

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?

CAT voorstelling 14/4/16
Bea Van den Poel
ASO Klinische biologie

Promotor: Dr. J. Frans

Casus

- ⊙ Vrouw, 50j
- ⊙ Epigastrische last



- ⊙ APO: “*H. pylori* geassocieerde chronische antritis”
- ⊙ Therapeutisch traject (meerdere centra)

En dan...

2010: Triple therapie: *PPI/clarithromycine/amoxi*

Afgenomen	Organisme	amp i.mic	ery t.mic	dox y.mic	cip r.mic	lev o.mic	met r.mic
16/09/10	Helicobacter pylori	S	R	S	S	S	S

2011: *PPI/amoxicilline/levofloxacin*

Tendinitis

2011: *PPI/amoxicilline/doxycycline*

Afgenomen	Organisme	amp i.mic	ery t.mic	dox y.mic	cip r.mic	lev o.mic	met r.mic
29/08/11	Helicobacter pylori	S	R	S	S	S	R

Afwachtend beleid...

28/11/2012: amoxicilline + doxycycline + levofloxacin + PPI

13/02/2014:

lazole

13/03/2014:

05/07/2014:

25/08/2014:

lazole

04/09/2014:

bismuth

(achillespees
op tetracycli

kt haaruitval

21/08/2015:

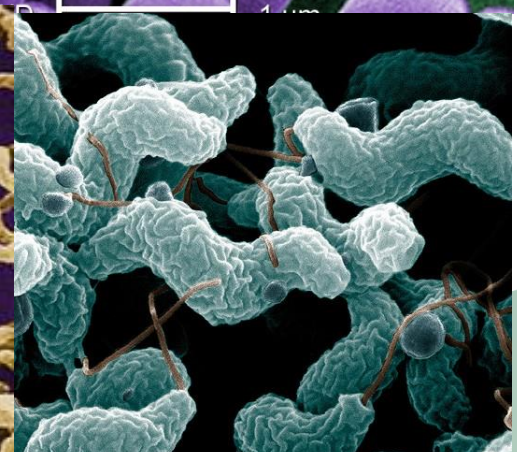
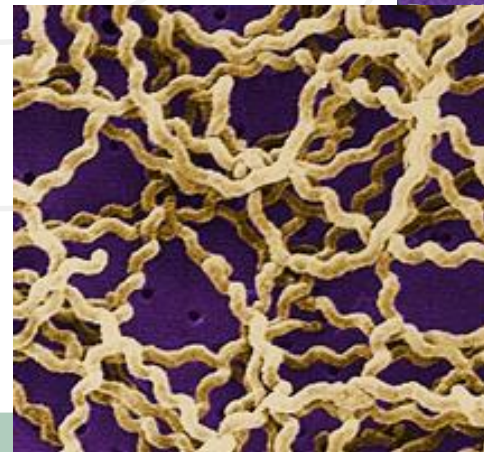
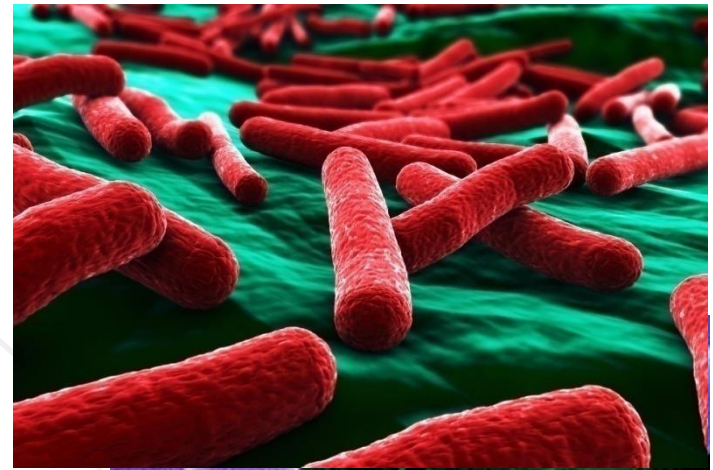
22/09/2015: amoxicilline + doxycycline + levofloxacin + PPI

03/12/2015: biopsie: R voor metronidazole en levofloxacin





VS.



Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicietherapie

Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicaie van HP na eerstelijns therapie

imelda omringt u met zorg

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

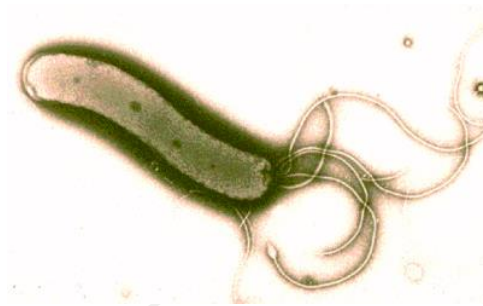
Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicatietherapie

Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicatie van HP na eerstelijns therapie

imelda omringt u met zorg

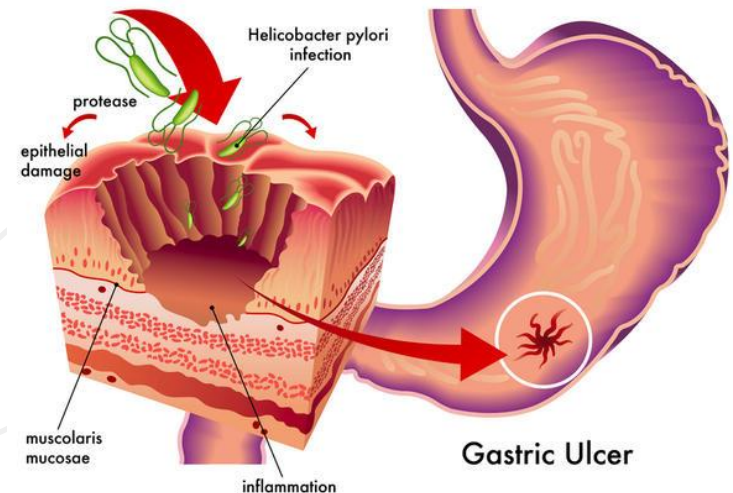
H. pylori

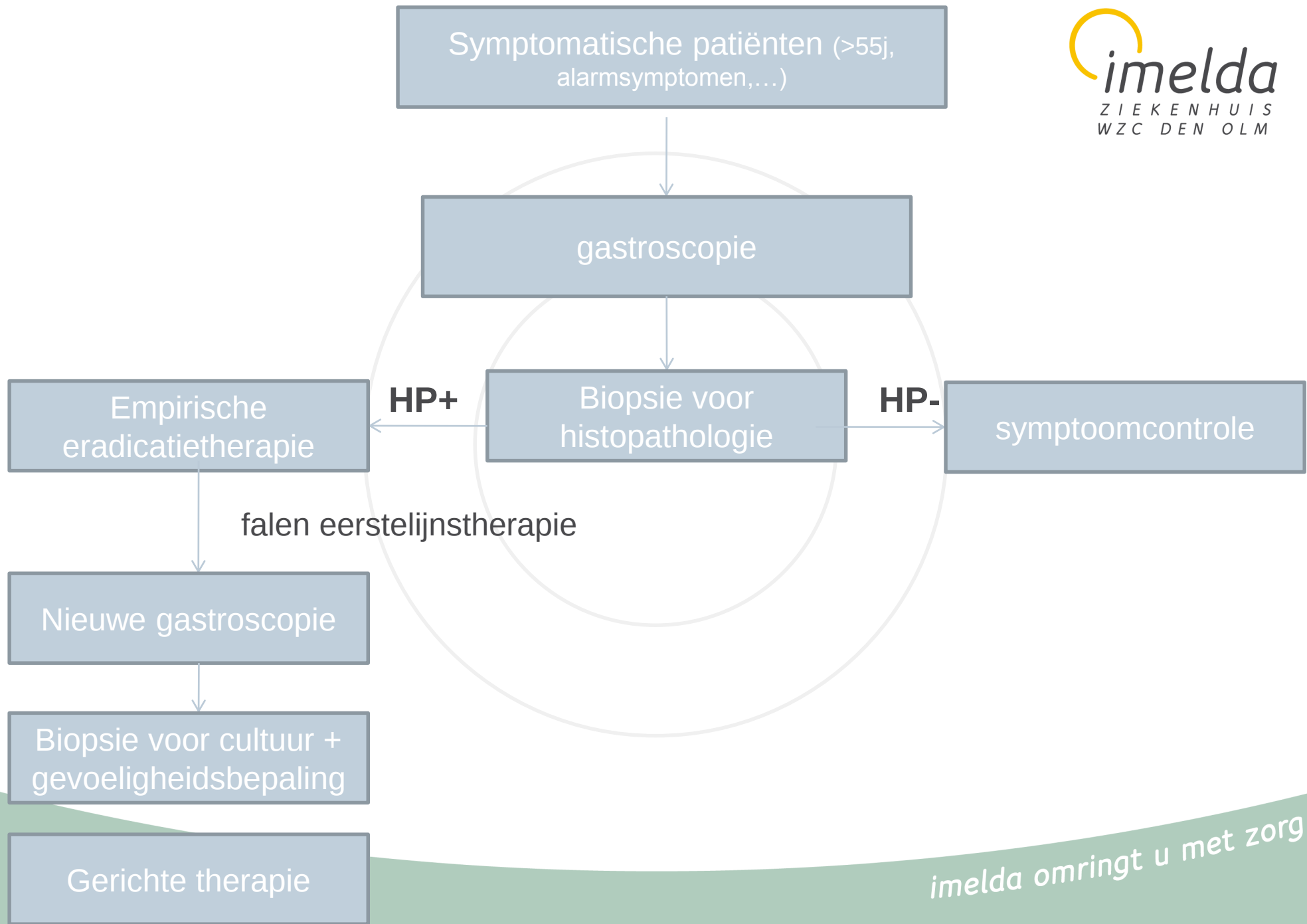


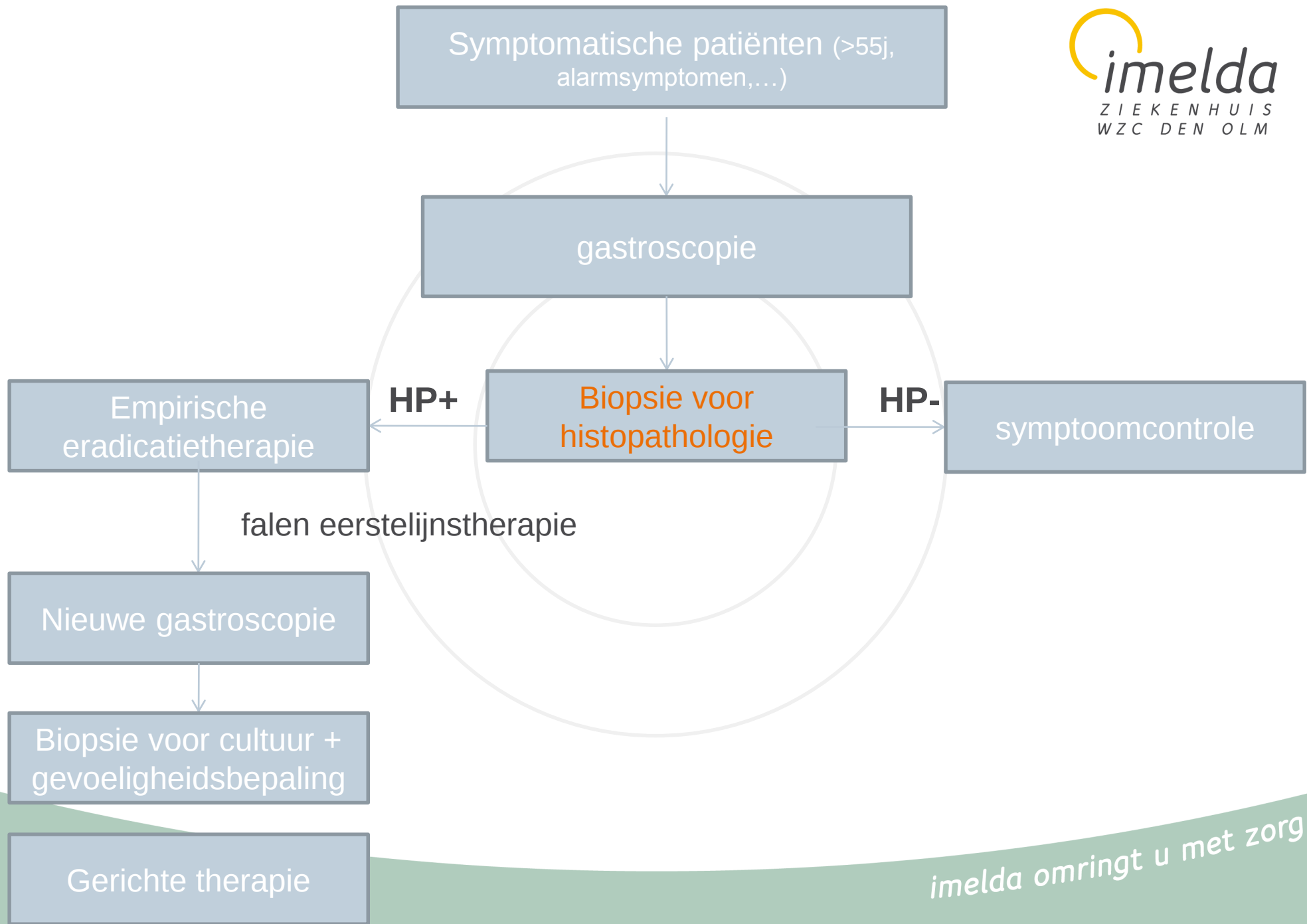
- ⊙ “Spiraalvormige bacterie van de maagportier”
- ⊙ Gramnegatief
- ⊙ Geassocieerd met peptisch ulcuslijden, maagneoplasie, MALT lymfoom

Prevalentie

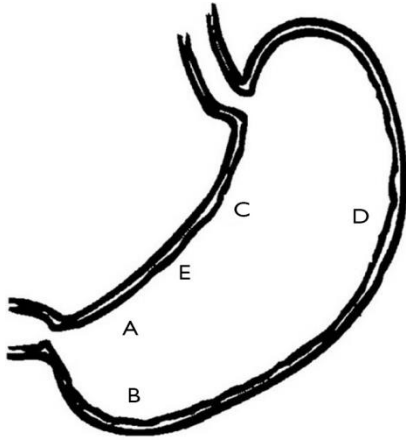
- 20-50% geïndustrialiseerde landen
- 70-80% ontwikkelingslanden
- ⊙ Eradicatie → vermindering symptomen, verhinderen van evolutie naar carcinoma



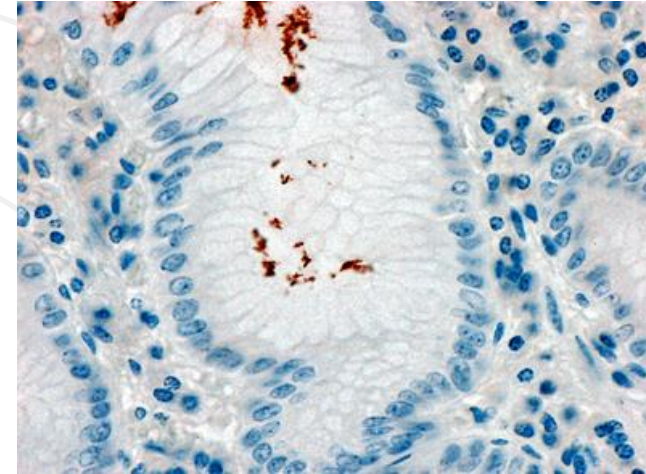




Histologie



A. kleine curvatuur antrum; B. grote curvatuur antrum; C. kleine curvatuur corpus; D. grote curvatuur corpus; E. incisura angularis (Lee et al. 2015)



Immunohistochemische kleuring
voor HP

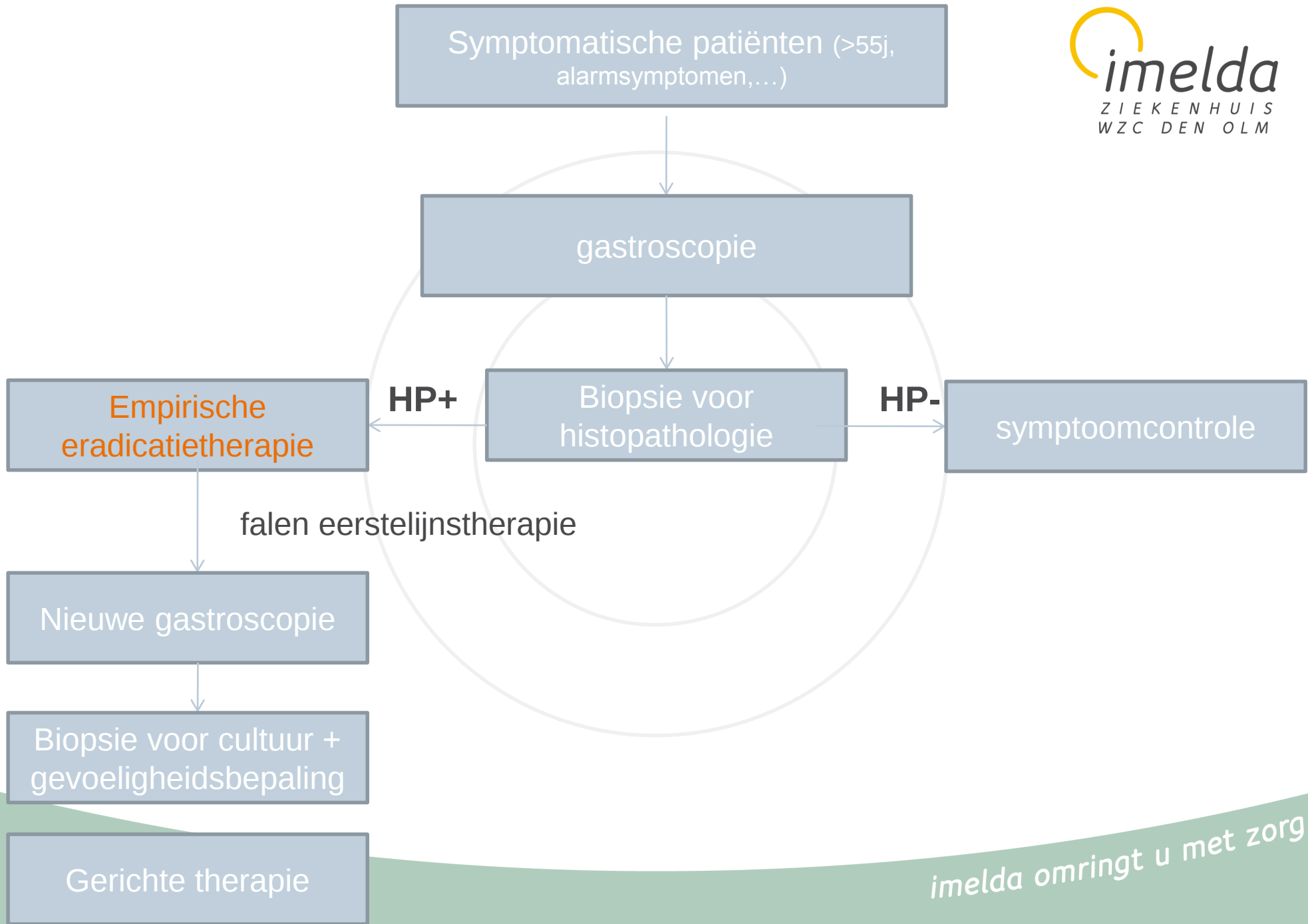
- Meer bipten → hogere gevoeligheid
- Stop PPI en AB minstens 2w voor onderzoek
- Immunohistochemische kleuringen → hogere gevoeligheid, lagere interobservationale variabiliteit

Histologie

- ⊙ Sensitiviteit: 84-95% Specificiteit: 90-95%
- ⊙ Expertise patholoog !
- ⊙ CAVE coccoïde vormen o.i.v. antibiotica
- ⊙ TAT: 24-48u

Jaar	Aantal aanvragen/jaar	Aantal positieven (minimumcijfers)	Positiviteits- ratio
2013	2438	264	10.8%
2014	2450	478	19.5%
2015	2477	292	11.7%

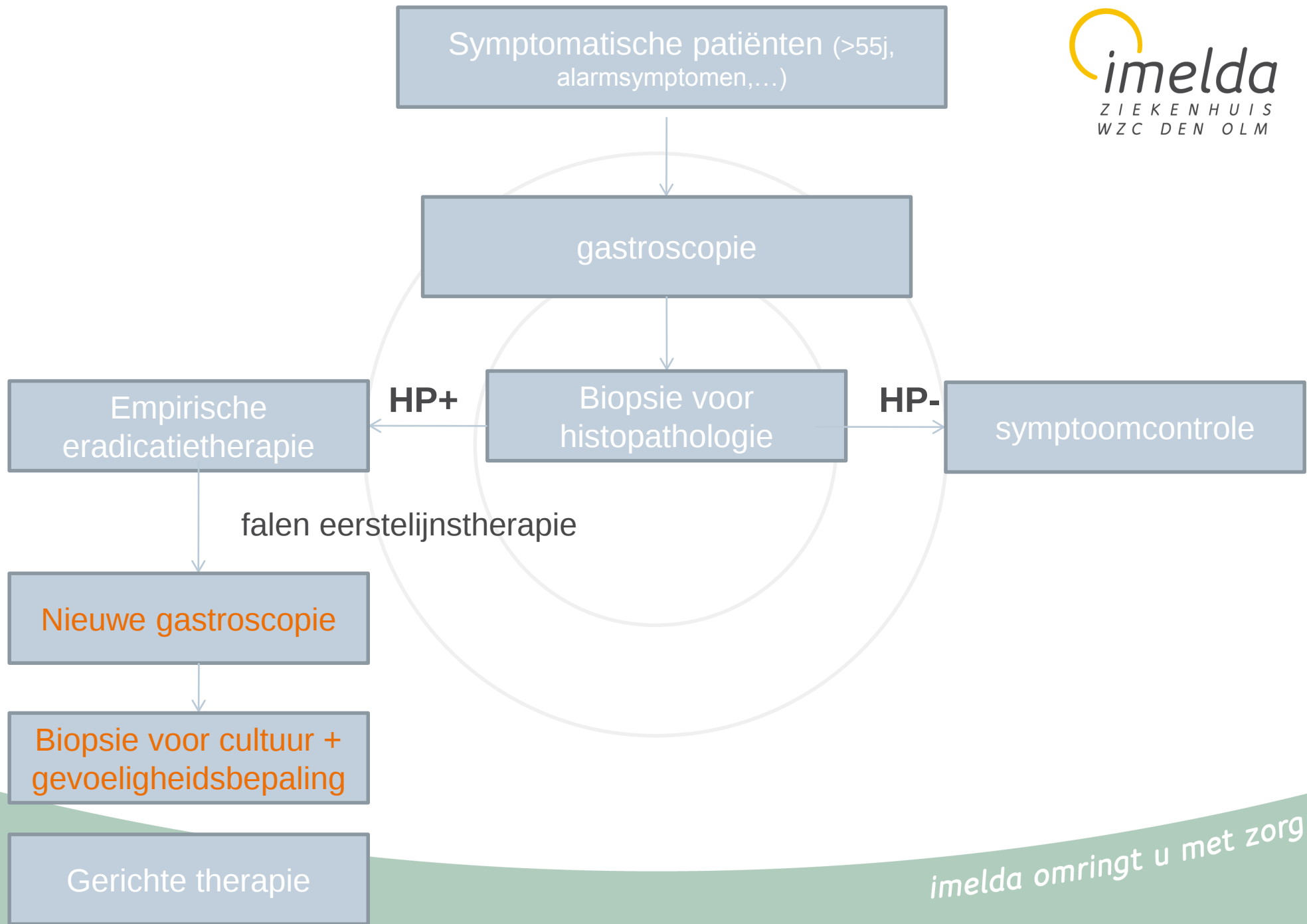
Immuunhistochemische kleuringen voor HP, Imeldaziekenhuis



Eradicatieschema's

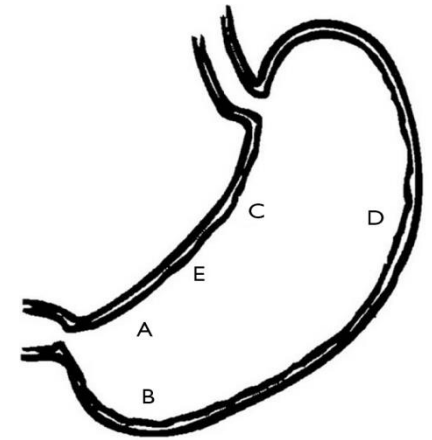
	Schema	Duur
<u>Eerstelijns therapie</u>		
<i>regio met lage clarithromycine resistentie (<15-20%)</i>	Triple therapie: PPI + clarithromycine 2x 500mg + amoxicilline 2x 1g OF PPI + clarithromycine 2x 500mg + metronidazole 2x 500mg	10-14d
<i>regio met hoge clarithromycine resistentie (≥15-20%)</i>	Quadruple therapie: PPI + bismuthsubsalicylaat 4x 525mg + metronidazole 4x 250mg + tetracycline 4x 500mg	10-14d
<u>Tweedelijns therapie</u>		
	Sequentiële therapie: PPI + amoxicilline 2x 1g 5d gevolgd door PPI + metronidazole 2x 500mg + clarithromycine 2x 500mg 5d	10d
	Quadruple therapie	10-14d
	Levofloxacin-gebaseerde triple therapie: PPI + amoxicilline 2x 1g + levofloxacin 4x 500mg	10d





Kweek + gevoeligheidsbepaling

- ⊙ Na falen eerstelijns therapie
- ⊙ Meer bipten → hogere gevoeligheid
- ⊙ Stop PPI en AB minstens 2w voor onderzoek
- CAVE
 - ⊙ Slechts +/- 2u overleven in fysiologisch water
 - ⊙ Transportmedia !! (vb. Portagerm HP (bioMérieux), BHI (BD),...)
 - ⊙ Selectieve + niet-selectieve bodem
 - ⊙ Microaërofiel, 35-37°C
 - ⊙ Performantie:
 - ⊙ *in theorie*: sens >90%, spec 100%
 - ⊙ *In praktijk*: sens 55-73%, spec 100%
 - ⊙ TAT:
 - ⊙ Kweek: 5-10 dagen`
 - ⊙ Gevoeligheidsbepaling: 10-14 dagen



Kweek + gevoeligheidsbepaling: E-test



Table 10. *Helicobacter pylori*

Testing Conditions	Routine QC Recommendations
Medium: Agar dilution: MHA and aged (≥ 2 -week-old) sheep blood (5% w/v) Inoculum: A saline suspension equivalent to a 2.0 McFarland standard (containing 1×10^7 to 1×10^8 CFU/mL), to be prepared from a 72-hour-old subculture from a BAP. The inoculum (1 to 3 μ L per spot) is replicated directly onto the antimicrobial agent-containing agar dilution plates. Incubation: $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$; 72 hours; microaerobic atmosphere equivalent to 10% CO_2 , 5% O_2 , and 85% N_2 . Use of a compressed gas incubator is preferable; however, acceptable performance may be achieved using microaerobic gas-generating sachets.	See QC Table 23D. <i>H. pylori</i> ATCC® 43504

* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

General Comment

(1) Growth characteristics on routine media: fastidious; optimal growth occurs on media supplemented with blood or serum; requires a microaerobic atmosphere (10% CO_2 , 5% O_2 , and 85% N_2); 36 to 37°C for at least 72 hours.

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	MIC Interpretive Standard ($\mu\text{g/mL}$)			Comments
		S	I	R	
A	Clarithromycin	≤ 0.25	0.5	≥ 1.0	(2) These breakpoints presume that clarithromycin will be used in an approved regimen that includes a proton-pump inhibitor and possibly one or more additional antimicrobial agents.

Abbreviations: ATCC®, American Type Culture Collection; BAP, blood agar plate; CFU, colony-forming unit(s); I, intermediate; MHA, Mueller-Hinton agar; MIC, minimal inhibitory concentration; R, resistant; S, susceptible.

Supplemental Information

Resistance:

Macrolide resistance in *H. pylori* has been ascribed to 23S ribosomal RNA (rRNA) point mutations (primarily 2143 and 2142 positions) and the resistance-nodulation cell division efflux pump system.⁵⁹

Reasons for Testing/Not Testing:

Laboratories may be asked to culture and perform susceptibility testing on *H. pylori* isolates from apparent treatment failures.

M45, 3rd ed.

Helicobacter pylori

EUCAST Clinical Breakpoint Tables

Disk diffusion criteria for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* method should be used. If a commercial MIC method is used, follow the manufacturer's instructions.

Antimicrobial Agent	MIC breakpoint (mg/L)		Notes
	S $\leq$	R $>$	
Penicillins			Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.
Amoxicillin	0.125 ¹	0.125 ¹	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish reduced susceptibility.
Fluoroquinolones			Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.
Levofloxacin	1 ¹	1 ¹	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish reduced susceptibility.
Macrolides			Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.
Clarithromycin	0.25 ¹	0.5 ¹	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish reduced susceptibility.
Tetracyclines			Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.
Tetracycline	1 ¹	1 ¹	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish reduced susceptibility.
Miscellaneous agents			Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints.
Metronidazole	8 ¹	8 ¹	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish reduced susceptibility.
Rifampicin	1 ¹	1 ¹	1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish reduced susceptibility.

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicatietherapie

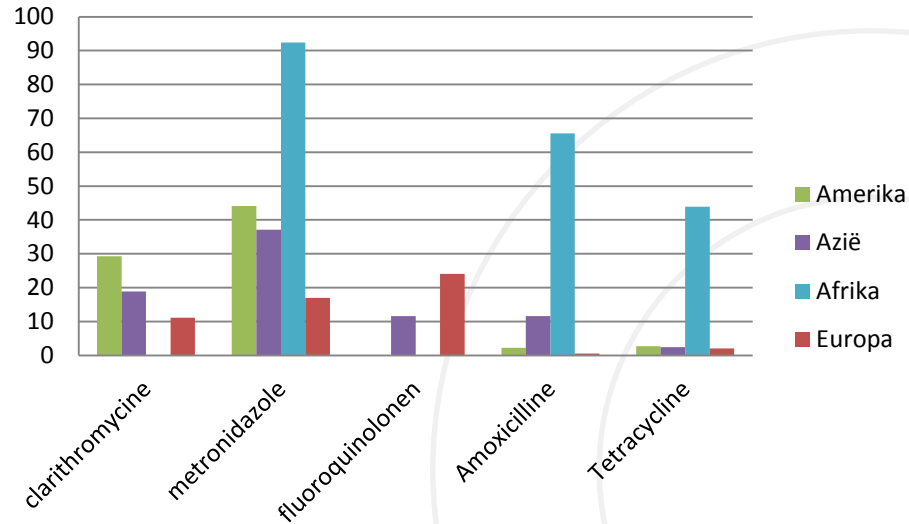
Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicatie van HP na eerstelijns therapie



HET PROBLEEM *H. pylori* Resistentie

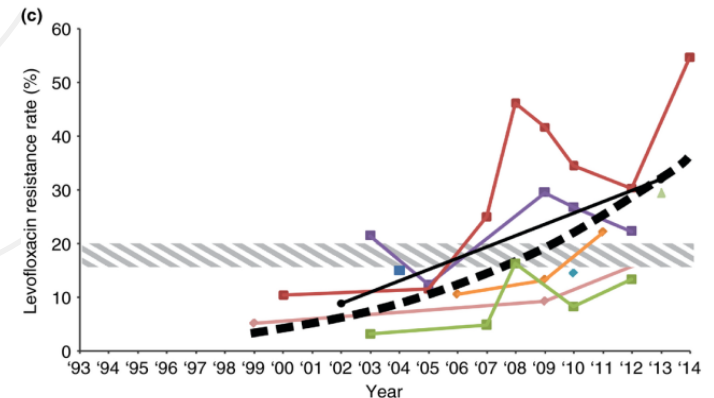
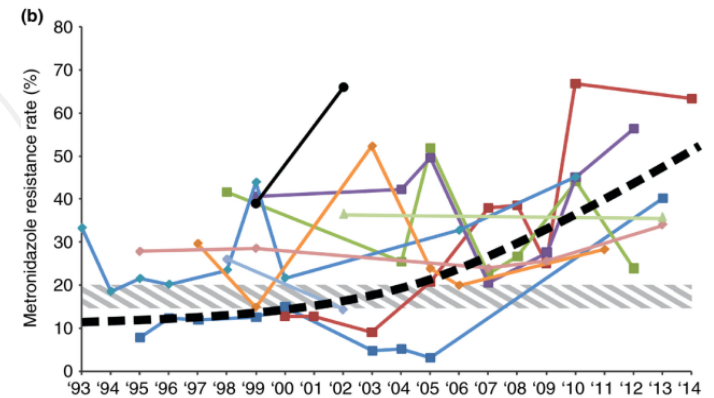
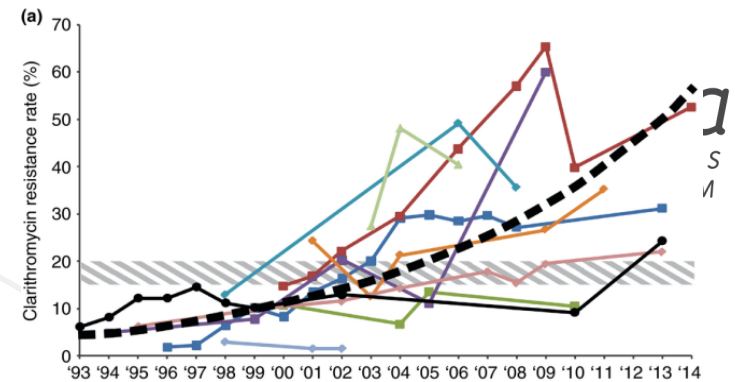
HP resistentie: wereld



De Francesco et al. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2010 (data van 1993-2009)

Europese regio	% clarithromycine resistentie	% levofloxacin resistentie	% metronidazole resistentie
Noord-Europa	7.7	7.7	28.6
West/centraal-Europa	18.7	18.6	43.8
Zuid-Europa	21.5	13.1	29.7

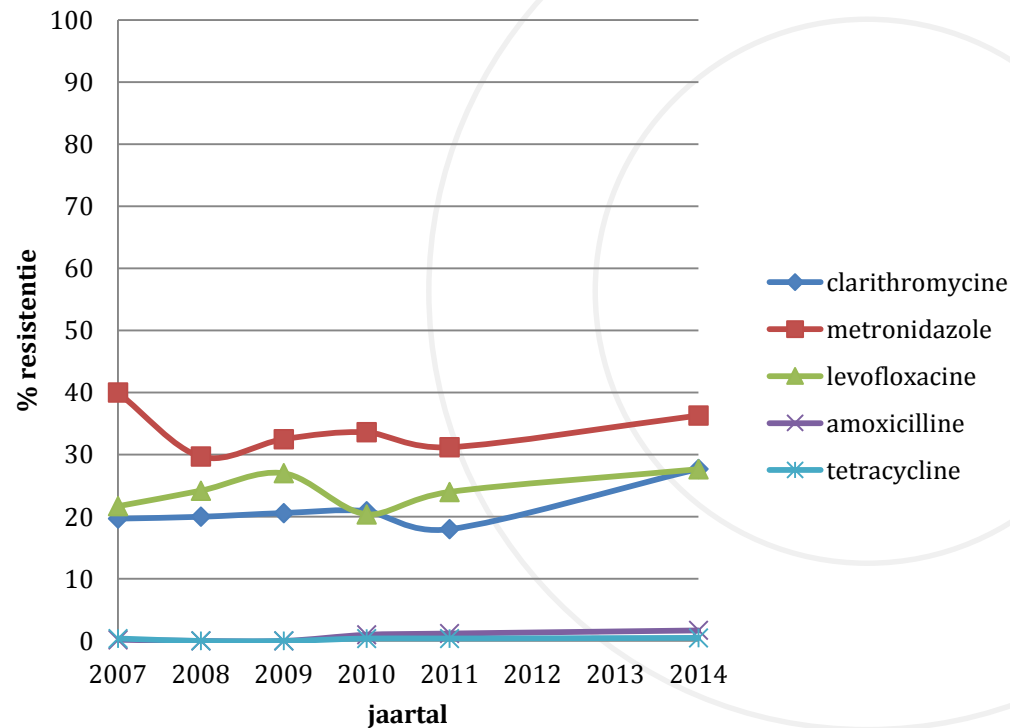
Megraud et al. *Gut.* 2013 (data van 2008-2009)



Japan China Taiwan Korea Spain
Italy Sweden Bulgaria Turkey USA

Thung et al. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015

HP resistentie: België



	2007	2008	2009	2010	2011	2014
clarithromycine	19.7	20	20.6	20.9	18	27.7
metronidazole	40	29.7	32.5	33.6	31.2	36.3
levofloxacin	21.7	24.2	27	20.4	24	27.6
amoxicilline	0.2	0	0	1	1.2	1.6
tetracycline	0.4	0	0	0.4	0.4	0.5

- [illegible]

Uit: Mégraud et al. 2015

22

The background of the slide features three concentric white circles centered behind the main text.

HET PROBLEEM

impact van resistentie op eradicatietherapieën

Effect van antibioticaresistentie op de eradicatiegraad van HP

THE
LANCET

- Fase drie klinische studie, 440 volwassenen uit 39 Europese centra, 2011
- Triple therapie: *PPI/amoxicilline/clarithromycine 7d*:
eradicatiegraad: **55%**
- Quadruple therapie: *PPI/bismuth subcitraat/metronidazole/tetracycline 10d*:
eradicatiegraad: **80%**

	Quadruple therapy		Standard therapy	
Eradication rate by baseline metronidazole resistance*				
Baseline metronidazole resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	38/42 (91%); 77.4-97.3	98/103 (95%); 89.0-98.4	28/41 (68%); 51.9-81.9	64/90 (71%); 89.0-98.4
p value	0.283	..	0.837	..
Eradication rate by baseline clarithromycin resistance*				
Baseline clarithromycin resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	30/33 (91%); 75.7-98.1	106/112 (95%); 88.8-98.0	2/25 (8%); 1.0-26.0	90/106 (85%); 76.6-91.1
p value	0.426	..	<0.0001	..
Eradication rate by baseline combined metronidazole and clarithromycin resistance*				
Baseline combined metronidazole and clarithromycin resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	11/12 (92%); 61.5-99.8	125/133 (94%); 88.5-97.4	2/10 (20%); 2.5-55.6	90/121 (74%); 65.6-81.9
p value	0.551	..	0.001	..

Data are n/N (%); 95% CI unless otherwise indicated. Quadruple therapy is omeprazole, bismuth, metronidazole, and tetracycline. Standard therapy is omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin. PP=per protocol.
*Percentages are based on the number of patients with both baseline and post-baseline resistance data in the PP population; not all cultures provided resistance or sensitivity data.

Table 3: Eradication rates and antibiotic resistance in the PP population

Effect van antibioticaresistentie op de eradicationgraad van HP

THE LANCET

- Fase drie klinische studie, 440 volwassenen uit 39 Europese centra, 2011
- Triple therapie: *PPI/amoxicilline/clarithromycine 7d*:
eradicationgraad: **55%**
- Quadruple therapie: *PPI/bismuth subcitraat/metronidazole/tetracycline 10d*:
eradicationgraad: **80%**

	Quadruple therapy		Standard therapy	
Eradication rate by baseline metronidazole resistance*				
Baseline metronidazole resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	38/42 (91%); 77.4-97.3	98/103 (95%); 89.0-98.4	28/41 (68%); 51.9-81.9	64/90 (71%); 89.0-98.4
p value	0.283	..	0.837	..
Eradication rate by baseline clarithromycin resistance*				
Baseline clarithromycin resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	30/33 (91%); 75.7-98.1	106/112 (95%); 88.8-98.0	2/25 (8%); 1.0-26.0	90/106 (85%); 76.6-91.1
p value	0.426	..	0.0001	..
Eradication rate by baseline combined metronidazole and clarithromycin resistance*				
Baseline combined metronidazole and clarithromycin resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	11/12 (92%); 61.5-99.8	125/133 (94%); 88.5-97.4	2/10 (20%); 2.5-55.6	90/121 (74%); 65.6-81.9
p value	0.551	..	0.001	..

Data are n/N (%); 95% CI unless otherwise indicated. Quadruple therapy is omeprazole, bismuth, metronidazole, and tetracycline. Standard therapy is omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin. PP=per protocol.
*Percentages are based on the number of patients with both baseline and post-baseline resistance data in the PP population; not all cultures provided resistance or sensitivity data.

Table 3: Eradication rates and antibiotic resistance in the PP population

Effect van antibioticaresistentie op de eradicatiegraad van HP

THE
LANCET

- Fase drie klinische studie, 440 volwassenen uit 39 Europese centra, 2011
- Triple therapie: *PPI/amoxicilline/clarithromycine 7d*:
eradicatiegraad: **55%**
- Quadruple therapie: *PPI/bismuth subcitraat/metronidazole/tetracycline 10d*:
eradicatiegraad: **80%**

	Quadruple therapy		Standard therapy	
Eradication rate by baseline metronidazole resistance*				
Baseline metronidazole resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	38/42 (91%); 77.4-97.3	98/103 (95%); 89.0-98.4	28/41 (68%); 51.9-81.9	64/90 (71%); 89.0-98.4
p value	0.283		0.837	..
Eradication rate by baseline clarithromycin resistance*				
Baseline clarithromycin resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	30/33 (91%); 75.7-98.1	106/112 (95%); 88.8-98.0	2/25 (8%); 1.0-26.0	90/106 (85%); 76.6-91.1
p value	0.426	..	<0.0001	..
Eradication rate by baseline combined metronidazole and clarithromycin resistance*				
Baseline combined metronidazole and clarithromycin resistance	Yes	No	Yes	No
Eradication	11/12 (92%); 61.5-99.8	125/133 (94%); 88.5-97.4	2/10 (20%); 2.5-55.6	90/121 (74%); 65.6-81.9
p value	0.551	..	0.001	..

Data are n/N (%); 95% CI unless otherwise indicated. Quadruple therapy is omeprazole, bismuth, metronidazole, and tetracycline. Standard therapy is omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin. PP=per protocol.

*Percentages are based on the number of patients with both baseline and post-baseline resistance data in the PP population; not all cultures provided resistance or sensitivity data.

Table 3: Eradication rates and antibiotic resistance in the PP population

Effect van antibioticaresistentie op de eradicatiegraad van HP

- clarithromycineresistentie:
 - **significante daling** in eradicatiegraad triple therapie (7 én 10 dagen) (tot 70%)
 - metronidazoleresistentie:
 - **GEEN** significante daling in eradicatiegraad quadruple therapie
 - tot 25% daling bij MZD-gebaseerde triple therapieën (significant?)
 - levofloxacineresistentie:
 - **significante daling** eradicatiegraad FQ-gebaseerde therapieën (tot 50%)
- eradicatiegraad standaard triple therapie: 55-83.2%
- Meeste studies: retrospectief !

Eradicatieschema's

	Schema	Duur
<u>Eerstelijns therapie</u>		
<i>regio met lage clarithromycine resistentie (<15-20%)</i>	Triple therapie: PPI + clarithromycine 2x 500mg + amoxicilline 2x 1g OF PPI + clarithromycine 2x 500mg + metronidazole 2x 500mg	10-14d
<i>regio met hoge clarithromycine resistentie (>=15-20%)</i>	Quadruple therapie: PPI + bismuthsubsalicylaat 4x 525mg + metronidazole 4x 250mg + tetracycline 4x 500mg	10-14d
<u>Tweedelijns therapie</u>		
	Sequentiële therapie: PPI + amoxicilline 2x 1g 5d gevolgd door PPI + metronidazole 2x 500mg + clarithromycine 2x 500mg 5d	10d
	Quadruple therapie	10-14d
	Levofloxacin-gebaseerde triple therapie: PPI + amoxicilline 2x 1g + levofloxacin 4x 500mg	10d



Maastricht IV consensus, 2012

American college of gastroenterology, 2007

Impact van resistentie op therapie

Within any region, only regimens that reliably produce **eradication rates of $\geq 90\%$** in that population should be used for empirical treatment.



Statement 5: (1) It is important to **perform culture and standard susceptibility testing** to antimicrobial agents **in a region or population of high clarithromycin resistance** before prescription of the first-line treatment if the standard **clarithromycin-containing triple therapy is being considered.**

Statement 7: PPI-clarithromycin-containing triple therapy without prior susceptibility testing should be **abandoned** when the clarithromycin resistance rate in the region is **more than 15-20%.**

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicatietherapie

Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicatie van HP na eerstelijns therapie

Diagnose

Table 2. Diagnostic Testing for *Helicobacter pylori*

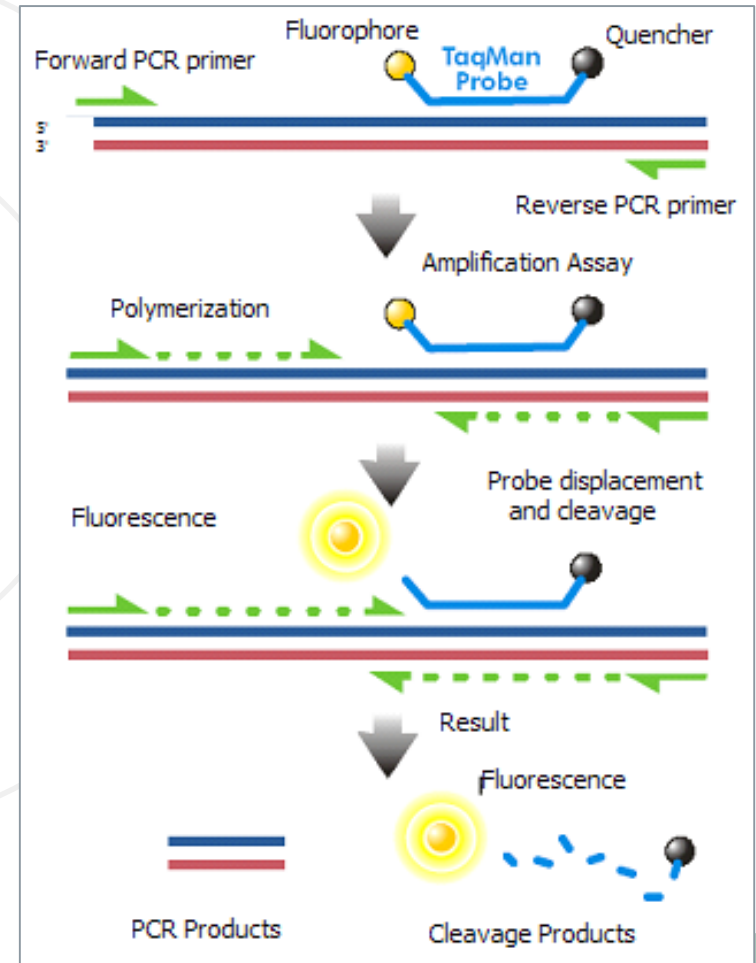
Previous table	Figure and tables index	Next table
Endoscopic Testing	Advantages	Disadvantages
* 1. Histology	Excellent sensitivity and specificity	Expensive and requires infrastructure and trained personnel
* 2. Rapid urease testing	Inexpensive and provides rapid results. Excellent specificity and very good sensitivity in properly selected patients	Sensitivity significantly reduced in the posttreatment setting
* 3. Culture	Excellent specificity. Allows determination of antibiotic sensitivities	Expensive, difficult to perform, and not widely available. Only marginal sensitivity
* 4. Polymerase chain reaction	Excellent sensitivity and specificity. Allows determination of antibiotic sensitivities	Methodology not standardized across laboratories and not widely available
Nonendoscopic Testing	Advantages	Disadvantages
1. Antibody testing (quantitative and qualitative)	Inexpensive, widely available, very good NPV	PPV dependent upon background <i>H. pylori</i> prevalence. Not recommended after <i>H. pylori</i> therapy
* 2. Urea breath tests (¹³ C and ¹⁴ C)	Identifies active <i>H. pylori</i> infection. Excellent PPV and NPV regardless of <i>H. pylori</i> prevalence. Useful before and after <i>H. pylori</i> therapy	Reim WHY NOT? remain inconsistent
* 3. Fecal antigen test	Identifies active <i>H. pylori</i> infection. Excellent positive and negative predictive values regardless of <i>H. pylori</i> prevalence. Useful before and after <i>H. pylori</i> therapy	Polyclonal test less well validated than the UBT in the posttreatment setting. Monoclonal test appears reliable before and after antibiotic therapy. Unpleasantness associated with collecting stool

* The sensitivity of all endoscopic and nonendoscopic tests that identify active *H. pylori* infection is reduced by the recent use of PPIs, bismuth, or antibiotics

PPI = proton pump inhibitor; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; UBT = urea breath test.

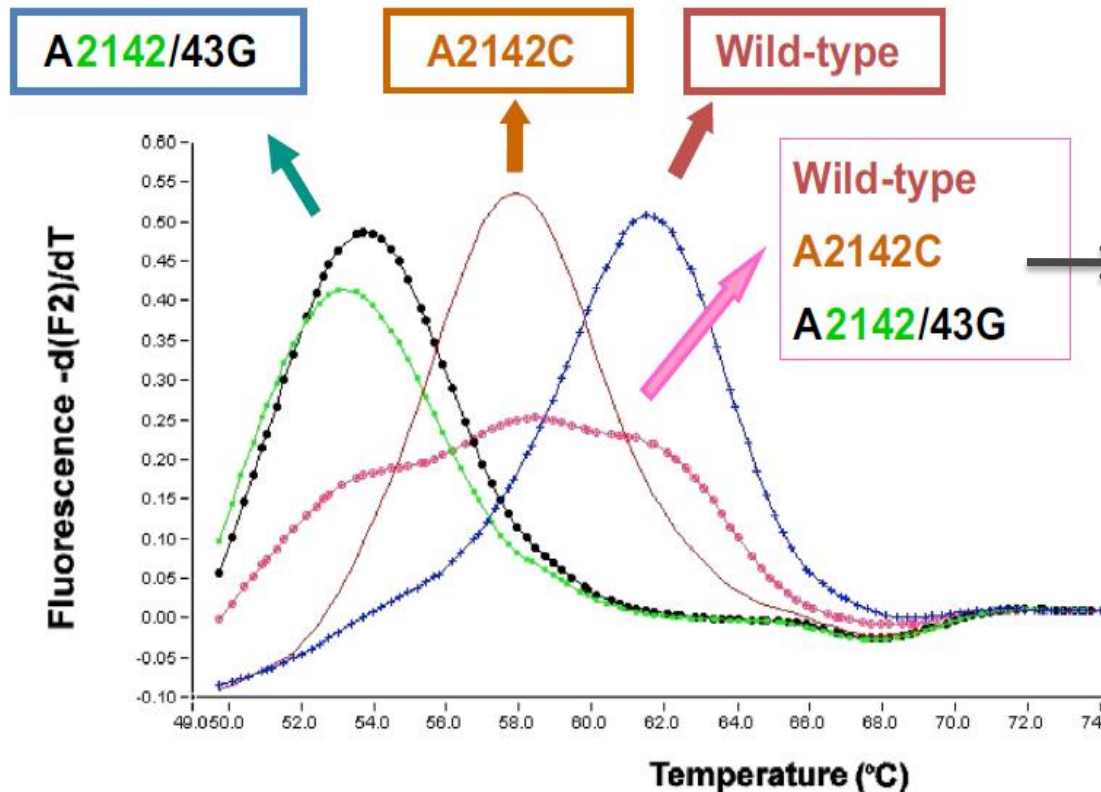
PCR

- Targetgenen HP: *ureA*, *ureC*, *16S rRNA*, *23S rRNA*
- Detectie van resistentiemutaties !
- Real-time PCR
 - Snel, eenvoudig
 - Hoogste sensitiviteit
 - Ook coccoïde vormen oppikken
 - Minder onderhevig aan transportcondities
 - Smeltcurveanalyse: opsporen van heteroresistentie



Clarithromycineresistentie via smeltcurveanalyse

- ⊙ $\uparrow t^\circ \rightarrow$ ds DNA dissociëren
- ⊙ Wild-type en mutant dissociëren op $\neq t^\circ$



Detectie van heteroresistentie!

Commerciële kits

MutaREAL®

Helicobacter pylori
(Clarithromycin resistance)

real time PCR Kit

Immundiagnostik - Bensheim



H. pylori ClariRes Assay

Ingenetix - Wenen

RIDA® GENE Helicobacter pylori

r-Biopharm – Darmstadt

GenoType® HelicoDR

Hain, Lifescience – Nehren

Commerciële kits

MutaREAL[®]

Helicobacter

(Clarithromycin)

real-time

Immunodiagnostik - Bensheim

clarithromycine



H. pylori

clarithromycine

Assay

Venen

RIDA[®]GE

clarithromycine

pylori
Darmstadt

GenoType[®] **toDR**

Hair

Clarithromycine +
Fluoroquinolonen

	RIDA®GENE	MutaREAL®	ClariRes™ RT-PCR	GenoTypeHelicoDR
firma	r-Biopharm AG (Darmstadt, Duitsland)	Immundiagnostik AG (Bensheim, Duitsland)	Ingenetix (Wenen, Oostenrijk)	Bioscience Hain Lifescience (Nehren, Duitsland)
methode	real-time PCR FRET hybridisatie	real-time PCR FRET hybridisatie smeltcurveanalyse	real-time PCR SYBR® Green I smeltcurveanalyse	PCR + strip hybridisatie
specimen	maagbiopt	maagbiopt, stoelgang	maagbiopten, stoelgang	maagbiopt
HP detectie	16S rRNA,	23S rRNA	23S rRNA	23S rRNA
clarithromycine-resistentie	23S rRNA	23S rRNA)	23S rRNA	23S rRNA
fluoroquinolonen-resistentie	-	-	-	gyrA
toestel	LightCycler 480 (Roche) SmartCycler (Cepheid) ABI 7500 (Applied Biosystems) m2000rt (Abbott) Mx3005P (Agilent Technologies) Rotor-Gene Q (Qiagen) CFX96 (Bio-Rad)	LightCycler1.5, 2.0 (Roche)	LightCycler1.1/1.2/1.5/2.0 (Roche)	Conventioneel PCR toestel Incubator GT-Blot 48
CE-IVD	+	+	+	+
Detectie van heteroresistentie?	?	ja	ja	ja

Analytische performantie

1. Biologische variatie

- Antrum → corpus
- Meerdere bipten → hogere gevoeligheid

2. Interferentie

- Stop PPI en AB minstens 2 weken vóór staalname
- Vals positiviteit: *niet-pylori Helicobacters*, *Campylobacter spp.*, contaminatie
- Vals negativiteit: lage bacteriële load, PCR inhibitoren

3. staalstabiliteit:

- Transportmedia minder belangrijk, meeste studies op ingevroren verse bipten
- Rondvraag BILULU: 2/4 centra: geen transportmedium
- Weinig literatuur over stabiliteit voor PCR !

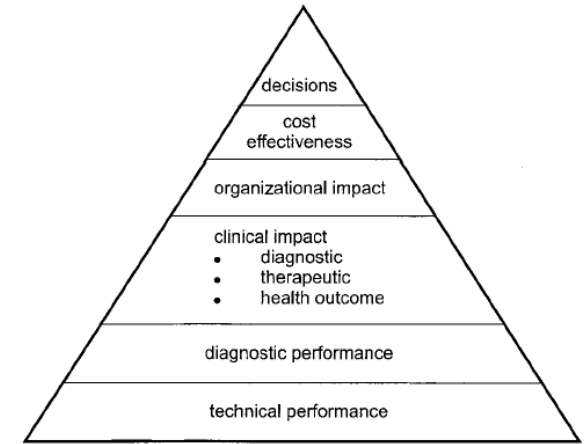


Fig. 2. Evidence of performance designed to facilitate decision-making.

Analytische performantie

4. Detectielimiet (LOD)

- Weinig literatuur, geen informatie in bijsluiters van firma
- 82% van symptomatische patiënten: 10^4 - 10^{12} CFU/mL
- Vanaf welke LOD klinisch belangrijk???

5. Controles

- Positieve, negatieve en interne controle firma ter beschikking
- ATCC 43504: clarithromycine gevoelig, metronidazole resistent
- CCUG 38770: clarithromycine gevoelig-intermediair, metronidazole resistent
- CCUG 38771: clarithromycine gevoelig, metronidazole gevoelig
- CCUG 38772: clarithromycine resistent, metronidazole intermediair-resistent
- EQC: QCMD (Glasgow), Instand (Düsseldorf)

6. Prijs

- 14-30 euro/test (excl. 21%, extractie), geen terugbetaling

Diagnostische performantie

		N	sensitiviteit	specificiteit	PPV	NPV	referentie
RIDA®GENE	<i>HP detectie</i>	225	98-100%	98-100%	98%	100%	Bijsluiter abstract ECCMID 2016
	<i>Clarithromycine-resistentie</i>	139	96-97%	96-97%	98%	95%	
MutaREAL®	<i>HP detectie</i>	188	93%	87%	91%	91%	Agudo et al. <i>Diagn Microbiol Infect Dis.</i> 2010
	<i>Clarithromycine-resistentie</i>	60	91%	96%	97%	88%	
ClariRes™RT-PCR	<i>HP detectie</i>	92	100%	98%	98%	100%	Schabereiter-Gurtner <i>J Clin Microbiol.</i> 2004
	<i>Clarithromycine-resistentie</i>	45	82%	100%	100%	94%	
GenoType HelicoDR	<i>HP detectie</i>	35	93-100%	100%	100%	95%	-Deyi et al. <i>Diagn Microbiol Infect Dis.</i> 2011 - Cambau et al. <i>J Clin Microbiol.</i> 2009 -Lee et al. <i>Antimicrob Agents Chemother.</i> 2005 -Tanih et al. <i>Gastroenterol Res Pract.</i> 2013
	<i>Clarithromycine-resistentie</i>		95-100%	86-100%	99%	94%	
	<i>Fluoroquinolonen-resistentie</i>		89-98%	80-97%	96%	96%	

Diagnostische performantie

⊙ HP detectie:

- ⊙ sensitiviteit: 93-100%, specificiteit: 87-100%
- ⊙ CAVE meeste studies: cultuur als gouden standaard!

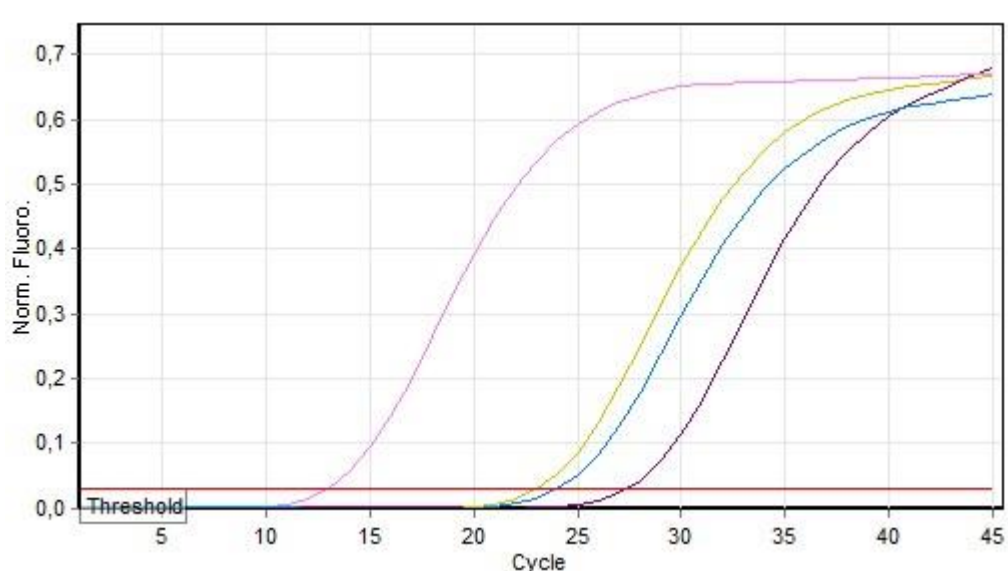
⊙ Clarithromycineresistentie:

- ⊙ sensitiviteit: 82-100%, specificiteit: 86-100%
- ⊙ CAVE: andere mutaties of resistentiemechanismen, heteroresistentie

⊙ Fluoroquinolonenresistentie:

- ⊙ sensitiviteit: 89-98%, specificiteit 80-97%
- ⊙ Complexer: grotere variabiliteit in mutaties, sterk regio-afhankelijk

RIDA[®]GENE, Imelda



Praktisch:

- Biopt overnacht verteren met proteïnase K
- Extractie: +/- 30min
- PCR reactie: +/- 70min
- Kit:
 - Positieve controle
 - Negatieve controle
 - Interne controle
 - Taq-polymerase
 - Reactie mix

	HP cultuur	HP 16S rRNA	E-test clarithromycine	Clarithromycine resistentiemutatie
patiënt 1	negatief	negatief	-	-
patiënt 2	positief	Ct 23,06	S	negatief
patiënt 3	negatief	negatief	-	-
patiënt 4	positief	Ct 27,36	S	negatief
ATCC [®] 43504	positief	Ct 12,94	S	negatief

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicatortherapie

Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicator van HP na eerstelijns therapie

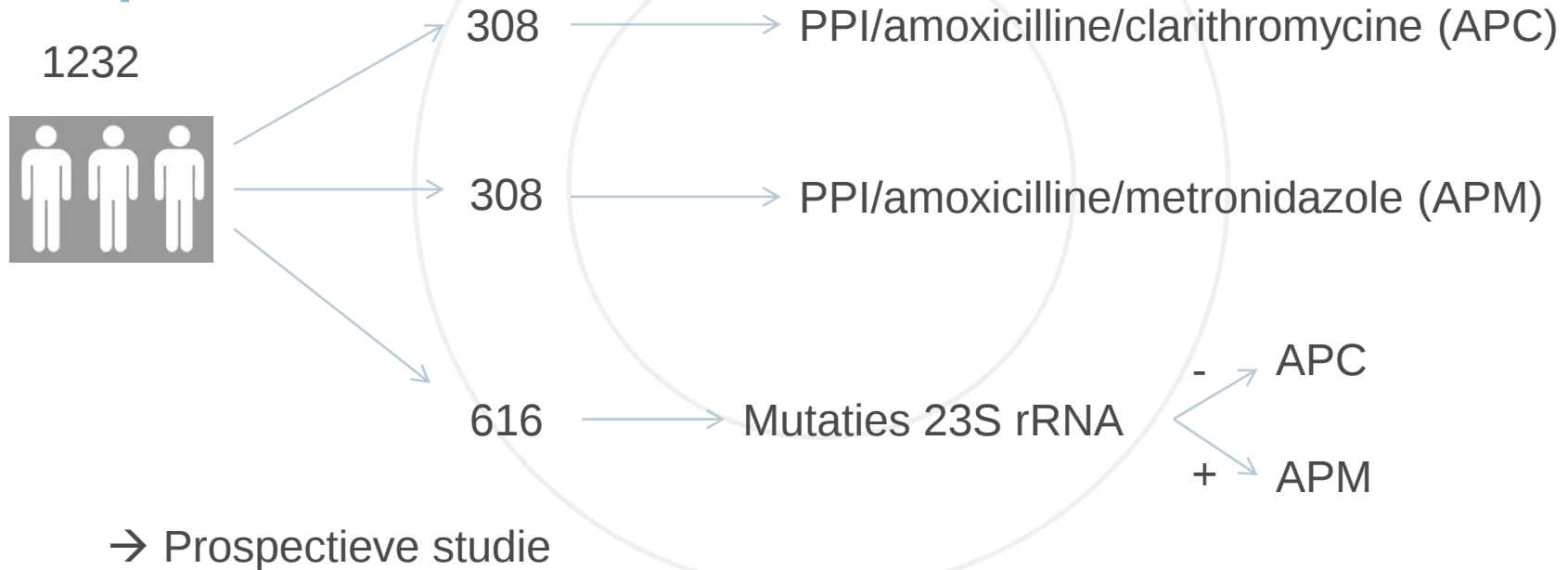
imelda omringt u met zorg

Klinische performantie:

Gerichte vs. empirische therapie

The Journal of
Infectious
Diseases

Lee et al. *J Infect Dis.* 2012: gerichte therapie vs. triple therapie

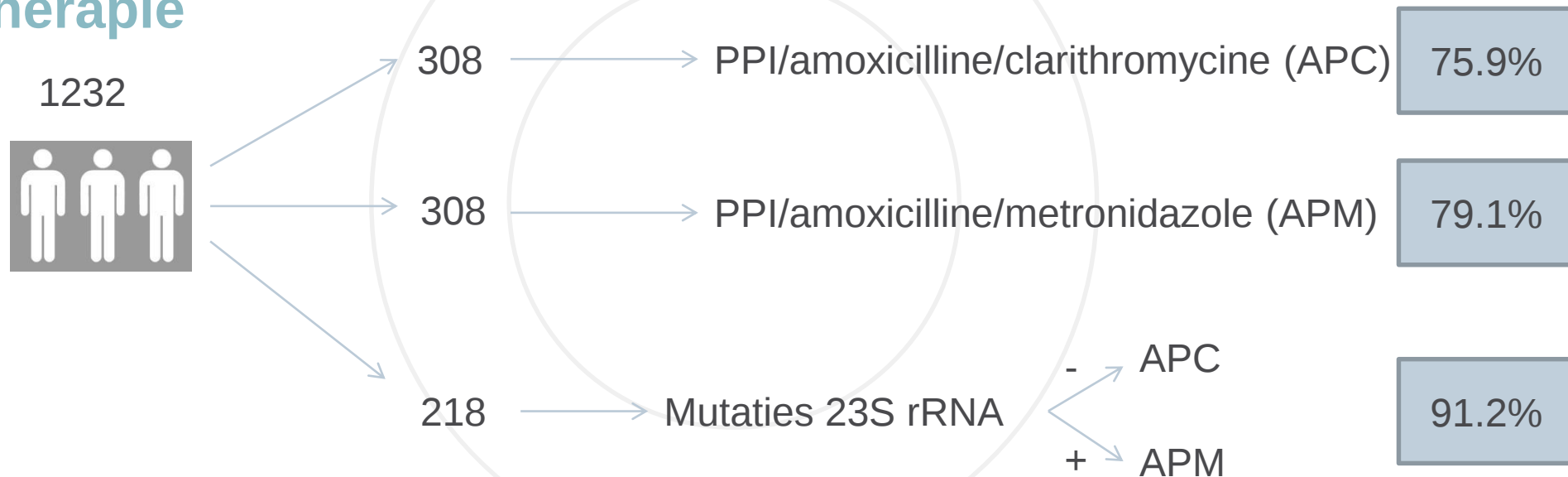


Klinische performantie:

Gerichte vs. empirische therapie

The Journal of
Infectious
Diseases

Lee et al. *J Infect Dis.* 2012 : gerichte therapie vs. triple therapie



Chen et al. *Medicine (Baltimore).* 2016 : meta-analyse

In subgroup analysis, **tailored therapy was superior to 7-day standard triple therapy** (RR 1.22, 95% CI 1.16–1.29) **and bismuth-quadruple therapy** (RR 1.14, 95% CI 1.07–1.22) **on eradication rates**; first-line tailored therapy achieved higher eradication rates than first-line empirical regimens (pooled RR 1.18, 95% CI 1.14–1.22), whereas tailored rescue regimen showed no difference with empirical ones (pooled RR 1.16, 95% CI 0.96–1.39).

imelda omringt u met zorg

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen **via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicatietherapie**

Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicatie van HP na eerstelijns therapie

imelda omringt u met zorg

Klinische performantie

Genotypische vs. fenotypische resistentiebepaling

De Francesco et al. *J Antimicrob Chemother.* 2010

- ⊙ 146 symptomatische patiënten zonder AB therapie
- ⊙ Kweek HP op maagbiopten → E-test + real-time PCR 23S rRNA op paraffine ingebed materiaal
- ⊙ RESULTATEN:
 - ⊙ Clarithromycineresistentie: **18.4%** via E-test vs. **37.6%** via PCR`
 - ⊙ Indien genotypische R maar fenotypische S:
eradicatiegraad: **>80%**
 - Geeft PCR een overschatting van de resistenties??
 - Major error in de maak?

Klinische performantie

Genotypische vs. fenotypische resistentiebepaling

De Francesco et al. *J Antimicrob Chemother.* 2010

◉ RESULTATEN

- ◉ Genotypisch R en fenotypisch S → voornamelijk te wijten aan **heteroresistentie**
- ◉ Indien genotypisch R én fenotypisch R
eradicatiegraad: **46%**

◉ BESLUIT

- ◉ Genotypische resistentiebepaling is gelijkwaardig aan fenotypische resistentiebepaling **indien heteroresistentie uitgesloten wordt**

	RIDA®GENE	MutaREAL®	ClariRes™ RT-PCR	GenoTypeHelicoDR
firma	r-Biopharm AG (Darmstadt, Duitsland)	Immundiagnostik AG (Bensheim, Duitsland)	Ingenetix (Wenen, Oostenrijk)	Bioscience Hain Lifescience (Nehren, Duitsland)
methode	real-time PCR FRET hybridisatie	real-time PCR FRET hybridisatie smeltcurveanalyse	real-time PCR SYBR® Green I smeltcurveanalyse	PCR + strip hybridisatie
specimen	maagbiopt	maagbiopt, stoelgang	maagbiopten, stoelgang	maagbiopt
HP detectie	16S rRNA,	23S rRNA	23S rRNA	23S rRNA
clarithromycine-resistentie	23S rRNA	23S rRNA)	23S rRNA	23S RNA
fluoroquinolonen-resistentie	-	-	-	gyrA
toestel	LightCycler 480 (Roche) SmartCycler (Cepheid) ABI 7500 (Applied Biosystems) m2000rt (Abbott) Mx3005P (Agilent Technologies) Rotor-Gene Q (Qiagen) CFX96 (Bio-Rad)	LightCycler1.5, 2.0 (Roche)	LightCycler1.1/1.2/1.5/2.0 (Roche)	Conventioneel PCR toestel Incubator GT-Blot 48
CE-IVD	+	+	+	+
Detectie van heteroresistentie?	?	ja	ja	ja

Niemand doet *H. pylori* resistentiebepaling alvorens opstart van therapie. Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Patiënt: symptomatische patiënten waarbij endoscopische investigatie en opsporing van HP is aangewezen

Interventie: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicatietherapie

Comparison: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentie via cultuur na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: >90% eradicatie van HP na eerstelijns therapie

imelda omringt u met zorg

Bemerkingen

- I. **Bias** op studies m.b.t. prevalentie en resistentie → risicopopulatie vs. algemene populatie; aantal publicaties,...? **WEL** altijd vermelding zo **primaire resistentie** (zonder voorafgaande AB R/)
- II. Nog **andere factoren** die eradicaatie beïnvloeden vb. therapietrouw, roken,...
- III. Weinig gegevens over **regionale verschillen in België**
- IV. Meeste studies gerichte vs. empirische behandeling: **7-dagen** durende triple therapie
- V. Nood aan **meer prospectieve studies**
- VI. Meer info nodig over **analytische performantie** commerciële PCR testen

TO DO's

- I. PCR op **stoelgangsstalen**?
- II. RIDA[®]GENE: nagaan performantie
CAVE probleem van geen detectie van **heteroresistentie** → hoe oplossen?
- III. Waar in de **klinische pathway** kunnen we PCR implementeren?
- IV. **Kosten vs. baten**
- V. Overleg met **gastro-enterologen** en **anatoom-pathologen**

Take home messages

- I. **Toenemende** prevalentie en **resistentie** van HP + sterk **regio-afhankelijk**
- II. Resistentie aan **clarithromycine** doet eradicationgraad van **triple therapie tot 70% dalen**
- III. Resistentie aan **metronidazole** heeft **geen significante impact** op quadruple therapie
- IV. **Gerichte therapie** leidt tot een **hogere eradicationgraad (>90%)** dan empirische therapie
- VI. **Moleculaire methoden: performant** in het opsporen van HP en (clarithromycine) resistentiemutaties
- VII. **Real-time PCR** heeft de hoogste gevoeligheid en het minste risico op contaminatie
- VIII. **Genotypische resistentiebepaling is evenwaardig** in het voorspellen van de klinische uitkomst aan fenotypische resistentiebepaling **indien heteroresistentie uitgesloten wordt**

Tijd voor (moleculaire) revolutie?



Dank voor uw aandacht