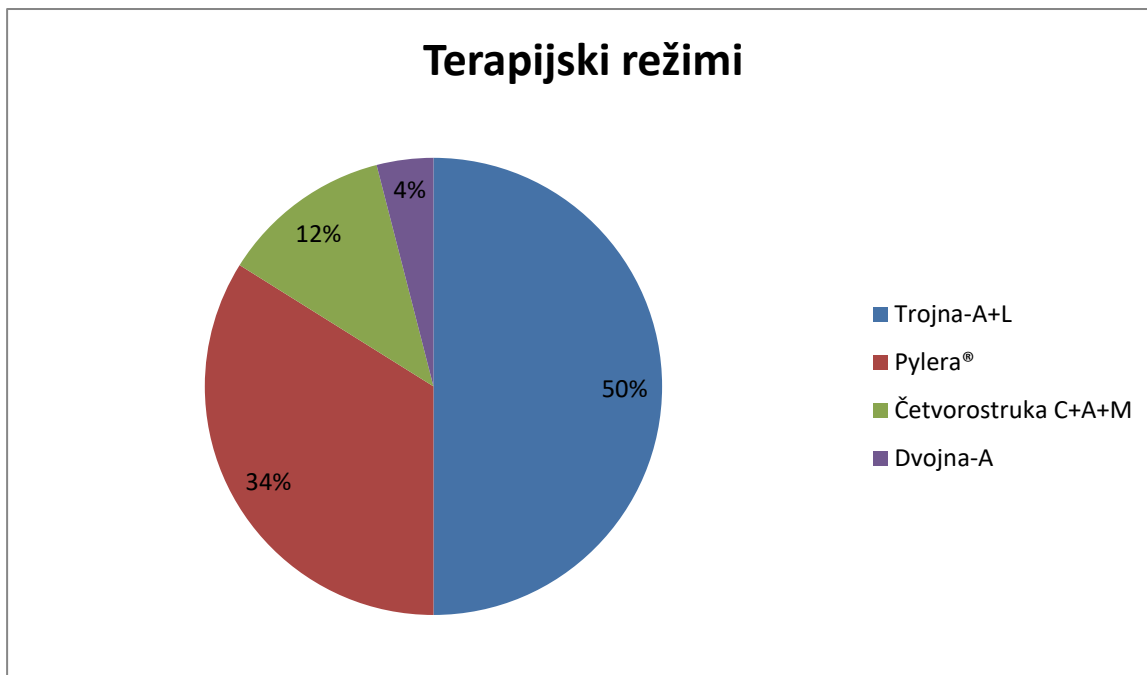
Najčešće propisivani terapijski režim u prvoj liniji eradikacije bila je četvorostruka terapija sa bizmutom i to klaritromicin+amoksisilin+metronidazol (C+A+M) terapija kojom su lečena 34 pacijenta (60%), potom jedinstvena kapsula Pylera® koja je primenjena kod 11 pacijenata (19%), zatim trojna terapija bazina na levofloksacinu (A+L ili M+L) kod šest pacijenta (11%) i na kraju dvojna terapija sa visokim dozama amoksicilina i PPI primenjena je kod pet pacijenata (9%) pacijenata.

Tabela 19. Efikasnost *tailored made* terapije u prvoj liniji lečenja

Terapijski modalitet	Efikasnost (%)
Četvorostruka C+A+M	94
Kapsula Pylera®	100
Trojna Levo-bazirana	83.3
Dvojna A	80

Zadovoljavajuću efikasnost u prvoj liniji terapije ostvarila je isključivo četvorostruka terapija, sa ili bez bizmuta. Ukupna stopa eradikacija je bila dobra i iznosila je 93%.

#### 4.11. Terapija druge linije (tailored made): propisivani režimi i efikasnost



Grafik 20. Učestalost najčešće propisivanih *tailored made* terapijskih režima u drugoj liniji terapije

„Rescue“ terapija primenjena je kod 124 pacijenta (69%). Najčešće propisana terapija bila je trojna amoksicilin (1000mg/12h) + levofloksacin (500mg/24h)+PPI terapija (n=62, 50%). Drugi po učestalosti terapijski režim bila je jedinstvena kapsula Pylera® (n=42, 33,9%), zatim četvorostruka konkomitantna terapija bez bizmuta (n=15, 12, 1%), te potom dvojna terapija sa visokim dozama amoksicilina i PPI koja je propisana kod 5 pacijenata (4%).

Tabela 20. Efikasnost *tailored made* terapije u drugoj liniji lečenja

Terapijski režim	Efikasnost (%)
<b>Trojna-A+L</b>	83,9
<b>Kapsula Pylera®</b>	85,7
<b>Četvorostruka-C+A+M</b>	75
<b>Dvojna-A</b>	80

U drugoj liniji terapije, prihvatljivu stopu eradikacije ostvarila je isključivo četvorostruka terapija sa bizmutom i to u obliku 3-u-1 kapsule Pylera®.



#### 4.12. Komplijansa, neželjeni efekti i adjuvantna terapija

Tabela 21. Komplijansa, neželjeni efekti i adjuvantna terapija u prvoj i drugoj liniji eradikacije

<b>Varijable</b>	<b>Prva linija terapije</b>	<b>Druga linija terapije</b>
Komplijansa (>90%, da)	100%	98,4%
Neželjeni efekti	8,5%	5,6%
Probiotici (da)	93%	97%

Komplijansa svih bolesnika u obe terapijske linije bila je zadovoljavajuća (>90%). U prvoj liniji terapije, 8,5% bolesnika prijavilo je pojavu neželjenih efekata na primenjenu terapiju, dok je u drugoj liniji terapije taj procenat iznosio 5,6%. U obe terapijske linije mučnina je prijavljivana kao najčešći neželjeni efekat primenjene terapije.

Kao adjuvantnu terapiju u vidu probiotika, u prvoj liniji terapije koristilo je 93% bolesnika, a u drugoj 97% bolesnika.

## 5.0. DISKUSIJA

Prevalenca *H. pylori* infekcije u Evropi se kreće u rasponu od 20% do 40% (186). Infekcija predstavlja globalni zdravstveni problem i smatra se da je oko polovine populacije prokuženo sa *H. pylori* (187). U poslednje dve dekade se globalno uočava nešto niža prevalenca infekcije što se može objasniti većom upotrebom PPI i antibiotika (188). U našoj studiji prevalenca infekcije je iznosila oko 43%.

Odnos između pola i *H. pylori* infekcije bio je kontroverzan u prethodnim studijama (189–191). Našom analizom nije uočena značajna razlika među polovima u prevalenci *H. pylori* infekcije. Nedavna meta-analiza Ibrahima i saradnika pokazala je da se infekcija češće javlja kod muškaraca nego kod žena, kako kod dece tako i kod odraslih (192). U velikoj meta analizi sprovedenoj od strane Zamanija i saradnika, uočena je veća prevalenca *H. pylori* infekcije kod muškaraca u odnosu na žene (13). Polna razlika u infekciji *H. pylori* je intrigantna tema, budući da adenokarcinom želuca (najozbiljnija posledica infekcije *H. pylori*) pokazuje značajno dominantniju učestalost kod muškaraca.

Naši podaci imaju slične pokazatelje, među bolesnicima koji su imali dispeptične smetnje bilo je više osoba ženskog pola, dok je u grupi *H. pylori* pozitivnih bolesnika odnos sličan sa diskretno većom prevalencom muškog pola.

Potvrđeno je da su lošiji socioekonomski uslovi u detinjstvu najvažniji faktori rizika za infekciju *H. pylori* (193). Socioekonomski status obuhvata niz činilaca, uključujući gustinu naseljenosti, nivo lične higijene, sanitarnih uslova i mogućnosti obrazovanja. Konkretno, veruje se da niži nivo obrazovanja, velika gustina naseljenosti, nedostatak sanitarnih uslova, nizak nivo higijene povećavaju verovatnoću sticanja infekcije unutar populacije (194,195). U našoj grupi postoji statistički značajno prisutnija prevalenca infekcije kod bolesnika koji žive na selu što se verovatno može objasniti nekim od ovih faktora koji su kod ove subpopulacije bolesnika prisutni.

Studija preseka unutar evropske populacije zaražene bakterijom nije mogla pokazati nikakvu značajnu povezanost između pušenja i infekcije. Povezanost između upotrebe alkohola i atrofičnog hroničnog gastritisa povezanog sa *H. pylori* nije se mogla dokazati (196).

Alkohol i pušenje doprinose promenama u želucu i utiču na poremećaje povezane sa kancerogenezom *H. pylori* uključujući rizik od raka želuca (197). U našem istraživanju nije bilo statistički značajne razlike u vezi navika pušenja i upotrebe alkohola između *H. pylori* negativnih i *H. pylori* pozitivnih bolesnika.

Oštećenje gornjeg dela digestivnog trakta izazvano nesteroidnim antiinflamatornim lekovima (NSAIL) lako se javlja kod ljudi sa istorijom komplikovanih ili nekomplikovanih ulkusa. Mnoge nedavne kliničke studije dokazale su dobrobit eradikacije *H. pylori* kod korisnika NSAIL, međutim, tačan patofiziološki odnos između istovremene infekcije *H. pylori* i primene NSAIL-a još nije u potpunosti razjašnjen. Testiranje i iskorenjivanje *H. pylori* generalno se preporučuju kod bolesnika koji su pod visokim rizikom od oštećenja digestivnog trakta uzrokovanog NSAIL. Međutim, kod visokorizičnih bolesnika potrebna je profilaksa ulkusa primenom PPI čak iako je *H. pylori* uspešno izlečen. Kod bolesnika sa niskim rizikom još uvek je upitno može li ili ne eradikacija *H. pylori* smanjiti oštećenje gornjeg gastrointestinalnog trakta (GIT). Međutim, u zapadnim zemljama, zbog svoje isplativosti, testiranje i iskorenjavanje *H. pylori* preporučuje se pre početka uzimanja aspirina ili NSAIL-a, bez obzira na visinu rizika. U regionima sa visokom prevalencom infekcije *H. pylori* (>20%), korist od testiranja i lečenja *H. pylori* kod bolesnika koji dugoročno piju NSAIL još nije utvrđena. Podaci iz ranije studije Sokić i saradnika govori o uticaju upotrebe NSAIL, aspirina i *H. pylori* infekcije na krvarenje. Prema rezultatima studije akutno krvarenje iz gornjeg GIT-a uzrokovano je isključivo NSAIL u 55 (11%), aspirinom u 66 (13,2%), dok je kombinovana terapija NSAIL/aspirin utvrđena u 19 (3,8%) bolesnika. Ukupno je korišćenje NSAIL-a i/ili aspirina

dijagnostikovano kod 139 (27,8%), dok je kod 122 (24,4%) dijagnostikovana *H. pylori* infekcija. Oba faktora rizika utvrđena su u 144 (28,8%) bolesnika (*H. pylori*+NSAIL u 12,2%, *H. pylori*+aspirin u 10,8% i *H. pylori*+aspirin+NSAIL u 5,8%). U 19,8% slučajeva (14% muškaraca i 27% žena) nije zabeležena ni upotreba NSAIL/aspirina niti prisustvo *H. pylori* infekcije (198). Drugo istraživanje Milivojevića i saradnika govori o istim i istovremeno najznačajnijim razlozima za akutno gornje GIT krvarenje, bez statistički značajne razlike između upotrebe NSAIL između grupa koje su bile *H. pylori* pozitivne i *H. pylori* negativne, a imale su gornje GIT krvarenje (199). U našoj studiji nije bilo statistički značajne razlike u upotrebi NSAIL i aspirina među *H. pylori* pozitivnim i *H. pylori* negativnim bolesnicima.

Objavljene su brojne studije koje sugerišu povezanost *H. pylori* infekcije sa dijabetes melitusom (DM), hipertenzijom, anemijom i drugim ekstraintestinalnim bolestima (200–202).

Dok je uloga *H. pylori* u idiopatskoj trombocitopenijskoj purpuri, sideropenijskoj anemiji i deficitu vitamina B12 već prepoznata, novi dokazi upućuju na to da *H. pylori* može povećati rizik od akutnog koronarnog sindroma, srčane insuficijencije, insulinske rezistencije, metaboličkog sindroma i biti povezana sa neurodegenerativnim, neurološkim, imunološkim, hematološkim, respiratornim i drugim poremećajima koji su se prethodno povezivali sa drugim faktorima rizika (203,204).

Odnos između *H. pylori* i anemije uzrokovane nedostatkom gvožđa utvrđen je brojnim studijama (205–207).

Studije su pokazale da osobe zaražene *H. pylori* imaju značajno niže vrednosti serumskog feritina i gvožđa u odnosu na *H. pylori* negativne osobe. Nakon uspešne eradikacije *H. pylori* infekcije, metabolizam gvožđa se normalizuje (208).

Literaturni rezultati podržavaju teoriju da infekcija *H. pylori* utiče na vrednost CRP-a, kao markera inflamacije i metabolizam lipida na način da može povećati rizik od ateroskleroze i kardiovaskularnih događaja. Takvi podaci impliciraju da se infekcija *H. pylori* može smatrati nezavisnim faktorom rizika za razvoj koronarne bolesti. Uspešnim sprovođenjem lečenja infekcije dolazi do pada nivoa CRP-a (209). Naši rezultati ukazuju da je nivo hemoglobina, serumskog gvožđa i feritina značajno niži u grupi *H. pylori* pozitivnih osoba, dok su markeri inflamacije (CRP) u istoj grupi bili značajno viši, što je u skladu sa referencama koje opisuju slične nalaze.

Naši podaci pokazuju najveću zastupljenost kardiovaskularnih bolesti među komorbiditetima, bez značajne razlike između *H. pylori* negativnih (29,2%) i *H. pylori* pozitivnih (29%) bolesnika. Na drugom mestu po učestalosti komorbiditeta je bio diabetes melitus, takođe bez statistički značajne razlike između pomenutih grupa. Beleži se nešto veća učestalost astme i respiratornih bolesti među *H. pylori* pozitivnim bolesnicima što je u skladu sa literaturnim podacima (204).

Dispepsija bez alarmnih simptoma nije apsolutna indikacija za endoskopiju, ali endoskopija može olakšati dijagnozu strukturnih poremećaja u određenoj grupi bolesnika. Rizik od maligniteta vrlo je nizak u mladih bolesnika bez simptoma alarma (13). Endoskopija se kod bolesnika mlađih od 45 godina ipak može razmotriti u grupi onih koji ne reaguju na inicijalnu terapiju i kako bi se isključila strukturna bolest poput gluten senzitivne enteropatije (210). Potencijalna prednost negativne endoskopije u proceni dispeptičkih bolesnika je smanjenje anksioznosti i povećanje zadovoljstva bolesnika (211).

U našem istraživanju glavna klinička indikacija za lečenje bila je neispitivana dispepsija praćena sumnjom na gastritis ili gastroduodenitis. Glavna dijagnostička metoda izbora bila je histologija nakon gornje endoskopije, dok je drugi najčešće korišćeni dijagnostički test bio fekalni antigenski test i ureaza izdisajni test. S obzirom na činjenicu da se analizirala rezistencija, svi pozitivni bolesnici uključeni u studiju podvrgnuti su gornjoj endoskopiji. Većina uključenih bolesnika zadovoljila je i

kliničku indikaciju za gornju endoskopiju, temeljenu na osnovnim karakteristikama (stariji od 45 godina, alarmni simptomi, više ranijih neuspešnih lečenja *H. pylori* infekcije).

Infekcija *H. pylori* je glavni uzrok želudačne atrofije. Atrofične promene (metaplastične i nemetaplastične) otkrivene u uzorku koji je dobijen adekvatnim uzimanjem biopsije iz regiona želuca u skladu sa Sidnejskom klasifikacijom uvek treba da bude sumnju da se radi o *H. pylori* pozitivnom gastritisu kao uzroku atrofije (212).

U dugotrajnoj infekciji (tj. kod starijih osoba) ili u mladim bolesnika sa infekcijom i propratnim faktorima rizika, atrofične promene takođe se tipično javljaju kao pseudopilorusna metaplazija, koja često koegzistira sa multifokalnom intestinalnom metaplazijom (u antrumu i korpusu). Takvi bolesnici imaju veći rizik od tumora želuca (213).

U našem uzorku, među *H. pylori* negativnim i *H. pylori* pozitivnim bolesnicima, najdominantnija histopatološka dijagnoza bio je superficijalni gastritis. U grupi *H. pylori* pozitivnih bolesnika značajno je više bilo bolesnika sa atrofičnim gastritisom i intestinalnom metaplazijom (43,5%) nasuprot 28% u grupi *H. pylori* negativnih što se uklapa u literaturne podatke da je *H. pylori* gastritis povezan sa atrofijom sluznice i intestinalnom metaplazijom.

Do 2016. godine najčešće propisivan režim za eradikaciju *H. pylori* u Srbiji bila je trojna terapija bazirana na klaritromicinu. Od 2016. godine, prema nacionalnom vodiču, randomiziranim kliničkim ispitivanjima i u skladu sa *Maastricht* konsenzusom (V izdanje), koji preporučuju napuštanje trojne i prelazak na četvorostruku terapiju, uspostavljene su nove nacionalne smernice – koje usko slede međunarodne (214–216). Trenutna studija pokazala je da je najpropisivaniji režim za bolesnike koji prethodno nisu bili lečeni, bila četvorostruka terapija bez bizmuta (konkomitantna terapija), a zatim *Pylera*® (četvorostruka terapija sa bizmutom koja sadrži tetraciklin) sa jednom kapsulom, koja je uglavnom propisivana kao opcija u drugoj terapijskoj liniji kod utvrđene rezistencije na oba antibiotika (dualna rezistencija). U tom smislu, naše istraživanje je u skladu sa *Maastricht* konsenzusom, te pokazuje da su nacionalne i svetske smernice adekvatno implementirane i propisane u svakodnevnoj praksi.

Uspešnost lečenja *H. pylori* infekcije može se klasifikovati kao odlična (>95%), dobra (>90%), granično prihvatljiva (85-89%) i neprihvatljiva (<85%) (217). U našem istraživanju ishod lečenja kod 155 (86,1%) bolesnika bio je pozitivan (eradikovana *H. pylori* infekcija), dok je ishod bio negativan kod 25 (13,9%) bolesnika (neuspeh terapije). Kod „naïve“ bolesnika u ovom istraživanju primenom odgovarajućih terapijskih protokola izlečeno je 52 (92,86%) bolesnika, dok 4 (7,14%) bolesnika nije izlečeno. U grupi bolesnika koji su prethodno dobijali eradikacionu terapiju, primenom odgovarajućih terapijskih protokola izlečeno je 103 (83,1%) bolesnika, dok 21 (16,9%) bolesnik nije izlečen.

Utvdili smo da je ukupna stopa eradikacije, bez obzira na broj prethodnih pokušaja eradikacije, bila 86,1% što se može smatrati prihvatljivim. Ukupna stopa izlečenja u prvoj liniji je bila 93% što se smatra dobrom stopom izlečenja. Najčešće propisana prva linija lečenja bila je 14-dnevna četvorostruka terapija klaritromicin-amoksicilin-metronidazol (C+A+M, 60%) sa učinkovitošću od 94% koja je na granici dobre i optimalne stope izlečenja. *Pylera*® u pojedinačnoj kapsuli je primenjena u prvom režimu kod 19,6% bolesnika sa uspehom u 100% slučajeva i optimalnim učinkom, dok su još primenjeni trojna terapija sa levofloksacinom (A+L+PPI i M+L+PPI) u trajanju od 14 dana kod 10,7% bolesnika i uspehom od 83,33%, kao i dualna terapija sa visokim dozama amoksicilina i PPI kod 8,9% bolesnika sa uspehom od 80%. Ova dva terapijska režima su primenjena kod manjeg broja bolesnika sa neprihvatljivim rezultatom eradikacije. Svi terapijski režimi u prvoj liniji su ordinirani nakon dobijanja rezultata rezistencije određenog PCR metodom (*tailored made* terapija). Ono što treba napomenuti je da, prema prethodno objavljenim podacima studije Hp-EuReg, trendovi lečenja u jugoistočnoj Evropi ukazuju na to da je trojna terapija bazirana na klaritromicinu još uvek najzastupljenija. Slovenačka studija koju su sproveli *Tepes* i saradnici pokazala je trojnu-

C+A kao najčešću opciju prve linije terapije sa stopom eradikacije od 93% (218). Dok je slično strukturisana grčka studija otkrila da je konkomitantna četvostruka terapija-C+A+M najčešće propisivana prva linija terapije sa dobrim učinkom od 92%, slično našim podacima (219). Ovi se nalazi mogu objasniti još uvek niskom klaritromicin (CLA) rezistencijom u Sloveniji (<15%), dok je CLA rezistencija u Grčkoj preko 15%, što je u skladu sa rezultatima stopa antimikrobne rezistencije koje je objavila SZO za regiju južne Evrope (220). To ukazuje na potrebu za preispitivanjem i optimizacijom lečenja (130).

Naši rezultati, temeljeni na ograničenom broju testiranih bolesnika i uz prospektivnu studiju koja je u toku, pokazuju da je rezistencija prve linije na klaritromicin u Srbiji prilično visoka (42%) i iznad predloženog praga od 15%. Prema tome, predložena 14-dnevna četvostruka terapija (sa bizmutom ili bez bizmuta) kao izbor prve linije može se smatrati razumnom terapijskom opcijom. Četvostruka terapija koja sadrži bizmut dobar je izbor lečenja u slučaju visoke CLA rezistencije i/ili dvostruke antimikrobne rezistencije. Premda se generalno koristi kao izbor druge linije lečenja, ova terapijska opcija može se koristiti i kao prva opcija kada je poznata antibiotska rezistencija pre lečenja i u slučaju alergije na penicilin. Trojna terapija sa levofloksacinom (M+L+PPI) je neadekvatna i ne bi je trebalo primenjivati kao alternativu u slučaju alergije na penicilin ili kao opciju druge linije terapije. To je u skladu sa našim nalazima suboptimalne učinkovitosti trojne M+L i A+L kod prethodno nelečenih pacijenata (83,3%).

Uzimajući sve u obzir, sa ovakvim podacima u Srbiji nema mesta za trojnu terapiju C+A kao prvu liniju terapije i ona je rezervisana za područja sa niskom CLA rezistencijom i dokazanom učinkovitošću iste, poput severnoevropskih zemalja, dok je u jugoistočnoj Evropi (sa visokom CLA rezistencijom) prva linija četvostruka terapije preferirani i preporučeni režim (117). Četvostruka terapija koja sadrži bizmut još je jedan oblik terapije sa četiri leka, koja se obično propisuje u područjima sa visokom CLA rezistencijom i/ili visokom metronidazolskom rezistencijom. Bizmut svoj baktericidni učinak na *H. pylori* ostvaruje nizom različitih mehanizama, a istovremeno deluje u sinergizmu sa različitim antibioticima (117). Stoga terapija bazirana na bizmutu nadmašuje otpornost na klaritromicin i metronidazol, čineći *H. pylori* osetljivom na propisane antibiotike. U našem istraživanju, četvostruka terapija temeljena na bizmutu (BQT) druga je najčešća propisivana prva linija lečenja (to je takođe bio drugi najčešći propisivani režim u drugoj liniji terapije). Učinkovitost 14-dnevnog BQT-a bila je optimalna u prvoj liniji (100%). U slučaju dvostruke rezistencije, predložena terapija izbora bila bi BQT, a ne nonBQT (117,148). U našoj studiji smo utvrdili da je najčešće propisivana terapija druge linije bila trojna-A+L kod 50% bolesnika, što je u skladu sa smernicama srpskog nacionalnog konsenzusa iz 2016. godine. Terapija temeljena na levofloksacinu obično se propisuje nakon neuspeha lečenja temeljenog na klaritromicinu, ali se takođe može koristiti kao prvi izbor (obično u regijama sa poznatom visokom CLA rezistencijom pre lečenja ili kao *tailored made* terapija nakon primene PCR i provere antibiotske rezistencije) (148). Pylera® u jednoj kapsuli u drugoj liniji je primenjena kod 33,9% bolesnika sa uspehom u izlečenju od 85,7%, što je prihvatljiva stopa izlečenja. Kod 12,1% bolesnika je primenjena non-BQT (konkomitantna terapija A+C+M+PPI) sa suboptimalnim uspehom od 75%. Terapija je primenjena kod bolesnika koji su bili rezistentni na fluorohinolone, a senzitivni na klaritromicin. Izvestili smo o nezadovoljavajućoj stopi eradikacije (83,9%) sa trojnom-A+L u drugoj liniji bez obzira na trajanje terapije. To se može objasniti visokom stopom rezistencije bakterija na fluorohinolone. Na temelju brojnih testiranih bolesnika, otkrili smo da je rezistencija na fluorohinolone bila 50%, zbirno, što je značajno više od stopa rezistencije prema podacima SZO-a za regiju istočnog Sredozemlja (oko 19%) (220,221). Studija Megraud i saradnika pokazuje da postoji rastući trend rezistencije na klaritromicin, metronidazol i levofloksacin u poslednjih 20 godina što je u potpunoj korelaciji i sa našim stopama rezistencije (149).

Pylera®, tri leka u jednoj kapsuli (tetraciklin, bizmut, metronidazol) bila je drugi najčešći propisivan režim druge linije. Postigla je stopu izlečenja od 85,7%, što je prihvatljivo, bez obzira na dozu PPI. Nažalost, u Srbiji još uvek nije na pozitivnoj listi lekova Republičkog Fonda za zdravstveno osiguranje, te se ne može propisati na recept, s toga se i ređe propisuje. Ispitivanje antimikrobne

osetljivosti pre lečenja bilo bi korisno ne samo u promeni izbora lečenja i smernica u skladu sa tim, već bi, takođe, omogućilo individualno prilagođavanje lečenja koje ostaje krajnji cilj terapije (130).

S obzirom na dužinu lečenja, uočili smo značajnu zavisnost efikasnosti lečenja u odnosu na trajanje lečenja. Stopa eradikacije u prethodno nelečenih bolesnika lečenih četvorostrukim-C+A+M režimom bila je značajno viša kod bolesnika lečenih 14-dnevnom terapijom za razliku od 10-dnevne terapije. Svi naši bolesnici lečeni su režimima u trajanju od 14 dana, osim bolesnika koji su lečeni Pylera čije je lečenje trajalo 14 dana.

Pokazano je da je jedan od promenljivih faktora koji utiču na učinkovitost lečenja upravo dužina trajanja terapije. Pre 2013. godine standardna eradikaciona terapija podrazumevala je 7-dnevno trajanje lečenja (222). S obzirom na rastuću antimikrobnu rezistenciju, pretpostavljeno je da bi duže trajanje lečenja moglo popraviti stopu izlečenja. S toga trenutne smernice predlažu trajanje terapije od 14 dana. Zabeležen je trend povećanja dužine lečenja sa 9,6 dana u 2013. godini na 11,8 dana u 2018. godini (222). Brojne randomizovane kliničke studije ispitivale su efikasnost lečenja u kontekstu samog trajanja istog. Očekivano, pokazano je da 7-dnevna terapija ne daje zadovoljavajuće rezultate (110,223). U tom smislu, velika promena u našem nacionalnom vodiču, a koja je u skladu sa nacionalnim smernicama zemalja širom Europe jeste prekid 7-dnevne terapije, što govori u prilog konzistentnosti naših protokola sa internacionalnim preporukama, budući da nijednom od naših bolesnika nije propisano 7-dnevno lečenje (222). Ipak, čini se da je propisivanje terapije u trajanju od 10 dana još uvek rasprostranjeno u praksi među regionalnim gastroenterolozima (215). Randomizovana klinička studija sprovedena od strane Kima i saradnika, poređenjem trojne-C+A u odnosu na dužinu trajanja lečenja (7 dana naspram 14 dana) pokazala je značajno bolju stopu izlečenja kod terapije trajanja 14 dana (115). Međutim, oba režima imala su neprihvatljivo nisku učinkovitost (73,5% odnosno 78,6%). Indonezijska studija koju su proveli Herald i saradnici otkrila je slične rezultate sa sličnim režimima terapije (trojna-C+A), pri čemu su obe opcije postigle suboptimalne stope eradikacije (73,5% naspram 86,8%) (224).

Poslednjih godina i doziranje PPI-a zauzima središte debate. Preživljavanje i replikacija *H. pylori* umnogome zavisi od intragastrične pH (110). PPI deluju na povećanje pH, čineći patogen nedostupnim za replikaciju (176,217). Povećanje doze PPI bilo je predmet rasprave u prošlosti, ali nakon *Maastricht V* konsenzusa, primena tzv. standardnih tj. visokih doza prihvaćena je kao preporučeni izbor lečenja. Naši podaci kažu da postoje značajne razlike u propisivanju doza PPI, ali da su se protokoli sa višim dozama PPI pokazali efikasnijim u pogledu uspešnosti eradikacije. Izuzetak je 3-u-1 kapsula Pylera® koja je, propisana kako sa visokom tako i sa standardnom dozom PPI, postigla optimalnu stopu eradikacije u oba slučaja (100%), što sugerise njenu snažnu eradikacionu moć, što je i u skladu sa prethodnim istraživanjima (223). Pokazalo se da je jedinstvena kapsula Pylera® bila učinkovita u lečenju infekcije kod bolesnika sa visokom CLA i/ili MET rezistencijom i to sa zadovoljavajućim stepenom komplikacije bolesnika kako u prvoj liniji tako i kada se primenjivala kao tzv. "rescue" terapija (223). Svi naši bolesnici su lečeni visokim dozama PPI uz skoro optimalnu komplikaciju.

Kako bi se poboljšala stopa eradikacije, predložena su sredstva adjuvantne terapije. Probiotici smanjuju nuspojave i poboljšavaju adherentnosti bolesnika da uspešno završi terapiju, što dovodi do povećanja stope izlečenja (110,225). Velika većina naših bolesnika uzimala je probiotike, 93,3% bolesnika uzimalo je probiotike tokom prve linije terapije, dok je 96.6% bolesnika uzimalo probiotike tokom druge linije lečenja. Komplikacija u terapiji prve i druge linije bila je iznad 90%. Pretpostavlja se da eradikaciona terapija može dovesti do disbioze (226). Probiotici, osim što smanjuju nuspojave antimikrobne terapije, takođe mogu biti korisni kod bolesnika sa infekcijom *H. pylori* modulacijom crevne mikrobiote i pomaganjem njene obnove nakon lečenja, kao i prevencijom antibiotskog kolitisa (227).

Sveukupna sigurnost primenjenih režima, bilo da se radilo o bolesnicima koji još nisu bili lečeni ili kao terapija druge ili treće linije, bila je prihvatljiva. Tokom terapije prve linije, samo je 8,5% bolesnika prijavilo neželjene efekte od kojih je najčešća bila mučnina. Druga i treća linija terapije bile su praćene, takođe, manjim brojem neželjenih pojava (7 bolesnika prijavilo je nuspojave). Nakon antibiotske rezistencije, neželjeni događaji drugi su najvažniji prediktor stope eradikacije i mogu smanjiti komplijansu bolesnika i adherentnost protokolu lečenja (228,229). Važno je naglasiti da je u obe terapijske linije komplijansa naših pacijenata bila >90% (tabela 21.).

Jedno od ograničenja našeg istraživanja jeste veličina uzorka, koji u kontekstu visoke prevalencije *H. pylori* infekcije potencijalno ne oslikava na najreprezentativniji način populaciju *H. pylori* pozitivnih osoba. Dodatno, činjenica je da se ne radi o randomizovanoj kontrolisanoj studiji te mogućnost neželjene pristrasnosti ne može biti u potpunosti isključena. Sa druge strane, iskustva iz realne kliničke prakse imaju višestruki značaj i mogu biti od ključnog značaja u formiranju budućih (inter)nacionalnih vodiča te pomoći u eradikaciji i lečenju *H. pylori* infekcije.

Kod bolesnika kojima su uzimani bioptati želuca za potrebe molekularne detekcije *H. pylori*, istovremeno je ispitivana genetički osetljivost na fluorohinolone i klaritromicin, kao i osnova detektovane rezistencije u vidu tačkastih mutacija na odgovornim genima. Ukupna rezistencija ispitivanih uzoraka je iznosila 50% za fluorohinolone i 55% za klaritromicin. Detektovani nivoi rezistencije ukazuju na visok stepen rezistencije u Srbiji i sličan je Evropskim studijama, naročito nakon kovid pandemije. Fernandez-Caso i saradnici su u studiji u Španiji 2022. godine istim testom utvrdili prisustvo rezistencije uzoraka bolesnika u njihovoj populaciji od 59% za fluorohinolone i 84% za klaritromicin (105). Genetička osnova rezistencije na fluorohinolone i klaritromicin je ispitivana prisustvom, odnosno odsustvom „wild type“ (WT) odnosno divljih alela odgovornih gena ili prisustvom najčešćih mutiranih formi alela (MUT) za *gyrA* gen koji daje enzim girazu u slučaju fluorohinolona i *rrl* gena odgovornog za 23S RNK kod klaritromicina. U ispitivanim uzorcima, dominantna detektovana osnova rezistencije na fluorohinolone je bila izmena asparagina u lizin na poziciji 87 (N87K) i asparaginske kiseline u asparagin na poziciji 91 *gyrA* gena (>27% odnosno >24%). Takođe, dominantna mutacija kod *rrl* gena odgovorna za rezistenciju na klaritromicin bila je izmena adenina u guanin na poziciji 2147 (A2147G; >78%). Rezultati dobijeni testiranjem populacije u Srbiji u skladu su sa sličnim studijama koje su takođe detektovale navedene izmene kao dominantne nosioce rezistencije na fluorohinolone i klaritromicin (230). Zastupljenost i distribucija detektovanih promena i procentualno se slaže sa autorima iz Švajcarske i Francuske, koji navode dominaciju izmene A2147G (70%), praćenu sa A2146G (29%) i A2146C (1%) kod klaritromicina i izmene na 87 poziciji od preko 50% (231). Treba navesti da na odgovornoj poziciji osim detektovane izmene testom primenjenim u Srbiji N87K, u prethodno navedenoj studiji, na 87 poziciji su detektovane dodatno izmene N87I (asparagin u izoleucin), T87Y (treonin u tirozin) i N87Y (asparagin u tirozin). Ovo su i neki od razloga zbog koji je u ovoj studiji bilo 31% uzoraka kojima nije mogla da se odredi tačna mutacija, odnosno osnova rezistencije na fluorohinolone. Osim navedenih izmena na poziciji 87 koje korišćeni komercijalni test nije mogao direktno da odredi, dodatno postoje opisane izmene na poziciji 86 (D86N), ali i 88, 91, kao i u *gyrB* genu DNK giraze (232). Tu je i poseban dijagnostički izazov heterorezistencije ili prisustva mešanih genotipova. U našoj populaciji, preko 20% uzoraka je imalo upravo ovakav nalaz. Cambau i saradnici u svojoj studiji navode zastupljenost ovakvih uzoraka od preko 30% sa najčešćim mešanim genotipovima u okviru regiona za klaritromicin (WT+MUT) od skoro 10% cele populacije, dok je kod fluorohinolona najčešća kombinacija WT i neke od izmena na 91 poziciji (230). Podaci ispitivane populacije u ovoj studiji ukazuju na veoma sličnu zastupljenost detektovanih promena u regionu za klaritromicin (9%), kao i najveću učestalost kombinovanih genotipova u regionu 91 *gyrA* gena (>22%). Takođe je bitno napomenuti prisustvo istovremeno detektovanih osetljivog i rezistentnog genotipa u okviru istog uzorka, odnosno prisustvo najmanje dva soja *H. pylori*. Ovakvi nalazi doprinose razumevanju neuspešnosti primarne empirijske terapije i eradikacije zbog čega se u novom *Maastricht VI* konsenzusu i sugeriše testiranje osetljivosti minimum na klaritromicin bilo fenotipskim, bilo genotipskim metodama kad god je moguće (45).

Nakon otkrivanja, *H. pylori* se dugo smatrao jedinim pravim stanovnikom ljudskog želuca. Međutim, uprkos specifičnim uslovima u želucu, dokazano je postojanje dinamične zajednice želudačnih mikroorganizama (233–236). Procenjuje se da želudac naseljava  $10^2$  -  $10^4$  jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) bakterija/ml (171). Osim bakterijskih zajednica, članovi gljivične mikrobiote takođe su identifikovani u uzorcima biopsije želuca, sa brojem prisutnih gljivica u rasponu od 0 do  $10^2$  CFU/ml (171,233,235). *Candida spp.* predstavlja najčešće izolovani rod gljivica, sa *C. albicans* kao najčešće identifikovanom vrstom (167,169,173). Zanimljivo je da je nekoliko studija pokazalo da je kolonizacija želudačne sluznice *Candidom* povezana sa nekoliko želudačnih patologija. Štaviše, koegzistencija vrsta *Candida* i *H. pylori* potvrđena je u nekoliko studija te je pokazan sinergistički odnos između ova dva mikroorganizma u patogenezi želudačnih bolesti (167,235)

Za razliku od *H. pylori*, *Candida* je otporna na okolne uslove i može preživeti temperature iznad 40°C i pH u rasponu između 2 i 10 (167,170,237). Zanimljivo je da je prisutnost *H. pylori* unutar vakuola *Candida* potvrđena fluorescentnom mikroskopijom i da su geni i proteini specifični za *H. pylori* izolovani iz ćelija gljivice (19,167,168,170). Ulazak *H. pylori* unutar ćelije gljivice *Candida* okarakterisano je kao zaštitno prilagođavanje na stresne uslove, uključujući promene pH vrednosti, lečenje antibioticima i okruženje sa nedostatkom hranjivih supstanci (167,169,238,239). Ovaj endosimbiotski odnos potvrđen je u uzorcima sa različitih delova tela, uključujući oralne, želudačne i vaginalne uzorke te različite izvore hrane (237). Kod naših bolesnika *Candida* je izolovana u oko 8,5% bolesnika, što može objasniti eventualne neuspehe tzv. “*tailored made*” terapije, iako je ona data na osnovu podataka o rezistenciji na antibiotike i propisana je individualizovano, te se očekivalo da će biti uspešna. Ova pretpostavka se pominje u literaturi kao mogući razlog za neuspeh terapije (130).

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija u kojoj je otkrivena prisutnost gljivica *Candida*, a vrste *Candidae* identifikovane su qPCR metodom kod bolesnika sa potvrđenom infekcijom *H. pylori*. Slično rezultatima studije koju su proveli Karczewska i saradnici, koja je otkrila koegzistenciju *Candidae* i *H. pylori* u 11% bolesnika koji su bili podvrgnuti endoskopiji, potvrdili smo prisutnost oba mikroorganizma u 9 (8%) bolesnika (169). Najzastupljenija vrsta *Candidae* bila je *C. albicans* pronađena u 5 *Candida* pozitivnih uzoraka, a zatim *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* identifikovane u po dva uzorka. Prethodne studije identifikovale su *C. albicans* kao najčešće izolovanu gljivicu iz želudačne sluznice, dok su druge vrste *Candidae* takođe otkrivene, uključujući *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. famata* i *C. tropicalis* (173,240).

Iako identifikovan broj gljivica nije bio prisutan u značajnom obimu, pokazano je da je njihovo prisustvo povezano sa razvojem i napredovanjem kliničkih patoloških stanja u želucu. Prethodno, postojanje gastritisa uglavnom je bilo usko povezano sa postojanjem *H. pylori* infekcije, međutim, slučajevi želudačnih ulkusa povezanih sa *Candidom* potvrđeni su čak i kod *H. pylori* negativnih bolesnika (241). Prisutnost gljivice *Candida* povezana je i sa drugim patološkim stanjima, uključujući pomenuti hronični gastritis, peptički ulkus i tumor želuca (241–243). Davne 1979. godine Katzenstein i saradnici otkrili su da je jedna trećina uzoraka želudačnih ulkusa bila kolonizovana gljivicama roda *Candida* i da je prisustvo klastera gljivica povezano sa visokom postoperativnom smrtnošću (243).

Razvoj molekularnih tehnika omogućio je istraživačima dublji uvid u sastav želudačne mikrobiote, ali uloga gljivica u patogenezi bolesti i međudnos između *H. pylori* i drugih članova želudačne sluznice ostaju nedovoljno istraženi (243). Većina bolesnika u našem istraživanju kod kojih je testirano prisustvo *Candida* imalo je dijagnozu gastritisa ili duodenitisa (n=74, 67,3%), što daje dodatne dokaze o *H. pylori* kao uzročnom faktoru u razvoju gastritisa (41). Iako su Karczewska i saradnici izvestili o značajno višoj incidenci želudačnih ulkusa u grupi sa *H. pylori* i koinfekcijom *Candidom*, nije pronađena statistička razlika u incidenci ulkusa među *Candida*-pozitivnim i negativnim bolesnicima u našem istraživanju (169).



Iako naši rezultati ukazuju na značajno nižu učestalost gastritisa ili duodenitisa u grupi sa otkrivenom kolonizacijom *Candidom*, za tumačenje korelacijske analize treba uzeti u obzir relativno mali broj *Candida* pozitivnih uzoraka. U poređenju sa studijom koju su sprovedi Zwolińska i saradnici, gde je gljivična kolonizacija otkrivena kod 54,2% bolesnika sa želudačnim ulkusom i kod 10,3% slučajeva kod bolesnika sa hroničnim gastritisom, primetili smo manju incidencu želudačnog ulkusa (n=1; 11%) kod *Candida*-pozitivnih bolesnika (173). GERB je najčešće dijagnoza (n=3; 33%), a slede ga dispepsija i gastroduodenitis (n=2; 22%) kod *Candida*-pozitivnih bolesnika, što predstavlja niz kliničkih dijagnoza povezanih sa kolonizacijom *H. pylori* (244,245).

Slično sa prethodnim studijama, naši rezultati su pokazali da je među ekstragastričnim patologijama najčešće dijagnostikovana sideropenijska anemija (n=6; 5,5%), što ukazuje na povezanost između kolonizacije *H. pylori* i disregulacije metabolizma gvožđa (246,247).

Osim direktnog uticaja zbog kolonizacije *H. pylori*, rezultati novijih studija ukazuju na važnost drugih mikroorganizama u želucu u patogenezi inflamacije. Naime, uočeno je postojanje značajne korelacije između disbioze na nivou želuca i različitih patologija, naglašavajući važnost poremećaja u želudačnom mikrobiomu u etiopatologiji bolesti želuca, a ta veza se tiče i poremećaja gljivične mikrobiote na nivou želuca (79,171,235,236,248–250).

Od 110 bolesnika pozitivnih na *H. pylori* kod kojih je testirano prisustvo *Candida*, njih 68 (61,8%) bilo je starije od 50 godina. Primećena je značajna razlika kada se upoređi srednja životna dob *Candida*-pozitivnih (66 godina) i *Candida*-negativnih (55 godina) bolesnika ( $p < 0,05$ ). Među *Candida*-pozitivnom grupom, svi ispitanici bili su stariji od 50 godina, što dodatno podupire prethodne nalaze da je starija životna dob glavni predisponirajući faktor za gljivičnu kolonizaciju želuca (175).

Ista studija je pokazala da uz stariju životnu dob, upotreba PPI takođe pogoduje kolonizaciji sluznice želuca *Candidom* (175). Osim što predstavljaju deo terapijskog režima za eradikaciju *H. pylori*, PPI su široko propisivani lekovi za druge indikacije. Međutim, kako je prethodno izneto, nedavne studije su dokazale da hronična upotreba PPI favorizuje poremećaje u želudačnom mikrobiomu menjajući pH vrednost (176,240). Povezanost između upotrebe PPI i gljivične kolonizacije želuca takođe je potvrđena u studiji koju su sprovedi Mottaghi i saradnici, gde je upotreba ranitidina, pantoprazola i omeprazola bila povezana sa značajno povećanim rizikom od želudačne kandidijaze (240). Prema važećim smernicama iz *Maastrichta*, visoke doze PPI preporučuju se za terapiju eradikacije *H. pylori*, a sve *H. pylori*-pozitivne bolesnike treba lečiti antibioticima (214).

Privikavanje *H. pylori* na želudačnu okolinu i stečeni mehanizmi rezistencije odgovorni su za visoku svetsku prevalencu infekcije *H. pylori*. Bakterijska kolonizacija želudačne sluznice bila je uspešna zahvaljujući nekoliko evolucijskih mehanizama prilagođavanja, uključujući pokretljivost, sposobnost adhezije i regulaciju pH (251,252). Kao adaptivni mehanizam na niske pH vrednosti u želudačnoj sluznici, *H. pylori* je dobila enzim ureazu, koji razgrađuje ureu na ugljen dioksid i amonijak, što rezultira povećanjem pH i omogućava metaboličke procese bakterija (251). Smanjenje kiselosti okolne sredine želuca omogućava drugim pripadnicima mikrobiote iz usne duplje i tankog creva naseljavanje želuca, što favorizuje razvoj disbioze (240). Dodatno, uočena je i veza između infekcije *H. pylori* i disbioze crevne mikrobiote, uključujući promene u gljivičnoj gastrointestinalnoj zajednici, koju karakteriše povećana zastupljenost *Candida glabrata* i drugih neklasifikovanih gljivica (240). Osim direktnog uticaja koji *H. pylori* ima na želudačni mikrobiom, pokušaji eradikacije *H. pylori* korišćenjem nekoliko različitih antibiotika takođe utiču na gastričnu mikrobiotu i mogu rezultirati disbiozom (174,253).

Rezistencija *H. pylori* na antibiotike raste širom sveta i predstavlja glavni činilac neuspeha eradikacione terapije (147,245,254,255). Iako stope prevalencije rezistentnih sojeva *H. pylori* značajno variraju u različitim geografskim regijama, uočena je povezanost sa socioekonomskim statusom i sa

višim stopama prevalencije u zemljama u razvoju (256,257). Prema podacima SZO, u većini razvijenih zemalja i zemalja u razvoju, rezistencija sojeva *H. pylori* na klaritromicin, metronidazol i levofloksacin procenjena je na više od 15%, pri čemu je rezistencija na klaritromicin najčešće povezana sa neuspehom lečenja (107). Naime, SZO je nedavno priznala *H. pylori* rezistentnu na klaritromicin kao patogen visokog prioriteta za ulaganje u nove lekove (258).

Molekularni mehanizmi koji stoje iza rezistencije *H. pylori* na antibiotike su se intenzivno istraživali i tačkaste mutacije su identifikovane kao glavni uzrok neuspeha antibiotika (245). Studije su otkrile da su tačkaste mutacije u domenu V gena 23S rRNK i nekoliko položaja u podjedinici A DNK giraze odgovorne za otpornost *H. pylori* na makrolidne, odnosno hinolonske antibiotike (245,254,259,260). Kao što se i očekivalo, istraživanje uobičajenih mutacija povezanih sa rezistencijom na antibiotike u našoj studiji otkrilo je značajno veću prevalenciju gena za rezistenciju na antibiotike kod ispitanika koji su prethodno bili na terapiji anti-*H. pylori* antibioticima. Analiza korelacije između rezistencije na antibiotike na klaritromicin i fluorohinolone i statusa eradikacije pokazala je značajno veću učestalost mutacija povezanih sa rezistencijom kod prethodno lečenih ispitanika, u poređenju sa nelečenom grupom.

U 2018. godini procenjena je ukupna prevalenca rezistencije na antibiotike u Evropi na 32%, odnosno 14% za klaritromicin i levofloksacin. Rezistenciju na klaritromicin karakteriše visoka geografska heterogenost u stopama rezistencije, u rasponu od 96% u Australiji do 15% u Italiji (107,261). Iako su se hinoloni ranije koristili kao alternativno lečenje, porast sojeva *H. pylori* otpornih na druge antibiotike povećao je upotrebu levofloksacina i drugih hinolonskih lekova. Procenjeno je da je rezistencija na levofloksacin značajno niža u odnosu na klaritromicinom, te da se kreće u rasponu od 5% u Australiji i Italiji do 15% u Francuskoj i 16% u Španiji (107).

Zabrinjavajuće je da su u našoj studiji primećene visoke stope rezistencije na oba antibiotika, 55% i 50% učesnika bili su rezistentni na klaritromicin i fluorohinolone (respektivno), pokazujući značajan porast rezistencije na prve linije antibiotskih lekova. Štaviše, 69 (38%) ispitanika imalo je gene otpornosti na obe grupe antibiotika. Alarmantna prevalenca sojeva *H. pylori* otpornih na antibiotike upućuje na neophodnost hitnih istraživanja i razvoj novih terapijskih opcija. Ipak, ove podatke treba uzeti s oprezom imajući u vidu veličinu ukupnog uzorka i većine bolesnika koji su činili grupu *H. pylori* pozitivnih, a bili su već ranije lečeni.

Analiza korelacije nije otkrila značajnu razliku u stopama rezistencije između *Candida*-pozitivne i *Candida*-negativne grupe, što ukazuje da sama kolonizacija gljivicama nema veliki uticaj na prenos gena za rezistenciju *H. pylori*. Međutim, u pogledu histopatoloških nalaza, utvrđena je značajna razlika među grupama koji su bili *naive* i bolesnika koji su jedan ili više puta ranije lečeni. Značajno veći stepen inflamatorne aktivnosti i atrofije nađeni su kod bolesnika koji su prethodno dobijali eradikacionu terapiju.

Iako je neuspeh lečenja prvenstveno povezan sa rezistencijom na antibiotike, drugi faktori mogu dalje uticati na ishod eradikacije, uključujući ulazak *H. pylori* unutar eukariotskih ćelija (239). Tokom evolucijskog toka, *H. pylori* i drugi prokarioti razvili su sposobnost fakultativnog boravka unutar eukariotskih ćelija, koje im pružaju zaštitu od negativnih uticaja iz okoline (237). Intracelularni *H. pylori* potvrđen je u vrstama *Candida* izolovanim iz oralnih, gastričnih i vaginalnih uzoraka. Ulazak *H. pylori* unutar ćelija gljivica smatra se mogućim putem prenosa, budući da su ćelije gljivica otpornije na stresno okruženje (19,167,237,262,263). Sanchez-Alonzo i kolege otkrili su nekoliko pokretačkih činilaca ovog endosimbiotskog odnosa, koji pokreću skrivanje *H. pylori* unutar vakuola *Candide*, uključujući temperature izvan optimalnog raspona rasta za *H. pylori*, lečenje antibioticima, nepovoljne pH uslove (170,239,264). Rezultati druge studije pokazuju da je sklanjanje *H. pylori* unutar *Candide* povećano kod ekosistema u kojima vlada deficit u nutrijensima i da endosimbiotski odnos uveliko zavisi od toga o kom soju *H. pylori* se radi (239).

Uz endosimbiotski odnos, uočeni su i drugi oblici interakcija između članova gastrične zajednice gljivica i bakterija. Još 1998. godine, Ansorg i Schmid objavili su da *H. pylori* ima sposobnost da adherira na nekoliko vrsta *Candida* (265). Štaviše, nedavno je pokazano da *C. albicans* i *H. pylori* razvijaju složene površinske interakcije koje podstiču stvaranje polimikrobnog biofilma i koagregaciju ćelija (266). Međutim, još uvek nije jasno da li istovremena infekcija *Candidom* i *H. pylori* implicira razvoj i pogoršanje želudačnih bolesti.

Neuspeh lečenja i povećanje stope ponovljenih infekcija ukazuju na hitnu potrebu za alternativnim pristupom lečenju infekcije *H. pylori*, uključujući korišćenje prirodnih proizvoda i probiotskih vrsta. Istraživanja fitohemikalija i sekundarnih metabolita su pokazala da niz prirodnih bioaktivnih supstanci izražava anti-*H. pylori* uticaj direktnim delovanjem na proces adhezije i metabolizam *H. pylori* stimulisanjem rasta drugih članova gastrične mikrobiote i stimulisanjem imunološke funkcije (267–269). Štaviše, mnogi prirodni preparati poseduju antimikrobno i antiinflamatorno dejstvo, uključujući niz polifenolnih supstanci i alkaloida (270). *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale anti-*H. pylori* aktivnost mnoštva biljaka i eteričnih ulja dobijenih iz porodica *Lamiaceae*, *Cupressaceae* i *Myrtaceae* (271).

Osim toga, studije su pokazale da mnoge vrste voća i povrća, uključujući avokado, beli luk, grožđe, brusnica i crna ribizla, suzbijaju kolonizaciju *H. pylori*, što ukazuje na važnost uravnotežene ishrane. U poređenju sa redovnom terapijom, korišćenje prirodnih proizvoda prati manje nuspojave i veća adherentnost (269). Međutim, tačan mehanizam anti-*H. pylori* dejstva relativno je neistražen, uz nedostatak *in vivo* studija koje potvrđuju pozitivne rezultate.

Osim ublažavanja neželjenih pojava upotrebe antibiotika, pokazalo se da probiotski mikroorganizmi pokazuju niz korisnih svojstava kroz sposobnost da se, uslovno rečeno, takmiče sa patogenima i proizvode bakteriocine ili mlečnu kiselinu, regulišući imunološki sistem creva i stimulišući rast komensalne mikrobiote (235,272). Rezultati istraživanja otkrili su nekoliko probiotskih sojeva sa sposobnošću inhibicije rasta *H. pylori* (235). Najviše proučavani i najčešće korišćeni probiotici su bakterije koje proizvode mlečnu kiselinu, uključujući vrste *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (272). Osim toga, nedavne studije su pokazale da upotreba *Saccharomyces boulardii* poboljšava stopu izlečenja *H. pylori*, što ukazuje na povoljan učinak gljivica na homeostazu gastrične mikroba. Dodatak probiotika treba da bude adjuvantna terapija u lečenju *H. pylori* jer je uočena viša stopa eradikacije u studijama u kojima su probiotici korišćeni uz standardnu 14-dnevnu terapiju antibioticima (267,272,273).

Poznati faktori o kojima je prethodno diskutovano, a koji doprinose padu stope izlečenja *H. pylori* infekcije uključuju rezistenciju na antibiotike, lošu komplijansu bolesnika, visok nivo želudačne kiselosti. Ipak, treba obratiti pažnju i na značaj polimorfizma citohroma P450 2C19 (CYP2C19). PPI su važni u režimu eradikacije. Glavni enzim koji je uključen u metabolizam PPI je CYP2C19. Učinci PPI zavise od citohrom P450 enzimskog sistema i CYP2C19 polimorfizma, homozigotni EM (HomEM), heterozigotni EM (HetEM) i slabi metabolizatori (poor metabolisers, PM) (274). Učestalost polimorfizma CYP2C19 vrlo varira među različitim etničkim populacijama. Prema prethodnim studijama, Azijati imaju veći udeo osoba koji su PM u poređenju sa belcima (275). Gotovo 2%-6% belaca i 1% Afroamerikanaca identifikovano je kao PM, dok je taj procenat u azijskoj populaciji znatno veći (14%) (276,277). Učestalost PM-a kod Japanaca je 19%-23% (278). Sa druge strane, stopa prevalencije HomEM-a je oko 70% za belce, ali svega 30%-40% za Azijate (279).

Pokazalo se da polimorfizam CYP2C19 utiče na učinkovitost trojne terapije temeljene na levofloksacinu (280). Studije pokazuju da je učestalost genotipova HomEM i HetEM bila nešto veća u grupi sa neuspešnom eradikacijom nego u grupi sa uspehom eradikacije, ali razlika nije bila značajna, dok je učestalost genotipa PM bila značajno niža u grupi s neuspehom eradikacije nego u grupi sa uspešnom eradikacijom. Gotovo 82% bolesnika u našoj studiji su bili homozigoti u genu za CYP450 (P2C19), 14% heterozigoti, a oko 4% bolesnika su bili 'poor metabolizer-i'. Od toga, 35

analiziranih bolesnika bili su *H. pylori* negativni, dok je 59 bolesnika bilo *H. pylori* pozitivno. Nije uočena statistički značajna razlika između *H. pylori* pozitivnih i *H. pylori* negativnih u odnosu na polimorfizam gena za CYP450, što je u skladu sa literaturnim podacima i možda se može objasniti sprovođenjem protokola davanjem visokih doza PPI uz davanje PPI druge generacije. Nije bilo značajnijih razlika u prisustvu određenih genotipova i ishoda terapije. Ipak, aktuelne rezultate treba tumačiti u skladu sa veličinom uzoračke populacije. Svakako, dalja istraživanja u ovoj oblasti su od neosporne važnosti.

## 6.0. ZAKLJUČCI

- Prevalenca *H. pylori* infekcije je i dalje visoka što predstavlja značajan zdravstveno-klinički izazov.
- Analizom socio-demografskih karakteristika uočena je značajna razlika u pogledu mesta stanovanja, uz notiranu veću zastupljenost *H. pylori* infekcije među osobama koje su živele na selu.
- Kao prateće komorbiditete *H. pylori* pozitivni bolesnici su najčešće prijavljivali prisustvo kardiovaskularnih bolesti.
- Vodeća uputna dijagnoza bile su dispepsija i gastroduodenitis, a najčešća patohistološka dijagnoza nakon endovideogastroduodenoskopije bio je superficijalni gastritis. Atrofični gastritis značajno češće je dijagnostikovano u *H. pylori* pozitivnih bolesnika. Uočen je veći stepen atrofije i inflamacije sluznice u prethodno eradikovanih pacijenata u odnosu na „naivne“ bolesnike.
- Ukupna stopa izlečenja, nezavisno od broja eradikacija bila je prihvatljiva, a rukovođena je individualizovanim principom na osnovu dobijanja rezultata PCR.
- U prvoj liniji terapije, *tailored made* terapijom, a nakon molekularnom PCR tehnikom evaluirane antibiotske rezistencije, najčešće propisivani režimi bili su konkomitantna četverostruka terapija bez bizmuta, četverostruka terapija sa bizmutom u vidu jedinstvene kapsule Pylera®. Efikasnost pomenutih režima u lečenju primoinfekcije bila je optimalna tj. zadovoljavajuća.
- U drugoj liniji terapije, takođe *tailored made* terapijom, najčešće primenjivani modaliteti bili su trojna terapija bazirana na levofloksacinu i Pylera® u jednoj kapsuli, Efikasnost najčešće primenjenih režima u drugoj liniji terapije bila je prihvatljiva.
- Postojanje rezistencije koja je rastuća i dostiže alarmne razmere analizirali smo PCR metodom koja je rezervisana samo za velike svetske centre, a koja je nama postala dostupna u svakodnevnom kliničkom radu. Ukupno kao i u obe terapijske linije pojedinačno uočene su izrazito visoke stope rezistencije na klaritromicin i fluorohinolone, kao i stopa dualne rezistencije.
- Detektovane su mutacije kod svih uzoraka rezistentnih na klaritromicin. Uočena je značajna razlika u detektovanim mutacijama u odnosu na broj prethodnih eradikacija. Bolesnici sa više od jedne prethodne eradikacije, imali su značajno veću incidencu mutacija u GyrA i 23S genu u odnosu na prethodno nelečene bolesnike.
- Polimorfizam za citohrom P450 (CYP450) je značajan predisponirajući faktor koji može uticati na neuspeh terapije, potvrđujući činjenicu da su u našoj populaciji dominantno heterozigotne mutacije za tzv. *extensive metabolizer-e*, sledeći manji broj pacijenata koji su bili homozigoti, odnosno koji su pripali grupi tzv. *poor metabolizer-a*.
- U subpopulaciji *H. pylori* pozitivnih bolesnika ispitivano je prisustvo tj. kolonizacija gljivicom iz roda *Candida*. *Candida* je izolovana kod određenog broja ispitivanih bolesnika sa *C. albicans* kao najčešće izolovanom. *Candida*-pozitivni pacijenti bili su značajno stariji.
- Sagledavanje rezistencije, CYP polimorfizma, uticaja doze inhibitora protonske pumpe i potencijalne internalizacije *H. pylori* unutar *Candida* mogu biti neki od razloga neuspeha terapije. Dalje studije na većem broju bolesnika su potrebne, ali ohrabruje činjenica da je ovo prva studija u Srbiji i jedna od retkih u svetu koja se bavi ovom problematikom kumulativno.
- Jedno od ograničenja našeg istraživanja jeste veličina uzorka, koji u kontekstu visoke prevalencije *H. pylori* infekcije potencijalno ne oslikava na najreprezentativniji način populaciju *H. pylori* pozitivnih osoba. Dodatno, činjenica je da se ne radi o randomizovanoj kontrolisanoj studiji te mogućnost neželjene pristrasnosti ne može biti u potpunosti isključena. Sa druge strane, iskustva iz realne kliničke prakse imaju višestruki značaj i mogu biti od ključnog značaja u formiranju budućih (inter)nacionalnih vodiča te pomoći u eradikaciji i lečenju *H. pylori* infekcije.

## 7.0. LITERATURA

1. Boyanova L. *Helicobacter pylori*. In Caister Academic Press; 2011.
2. Suzuki H, Marshall B, Warren R. *Helicobacter pylori*. *Helicobacter Pylori*. 2016;1–267.
3. Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol*. 2003 Dec;54 Suppl 3:23–41.
4. Bizzozero G. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. *Arch für Mikroskopische Anat*. 1892 Dec;40(1):325–75.
5. Kasai K, Kobayashi R. The Stomach Spirochete Occurring in Mammals. *J Parasitol*. 1919 Sep;6(1):1.
6. Quach DT, Hiyama T. Assessment of Endoscopic Gastric Atrophy according to the Kimura-Takemoto Classification and Its Potential Application in Daily Practice. *Clin Endosc*. 2019 Jul 31;52(4):321–7.
7. Corcionivoschi N, Thompson SA, Gundogdu O. Editorial: Developments in *Campylobacter*, *Helicobacter* & Related Organisms Research – CHRO 2019. *Front Microbiol*. 2021 Jan 8;11.
8. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993 Mar;22(1):5–19.
9. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997 Aug 7;388(6642):539–47.
10. Öztekin M, Yılmaz B, Ağagündüz D, Capasso R. Overview of *Helicobacter pylori* Infection: Clinical Features, Treatment, and Nutritional Aspects. *Dis (Basel, Switzerland)*. 2021 Sep 23;9(4).
11. Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, et al. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Aug 25;106(34):14321–6.
12. Abdullah M, Greenfield LK, Bronte-Tinkew D, Capurro MI, Rizzuti D, Jones NL. *VacA* promotes *CagA* accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
13. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018 Apr;47(7):868–76.
14. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017 Aug 1;153(2):420–9.
15. Saša G. *Helicobacter pylori* infekcija : patogeneza i kliničke posledice. In Leskovac: Naša reč; 2002.
16. Boehnke KF, Eaton KA, Valdivieso M, Baker LH, Xi C. Animal Model Reveals Potential Waterborne Transmission of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2015 Oct;20(5):326–33.
17. Mamishi S, Eshaghi H, Mahmoudi S, Bahador A, Hosseinpour Sadeghi R, Najafi M, et al. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori*: genotyping of faecal samples. *Br J Biomed Sci*. 2016;73(1):38–43.
18. Yokota S, Konno M, Fujiwara S, Toita N, Takahashi M, Yamamoto S, et al. Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intraspousal, *Helicobacter pylori* Infection in Japan Determined by Mutilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. *Helicobacter*. 2015 Oct;20(5):334–42.
19. Siavoshi F, Taghikhani A, Malekzadeh R, Sarrafnejad A, Kashanian M, Jamal AS, et al. The role of mother's oral and vaginal yeasts in transmission of *Helicobacter pylori* to neonates.

- Arch Iran Med. 2013 May;16(5):288–94.
20. Chak E, Rutherford GW, Steinmaus C. The role of breast-feeding in the prevention of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Clin Infect Dis*. 2009 Feb 15;48(4):430–7.
  21. Kitagawa M, Natori M, Katoh M, Sugimoto K, Omi H, Akiyama Y, et al. Maternal transmission of *Helicobacter pylori* in the perinatal period. *J Obstet Gynaecol Res*. 2001 Aug;27(4):225–30.
  22. Soltani J, Nikkhoo B, Khormehr J, Ataee P, Hakhamaneshi M-S, Gharibi F. Breastfeeding and *Helicobacter pylori* Infection in Early Childhood: a Continuing Dilemma. *Iran J Pediatr*. 2014 Dec;24(6):745–52.
  23. Narayanan M, Reddy KM, Marsicano E. Peptic Ulcer Disease and *Helicobacter pylori* infection. *Mo Med*. 2018;115(3):219–24.
  24. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J*. 2016 Feb;39(1):14–23.
  25. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Jun;11(6):385–99.
  26. Brito BB de, Silva FAF da, Soares AS, Pereira VA, Santos MLC, Sampaio MM, et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J Gastroenterol*. 2019 Oct 7;25(37):5578–89.
  27. Suarez G, Romero-Gallo J, Sierra JC, Piazuolo MB, Krishna US, Gomez MA, et al. Genetic Manipulation of *Helicobacter pylori* Virulence Function by Host Carcinogenic Phenotypes. *Cancer Res*. 2017 May 1;77(9):2401–12.
  28. Djekic A, Müller A. The Immunomodulator VacA Promotes Immune Tolerance and Persistent *Helicobacter pylori* Infection through Its Activities on T-Cells and Antigen-Presenting Cells. *Toxins (Basel)*. 2016 Jun 16;8(6).
  29. Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HMT, Lee CK, Yamaoka Y, et al. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut*. 2004 Sep;53(9):1235–43.
  30. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul;19(3):449–90.
  31. Lu H, Hsu P-I, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):833–48.
  32. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *J Med Microbiol*. 2008 May;57(Pt 5):545–53.
  33. Farzi N, Yadegar A, Aghdaei HA, Yamaoka Y, Zali MR. Genetic diversity and functional analysis of *oipA* gene in association with other virulence factors among *Helicobacter pylori* isolates from Iranian patients with different gastric diseases. *Infect Genet Evol*. 2018 Jun;60:26–34.
  34. Miftahussurur M, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. *Expert Rev Mol Med*. 2017 Mar 21;19:e4.
  35. Kim K-M, Lee S-G, Kim J-M, Kim D-S, Song J-Y, Kang H-L, et al. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase induces cell cycle arrest at the G1-S phase transition. *J Microbiol*. 2010 Jun;48(3):372–7.
  36. Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, Jiménez Abreu JA, Uchida T, Mahachai V, et al. Toll-like Receptor 10 in *Helicobacter pylori* Infection. *J Infect Dis*. 2015 Nov 15;212(10):1666–76.
  37. Nurgalieva ZZ, Conner ME, Opekun AR, Zheng CQ, Elliott SN, Ernst PB, et al. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect Immun*. 2005 May;73(5):2999–3006.
  38. Dacha S, Razvi M, Massaad J, Cai Q, Wehbi M. Hypergastrinemia. *Gastroenterol Rep*. 2015 Aug;3(3):201–8.
  39. Malfertheiner P, Link A, Selgrad M. *Helicobacter pylori*: perspectives and time trends. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Oct;11(10):628–38.
  40. Futagami S, Yamawaki H, Agawa S, Higuchi K, Ikeda G, Noda H, et al. New classification Rome IV functional dyspepsia and subtypes. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018;3:70.

41. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, Graham DY, El-Omar EM, Miura S, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. 2015 Sep;64(9):1353–67.
42. Kang SJ, Park B, Shin CM. *Helicobacter pylori* Eradication Therapy for Functional Dyspepsia: A Meta-Analysis by Region and *H. pylori* Prevalence. *J Clin Med*. 2019 Aug 28;8(9).
43. Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF de M, Mazzoleni F, Uchoa DM, De Bona LR, et al. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES trial. *Arch Intern Med*. 2011 Nov 28;171(21):1929–36.
44. Lane JA, Murray LJ, Noble S, Egger M, Harvey IM, Donovan JL, et al. Impact of *Helicobacter pylori* eradication on dyspepsia, health resource use, and quality of life in the Bristol *helicobacter* project: randomised controlled trial. *BMJ*. 2006 Jan 28;332(7535):199–204.
45. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022 Sep 1;71(9):1724–62.
46. El-Serag HB, Sweet S, Winchester CC, Dent J. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2014 Jun;63(6):871–80.
47. Savarino E, de Bortoli N, De Cassan C, Della Coletta M, Bartolo O, Furnari M, et al. The natural history of gastro-esophageal reflux disease: a comprehensive review. *Dis esophagus Off J Int Soc Dis Esophagus*. 2017 Feb 1;30(2):1–9.
48. Vakil N, van Zanten S V, Kahrilas P, Dent J, Jones R, Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol*. 2006 Aug;101(8):1900–20; quiz 1943.
49. Labenz J, Blum AL, Bayerdörffer E, Meining A, Stolte M, Börsch G. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology*. 1997 May;112(5):1442–7.
50. McColl KEL. Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2010 Apr 29;362(17):1597–604.
51. Kandulski A, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2014 Jul;30(4):402–7.
52. Chung SJ, Lim SH, Choi J, Kim D, Kim YS, Park MJ, et al. *Helicobacter pylori* Serology Inversely Correlated With the Risk and Severity of Reflux Esophagitis in *Helicobacter pylori* Endemic Area: A Matched Case-Control Study of 5,616 Health Check-Up Koreans. *J Neurogastroenterol Motil*. 2011 Jul;17(3):267–73.
53. Shavalipour A, Malekpour H, Dabiri H, Kazemian H, Zojaji H, Bahroudi M. Prevalence of cytotoxin-associated genes of *Helicobacter pylori* among Iranian GERD patients. *Gastroenterol Hepatol from bed to bench*. 2017;10(3):178–83.
54. Yaghoobi M, Farrokhyar F, Yuan Y, Hunt RH. Is there an increased risk of GERD after *Helicobacter pylori* eradication?: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2010 May;105(5):1007–13; quiz 1006, 1014.
55. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jun;10(6):403–14.
56. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans. 1994;61:1–241.
57. Noto JM, Peek RM. *Helicobacter pylori*: an overview. *Methods Mol Biol*. 2012;921:7–10.
58. Petrelli F, Berenato R, Turati L, Mennitto A, Steccanella F, Caporale M, et al. Prognostic value of diffuse versus intestinal histotype in patients with gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Gastrointest Oncol*. 2017 Feb;8(1):148–63.
59. Datta De D, Roychoudhury S. To be or not to be: The host genetic factor and beyond in *Helicobacter pylori* mediated gastro-duodenal diseases. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 14;21(10):2883–95.
60. Ahn HJ, Lee DS. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *World J Gastrointest Oncol*. 2015 Dec 15;7(12):455–65.
61. Wong BC-Y, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, et al. *Helicobacter pylori*



- eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004 Jan 14;291(2):187–94.
62. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Kusumoto C, Imada T, Hamada F, et al. Risk of gastric cancer in the second decade of follow-up after *Helicobacter pylori* eradication. *J Gastroenterol*. 2020 Mar;55(3):281–8.
  63. Fukase K, Kato M, Kikuchi S, Inoue K, Uemura N, Okamoto S, et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2008 Aug 2;372(9636):392–7.
  64. Chen H-N, Wang Z, Li X, Zhou Z-G. *Helicobacter pylori* eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. *Gastric Cancer*. 2016 Jan;19(1):166–75.
  65. Floch P, Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins (Basel)*. 2017 Apr 8;9(4).
  66. Kuo S-H, Wu M-S, Yeh K-H, Lin C-W, Hsu P-N, Chen L-T, et al. Novel Insights of Lymphomagenesis of *Helicobacter pylori*-Dependent Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2019 Apr 17;11(4).
  67. Wong F, Rayner-Hartley E, Byrne MF. Extraintestinal manifestations of *Helicobacter pylori*: a concise review. *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 14;20(34):11950–61.
  68. Muhsen K, Cohen D. *Helicobacter pylori* infection and iron stores: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*. 2008 Oct;13(5):323–40.
  69. Camaschella C. Iron deficiency. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):30–9.
  70. Papagiannakis P, Michalopoulos C, Papalexi F, Dalampoura D, Diamantidis MD. The role of *Helicobacter pylori* infection in hematological disorders. *Eur J Intern Med*. 2013 Dec;24(8):685–90.
  71. Ozkasap S, Yarali N, Isik P, Bay A, Kara A, Tunc B. The role of prohepcidin in anemia due to *Helicobacter pylori* infection. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013 Aug;30(5):425–31.
  72. Senkovich O, Ceaser S, McGee DJ, Testerman TL. Unique host iron utilization mechanisms of *Helicobacter pylori* revealed with iron-deficient chemically defined media. *Infect Immun*. 2010 May;78(5):1841–9.
  73. Yokota S-I, Toita N, Yamamoto S, Fujii N, Konno M. Positive relationship between a polymorphism in *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein a gene and iron-deficiency anemia. *Helicobacter*. 2013 Apr;18(2):112–6.
  74. Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. *Blood*. 2014 Jan 16;123(3):326–33.
  75. Kato S, Gold BD, Kato A. *Helicobacter pylori*-Associated Iron Deficiency Anemia in Childhood and Adolescence-Pathogenesis and Clinical Management Strategy. *J Clin Med*. 2022 Dec 10;11(24):7351.
  76. Gravina AG, Zagari RM, De Musis C, Romano L, Loguercio C, Romano M. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review. *World J Gastroenterol*. 2018 Aug 7;24(29):3204–21.
  77. Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, et al. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2004 Jan;124(1):91–6.
  78. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 2011 Apr 21;117(16):4190–207.
  79. Kountouras J, Tsolaki M, Gavalas E, Boziki M, Zavos C, Karatzoglou P, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease. *Neurology*. 2006 Mar 28;66(6):938–40.
  80. Kountouras J, Boziki M, Gavalas E, Zavos C, Deretzi G, Grigoriadis N, et al. Increased cerebrospinal fluid *Helicobacter pylori* antibody in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*.

2009;119(6):765–77.

81. Malaguarnera M, Bella R, Alagona G, Ferri R, Carnemolla A, Pennisi G. Helicobacter pylori and Alzheimer's disease: a possible link. *Eur J Intern Med.* 2004 Oct;15(6):381–6.
82. Hsieh M-C, Wang SSW, Hsieh Y-T, Kuo F-C, Soon M-S, Wu D-C. Helicobacter pylori infection associated with high HbA1c and type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest.* 2013 Sep;43(9):949–56.
83. Horikawa C, Kodama S, Fujihara K, Hirasawa R, Yachi Y, Suzuki A, et al. High risk of failing eradication of Helicobacter pylori in patients with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Oct;106(1):81–7.
84. Mitchell HM, Kaakoush NO, Sutton P. Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter pylori 21st Century Adv Mol Cell Microbiol.* 2010;69–93.
85. Sayar R, Shokri Shirvani J, Hajian-Tilaki K, Vosough Z, Ranaei M. The negative association between inflammatory bowel disease and Helicobacter pylori seropositivity. *Casp J Intern Med.* 2019;10(2):217–22.
86. Papamichael K. Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease: Is there a link? *World J Gastroenterol.* 2014;20(21):6374.
87. Preverte N, Liotti F, Marone G, Melillo RM, de Paulis A. Formyl peptide receptors at the interface of inflammation, angiogenesis and tumor growth. *Pharmacol Res.* 2015 Dec;102:184–91.
88. Gravina AG, Priadko K, Ciamarra P, Granata L, Facchiano A, Miranda A, et al. Extra-Gastric Manifestations of Helicobacter pylori Infection. *J Clin Med.* 2020 Nov 30;9(12):3887.
89. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of Helicobacter pylori: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol.* 2014 Sep 28;20(36):12847–59.
90. Savarino V, Vigneri S, Celle G. The 13C urea breath test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Gut.* 1999 Jul;45 Suppl 1(Suppl 1):I18-22.
91. Wang Y-K, Kuo F-C, Liu C-J, Wu M-C, Shih H-Y, Wang SSW, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* 2015 Oct 28;21(40):11221–35.
92. Chey WD, Wong BCY, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. American College of Gastroenterology guideline on the management of Helicobacter pylori infection. *Am J Gastroenterol.* 2007 Aug;102(8):1808–25.
93. Taj Y, Essa F, Kazmi SU, Abdullah E. Sensitivity and specificity of various diagnostic tests in the detection of Helicobacter pylori. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2003 Feb;13(2):90–3.
94. Locatelli A, Catapani WR, Gomes CR, Silva CBP, Waisberg J. Detection of anti-Helicobacter pylori antibodies in serum and duodenal fluid in peptic gastroduodenal disease. *World J Gastroenterol.* 2004 Oct 15;10(20):2997–3000.
95. Vaira D, Vakil N, Menegatti M, van't Hoff B, Ricci C, Gatta L, et al. The stool antigen test for detection of Helicobacter pylori after eradication therapy. *Ann Intern Med.* 2002 Feb 19;136(4):280–7.
96. Bravo LE, Realpe JL, Campo C, Mera R, Correa P. Effects of acid suppression and bismuth medications on the performance of diagnostic tests for Helicobacter pylori infection. *Am J Gastroenterol.* 1999 Sep;94(9):2380–3.
97. Siddique I, Al-Mekhaizeem K, Alateeqi N, Memon A, Hasan F. Diagnosis of Helicobacter pylori: improving the sensitivity of CLOtest by increasing the number of gastric antral biopsies. *J Clin Gastroenterol.* 2008 Apr;42(4):356–60.
98. Yadav R, Sagar M. Comparison of Different Histological Staining Methods for Detection of Helicobacter pylori Infection in Gastric Biopsy. *Cureus.* 2022 Jul;14(7):e27316.
99. Lee JY, Kim N. Diagnosis of Helicobacter pylori by invasive test: histology. *Ann Transl Med.* 2015 Jan;3(1):10.
100. Rad R, Brenner L, Krug A, Voland P, Mages J, Lang R, et al. Toll-Like Receptor–Dependent Activation of Antigen-Presenting Cells Affects Adaptive Immunity to Helicobacter pylori. *Gastroenterology.* 2007 Jul;133(1):150-163.e3.

101. Sulo P, Šipková B. DNA diagnostics for reliable and universal identification of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2021 Nov 7;27(41):7100–12.
102. Belda S, Saez J, Santibáñez M, Rodríguez JC, Galiana A, Sola-Vera J, et al. Quantification of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa by real-time polymerase chain reaction: comparison with traditional diagnostic methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Nov;74(3):248–52.
103. Leonardi M, La Marca G, Pajola B, Perandin F, Ligozzi M, Pomari E. Assessment of real-time PCR for *Helicobacter pylori* DNA detection in stool with co-infection of intestinal parasites: a comparative study of DNA extraction methods. *BMC Microbiol*. 2020 Dec 24;20(1):131.
104. Al-Sulami AA, Al-Edani TAA, Al-Abdula AA. Culture Method and PCR for the Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water in Basrah Governorate Iraq. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:1–5.
105. Fernandez-Caso B, Miqueleiz A, Valdez VB, Alarcón T. Are molecular methods helpful for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and for the prediction of its antimicrobial resistance? *Front Microbiol*. 2022 Aug 9;13.
106. Vilaichone RK, Quach DT, Yamaoka Y, Sugano K, Mahachai V. Prevalence and Pattern of Antibiotic Resistant Strains of *Helicobacter Pylori* Infection in ASEAN. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 May 26;19(5):1411–3.
107. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*. 2018 Nov;155(5):1372-1382.e17.
108. Gastroenterology W, Global O. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: *Helicobacter pylori*. *Chinese J Gastroenterol*. 2021;26(9):540–53.
109. Bazzoli F, Cohen H, Ming Fock K. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. 2021.
110. Milivojevic V, Milosavljevic T, Milivojevic V. REVIEW-TREATMENT OF HELICOBACTER PYLORI INFECTION.
111. Gao W, Ye H, Deng X, Wang C, Xu Y, Li Y, et al. Rabeprazole-amoxicillin dual therapy as first-line treatment for H pylori eradication in special patients: A retrospective, real-life study. *Helicobacter*. 2020 Oct;25(5):e12717.
112. Fernández-Salazar L, Campillo A, Rodrigo L, Pérez-Aisa Á, González-Santiago JM, Segarra Ortega X, et al. Effectiveness and Safety of High-Dose Dual Therapy: Results of the European Registry on the Management of *Helicobacterpylori* Infection (Hp-EuReg). *J Clin Med*. 2022 Jun 20;11(12).
113. Mégraud F, Graham DY, Howden CW, Trevino E, Weissfeld A, Hunt B, et al. Rates of Antimicrobial Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates From Clinical Trial Patients Across the US and Europe. *Am J Gastroenterol*. 2022 Feb;Publish Ah(2):269–75.
114. Mégraud F, Graham DY, Howden CW, Trevino E, Weissfeld A, Hunt B, et al. Rates of Antimicrobial Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates From Clinical Trial Patients Across the US and Europe. *Am J Gastroenterol*. 2023 Feb;118(2):269–75.
115. Kim TH, Park JM, Cheung DY, Oh JH. Comparison of 7- and 14-Day Eradication Therapy for *Helicobacter pylori* with First- and Second-Line Regimen: Randomized Clinical Trial. *J Korean Med Sci*. 2020 Feb 10;35(5):e33.
116. Nyssen OP, Moreira L, García-Morales N, Cano-Català A, Puig I, Mégraud F, et al. European Registry on *Helicobacter pylori* Management (Hp-EuReg): Most relevant results for clinical practice. *Front Gastroenterol*. 2022;1(August):1–20.
117. Alkim H, Koksar AR, Boga S, Sen I, Alkim C. Role of Bismuth in the Eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Ther*. 2017;24(6):e751–7.
118. Ford AC, Malfertheiner P, Giguere M, Santana J, Khan M, Moayyedi P. Adverse events with bismuth salts for *Helicobacter pylori* eradication: systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 28;14(48):7361–70.
119. Nyssen OP, McNicholl AG, Gisbert JP. Meta-analysis of three-in-one single capsule bismuth-containing quadruple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2019

- Apr;24(2):e12570.
120. Guo B, Cao N-W, Zhou H-Y, Chu X-J, Li B-Z. Efficacy and safety of bismuth-containing quadruple treatment and concomitant treatment for first-line *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. *Microb Pathog.* 2021 Mar;152:104661.
  121. Nyssen OP, Vaira D, Pérez Aísa Á, Rodrigo L, Castro-Fernandez M, Jonaitis L, et al. Empirical Second-Line Therapy in 5000 Patients of the European Registry on *Helicobacter pylori* Management (Hp-EuReg) . Vol. 20, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. The American Gastroenterological Association; 2022. 2243–2257 p.
  122. Song Z-Q, Zhou L-Y. Hybrid, sequential and concomitant therapies for *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2016 May 21;22(19):4766–75.
  123. Howden CW, Graham DY. Recent Developments Pertaining to *H. pylori* Infection. *Am J Gastroenterol.* 2021 Jan 1;116(1):1–3.
  124. Kim JS, Park SM, Kim B-W. Sequential or concomitant therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015 Sep;30(9):1338–45.
  125. Apostolopoulos P, Ekmektzoglou K, Georgopoulos S, Chounta E, Theofanopoulou A, Kalantzis C, et al. 10-Day Versus 14-Day Quadruple Concomitant Nonbismuth Therapy for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Results From a Randomized Prospective Study in a High Clarithromycin Resistance Country. *J Clin Gastroenterol.* 2020 Jul;54(6):522–7.
  126. Romano M, Gravina AG, Nardone G, Federico A, Dallio M, Martorano M, et al. Non-bismuth and bismuth quadruple therapies based on previous clarithromycin exposure are as effective and safe in an area of high clarithromycin resistance: A real-life study. *Helicobacter.* 2020 Aug;25(4):e12694.
  127. Graham DY, Lu H, Dore MP. Relative potency of proton-pump inhibitors, *Helicobacter pylori* therapy cure rates, and meaning of double-dose PPI. *Helicobacter.* 2019 Feb;24(1):e12554.
  128. Villoria A, Garcia P, Calvet X, Gisbert JP, Vergara M. Meta-analysis: high-dose proton pump inhibitors vs. standard dose in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Oct 1;28(7):868–77.
  129. Furuta T, Graham DY. Pharmacologic aspects of eradication therapy for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010 Sep;39(3):465–80.
  130. Gisbert JP, McNicholl AG. Optimization strategies aimed to increase the efficacy of *H. pylori* eradication therapies. *Helicobacter.* 2017 Aug;22(4).
  131. Sugimoto M, Shirai N, Nishino M, Kodaira C, Uotani T, Yamade M, et al. Rabeprazole 10 mg q.d.s. decreases 24-h intragastric acidity significantly more than rabeprazole 20 mg b.d. or 40 mg o.m., overcoming CYP2C19 genotype. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Oct;36(7):627–34.
  132. Sahara S, Sugimoto M, Uotani T, Ichikawa H, Yamade M, Kagami T, et al. Potent Gastric Acid Inhibition Over 24 Hours by 4-Times Daily Dosing of Esomeprazole 20 mg. *Digestion.* 2015;91(4):277–85.
  133. Murakami K, Sakurai Y, Shiino M, Funao N, Nishimura A, Asaka M. Vonoprazan, a novel potassium-competitive acid blocker, as a component of first-line and second-line triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a phase III, randomised, double-blind study. *Gut.* 2016 Sep;65(9):1439–46.
  134. Jung YS, Kim EH, Park CH. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of vonoprazan-based triple therapy on *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017 Jul;46(2):106–14.
  135. Graham DY, Lu H, Shiotani A. Vonoprazan-containing *Helicobacter pylori* triple therapies contribution to global antimicrobial resistance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021 May;36(5):1159–63.
  136. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004 Sep;53(9):1374–84.
  137. Gisbert JP. Empirical or susceptibility-guided treatment for *Helicobacter pylori* infection? A

- comprehensive review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2020;13:1756284820968736.
138. Gisbert JP, Romano M, Gravina AG, Solís-Muñoz P, Bermejo F, Molina-Infante J, et al. Helicobacter pylori second-line rescue therapy with levofloxacin- and bismuth-containing quadruple therapy, after failure of standard triple or non-bismuth quadruple treatments. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Apr;41(8):768–75.
  139. Gisbert JP. Optimization Strategies Aimed to Increase the Efficacy of Helicobacter pylori Eradication Therapies with Quinolones. *Molecules*. 2020 Nov 2;25(21).
  140. Smith SM, O'Morain C, McNamara D. Helicobacter pylori resistance to current therapies. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019 Jan;35(1):6–13.
  141. Yang X, Wang J-X, Han S-X, Gao C-P. High dose dual therapy versus bismuth quadruple therapy for Helicobacter pylori eradication treatment: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Feb;98(7):e14396.
  142. Gisbert JP. Rifabutin for the Treatment of Helicobacter Pylori Infection: A Review. *Pathog (Basel, Switzerland)*. 2020 Dec 28;10(1).
  143. Gingold-Belfer R, Niv Y, Levi Z, Boltin D. Rifabutin triple therapy for first-line and rescue treatment of Helicobacter pylori infection: A systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jun;36(6):1392–402.
  144. Burgos-Santamaría D, Nyssen OP, Gasbarrini A, Vaira D, Pérez-Aisa Á, Rodrigo L, et al. Empirical rescue treatment of Helicobacter pylori infection in third and subsequent lines: 8-year experience in 2144 patients from the European Registry on H. pylori management (Hp-EuReg). *Gut*. 2022 Dec 5;
  145. Maconi G, Manes G, Porro G-B. Role of symptoms in diagnosis and outcome of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2008 Feb 28;14(8):1149–55.
  146. Milivojevic V, Babic I, Kekic D, Rankovic I, Sagdati S, Panic N, et al. Current trends in the management of Helicobacter pylori infection in Serbia: preliminary results from the European registry on H. pylori management (Hp-EuReg). *Dig Dis*. 2022 Dec 20;
  147. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, et al. Review article: the global emergence of Helicobacter pylori antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Feb;43(4):514–33.
  148. Bujanda L, Nyssen OP, Vaira D, Saracino IM, Fiorini G, Lerang F, et al. Antibiotic Resistance Prevalence and Trends in Patients Infected with Helicobacter pylori in the Period 2013-2020: Results of the European Registry on H. pylori Management (Hp-EuReg). *Antibiot (Basel, Switzerland)*. 2021 Sep 1;10(9).
  149. Megraud F, Bruyndonckx R, Coenen S, Wittkop L, Huang T-D, Hoebeke M, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe in 2018 and its relationship to antibiotic consumption in the community. *Gut*. 2021 Oct;70(10):1815–22.
  150. Mascellino MT, Porowska B, De Angelis M, Oliva A. Antibiotic susceptibility, heteroresistance, and updated treatment strategies in Helicobacter pylori infection. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:2209–20.
  151. Ierardi E, Giorgio F, Iannone A, Losurdo G, Principi M, Barone M, et al. Noninvasive molecular analysis of Helicobacter pylori: Is it time for tailored first-line therapy? *World J Gastroenterol*. 2017 Apr 14;23(14):2453–8.
  152. Wenzhen Y, Yumin L, Quanlin G, Kehu Y, Lei J, Donghai W, et al. Is antimicrobial susceptibility testing necessary before first-line treatment for Helicobacter pylori infection? Meta-analysis of randomized controlled trials. *Intern Med*. 2010;49(12):1103–9.
  153. Chen H, Dang Y, Zhou X, Liu B, Liu S, Zhang G. Tailored Therapy Versus Empiric Chosen Treatment for Helicobacter pylori Eradication: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Feb;95(7):e2750.
  154. Nyssen OP, Espada M, Gisbert JP. Empirical vs. Susceptibility-Guided Treatment of Helicobacter pylori Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol*. 2022;13:913436.
  155. Huang HT, Wang H-M, Yang S-C, Tai W-C, Liang C-M, Wu K-L, et al. Efficacy of a 14-day

- quadruple-therapy regimen for third-line *Helicobacter pylori* eradication. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2073–80.
156. Sayed MM, Ibrahim WA, Abdel-bary SA, Abdelhakam SM, El-Masry SA, Ghoraba D. Salivary PCR detection of *Helicobacter pylori* DNA in Egyptian patients with dyspepsia. *Egypt J Med Hum Genet.* 2011 Nov;12(2):211–6.
  157. Goldstein FC, Steenland K, Zhao L, Wharton W, Levey AI, Hajjar I. Proton Pump Inhibitors and Risk of Mild Cognitive Impairment and Dementia. *J Am Geriatr Soc.* 2017 Sep;65(9):1969–74.
  158. El Rouby N, Lima JJ, Johnson JA. Proton pump inhibitors: from CYP2C19 pharmacogenetics to precision medicine. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2018 Apr 3;14(4):447–60.
  159. Lima JJ, Thomas CD, Barbarino J, Desta Z, Van Driest SL, El Rouby N, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C19 and Proton Pump Inhibitor Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2021 Jun 20;109(6):1417–23.
  160. Andersson T, Holmberg J, Kerstin Röhss, Walan A. Pharmacokinetics and effect on caffeine metabolism of the proton pump inhibitors, omeprazole, lansoprazole, and pantoprazole. *Br J Clin Pharmacol.* 1998 Apr 7;45(4):369–75.
  161. Arenas A, Serrano C, Quiñones L, Harris P, Sandoval M, Lavanderos M, et al. High prevalence of clarithromycin resistance and effect on *Helicobacter pylori* eradication in a population from Santiago, Chile: cohort study and meta-analysis. *Sci Rep.* 2019 Dec 27;9(1):20070.
  162. Qiao H-L, Hu Y-R, Tian X, Jia L-J, Gao N, Zhang L-R, et al. Pharmacokinetics of three proton pump inhibitors in Chinese subjects in relation to the CYP2C19 genotype. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 Feb 10;62(2):107–12.
  163. Park S, Hyun YJ, Kim YR, Lee JH, Ryu S, Kim JM, et al. Effects of CYP2C19 Genetic Polymorphisms on PK/PD Responses of Omeprazole in Korean Healthy Volunteers. *J Korean Med Sci.* 2017;32(5):729.
  164. Zhao X, Zhang Z, Lu F, Xiong M, Jiang L, Tang K, et al. Effects of CYP2C19 genetic polymorphisms on the cure rates of *H. pylori* in patients treated with the proton pump inhibitors: An updated meta-analysis. *Front Pharmacol.* 2022;13(October).
  165. Zhao F, Wang J, Yang Y, Wang X, Shi R, Xu Z, et al. Effect of CYP2C19 Genetic Polymorphisms on the Efficacy of Proton Pump Inhibitor-Based Triple Therapy for *Helicobacter pylori* Eradication: A Meta-Analysis. *Helicobacter.* 2008 Dec;13(6):532–41.
  166. Sugimoto M, Hira D, Murata M, Kawai T, Terada T. Effect of Antibiotic Susceptibility and CYP3A4/5 and CYP2C19 Genotype on the Outcome of Vonoprazan-Containing *Helicobacter pylori* Eradication Therapy. *Antibiotics.* 2020 Sep 26;9(10):645.
  167. Cancino AG. *Candida* sp. As a Potential Reservoir and Transmission Facilitator of *Helicobacter Pylori*. *Biomed J Sci Tech Res.* 2018;4(1):3736–8.
  168. Saniee P, Siavoshi F, Nikbakht Broujeni G, Khormali M, Sarrafnejad A, Malekzadeh R. Localization of *H.pylori* within the vacuole of *Candida* yeast by direct immunofluorescence technique. *Arch Iran Med.* 2013 Dec;16(12):705–10.
  169. Karczewska E, Wojtas I, Sito E, Trojanowska D, Budak A, Zwolinska-Wcislo M, et al. Assessment of co-existence of *Helicobacter pylori* and *Candida* fungi in diseases of the upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Dec;60 Suppl 6:33–9.
  170. Sánchez-Alonzo K, Arellano-Arriagada L, Castro-Seriche S, Parra-Sepúlveda C, Bernasconi H, Benavidez-Hernández H, et al. Temperatures Outside the Optimal Range for *Helicobacter pylori* Increase Its Harboring within *Candida* Yeast Cells. *Biology (Basel).* 2021 Sep 15;10(9):1–17.
  171. Ianiro G, Molina-Infante J, Gasbarrini A. Gastric Microbiota. *Helicobacter.* 2015 Sep;20 Suppl 1:68–71.
  172. Bačić A, Milivojević V, Petković I, Kekić D, Gajić I, Medić Brkić B, et al. In Search for Reasons behind *Helicobacter pylori* Eradication Failure—Assessment of the Antibiotics Resistance Rate and Co-Existence of *Helicobacter pylori* with *Candida* Species. *J Fungi.* 2023 Mar 7;9(3):328.

173. Zwolinska-Wcisło M, Budak A, Bogdał J, Trojanowska D, Stachura J. Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. *Med Sci Monit*. 2001;7(5):982–8.
174. Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*. 2016 Nov;65(11):1906–15.
175. Massarrat S, Saniee P, Siavoshi F, Mokhtari R, Mansour-Ghanaei F, Khalili-Samani S. The Effect of *Helicobacter pylori* Infection, Aging, and Consumption of Proton Pump Inhibitor on Fungal Colonization in the Stomach of Dyspeptic Patients. *Front Microbiol*. 2016;7:801.
176. Ierardi E, Losurdo G, Fortezza RF La, Principi M, Barone M, Leo A Di. Optimizing proton pump inhibitors in *Helicobacter pylori* treatment: Old and new tricks to improve effectiveness. *World J Gastroenterol*. 2019 Sep 14;25(34):5097–104.
177. Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian J Microbiol*. 2021 Dec 23;52(4):1701–18.
178. Chen L, Wen Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci*. 2011 Apr;3(2):66–73.
179. Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–9.
180. Hou C, Yin F, Wang S, Zhao A, Li Y, Liu Y. *Helicobacter pylori* Biofilm-Related Drug Resistance and New Developments in Its Anti-Biofilm Agents. *Infect Drug Resist*. 2022;15(March):1561–71.
181. Penesyana A, Paulsen IT, Gillings MR, Kjelleberg S, Manefield MJ. Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms. *Front Microbiol*. 2020 Sep 2;11.
182. Krzyzek P, Gosciniak G. A proposed role for diffusible signal factors in the biofilm formation and morphological transformation of *Helicobacter pylori*. *Turkish J Gastroenterol*. 2018 Jan 31;29(1):7–13.
183. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul;65(2):183–95.
184. Roberts LT, Issa PP, Sinnathamby ES, Granier M, Mayeux H, Eubanks TN, et al. *Helicobacter Pylori*: A Review of Current Treatment Options in Clinical Practice. *Life*. 2022;12(12):1–20.
185. Pantuzza LL, Ceccato M das GB, Silveira MR, Junqueira LMR, Reis AMM. Association between medication regimen complexity and pharmacotherapy adherence: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol*. 2017 Nov;73(11):1475–89.
186. Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(3):479–86.
187. Selgrad M, Malfertheiner P. Management of *Helicobacter pylori* Infection: What Should the Surgeon Know? *Visc Med*. 2017;33(3):216–9.
188. Milivojevic V, Milosavljevic T. Burden of Gastrointestinal Diseases from the Global Perspective. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2020;18(1):148–57.
189. Yordanov D, Boyanova L, Markovska R, Ilieva J, Andreev N, Gergova G, et al. Influence of Dietary Factors on *Helicobacter pylori* and CagA Seroprevalence in Bulgaria. *Gastroenterol Res Pract*. 2017;2017.
190. Yu X, Yang X, Yang T, Dong Q, Wang L, Feng L. Decreasing prevalence of *Helicobacter pylori* according to birth cohorts in urban China. *Turk J Gastroenterol*. 2017 Mar;28(2):94–7.
191. Bazzoli F, Palli D, Zagari RM, Festi D, Pozzato P, Nicolini G, et al. The Loiano-Monghidoro population-based study of *Helicobacter pylori* infection: Prevalence by <sup>13</sup>C-urea breath test and associated factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(7):1001–7.
192. Ibrahim A, Morais S, Ferro A, Lunet N, Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: Systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Dig Liver Dis*. 2017;49(7):742–9.
193. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 2014;19(S1):1–5.
194. Mitchell HM. Epidemiology of Infection in *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics.

- Mobley HLT, Mendz GL HS, editor. Washington (DC): ASM Press; 2001;
195. S. Sierra M, V. Hastings E, Fagan-Garcia K, Colquhoun A, J. Goodman K, editors. Epidemiology, Transmission and Public Health Implications of *Helicobacter pylori* Infection in Western Countries. In: *Helicobacter Pylori: A Worldwide Perspective 2014* . BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS; 2014. p. 25–79.
  196. Broutet N, Mégraud F, O’Morain C, Sipponen P, Price A, Malfertheiner P, et al. Risk factors for atrophic chronic gastritis in a European population: Results of the Eurohepygast study. *Gut*. 2002;50(6):779–85.
  197. Capurso G, Lahner E. The interaction between smoking, alcohol and the gut microbiome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* . 2017;31(5):579–88.
  198. Sokić-Milutinović A, Krstić M, Popović D, Mijalković N, Djuranović S, Culafić D. [Role of *Helicobacter pylori* infection and use of NSAIDs in the etiopathogenesis of upper gastrointestinal bleeding]. *Acta Chir Jugosl*. 2007;54(1):51–62.
  199. Milivojević V. Time trends in acute upper gastrointestinal bleeding in Serbian adult population. *Helicobacter*. 2020;
  200. Bytzer P, Talley NJ, Hammer J, Young LJ, Jones MP, Horowitz M. GI symptoms in diabetes mellitus are associated with both poor glycemic control and diabetic complications. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(3):604–11.
  201. Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M. Prevalence of Gastrointestinal Symptoms Associated With Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med*. 2001;161(16):1989.
  202. Talley NJ, Howell S, Jones MP, Horowitz M. Predictors of turnover of lower gastrointestinal symptoms in diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(12):3087–94.
  203. Franceschi F, Gasbarrini A, Polyzos SA, Kountouras J. Extragastic Diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2015;20:40–6.
  204. Goni E, Franceschi F. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter*. 2016;21:45–8.
  205. Barabino A, Dufour C, Marino CE, Claudiani F, De Alessandri A. Unexplained refractory iron-deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* gastric infection in children: further clinical evidence. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 Jan;28(1):116–9.
  206. Berg G, Bode G, Blettner M, Boeing H, Brenner H. *Helicobacter pylori* infection and serum ferritin: A population-based study among 1806 adults in Germany. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1014–8.
  207. Parkinson AJ, Gold BD, Bulkow L, Wainwright RB, Swaminathan B, Khanna B, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* in the Alaska Native population and association with low serum ferritin levels in young adults. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(6):885–8.
  208. Choe YH, Lee JE, Kim SK. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on sideropenic refractory anaemia in adolescent girls with *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2000;89(2):154–7.
  209. Kanbay M, Gür G, Yücel M, Yilmaz U, Boyacıoğlu S. Does eradication of *Helicobacter pylori* infection help normalize serum lipid and CRP levels? *Dig Dis Sci*. 2005;50(7):1228–31.
  210. Ford AC, Chey WD, Talley NJ, Malhotra A, Spiegel BMR, Moayyedi P. Yield of diagnostic tests for celiac disease in individuals with symptoms suggestive of irritable bowel syndrome systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2009;169(7):651–8.
  211. Rabeneck L, Wristers K, Soucek J, Ambriz E. Impact of upper endoscopy on satisfaction in patients with previously uninvestigated dyspepsia. *Gastrointest Endosc*. 2003;57(3):295–9.
  212. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996 Oct;20(10):1161–81.
  213. Ruge M, Pennelli G, Pillozzi E, Fassan M, Ingravalle G, Russo VM, et al. Gastritis: The histology report. *Dig Liver Dis*. 2011;43(SUPPL. 4).
  214. Malfertheiner P, Megraud F, O’Morain C, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon A, et al. Management



- of helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut*. 2017;66(1):6–30.
215. Georgopoulos SD, Xirouchakis E, Martinez-Gonzales B, Zampeli E, Grivas E, Spiliadi C, et al. Randomized clinical trial comparing ten day concomitant and sequential therapies for Helicobacter pylori eradication in a high clarithromycin resistance area. *Eur J Intern Med*. 2016;32:84–90.
  216. Milosavljevic T, Krstic M, Milinic N, Duranovic S, Popovic D, Damjanov D et al. Smernice Udruženja gastroenterologa Srbije. *Internist*. 2017;9(1):281–386.
  217. Kirchheiner J, Glatt S, Fuhr U, Klotz U, Meineke I, Seufferlein T, et al. Relative potency of proton-pump inhibitors - Comparison of effects on intragastric pH. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(1):19–31.
  218. Tepes B, Brglez Jurecic N, Tepes K, Espada Sanchez M, Perez Nyssen O, O’Morain C, et al. Helicobacter pylori eradication rates in Slovenia in the period from 2017 to 2019: Data from the European registry on H. pylori management. *Dig Dis*. 2021;39(4):318–24.
  219. Rokkas T, Georgopoulos S, Michopoulos S, Ntoulis V, Liatsos C, Puig I, et al. Assessment of first-line eradication treatment in Greece: data from the European Registry on Helicobacter pylori management (Hp-EuReg). *Ann Gastroenterol*. 2022;35(1):42–7.
  220. ECDC. WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022. 2020 p.
  221. Keikha M, Askari P, Ghazvini K, Karbalaei M. Levofloxacin-based therapy as an efficient alternative for eradicating Helicobacter pylori infection in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022 Jun;29:420–9.
  222. Nyssen OP, Bordin D, Tepes B, Pérez-Aisa Á, Vaira D, Caldas M, et al. European Registry on Helicobacter pylori management (Hp-EuReg): Patterns and trends in first-line empirical eradication prescription and outcomes of 5 years and 21 533 patients. *Gut*. 2021;70(1):40–54.
  223. Nyssen OP, Perez-Aisa A, Castro-Fernandez M, Pellicano R, Huguet JM, Rodrigo L, et al. European Registry on Helicobacter pylori management: Single-capsule bismuth quadruple therapy is effective in real-world clinical practice. *United Eur Gastroenterol J*. 2021;9(1):38–46.
  224. Herardi R, Syam AF, Simadibrata M, Setiati S, Darnindro N, Abdullah M, et al. Comparison of 10-day course of triple therapy versus 14-day course for eradication of Helicobacter pylori infection in an Indonesian population: Double-blinded randomized Clinical Trial. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2020;21(1):19–24.
  225. Kakiuchi T, Mizoe A, Yamamoto K, Imamura I, Hashiguchi K, Kawakubo H, et al. Effect of probiotics during vonoprazan-containing triple therapy on gut microbiota in Helicobacter pylori infection: A randomized controlled trial. *Helicobacter*. 2020;25(3):1–8.
  226. Sung JJY, Coker OO, Chu E, Szeto CH, Luk STY, Lau HCH, et al. Gastric microbes associated with gastric inflammation, atrophy and intestinal metaplasia 1 year after Helicobacter pylori eradication. *Gut*. 2020;69(9):1572–80.
  227. Guo Y, Zhang Y, Gerhard M, Gao JJ, Mejias-Luque R, Zhang L, et al. Effect of Helicobacter pylori on gastrointestinal microbiota: A population-based study in Linqiu, a high-risk area of gastric cancer. *Gut*. 2020;69(9):1598–607.
  228. Nyssen OP, Perez-Aisa A, Tepes B, Castro-Fernandez M, Kupcinskis J, Jonaitis L, et al. Adverse Event Profile During the Treatment of Helicobacter pylori: A Real-World Experience of 22,000 Patients From the European Registry on H. pylori Management (Hp-EuReg). *Am J Gastroenterol*. 2021 Jun 1;116(6):1220–9.
  229. Boltin D, Beniashvili Z, Lahat A, Hirsch J, Nyssen OP, Mégraud F, et al. European Registry on Helicobacter pylori management (Hp-EuReg): First-line Therapy in Israel. *Isr Med Assoc J*. 2021 Jan;23(1):38–42.
  230. 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(11):3600–7.
231. Lauener FN, Imkamp F, Lehours P, Buissonnière A, Benejat L, Zbinden R, et al. Genetic determinants and prediction of antibiotic resistance phenotypes in *Helicobacter pylori*. *J Clin Med*. 2019;8(1):1–14.
  232. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori*: Role of Mutations at Position 87 and 91 of GyrA on the Level of Resistance and Identification of a Resistance Conferring Mutation in GyrB. *Helicobacter*. 2012;17(1):36–42.
  233. Rajilic-Stojanovic M, Figueiredo C, Smet A, Hansen R, Kupcinskas J, Rokkas T, et al. Systematic review: gastric microbiota in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020;51(6):582–602.
  234. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur Gastroenterol J*. 2015;3(3):255–60.
  235. Duan X, Chen P, Xu X, Han M, Li J. Role of Gastric Microorganisms Other than *Helicobacter pylori* in the Development and Treatment of Gastric Diseases. Cantore S, editor. *Biomed Res Int*. 2022 Mar 14;2022:1–11.
  236. Hansen ABR, Johannesen TB, Spiegelhauer MR, Kupcinskas J, Urba M, Skieceviciene J, et al. Distinct Composition and Distribution of the Gastric Mycobiota Observed Between Dyspeptic and Gastric Cancer Patients Evaluated From Gastric Biopsies. *Microbiota Heal Dis*. 2020;1–15.
  237. Siavoshi F. Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5263.
  238. Mason KL, Downward JRE, Falkowski NR, Young VB, Kao JY, Huffnagle GB. Interplay between the gastric bacterial microbiota and *Candida albicans* during postantibiotic recolonization and gastritis. *Infect Immun*. 2012;80(1):150–8.
  239. Sánchez-Alonzo K, Belmar L, Parra-Sepúlveda C, Bernasconi H, Campos VL, Smith CT, et al. Antibiotics as a stressing factor triggering the harboring of *Helicobacter pylori* j99 within *Candida albicans* atcc10231. *Pathogens*. 2021;10(3):1–13.
  240. Mottaghi B, Emami MH, Riahi P, Fahim A, Rahimi H, Mohammadi R. *Candida* colonization of the esophagus and gastric mucosa; a comparison of patients taking proton pump inhibitors and those taking histamine receptor antagonist drugs. *Gastroenterol Hepatol from bed to bench*. 2021;14(4):349–55.
  241. Sasaki K. *Candida*-associated gastric ulcer relapsing in a different position with a different appearance. *World J Gastroenterol*. 2012;18(32):4450–3.
  242. Zhong M, Xiong Y, Zhao J, Gao Z, Ma J, Wu Z, et al. *Candida albicans* disorder is associated with gastric carcinogenesis. *Theranostics*. 2021;11(10):4945–56.
  243. Significance C. Candidal Infection of Gastric Ulcers. 1979;137–41.
  244. Tham KT, Peek RM, Atherton JC, Cover TL, Perez-Perez GI, Shyr Y, et al. *Helicobacter pylori* genotypes, host factors, and gastric mucosal histopathology in peptic ulcer disease. *Hum Pathol*. 2001;32(3):264–73.
  245. Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance — from biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(9):613–29.
  246. Sánchez-Alonzo K, Silva-Mieres F, Arellano-Arriagada L, Parra-Sepúlveda C, Bernasconi H, Smith CT, et al. Nutrient deficiency promotes the entry of *Helicobacter pylori* cells into *Candida* yeast cells. *Biology (Basel)*. 2021;10(5).
  247. Flores SE, Aitchison A, Day AS, Keenan JI. *Helicobacter pylori* infection perturbs iron homeostasis in gastric epithelial cells. *PLoS One*. 2017;12(9):1–16.
  248. Dash NR, Khoder G, Nada AM, Al Bataineh MT. Exploring the impact of *Helicobacter pylori* on gut microbiome composition. *PLoS One*. 2019;14(6):1–13.
  249. Yang P, Zhang X, Xu R, Adeel K, Lu X, Chen M, et al. Fungal Microbiota Dysbiosis and Ecological Alterations in Gastric Cancer. *Front Microbiol*. 2022;13(April):1–13.
  250. Wang Z, Ren R, Yang Y. Mucosa microbiome of gastric lesions: Fungi and bacteria interactions . 1st ed. Vol. 171, Progress in Molecular Biology and Translational Science.

- Elsevier Inc.; 2020. 195–213 p.
251. Marcus EA, Scott DR. Gastric Colonization by *H. pylori*. In: *Helicobacter pylori*. Singapore: Springer Singapore; 2016. p. 23–34.
  252. Merrell DS. The ferric uptake regulator of *Helicobacter pylori*: a critical player in the battle for iron and colonization of the stomach. *Future Microbiol.* 2013 Jun;8(6):725-38
  253. Chen CC, Liou JM, Lee YC, Hong TC, El-Omar EM, Wu MS. The interplay between *Helicobacter pylori* and gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–22.
  254. Francesco V De. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2011;2(3):35.
  255. Zou Y, Qian X, Liu X, Song YP, Song C, Wu S, et al. The effect of antibiotic resistance on *Helicobacter pylori* eradication efficacy: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter.* 2020;25(4):1–12.
  256. Sjomina O, Pavlova J, Niv Y, Leja M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2018;23:6–11.
  257. Jaka H, Rhee JA, Östlundh L, Smart L, Peck R, Mueller A, et al. The magnitude of antibiotic resistance to *Helicobacter pylori* in Africa and identified mutations which confer resistance to antibiotics: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):1–10.
  258. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–27.
  259. Talarico S, Korson AS, Leverich CK, Park S, Jalikis FG, Upton MP, et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance mutations among Seattle patients measured by droplet digital PCR. *Helicobacter.* 2018;23(2):2–9.
  260. Marques AT, Vítor JMB, Santos A, Oleastro M, Vale FF. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches. *Microb genomics*. 2020 Mar;6(3).
  261. Ghotaslou R. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World J Methodol.* 2015;5(3):164.
  262. Sánchez-Alonzo K, Matamala-Valdés L, Parra-Sepúlveda C, Bernasconi H, Campos VL, Smith CT, et al. Intracellular presence of *Helicobacter pylori* and its virulence-associated genotypes within the vaginal yeast of term pregnant women. *Microorganisms.* 2021;9(1):1–15.
  263. Sánchez-Alonzo K, Parra-Sepúlveda C, Vergara L, Bernasconi H, García-Cancino A. Detection of *Helicobacter pylori* in oral yeasts from students of a Chilean university. *Rev Assoc Med Bras.* 2020 Nov;66(11):1509–14.
  264. Sánchez-Alonzo K, Parra-Sepúlveda C, Vega S, Bernasconi H, Campos VL, Smith CT, et al. In vitro incorporation of *Helicobacter pylori* into *Candida albicans* caused by acidic pH stress. *Pathogens.* 2020;9(6):1–10.
  265. Ansorg R, Schmid EN. Adhesion of *Helicobacter pylori* to yeast cells. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 1998;288(4):501–8.
  266. Palencia SL, García A, Palencia M. Multiple surface interaction mechanisms direct the anchoring, co-aggregation and formation of dual-species biofilm between *Candida albicans* and *Helicobacter pylori*. *J Adv Res*. 2022;35(xxxx):169–85.
  267. Saxena A, Mukhopadhyay AK, Nandi SP. *Helicobacter pylori*: Perturbation and restoration of gut microbiome. *J Biosci.* 2020;45(1).
  268. Wang YC. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(30):10368–82.
  269. Liu Q, Meng X, Li Y, Zhao CN, Tang GY, Li S, et al. Natural Products for the Prevention and Management of *Helicobacter pylori* Infection. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018;17(4):937–52.
  270. Sychrová A, Koláriková I, Žemlička M, Šmejkal K. Natural compounds with dual antimicrobial and anti-inflammatory effects. Vol. 19, *Phytochemistry Reviews.* 2020. 1471–

1502 p.

271. Bonifácio V V., dos Santos Ramos AA, da Silva BB, Bauab MM. Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: A review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13(1):1–10.
272. Lesbros-Pantoflickova D, Corthésy-Theulaz I, Blum AL. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J Nutr.* 2007;137(3):1–7.
273. Rashighi M, Harris JE. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
274. Kuo CH, Lu CY, Shih HY, Liu CJ, Wu MC, Hu HM, et al. CYP2C19 polymorphism influences *Helicobacter pylori* eradication. *World J Gastroenterol.* 2014;20(43):16029–36.
275. Kuo CH, Wang SSW, Hsu WH, Kuo FC, Weng BC, Li CJ, et al. Rabeprazole can overcome the impact of CYP2C19 polymorphism on quadruple therapy. *Helicobacter.* 2010;15(4):265–72.
276. Ieiri I, Kubota T, Urae A, Kimura M, Wada Y, Mamiya K, et al. Pharmacokinetics of omeprazole (a substrate of CYP2C19) and comparison with two mutant alleles, CYP2C19(m1) in exon 5 and CYP2C19(m2) in exon 4, in Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59(6):647–53.
277. Goldstein AM, Balaji S, Ghaferi A GA. Goldstein et al. (peers).pdf. *Surgery.* 2020. p. 1–5.
278. Küpfer A, Preisig R. Pharmacogenetics of mephenytoin: A new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984;26(6):753–9.
279. Ishizaki T, Sohn DR, Kobayashi K, Chiba K, Lee KH, Shin SG, et al. Interethnic differences in omeprazole metabolism in the two S-mephenytoin hydroxylation phenotypes studied in Caucasians and Orientals. *Ther Drug Monit.* 1994 Apr;16(2):214–5.
280. Liou JM, Chen CC, Chen MJ, Chang CY, Fang YJ, Lee JY, et al. Empirical modified sequential therapy containing levofloxacin and high-dose esomeprazole in second-line therapy for *Helicobacter pylori* infection: A multicentre clinical trial. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1847–52.

## Spisak skraćenica:

A – amoksicilin  
AA - Asparaginska kiselina  
AB - antibiotik  
AG – Adenozin Guanizin mutacije  
ANOVA – test analize varijanse  
ASA – acetil salicilna kiselina  
ATP - adenzinotriofosfat  
AUC – površina ispod krive  
BabA –antigen vezujući adhezn  
BQT – bizmut četverostruka terapija  
C - klaritromicin  
CA – Citozin Adenozin mutacije  
CagA – citotoksin-povezani gen A  
CFU – jedinica formiranih kolonija  
CLA - klaritromicin  
CLA- R - rezistencija na klaritromicin  
CLA- S - osetljivost na klaritromicin  
CLO – kampilobakteriji sličan organizam  
CYP2C19 – citohrom 2c19  
CYP450 – citohrom p450  
DM - diabetes mellitus  
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina  
EGDS - ezofagogastroduodenoskopija  
ELISA – enzimsko-imunski testovi  
EM ekstenzivni metabolizator  
EPS – ekstracelularna polimerna supstancija  
Fe - gvožđe  
FLQ - fluorohinoloni  
FLQ-R - rezistencija na fluorohinolone  
FLQ-S - osetljivost na fluorohinolone  
GA – Guanin Adenozin  
GDB – gastično-duodenalne bolesti  
GERB – gastroezofagealna refluksna bolesti  
GGT – gama glutamil transferaza  
gyr - giraza enzim  
*H. pylori- helikobakter pylori*  
HP - Helicobacter pylori  
IBD – inflamatorne bolesti creva  
IDA – sideropenijska anemija  
IFN - interferon  
Ig – imunoglobulin  
IL - interleukin  
IM – intermedijarni metabolizator

L - levofloksacin  
M - metronidazol  
MALT – limfno tkivo povezano za mukozom  
MANOVA – test multivarijabilne analize varijanse  
MET - metronidazol  
MIK – minimalna inhibitorna koncentracija  
MLST - sekvenciranje gena sa više mesta  
MUT - mutirani tip alela  
NFkB – nuklearni faktor kB  
NH<sub>3</sub> - amonijak  
NO – azot oksid  
NSAID – nesteroidni antiinflamatorni lekovi  
OipA – inflamatorni protein spoljašnje membrane A  
OR - odds ratio  
P-CAB – kalijum kompetitivni blokator kiseline  
PCR – polymerase chain reaction  
PIT – primarna imuna trombocitopenija  
PM – slabi metabolizator  
PPI – inhibitori protonске pumpe  
PUD – peptična ulkusna bolest  
RNK – ribozonukleinska kiselina  
ROS – reaktanti oksidativnog stresa  
RT PCR – polimeraza lančani test u realnom vremenu  
RUT – brzi ureaza test  
SAD – sjedinjene američke države  
SAT – fekalni antigen test  
SZO svetska zdravstvena organizacija  
TEM – transmisiona elektronska mikroskopija  
TIBC – ukupni kapacitet vezivanja gvožđa  
TLR – toll like receptor  
TNF – tumor nekrotišući faktor  
UBT – ureaza izdisajni test  
UC – ulcerozni kolitis  
UIBC – nesaturisani kapacitet vezivanja gvožđa  
UM – ultra brzi metabolizator  
VacA – vakuolizirajući citotoksin A  
WT - divlji tip alela

Radovi proistekli iz doktorske disertacije:

1. Bačić A, **Milivojević V**, Petković I, Kekić D, Gajić I, Medić Brkić B, Popadić D, Milosavljević T, Rajilić-Stojanović M. In Search for Reasons behind *Helicobacter pylori* Eradication Failure-Assessment of the Antibiotics Resistance Rate and Co-Existence of *Helicobacter pylori* with *Candida* Species. J Fungi (Basel). 2023 Mar 7;9(3):328. doi: 10.3390/jof9030328
2. **Milivojević V**, Babic I, Kekic D, Rankovic I, Sagdati S, Panic N, Sekulic Spasic I, Krstic M, Milosavljevic T, Moreira L, Perez Nyssen O, Mégraud F, O' Morain C, Gisbert J. Current trends in the management of *Helicobacter pylori* infection in Serbia: preliminary results from the European registry on H. pylori management (Hp-EuReg). Dig Dis. 2022 Dec 20. <https://doi.org/10.1159/000528389>
3. **Milivojević V**. Problem antibiotske rezistencije kod lečenja *Helicobacter pylori* infekcije. Medicinski podmladak. 2023, Vol. 74(2). doi: 10.5937/mp74-41665

## **Biografija**

Vladimir Milivojević rođen 14.12.1981. godine u Beogradu, Republika Srbija, završio je osnovnu školu i gimnaziju u Lazarevcu, prirodno-matematički smer. Upisao je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2000. godine. Diplomirao je 2007. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 8.51. Od 7.11.2007. godine bio je zaposlen u Specijalnoj bolnici za endemsku nefropatiju u Lazarevcu, a od 23.04.2014. godine na Klinici za gastroenterologiju i hepatologiju Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije. Specijalističke studije iz interne medicine upisao je u decembru 2011. godine, a specijalistički ispit je položio u oktobru 2016. godine. U julu mesecu 2014. godine je završio specijalističke akademske studije iz oblasti Digestivni sistem pod mentorstvom Doc. dr Tamare Alempijević. Subspecijalističke studije iz oblasti gastroenterohepatologije je upisao u oktobru 2017. godine, a subspecijalista gastroenterologije i hepatologije je od 2021. godine. U julu mesecu 2019. godine je izabran za kliničkog asistenta na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu iz oblasti Interna medicina, reizabran u julu 2022.godine. Doktoske studije iz oblasti Klinička farmakologija upisao je 2014. godine.

Dr Vladimir Milivojević je autor i koautor više originalnih radova objavljenih u domaćim i međunarodnim časopisima, predsednik je Sekcije za nutriciju, mikrobiotu i imunometabolizam Srpskog lekarskog društva i suosnivač i koordinator udruženja Medkomas i međunarodnih simpozijuma Dileme i Kontroverze.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Vladimir Milivojević

Број индекса MF 11/14

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Procena uticaja rezistencije na antibiotike i cyp450 polimorfizma na efikasnost eradikacije  
*Helicobacter pylori* infekcije**

---

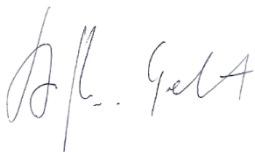
резултат сопственог истраживачког рада;

да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;

да су резултати коректно наведени и

да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

### Потпис аутора



У Београду, \_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Vladimir Milivojević

Број индекса MF 11/14

Студијски програм Medicinska farmakologija

Наслов рада **Procena uticaja rezistencije na antibiotike i cyp450 polimorfizma na efikasnost eradikacije *helicobacter pylori* infekcije**

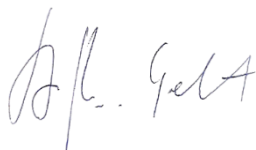
Ментор Prof. dr Miodrag Krstić

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

### Потпис аутора



У Београду, \_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### **PROCENA UTICAJA REZISTENCIJE NA ANTIBIOTIKE I CYP450 POLIMORFIZMA NA EFIKASNOST ERADIKACIJE *HELICOBACTER PYLORI* INFEKCIJE**

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

Ауторство (CC BY)

Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

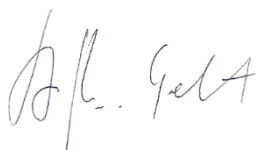
Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**



У Београду, \_\_\_\_

**Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава те умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

*AP. Gela*

---

