

CAT
Critically Appraised Topic

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

Author: Van den Poel Bea
Supervisor: Dr. Johan Frans
Date: 14/04/2016

CLINICAL BOTTOM LINE

H. pylori (HP) is de belangrijkste oorzaak van chronische gastritis en kan leiden tot het ontwikkelen van maagkanker. Eradicatie van HP heeft een bewezen positief effect op de morbiditeit van HP-veroorzaakte ziekte. Echter, het percentage van HP stammen die resistent zijn aan de frequentst gebruikte antibiotica is de laatste jaren sterk toegenomen en blijkt regio-afhankelijk. Daarom raden de Maastricht-richtlijnen (2012) aan om over te schakelen van standaard triple therapie (bestaande uit een protonpompinhibitor, clarithromycine en amoxicilline of metronidazole) naar bismuth-gebaseerde quadruple therapie of sequentiële therapie in regio's waar het HP-clarithromycineresistentiepercentage de 20% overschrijdt of een gevoeligheidsbepaling uit te voeren. Voornamelijk resistentie aan clarithromycine doet de eradicationgraad van triple therapie 50 tot 70% verlagen. Desondanks gerichte therapie superieur is t.o.v. empirische therapie, zelfs indien onmiddellijk met quadruple therapie wordt gestart, blijft de drempel voor een gevoeligheidsbepaling vóór opstart van eerstelijns therapie hoog. Gevoeligheidsbepaling van HP gebeurt in de meeste laboratoria via cultuur maar dit is een tijdrovend proces gezien de moeilijke kweekomstandigheden en trage groei van HP. Polymerase ketting reactie is een snelle en gevoelige methode voor het opsporen van HP en antibioticaresistentie. Er zijn reeds commerciële kits beschikbaar zoals MutaREALH. *pylori* (Immundiagnostik), ClariRes™ real-time PCR (Ingenetix), RIDA®GENE (r-biopharm) en GenoType® HelicoDR (Hain, Lifescience) die HP en de belangrijkste resistentiemutaties voor clarithromycine kunnen opsporen in maagbiopten. Ze hebben een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 93-100% en 87-100% voor de detectie van HP en van 82-100% resp. 86-100% voor het opsporen van clarithromycineresistentie. PCR kan heteroresistentie aantonen en resistentiemutaties genotypisch identificeren. Tevens is genotypische resistentiedetectie voor clarithromycine evenwaardig aan E-testen in het correleren met de klinische uitkomst indien heteroresistentie wordt uitgesloten. PCR op verse maagbiopten is dus een snelle en performante techniek voor het aantonen van HP en clarithromycineresistentie. Gezien het stijgend probleem van resistentie en therapiefalen, is het een techniek die niet meer genegeerd kan worden in de eerstelijnsaanpak van HP-geïnduceerde gastritis.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Infectie met *H. pylori* (HP), een gram-negatieve, spiraalvormige bacterie is de meest voorkomende chronische infectie ter wereld. Naar schatting 20-50% van de populatie in geïndustrialiseerde landen is geïnfecteerd met deze kiem. Dit aantal loopt in ontwikkelingslanden zelfs op tot 70-80%.^{1,2} De meerderheid van de geïnfecteerden (+/- 70%) blijven asymptomatisch terwijl een kleiner percentage (+/- 20%) een door HP-veroorzaakte ziekte ontwikkelt: peptisch ulcuslijden, maagneoplasieën en een MALT-lymfoom ('mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma') zijn de gekendste manifestaties van een HP infectie.³ HP-infectie kan invasief (via kweek/histochemische kleuringen op bipten na endoscopie) of niet-invasief (via een urease-ademtest ('ureabreath test, UBT') of faeces HP antigen test) gediagnosticeerd worden. Serologie heeft, gezien zijn lage positief voorspellende waarde, nog maar weinig plaats in de diagnostiek van HP-infectie.^{2,4} Recentelijk bestaan er ook moleculaire methoden voor het opsporen van HP op maagbipten of in stoelgangstalen. Detectie van HP wordt aangeraden bij patiënten met actief ulcuslijden, MALT-lymfoom en na endoscopische resectie van een vroeg-gediagnosticeerd maagcarcinoom.¹

Wereldwijd hebben er verschillende consensusmeetings plaatsgevonden waarbij experts zich bogen over de aanpak van HP infecties en van waaruit belangrijke richtlijnen omtrent HP werden vervaardigd. Zo bestaan er Europese richtlijnen ('Maastricht IV/Florence Consensus Report, 2012')⁴ opgesteld door de European Helicobacter Study group, Amerikaanse richtlijnen ('American College of Gastroenterology Guideline on the Management of HP Infection', 2007)⁵ en Aziatische richtlijnen ('Kyoto global consensus report', 2015).³

Eradicatie van HP heeft zijn nut reeds bewezen bij patiënten met HP-veroorzaakte dyspepsie en leidt tot een significante verbetering van de symptomen.^{3,4} Tevens is HP-eradicatie de eerstelijnsbehandeling voor een MALT-lymfoom en is er beperkte evidentie dat genezing van de infectie progressie naar een maagadenocarcinoma kan verhinderen. Voor de behandeling van HP bestaan verschillende antibiotica's (zie tabel I).^{4,5} De uitkomst van de eerstelijnsbehandeling voor de eradication van HP hangt in sterke mate af van de therapietrouw van de patiënt én van de prevalentie-en resistentiegraad van HP voor de antibiotica.⁵ Het steeds groter wordend probleem van resistentie van HP aan eerstelijnsantibiotica vormt echter een significante bedreiging voor het succes van de eradicatietherapie. De prevalentie en gevoeligheid van HP is sterk regio-gebonden. In België schommelt de prevalentie van HP jaarlijks rond 15-20% (bij patiënten die gastroscopie ondergaan) en het primair resistentiepercentage (d.i. resistentie zonder voorafgaand gebruik van antibiotica) aan clarithromycine, metronidazole en levofloxacin was in 2014 resp. 27.7%, 36.3% en 27.6% volgens de jaarlijkse surveillance studie van het nationaal referentiecentrum voor HP in Mont-Godinne. Gezien het steeds groter wordend probleem van resistentie van HP, voornamelijk tegen macrolidenantibiotica, wereldwijd, wordt het behandelingschema aangepast aan de clarithromycineresistentiegraad die gevonden wordt in een bepaalde regio (tabel I), gezien een eerste eradicatiepoging meestal gebeurt zonder voorafgaande gevoeligheidsbepaling.

	Schema	Duur
Eerstelijns therapie		
regio met lage clarithromycine resistentie (<15-20%)	Triple therapie: PPI + clarithromycine 2x 500mg + amoxicilline 2x 1g OF PPI + clarithromycine 2x 500mg + metronidazole 2x 500mg	10-14d
regio met hoge clarithromycine	Quadrupletherapie: PPI + bismuthsubsalicylaat 4x 525mg + metronidazole 4x	10-14d

resistentie ($\geq 15\text{-}20\%$)	250mg + tetracycline 4x 500mg
Tweedelijnstherapie	Sequentiële therapie: PPI + amoxicilline 2x 1g 5d gevolgd door PPI + 10d metronidazole 2x 500mg + clarithromycine 2x 500mg 5d
	Quadruple therapie 10-14d
	Levofloxacin-gebaseerde triple therapie: PPI + amoxicilline 2x 1g + 10d levofloxacin 1x 500mg

Tabel 1: behandelingschema's voor eradicaie van HP (PPI: protonpomp inhibitor) (uit: Malfertheiner et al., Sugano et al., Chey et al.)³⁻⁵

In dat geval wordt een quadruple therapie met bismuthzouten of een sequentiële therapie aanbevolen. Bismuthzouten zijn echter moeilijk als grondstof te verkrijgen in België (o.a. door toxiciteit van vb. bismuthsubcitraat) maar zit nog wel vevat in Tryplera®. Door het stijgend probleem van therapiefalen worden zelfs derdelijnsschema's met rifabutine meer en meer gebruikt (vb. rifabutine 300mg/24u/PPI/amoxicilline 2x1g/24u).⁶

De vraag rijst of het nuttig is de gevoeligheid van HP voor antibiotica (in het bijzonder voor clarithromycine) reeds te weten vóór de start van de antibioticatherapie. De European Helicobacter Study Group raadt immers in zijn recentste richtlijnen (2012) aan kweek en gevoeligheidsbepaling van HP uit te voeren in een regio met hoge clarithromycineresistentie vooraleer start van triple therapie en in alle regio's na falen van eerstelijns therapie.⁴ Dit wordt (nog) niet aanbevolen in de Amerikaanse richtlijnen.⁵ Gezien volgens de Kyoto Global Consensus Meeting in 2015 enkel behandelingschema's mogen worden toegepast waarvoor de eradicaiegraad $>90\%$ is, wordt de vraag naar snelle gevoeligheidsbepaling groter.³

Gevoeligheidsbepaling van HP gebeurt heden in de meeste laboratoria via cultuur en meestal slechts na falen van de eerstelijns therapie. Dit is een tijdrovend en moeilijk proces gezien de moeilijke kweekomstandigheden (microaërofiel milieu, selectieve voedingsbodems) en trage groei (3-5 dagen) van HP. Steeds meer en meer wordt er gesproken over PCR-gebaseerde technieken voor de opsporing van HP. PCR is gekenmerkt door een hoge sensitiviteit en specificiteit en heeft als bijkomend voordeel dat mutaties geassocieerd aan antibioticaresistentie geïdentificeerd kunnen worden. Het is een snelle en eenvoudige methode dewelke rechtstreeks op een vers maagbiopt kan uitgevoerd worden. Commerciële kits zijn reeds beschikbaar.

Deze CAT gaat na in hoeverre PCR-gebaseerde methoden voor de identificatie van HP en detectie van resistentiegenen op maagbiopten nuttig zijn in de eerste lijn d. i. vóór het opstarten van eradicaie therapie. De analytische performantie, de diagnostische performantie en de klinische impact van PCR-gebaseerde methoden worden besproken.

QUESTION(S)

Is moleculaire detectie en gevoeligheidsbepaling de oplossing in het behalen van meer dan 90% eradicaie na eerstelijnsbehandeling van *H. pylori* infecties?

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

Intervention: opsporen van HP op maagbiopten en detectie van resistentiegenen via PCR vóór het starten van eerstelijns eradicaie therapie

Comparison: empirische therapie en bepaling van gevoeligheid van HP na het falen van eerstelijns therapie via cultuur

Outcome: $>90\%$ eradicaie van HP na eerstelijns therapie (Kyoto-guidelines)

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “*Helicobacter pylori*, molecular method, PCR, diagnosis, eradication, triple therapy, quadruple therapy, resistance, molecular diagnosis, outcome”
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters “MutaREAL, ClariRes, RIDAGENE, GenoType® HelicoDR + sensitivity, specificity”, “resistance eradication”,
- 3) Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI; <http://clsi.org/>), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; <http://www.eucast.org/>)
- 4) UpToDate Online (2016)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Malfertheiner P, Bazzoli F, Delchier JC, et al. *Helicobacter pylori* eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet*. Mar 2011;377(9769):905-913.
2. Howden CW, Chey WD, Vakil NB. Clinical Rationale for Confirmation Testing After Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Implications of Rising Antibiotic Resistance. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. Jul 2014;10(7 Suppl 3):1-19.
3. Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*. Sep 2015;64(9):1353-1367.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*. May 2012;61(5):646-664.
5. Chey WD, Wong BC, Gastroenterology PPCotACo. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*. Aug 2007;102(8):1808-1825.
6. Gisbert JP, Castro-Fernandez M, Perez-Aisa A, et al. Fourth-line rescue therapy with rifabutin in patients with three *Helicobacter pylori* eradication failures. *Aliment Pharmacol Ther*. Apr 2012;35(8):941-947.
7. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. Feb 2016;43(4):514-533.
8. De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. Dec 2010;19(4):409-414.
9. Miendje Deyi VY, Deyi VY, Bontems P, et al. Multicenter survey of routine determinations of resistance of *Helicobacter pylori* to antimicrobials over the last 20 years (1990 to 2009) in Belgium. *J Clin Microbiol*. Jun 2011;49(6):2200-2209.
10. Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. Jan 2013;62(1):34-42.
11. Laboratorium voor microbiologie CUM-G. Rapportering 2011 Referentiecentrum voor *Helicobacter pylori*. Mont-Godinne 2011.
12. Sanford JP, Gilbert DN, Chambers HF, Eliopoulos GM, Moellering RC, Saag MS. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2012-2013 23rd Edition of the Belgian/Luxembourg version*. 23rd ed. Wavre: JCB Offset; 2012-2013.
13. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. *Helicobacter pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*. Jan 2016.
14. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. Sep 2004;53(9):1374-1384.
15. Carothers JJ, Bruce MG, Hennessy TW, et al. The relationship between previous fluoroquinolone use and levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Infect Dis*. Jan 2007;44(2):e5-8.
16. Rispo A, Capone P, Castiglione F, Pasquale L, Rea M, Caporaso N. Fluoroquinolone-based protocols for eradication of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. Jul 2014;20(27):8947-8956.
17. Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother*. Aug 2005;56(2):282-286.
18. Goodwin CS. The Sydney System: microbial gastritis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991 May-Jun 1991;6(3):235-237.
19. Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. Sep 2014;19 Suppl 1:6-10.

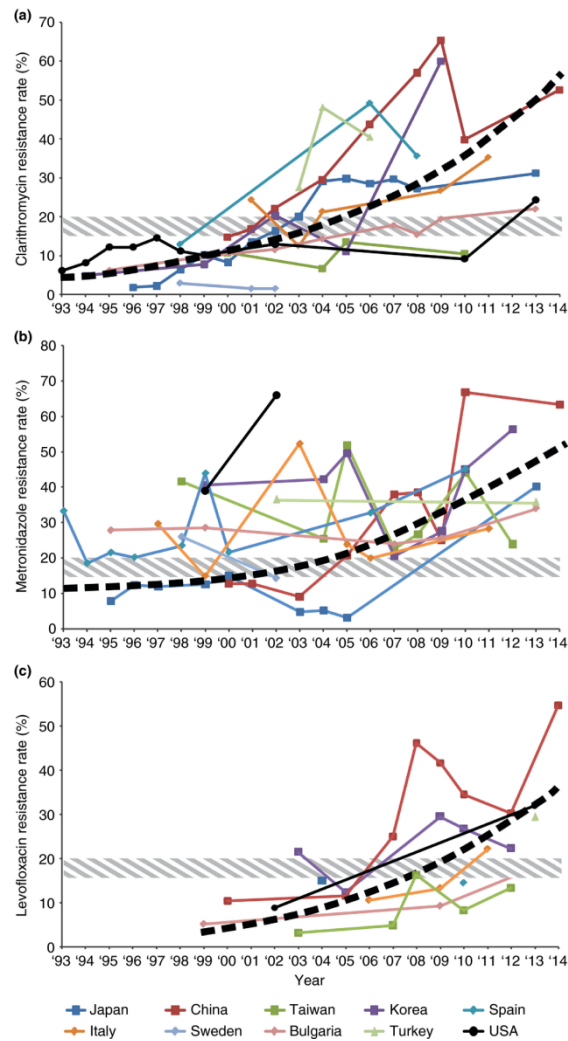
20. Lee JY, Kim N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology. *Ann Transl Med.* Jan 2015;3(1):10.
21. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* Apr 2007;20(2):280-322.
22. Smith SB, Snow AN, Perry RL, Qasem SA. *Helicobacter pylori*: to stain or not to stain? *Am J Clin Pathol.* May 2012;137(5):733-738.
23. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol.* Oct 2015;21(40):11221-11235.
24. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol.* Sep 2014;20(36):12847-12859.
25. Andrew A, Wyatt JI, Dixon MF. Observer variation in the assessment of chronic gastritis according to the Sydney system. *Histopathology.* Oct 1994;25(4):317-322.
26. Jonkers D, Stobberingh E, de Bruine A, Arends JW, Stockbrügger R. Evaluation of immunohistochemistry for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosal biopsies. *J Infect.* Sep 1997;35(2):149-154.
27. Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G. *Manual of Clinical Microbiology.* Vol 1. 11th ed. Washington, DC: ASM Press; 2015.
28. Kalach N, Gosset P, Dehecq E, et al. Usefulness of Gastric Biopsy-Based Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* Sep 2015;61(3):307-312.
29. Duś I, Dobosz T, Manzin A, Loi G, Serra C, Radwan-Oczko M. Role of PCR in *Helicobacter pylori* diagnostics and research--new approaches for study of coccoid and spiral forms of the bacteria. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013;67:261-268.
30. Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol.* 2013;943:279-287.
31. Mégraud F, Bénégat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. Molecular Approaches to Identify *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance. *Gastroenterol Clin North Am.* Sep 2015;44(3):577-596.
32. Agudo S, Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, López-Brea M. Detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance in gastric biopsies of pediatric patients by using a commercially available real-time polymerase chain reaction after NucliSens semiautomated DNA extraction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Jul 2010;67(3):213-219.
33. Glocker E, Berning M, Gerrits MM, Kusters JG, Kist M. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* Aug 2005;49(8):3166-3170.
34. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, Rüssmann H. Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClariRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *J Clin Microbiol.* Jun 2007;45(6):1718-1722.
35. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* Oct 2004;42(10):4512-4518.
36. Bessetti J. An introduction to PCR inhibitors: Promega Corporation; 2007.
37. Liu Q, Qi D, Kang J, et al. Efficacy of real-time PCR-based detection of *Helicobacter pylori* infection and genotypic resistance-guided quadruple therapy as the first-line treatment for functional dyspepsia with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Mar 2015;27(3):221-225.
38. Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Souod N. Real-time PCR for *Helicobacter pylori* quantification and detection of clarithromycin resistance in gastric tissue from patients with gastrointestinal disorders. *Res Microbiol.* Feb 2012;163(2):109-113.
39. Miendje Deyi VY, Burette A, Bentatou Z, et al. Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Aug 2011;70(4):557-560.
40. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, et al. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* Nov 2009;47(11):3600-3607.
41. Lee JH, Shin JH, Roe IH, et al. Impact of clarithromycin resistance on eradication of *Helicobacter pylori* in infected adults. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr 2005;49(4):1600-1603.
42. Tanih NF, Ndip RN. Molecular Detection of Antibiotic Resistance in South African Isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Res Pract.* 2013;2013:259457.
43. De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, et al. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother.* Feb 2010;65(2):327-332.
44. Venerito M, Krieger T, Ecker T, Leandro G, Malfertheiner P. Meta-analysis of bismuth quadruple therapy versus clarithromycin triple therapy for empiric primary treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Digestion.* 2013;88(1):33-45.
45. 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).* Feb 2016;95(7):e2750.

46. Laine L, Hunt R, El-Zimaity H, Nguyen B, Osato M, Spénard J. Bismuth-based quadruple therapy using a single capsule of bismuth biskalcitrate, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus omeprazole, amoxicillin, and clarithromycin for eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients: a prospective, randomized, multicenter, North American trial. *Am J Gastroenterol*. Mar 2003;98(3):562-567.
47. Murakami K, Sato R, Okimoto T, et al. Efficacy of triple therapy comprising rabeprazole, amoxicillin and metronidazole for second-line *Helicobacter pylori* eradication in Japan, and the influence of metronidazole resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. Jan 2003;17(1):119-123.
48. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. Aug 2007;26(3):343-357.
49. Liou JM, Bair MJ, Chen CC, et al. Levofloxacin Sequential Therapy vs Levofloxacin Triple Therapy in the Second-Line Treatment of *Helicobacter pylori*: A Randomized Trial. *Am J Gastroenterol*. Feb 2016.
50. Lee HJ, Kim JI, Cheung DY, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* according to 23S ribosomal RNA point mutations associated with clarithromycin resistance. *J Infect Dis*. Oct 2013;208(7):1123-1130.
51. Sugimoto M, Uotani T, Sahara S, et al. Efficacy of tailored *Helicobacter pylori* eradication treatment based on clarithromycin susceptibility and maintenance of acid secretion. *Helicobacter*. Aug 2014;19(4):312-318.
52. Liou JM, Chang CY, Sheng WH, et al. Genotypic resistance in *Helicobacter pylori* strains correlates with susceptibility test and treatment outcomes after levofloxacin- and clarithromycin-based therapies. *Antimicrob Agents Chemother*. Mar 2011;55(3):1123-1129.

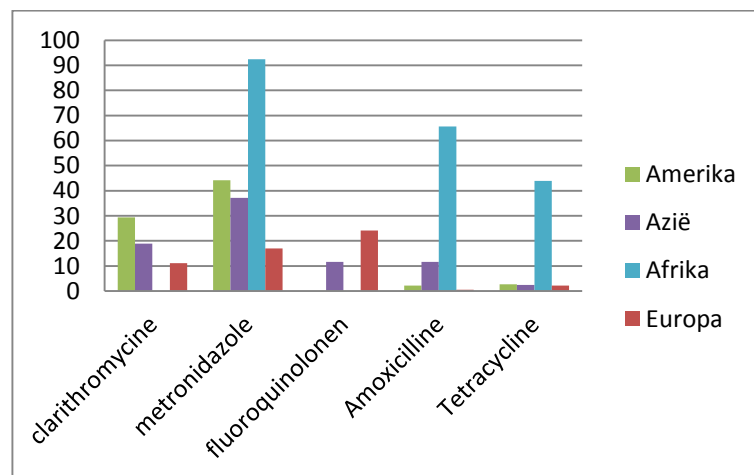
I. INLEIDING

I.1 HP prevalentie en resistentiecijfers

Een derde tot de helft van de populatie in geïndustrialiseerde landen test positief voor *H. pylori*. Toch lijkt het probleem van HP infectie-en resistentie nog groter te zijn in ontwikkelingslanden waar tot 80% van de populatie drager is van deze kiem.¹ De prevalentie en gevoeligheid van HP is dus sterk regio-gebonden en wordt beïnvloed door de socio-economische status van de populatie. Het is belangrijk kennis te hebben van deze geografische verschillen gezien behandel-schema's best worden aangepast aan de gekende prevalentie en resistentie in een bepaald gebied. Zo wordt er in China een HP prevalentie van 83.4% beschreven terwijl dit in de USA rond 30% ligt.⁷ Binnen Europa is de HP prevalentie groter in Zuid-Europa (60.3% in Spanje) dan in de Scandinavische landen (11% in Zweden).⁷ De resistentiegraad van HP in een bepaalde regio lijkt hand in hand te gaan met de prevalentie van deze kiem in de regio en het antibioticaverbruik.⁷ Hoe dan ook is in alle werelddelen een duidelijke stijgende trend aanwezig in zowel clarithromycine-, metronidazole- als levofloxacineresistentie (figuur 1). Figuur 2 toont de aanwezigheid van antibioticaresistentie in de verschillende werelddelen waarbij de hoge metronidazoleresistentie in Afrika erg opvallend is (>90%). Dit wordt mogelijks verklaard door het hoge metronidazolegebruik voor parasitaire infecties (vb. giardiasis, amoebiasis).^{8,9} Ook de resistentie aan andere antibiotica (amoxicilline, tetracycline) lijkt in Afrika veel hoger te liggen. Er dient wel vermeld te worden dat hier ook sprake is van publicatiebias gezien er slechts een beperkt aantal studies werden geïnccludeerd (m.b. 2 publicaties uit Senegal en Kameroen).



Figuur 1: evolutie van clarithromycine- (a), metronidazole-(b) en levofloxacin (c) resistentie wereldwijd (grijze band: drempelwaarde voor aanpassing therapie) (Thung et al.)⁷



Figuur 2: HP resistentie wereldwijd van 1993-2009 (De Francesco et al.)⁸

Cijfers uit Europa komen van een grote multicentrische studie uitgevoerd in 2008-2009 met 2204 volwassen patiënten uit 18 verschillende landen. Hieruit bleek de resistentiegraad voor clarithromycine, metronidazole en levofloxacin respectievelijk 17.5%, 34.9% en 14.1% te bedragen met een significant verschil tussen West-/ Zuid-Europa en Noord-Europa voor clarithro- en levofloxacineresistentie.¹⁰

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

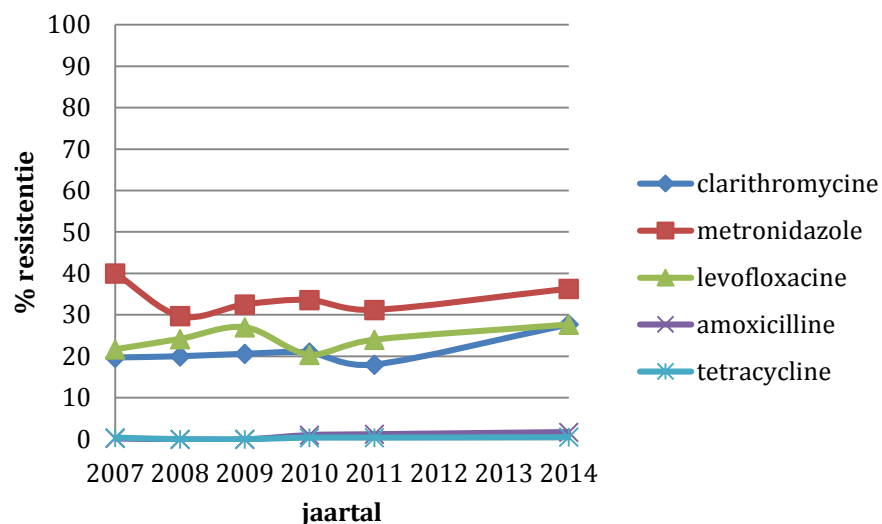
Tabel 2: HP resistentie Europa van 2008-2009 (Mégraud et al.)¹⁰

Er is met andere woorden een belangrijk verschil tussen Zuid-en Noord-Europa naar de aanpak van HP-infectie waardoor antibioticascema's dienen te worden aangepast in functie van de graad van resistentie.²

In België worden de HP prevalentie-en resistentiecijfers jaarlijks opgevolgd door het nationaal referentiecentrum voor *Helicobacter pylori*, CHU UCL, Mont-Godinne. Zij bestuderen HP-stammen uit verschillende centra verspreid over het gehele land. In 2011 beschreven zij een jaarlijkse prevalentie van HP van 16.5%, hetwelk in lijn ligt van de percentages van de voorgaande jaren (15-20%). De primaire resistenties (d.i. zonder voorafgaandelijke specifieke behandeling voor HP) op klinische isolaten bij patiënten uit verschillende centra waar endoscopie werd uitgevoerd van 2007 t.e.m. 2011 zijn weergegeven in tabel 3 en figuur 3.^{11,12} De resistentiecijfers van 2014 worden hier nog aan toegevoegd. In 2014 ziet men immers een drastische stijging in het resistentiepercentage voor clarithromycine.

	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

Tabel 3: evolutie van de primaire resistentiepercentages van HP tegen antibiotica in België (uit: Sanford guide to antimicrobial therapy; rapport *H.pylori* UCL, Mont-Godinne)^{11,12}



Figuur 3: grafische voorstelling van de evolutie van de primaire resistentiepercentages van HP tegen antibiotica in België
(uit: Sanford guide to antimicrobial therapy; rapport *H. pylori* UCL, Mont-Godinne)^{11,12}

De primaire resistentie van HP tegen antibiotica in België treft hoofdzakelijk metronidazole, clarithromycine (kruisresistentie met alle macroliden) en levofloxacin (kruisresistentie tegenover alle fluoroquinolonen). Resistentie tegen penicillines en tetracyclines is heel zeldzaam ($\leq 1\%$).⁹ Er wordt in 2011 geen significant verschil in resistentie gevonden tussen de verschillende geslachten voor clarithromycine en levofloxacin maar wel voor metronidazole, waarbij vrouwen een hoger resistentiepercentage vertonen, vermoedelijk door het verhoogd verbruik van metronidazole voor geslachtsinfecties (vb. *Trichomonas vaginalis*). In België schommelt de clarithromycineresistentie rond de 15-20%, de cut-off die de Maastricht guidelines hanteren om eerstelijns therapie aan te passen.⁴

1.2 Resistentiemechanismen

1.2.1 Resistentie aan macroliden

Clarithromycine is een bacteriostatisch antibioticum dat inwerkt op de eiwitsynthese van bacteriën door de binding aan het 23S ribosomaal RNA. Het is het meest gebruikte antibioticum voor HP-eradicatie daar het zeer stabiel is in zuur milieu. Resistentie aan clarithromycine gebeurt in $>90\%$ van de gevallen door puntmutaties die optreden in het 23S rRNA gen met verminderde affiniteit voor het antibioticum tot gevolg of door de aanwezigheid van effluxpompen. De meest voorkomende mutatie is A2143G (69.8%), gevolgd door A2142G (11.7%) en A2142C (2.6%).⁷ De fenotypische laagste eradicatiegraad (30.7%) ziet men bij mutatie A2143G. Andere mutaties worden beschreven maar hun rol in clarithromycineresistentie is thans nog onduidelijk en ook resistentie via effluxmechanismen kan voorkomen, wat men niet kan opsporen via moleculaire methoden.¹³ Kruisresistentie met andere macrolidenantibiotica is bekend. Het voorafgaand gebruik van macrolidenantibiotica is de belangrijkste risicofactor tot het ontwikkelen van clarithromycineresistentie.¹⁴

1.2.2 Resistentie aan fluoroquinolonen

Fluoroquinolonen verstoren de bacteriële DNA-synthese door te binden aan het DNA gyrase en topoisomerase met een bactericide effect tot gevolg. Mutaties in de genen (*gyrA* en *gyrB*) die coderen voor dit gyrase zijn verantwoordelijk voor resistentie van HP tegen

fluoroquinolonen. Mutaties in *gyrA* zijn het meest voorkomend (83.8%) t.o.v. mutaties in *gyrB* (4.4%). In *gyrA* worden 11 mutaties beschreven maar deze in codon 87 en 91 zijn de meest voorkomende.¹³ Tevens lijken bepaalde mutaties geassocieerd te zijn met bepaalde geografische gebieden en met een bepaalde graad van resistentie: zo lijken mutaties in codon87 gepaard te gaan met een hogere graad aan resistentie. Resistente HP-stammen zonder mutaties in *gyrA* of *gyrB* bestaan waarbij het mechanisme nog onduidelijk is. Er is kruisresistentie tussen levofloxacin, ciprofloxacin en moxifloxacin. De invloed van het voorafgaand gebruik van fluoroquinolonen op het voorkomen van resistentie is nog niet duidelijk. Sommige studies tonen een duidelijk verband maar er lijken nog andere, voorlopig onopgehelderde mechanismen een rol te spelen in fluoroquinoloneresistentie.^{15,16} Hoedanook wordt er geadviseerd eerst een gevoeligheidsbepaling uit te voeren vooraleer therapie met fluoroquinolonen wordt opgestart.

1.2.3 Resistentie aan metronidazole

Er zijn reeds 4 mechanismen beschreven die een rol spelen in resistentie aan metronidazole, een antibioticum dat bactericide werkt door de inhibitie van de aanmaak van nucleïnezuuren: verhoogde activiteit van DNA herstelenzymes, verminderde opname of verhoogde efflux van het antibioticum en verminderde activiteit van nitroreductase, een enzyme noodzakelijk voor de omzetting van de pro-drug naar het actief product. Genen die gelinkt zijn aan metronidazoleresistentie zijn *rdxA*, *frxA* en *fdxB*, dewelke allen een rol spelen in de werking van nitroreductase.¹³ Voorafgaand metronidazolegebruik is een bewezen risicofactor voor het ontwikkelen van resistentie.⁷

1.2.4 Resistentie aan amoxicilline

In tegenstelling tot andere gramnegatieve bacteriën, is resistentie aan amoxicilline bij HP wellicht niet te wijten aan de productie van een bèta-lactamase.¹³ Wel worden er mutaties in 3 genen die coderen voor penicilline-bindende proteïnen (PBP's) beschreven. Een mutatie enkel in het *pbp-1A* is geassocieerd met een laaggradige resistentie aan amoxicilline maar simultane mutaties in *pbp1A*, *pbp 2* en *pbp 3* leiden tot een hooggradige resistentie.¹³ Gezien de beschrijving van ook andere genen betrokken in de resistentie, zoals *hopC*, *hopH* en *hefC*, is het duidelijk dat amoxicillineresistentie een complex en multifactorieel maar gelukkig zeldzaam proces is.

1.2.5 Resistentie aan tetracyclines

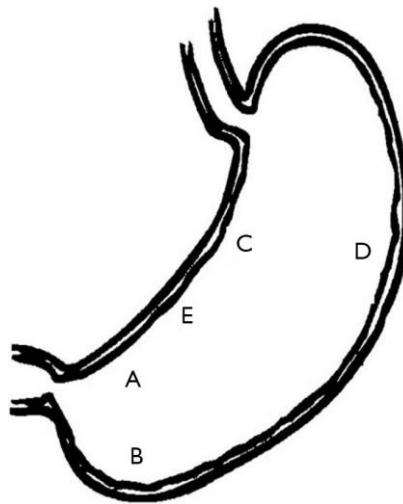
Tetracyclineresistentie is eerder zeldzaam en wordt veroorzaakt door veranderingen in het 16S rRNA (*tet-p* locus) wat leidt tot een verminderde affiniteit voor het antibioticum. Een triplet-mutatie is geassocieerd met een hogere resistentiegraad. Ook andere factoren beïnvloeden tetracyclineresistentie en er bestaat kruisresistentie tussen amoxicilline en de tetracyclines.¹³

Lawson et al. vond op 1006 isolaten in de Britse populatie slechts 3 (0,2%) fenotypisch tetracyclineresistente stammen en 18 (1,8%) met een verminderde gevoeligheid. Bij 10 van deze 18 isolaten werden mutaties in het 16S rRNA teruggevonden (A926G, A928C, A926C, A926T/A928C).¹⁷

1.3 Invasieve diagnostiek van HP en methoden voor gevoeligheidsbepaling

1.3.1 Histopathologie

De gouden standaard in de diagnose van HP-gastritis is het aantonen van deze bacterie op maagbiopten. Dit kan via kweek maar gezien de omslachtigheid en lange turn-around-time (TAT) van deze methode (zie verder) wordt HP-infectie in de meeste ziekenhuizen aangetoond via immunohistochemische kleuringen op maagbiopten, gefixeerd in formaldehyde. *Staalafname en transport:* De beste locatie voor het aantreffen van HP is t.h.v. de kleine curvatuur aan het antrum van de maag. Het Sydney System raadt zelfs het nemen van 5 biopten aan: t.h.v. de kleine en grote curvatuur van antrum en corpus en t.h.v. de incisura, echter een biopst t.h.v. de incisura biedt het minst toegevoegde waarde (figuur 4).^{3,18-20} De gevoeligheid van de methode verhoogt evenredig met het aantal biopten dat er kunnen genomen worden gezien HP zich niet op elke locatie in de maag in dezelfde hoeveelheid bevindt.



Figuur 4: optimale locaties voor het nemen van maagbiopten voor HP. A. kleine curvatuur antrum; B. grote curvatuur antrum; C. kleine curvatuur corpus; D. grote curvatuur corpus; E. incisura angularis (uit: Lee et al.)²⁰

Biopten worden onmiddellijk na afname gefixeerd in 10% formaldehyde waardoor de typische spiraalvormige morfologie van de bacterie behouden blijft. Transport kan gebeuren op kamertemperatuur maar het staal dient binnen één week verder behandeld te worden.²¹

Kleuringen Er zijn reeds verscheidene kleuringen onder de loep genomen om HP in maagweefsel te visualiseren maar de immunohistochemische kleuringen worden aangenomen als zijnde het meest sensitief en specifiek en kennen ook een lagere inter-observatie variabiliteit.²² Bij gebrek aan immunohistochemische kleuringen, krijgt de Giemsa kleuring de voorkeur. In het Imeldaziekenhuis te Bonheiden, gebeurt immunohistochemische kleuring met het specifiek HP antilichaam van Dako (Glostrup, Denmark).

Performantie De performantie van histopathologische diagnose voor HP is wisselend en sterk afhankelijk van de juiste omstandigheden. Zoals reeds aangehaald verhoogt de gevoeligheid van de methode met het aantal biopten dat kan worden afgenomen. Een bijkomend voordeel van histopathologie is dat de beoordeling van inflammatie t.h.v. de maagmucosa mee in rekening kan gebracht worden voor diagnose. Proton-pomp inhibitoren (PPI) dienen 2 weken voor staalname gestopt te worden gezien deze de bacteriële densiteit in zowel antrum als corpus sterk verlagen en ook gebruik van antibiotica heeft een negatieve invloed op de bacteriële load.^{21,23} Aanwezigheid van niet-pylori helicobacters kan tot misdiagnose lijden en ook het gebruik van antibiotica of PPI's kan de morfologie van HP veranderen van het typische spiraalvormig uitzicht naar een eerder coccoïde vorm.²⁴ Een gekend probleem van diagnose

via histopathologie is de grote inter-observatie variabiliteit: Cohen's kappawaarden variëren van 0.69 tot 0.74 in geval van haematoxyline/eosinekleuring en Giemsa kleuring.²⁵ De beste inter-observatie variabiliteit kon gevonden worden bij immunohistochemie.²⁶ De expertise van de patholoog is dus een onontbeerlijke parameter die de gevoeligheid van de test bepaalt. Sensitiviteit en specificiteit van histopathologie worden dus sterk beïnvloed door externe factoren en variëren van resp. 84-95% en 90-95%.²¹

Turn-around-time: 1-2 dagen

De dienst pathologie van het Imeldaziekenhuis in Bonheiden krijgt jaarlijks zo'n 2400 aanvragen voor HP te verwerken. De positiviteitsratio van 2013, 2014 en 2015 bedroeg resp. +/- 10.8%, 19.5% en 11.7% (tabel 4) wat in lijn ligt van de prevalentie van HP die beschreven wordt in België (15-20%).¹¹

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

Tabel 4: immuunhistochemische kleuringen voor HP, Imeldaziekenhuis, Bonheiden

I.3.2 Cultuur

Cultuur van HP wordt meestal niet standaard uitgevoerd voor de diagnosestelling van HP-gastritis. Het vindt zijn nut eerder in tweede lijn na het falen van een eerste eradicaatiepoging waarbij men de gevoeligheid van HP aan bepaalde antibiotica wilt kennen.

Staalafname en transport Het succes van de kweek van HP is afhankelijk van verscheidene factoren waaronder het tijdig stopzetten van antibiotica of PPI's (minimaal 2 weken), het nemen van bipten op de juiste locatie, het vermijden van contaminatie tijdens biopsienamen en het transport van de kiem onder de juiste omstandigheden. HP is immers zeer gevoelig aan uitdroging en temperatuurschommelingen waardoor bipten zo snel mogelijk in de juiste transportmedia dienen gebracht te worden. Voorbeelden van zulke media zijn Portagerm pylori (bioMérieux), Brucella medium met 20% glycerol of een in house medium bestaande uit brain heart infusion broth (3.5%), gist extract (2.5%), steriel paardenserum (5%) en HP selectief supplement.²⁷ Bipten voor kweek worden best ook afgenomen vóór bipten die worden gefixeerd in formaldehyde om een toxisch effect van deze chemische stof te vermijden. Zoals voor histopathologie, verhoogt de opbrengst van de kweek door meerdere bipten af te nemen.

Kweek en gevoeligheidsbepaling HP dient op zowel een selectieve- (vb. Helicobacteragar (BD)) als een niet-selectieve bodem, in microaërofiële omstandigheden en op 35-37°C gekweekt te worden.^{21,27} HP is gekenmerkt door een relatief trage groei waardoor bodems tot 10 dagen geïncubeerd dienen te worden vooraleer de kweek als negatief mag worden doorgegeven. Na 5 dagen incubatie wordt er een eerste maal gecontroleerd op groei. Indien afwezigheid van groei, worden de platen voor een volgende 5 dagen geïncubeerd. Gevoeligheidsbepaling van HP gebeurt via de E-test methode (MIC-bepaling; bioMérieux) volgens The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) richtlijnen op een Mueller-Hintonagar verrijkt met schapebloed. CLSI stelt breekpunten ter beschikking enkel voor clarithromycine terwijl

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing) breekpunten voorziet zowel voor clarithromycine als voor amoxicilline, levofloxacin, tetracycline, metronidazole en rifampicine.

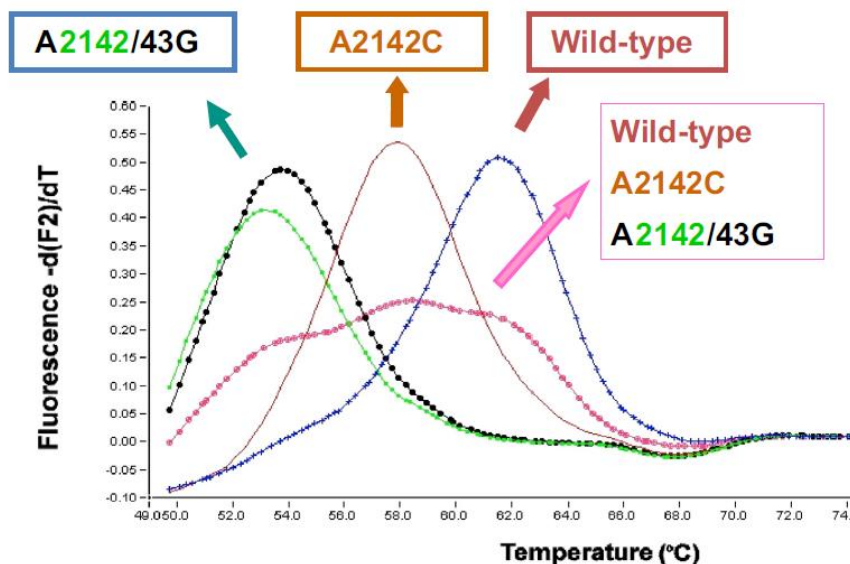
Performantie De opbrengst van kweek is afhankelijk van diverse externe factoren. Actieve gastritis, lage bacteriële load, bloeding, alcohol en het gebruik van PPI's en antibiotica hebben een negatieve invloed op de positiviteitsratio maar in optimale omstandigheden heeft cultuur op biopsiespecimens een sensitiviteit van meer dan 90% en een specificiteit van 100%. Echter in de praktijk ligt de gevoeligheid doorgaans lager (55-73%), gezien de slechte overleving van HP in niet-optimale omstandigheden.²⁴

Turn-around time 5-10 dagen voor kweek, 10-14 dagen voor gevoeligheidsbepaling

1.3.3 moleculaire methoden

Polymerase ketting reactie (PCR) is een veelbelovende methode voor het opsporen van HP daar het zowel de bacterie als eventuele antibioticaresistentiegenen kan detecteren. Sensitiviteit en specificiteit van meer dan 95% wordt beschreven en de techniek zou accurater zijn in het detecteren van HP tijdens actieve maagbloeding.²³ De genen die als 'target' voor HP detectie kunnen gebruikt worden zijn *ureA*, *ureC*, *Hsp60*, *VacA* of het 16S rRNA en 23S rRNA.²⁴ PCR heeft als voordeel dat een laag aantal bacteriën kan opgepikt worden (< 10 kopijen/ml), het is een snelle, eenvoudige techniek en wordt minder negatief beïnvloed door verminderde transportcondities.²⁸ Tevens kan PCR zowel spiraalvormige als coccoïde vormen van HP oppikken. De coccoïde vorm ontstaat onder invloed van antibiotica en wordt vaak gemist op histopathologisch onderzoek.²⁹ In de laatste jaren zijn veel protocols ontwikkeld voor het opsporen van HP en enkele resistentiemutaties m.b.v. PCR.

Er zijn verscheidene in-house protocols voor conventionele PCR en nested PCR terug te vinden in de literatuur maar sinds de ontwikkeling van real-time PCR geniet deze laatste methode de voorkeur.³⁰ Real-time PCR is snel, sensitief en heeft een lager risico op contaminatie gezien amplificatie en detectie in eenzelfde stap kan worden uitgevoerd.^{31,32} Voor detectie van HP en antibioticaresistentiemutaties is FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) real-time PCR met smeltcurve analyse de meest gebruikte methode. Amplificatie gebeurt door de binding van specifieke primers aan een geconserveerde regio van HP en/of aan bepaalde genen waarin resistentiemutaties voorkomen. Detectie gebeurt via binding van een kleurstof (vb. SYBR Green) of na hybridisatie van een probe (vb. TaqManprobe), gebonden aan een fluorochroom. Een smeltcurveanalyse heeft als bijkomend voordeel dat een heterogene populatie (d.i. met zowel gemuteerde als wild-type stammen) gedetecteerd kan worden.³¹ Het principe berust op het feit dat bij een DNA-mismatch de temperatuur waarop 2 DNA-strengen dissociëren lager is dan bij het wild-type. Verschillende mutaties zullen dan ook een verschillende smelttemperatuur hebben en zo kan men stammen met verschillende mutaties uit eenzelfde staal oppikken (figuur 5).



Figuur 5 Voorbeeld van detectie van clarithromycineresistentie via real-time PCR met een biprobe. Verschillende smelttemperaturen laten detectie van verschillende mutaties toe (Mégraud et al.)³¹

Naast in-house protocols voor real-time PCR, zijn er ook reeds verschillende commerciële kits beschikbaar die HP en clarithromycine en/of fluoroquinolonenresistentie simultaan kunnen opsporen. Voorbeelden van zulke commerciële kits zijn MutaREAL *H. pylori* (Immundiagnostik - Bensheim, Duitsland), ClariRes™ real-time PCR (Ingenetix - Wenen, Oostenrijk), RIDA®GENE (r-Biopharm – Darmstadt, Duitsland; verdeeld in België door apDIA, Turnhout) en GenoType® HelicoDR (Hain, Lifescience – Nehren, Duitsland, verdeeld door EMELCA bioscience, Antwerpen). Al deze testen zijn CE-IVD gelabeld maar nog geen enkele is FDA-goedgekeurd (tabel 5).

De meeste commerciële kits detecteren enkel clarithromycine en/of fluoroquinolonenresistentie. Metronidazoleresistentie berust op zeer veel potentiële mutaties of kan gebeuren via effluxmechanismen waardoor het ontwikkelen van moleculaire methoden complex is en achterwege blijft.³¹ Tevens blijkt de klinische impact van HP die resistent is aan metronidazole minder groot (zie verder). Resistentie aan amoxicilline en tetracycline is zeldzaam hoewel er voor deze laatste wel in-house real-time PCR testen werden ontworpen.^{17,33}

RIDA®GENE (r-biopharm, ApDia) is een gloednieuwe kit voor real-time PCR die sinds september 2015 op de markt is. Deze kit gebruikt HP- specifieke probes die binden aan het 16S en 23S rRNA en spoort resistentiemutaties in dit 23S rRNA op die geassocieerd zijn aan clarithromycineresistentie. Via een TaqManprobe wordt er een fluorescent signaal uitgezonden en detectie hiervan toont de aanwezigheid van HP met of zonder clarithromycineresistentiemutaties.

MutaREAL *H. pylori* (Immundiagnostik) en **ClariRes™** (Ingenetix) maken beiden gebruik van smeltcurveanalyse voor het opsporen van clarithromycineresistentie. Dit biedt als voordeel dat heteroresistente populaties kunnen worden opgepikt. Beide testen zijn eveneens gevalideerd voor stoelgangsstalen maar de gevoeligheid voor detectie van HP blijkt hier duidelijk lager (+/- 63%).³⁴

Er is daarentegen een recente kit **Amplidiag** (Mobidiag) waarbij detectie en gevoeligheidsbepaling van HP op stoelgangsstalen wel kan uitgevoerd worden met een hogere gevoeligheid (91.4% voor HP en 100% voor clarithromycineresistentie)

GenoType® HelicoDR (Hain, Lifescience; EMELCA bioscience) combineert PCR en hybridisatie. Na de PCR reactie wordt het DNA gehybridiseerd op strips gecoat met verschillende oligonucleotiden die verschillende mutaties bevatten. Het detecteert HP a.d.h.v. zijn geconserveerde regio in het 23S rRNA en spoort resistentiemutaties op voor zowel clarithromycine (mutaties in 23S-rRNA) als fluoroquinolonen (mutaties in het *gyrA* gen). Deze test is technisch complexer dan de andere 3 gezien ze minder geautomatiseerd is. Een bijkomend nadeel is dat steeds visuele interpretatie nodig is waardoor zwakke bandjes mogelijk gemist worden.³¹ Het contaminatierisico is tevens hoger dan voor real-time PCR gezien er meerdere stappen nodig zijn. GenoType® HelicoDR wordt in België onder andere gebruikt door het referentielaboratorium voor HP nl. CHU UCL, Mont-Godinne.

PCR-gebaseerde methoden laten naast detectie van HP en resistentiemutaties ook toe virulentiefactoren van HP aan te tonen, zoals het *CagA* en *VacA*-gen. Deze zijn geassocieerd met ernstigere inflammatie en een hoger risico op peptisch ulcuslijden en maagkanker.²³ Deze zijn echter (nog) niet opgenomen in de commerciële kits. Tevens is het ook een interessante methode voor epidemiologisch onderzoek vb. het aantonen van HP in drinkwater dewelke meer informatie kan bieden over de transmissie van HP.²³

De kostprijs van de commerciële PCR methoden schommelt tussen 14 en 30 euro per test waarbij GenoType® HelicoDR de duurste is. Bij deze laatste dient echter ook het Taq-polymerase te worden aangekocht wat de prijs nog doet stijgen. Moleculaire testen voor HP worden niet terugbetaald. Ter vergelijking: gevoeligheidsbepaling via kweek van 1 maagbiopt kost ruimgeschat +/- 45 euro, hierbij worden echter wel 5 antibiotica getest. Prijsberekeningen zijn exclusief personeelskosten, reagentiakosten e.d.

Er zijn verschillende factoren van belang bij het kiezen van een moleculaire test voor HP zoals de kostprijs, de expertise van laboratoria met moleculaire testen, de aanwezigheid van de juiste PCR toestellen en de performantie van de test. Zowel de analytische als de diagnostische performantie van PCR-gebaseerde methoden in het algemeen en specifiek voor deze commerciële kits worden hieronder besproken.

*In het Imeldaziekenhuis te Bonheiden werd **RIDA®GENE** (r-Biopharm) bekeken ter validatie van de test op verse maagbiopten. Deze biopten worden verwerkt vanuit het Portagerm transportmedium (bioMérieux). De firma heeft echter geen informatie ter beschikking wat de invloed is van dit medium op het resultaat van de PCR reactie. Deze studie is lopende en resultaten zullen volgen.*

2. ANALYTISCHE PERFORMANTIE

2.1 Pre-analytische factoren

2.1.1 Biologische variatie

HP is een pathogeen van het gastro-intestinaal stelsel. HP kan op verschillende gebieden in de maag in verschillende hoeveelheden voorkomen. In de meerderheid van de patiënten bevindt de kiem zich t.h.v. het antrum én het corpus (80%). Echter in sommige gevallen bevindt de kiem zich enkel in het antrum (8%) of enkel in de corpus (10%). In het begin van de infectie ziet men een antrale dominantie met slechts minimale corpusbezetting. Echter naarmate de infectie vordert, treedt er atrofie met intestinale metaplasie op waardoor de bacterie meer naar het maagcorpus migreert. De detectiegraad stijgt dus evenredig met het aantal bipten dat er kan genomen worden.²³ In de huidige richtlijnen wordt er aangeraden 2 bipten t.h.v. het antrum en 2 t.h.v. de corpus te nemen voor detectie van HP. PPI's en antibiotica doen de bacteriële load sterk verminderen en dienen minstens 2 weken vóór biopsienamen gestopt te worden.

2.1.2 Interferentie

Het gebruik van PPI's en antibiotica doen de bacteriële load sterk verminderen en dienen minstens 2 weken vóór biopsienamen gestopt te worden. Een zwak PCR-sigitaal kan dus hieraan te wijten zijn. Vals positieve resultaten kunnen voorkomen door aanwezigheid van niet-pylori helicobacters (*H. fennelliae*, *H. heilmanii*, *H. acinonychis*, *H. cetorum*) of door contaminatie tijdens collectie of verwerking van de stalen.²⁴ Vals positiviteit door niet-pylori helicobacters is voornamelijk een probleem wanneer 23S rRNA als target voor detectie wordt gebruikt. Bij *ureA* zag men dit probleem niet.³⁵ Vals negativiteit van de PCR reactie kan bij een lage bacteriële load van het staal en door aanwezigheid van PCR-inhibitoren zoals weefselcomponenten (collageen).^{24,36}

2.1.3 Staalstabiliteit

Het is geweten dat de overleving van HP zeer beperkt is in 'gewoon' milieu (d.i. niet op de juiste temperatuur, niet in microaërofiële omgeving...). In fysiologisch water zou de bacterie slechts 2u overleven.²⁷ Dit is uiteraard vooral van belang indien de bacterie gekweekt dient te worden. Voor PCR zouden deze ideale transport-en bewaarcondities minder van belang zijn, wat een belangrijk voordeel is.²⁴ Er is in de literatuur echter niet veel te vinden over hoelang een maagbiopt op kamertemperatuur kan bewaard worden voor moleculaire analyses. De meeste publicaties ter validatie van moleculaire detectie van HP vriezen verse bipten onmiddellijk in en ook de bijsluiters van de beschreven testen geven geen specificaties over de staalstabiliteit.

De meeste testen voor detectie van HP zijn gevalideerd op verse bipten die onmiddellijk werden ingevroren of via bipten getransporteerd in fysiologisch water.³² Echter, een grote studie in 2004 ontwikkelde een real-time PCR assay en valideerde deze test op 92 maagbipten die getransporteerd werden in Portagerm Pylori transport medium (bioMérieux).³⁵ De PCR assay ClariResTM (Ingenetix) is gebaseerd op deze studie. In sommige studies wordt real-time PCR uitgevoerd op formaldehyde-gefixeerd paraffine-ingebed materiaal.³⁷ Dit kan echter enkel indien korte amplicons gebruikt worden gezien DNA door het fixativa kan worden afgebroken.³¹

2.2 Analytische factoren

2.2.1 Precisie (herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid), detectielimiet (LOD), accuraatheid

Wat betreft precisie, LOD en accuraatheid is er in de bijsluiters van de beschreven testen en in de literatuur zeer weinig informatie te vinden.

Schabereiter-Gurtner et al. beschreef voor hun PCR assay (dewelke waarop ClariRes™ gebaseerd is) een concentratie van 4 fg puur HP DNA per PCR reactie als zijnde de laagste concentratie waarbij steeds een positief resultaat werd bekomen. De LOD van RIDA®GENE (r-biopharm) zou 10 kopijen HP DNA/PCR reactie zijn.

Volgens een studie uit 2005 zou de concentratie van HP in maagbiopten bij symptomatische patiënten 10^4 - 10^{12} CFU/mL zijn.³⁸ Het is dus belangrijk om minimaal deze concentraties bij patiënten op te pikken via PCR.

2.3 Kwaliteitsfactoren

2.3.1 Negatieve, positieve en interne controle

RIDA®GENE, MutaREAL® en ClariRes™ RT-PCRleveren hun eigen kitcontroles. Als negatieve controle gebruiken zij alledrie zuiver water. MutaREAL® en ClariRes™ RT-PCRnemen 2 positieve controles mee in hun PCR-reactie: één wild-type HP en één mutant (clarithromycineresistent). RIDA®GENE voorziet enkel een mutant genotype. Een interne controle volgt het volledige proces van extractie en PCR waardoor mogelijke matrixeffecten kunnen worden opgepikt. Deze ontbreekt bij MutaREAL®. Agudo et al. gebruikte in hun studie waarbij deze test gebruikt werd, humaan β -globine amplificatie ter controle van de extractie.³² Bij GenoType® HelicoDR bevat elke strip 4 controlezones: een conjugatiecontrole ter controle van binding van het conjugaat aan de strip, een amplificatiecontrole dewelke nagaat of de amplificatie gelukt is en een *gyrA* en 23S locus controle.

2.3.3 Interne en externe kwaliteitscontrole (IQC en EQC)

Als interne controle is er een ATCC stam beschikbaar nl. ATCC® 43504™. Deze HP is gevoelig aan clarithromycine en resistent aan metronidazole. Hiernaast zijn ook stammen beschikbaar van de Göteborg collectie (CCUG 38770, CCUG 38771 en CCUG 38772) ('culture collection university of gothenburg', Zweden) met verschillende resistentieprofielen:

CCUG 38770: clarithromycine gevoelig-intermediair, metronidazole resistent

CCUG 38771: clarithromycine gevoelig, metronidazole gevoelig

CCUG 38772: clarithromycine resistent, metronidazole intermediair-resistent

Als externe kwaliteitscontrole is QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics; Glasgow, VK) anno 2016 een pilootstudie gestart voor moleculaire detectie van HP (prijs: 345 euro voor 5-10 panels) en ook Instand (Düsseldorf, Duitsland) levert EQC materiaal (prijs: 159 euro voor 4 stalen)

	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)
verdelers België	apDIA (Turnhout)	/	/	EMELCA Bioscience (Antwerpen)
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	23SrRNA	23S rRNA)	23S rRNA	23S RNA
fluoroquinolonen- resistentie	-	-	-	<i>gyrA</i>
Toestel	LightCycler 480 (Roche) SmartCycler (Cepheid) ABI 7500 (Applied Biosystems) m2000rt (Abbott) Mx3005P (Agilent Technologies) Rotor-Gene Q (Qiagen) CFX96 (Bio-Rad)	LightCycler 1.5, 2.0 (Roche)	LightCycler 1.1/1.2/1.5/2.0 (Roche)	Conventioneel PCR toestel Incubator GT-Blot 48
LOD	>= 10 DNA kopijen per reactie		LOD 95%: 5 fg HP DNA/PCR (3 CFU)	
Controle	interne controle negatieve controle positieve controle (mutant)	negatieve controle 2 positieve controles (wild-type, mutant)	interne controle negatieve controle 2 positieve controles (wild-type, mutant)	conjugatie controle amplificatie controle 2 locus controles (<i>gyrA</i> , 23S)
CE-IVD	+	+	+	+
FDA	-	-	-	-
Detectie van heteroresistentie?	?	Ja	ja	ja
Aantal testen/kit	100	32/96	50	12/96
Opmerkingen			LCTM-FastStart DNA Master SYBR® Green I (Roche) niet inbegrepen	Hot Star Taq polymerase (Qiagen) niet inbegrepen

Tabel 5: belangrijkste kenmerken van enkele commerciële kits voor PCR HP

3. DIAGNOSTISCHE PERFORMANTIE

3.1 Sensitiviteit, specificiteit, positieve predictieve waarde (PPV) en negatieve predictieve waarde (NPV)

De laatste jaren zijn er heel wat ontwikkelingen verricht in de PCR methodiek om de gevoeligheid van de detectie van HP en resistentiemutaties te verhogen. Een significante verbetering van de sensitiviteit kwam er met de introductie van real-time PCR.²¹ Qua specificiteit zijn er doorgaans nooit grote problemen geweest wanneer er gewerkt wordt vanuit maagbiopten.²¹

Wat de performantie van de beschreven testen afzonderlijk betreft, is de literatuur vrij beperkt (tabel 6). De meeste publicaties die konden gevonden worden, bespreken de

performantie van GenoType® HelicoDR (Hain, Lifescience): 4 artikels beschrijven de performantie van de test (uit België, Frankrijk, Korea en Zuid-Afrika).³¹ MutaREAL *H. pylori* (Immundiagnostik) werd geëvalueerd in Spanje in 2010 op 106 kinderen.³² ClariRes™ (Ingenetix) is een test die ontworpen werd o.b.v. de publicatie van Schabereiter-Gurtner in 2004.³⁵ De meeste publicaties hieromtrent beschrijven echter de detectie van HP op stoelgangsstalen.³⁴ Tot slot is er nog RIDA®GENE (r-biopharm). Informatie over performantie kon enkel worden teruggevonden in de specificaties van de test online, bekomen in een retrospectieve studie op 364 klinische stalen. Echter, de test wordt momenteel uitgebreid gevalideerd in een referentielaboratorium te Frankrijk. Resultaten hiervan worden wellicht vrijgegeven tijdens het ECCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) congress, april 2016.

3.1.1 Detectie van HP

Volgens de gevonden informatie kon de hoogste gevoeligheid voor detectie van HP worden bekomen met RIDA®GENE, ClariRes™RT-PCR en GenoType® HelicoDR (tabel 6).

MutaREAL® doet het, wat HP detectie betreft, het slechtste. In de studie van Schabereiter-Gurtner (ClariRes™RT-PCR) kon een gevoeligheid van 100% gevonden worden: alle 45 patiënten die cultuur positief waren, werden opgepikt door 2 PCR-methoden: één met het *ureA* gen als target, een ander detecteerde het 23S rRNA. Echter, één patiënt testte positief met een snelle urease test op het maagbiopt maar HP kon niet met cultuur of PCR worden aangetoond.³⁵

Een studie van Liu uit 2015 vergeleek detectie van HP via een in-house real-time PCR met deze van histopathologie. Van de 136 positieve stalen (gedefinieerd als positief via PCR of via histopathologie), waren er 130 positief via real-time-PCR (95,6%) en 95 via histopathologie (69,9%).³⁷

		N	sensitiviteit	specificiteit	PPV	NPV	referentie
RIDA®GENE	HP detectie	225	100%	98%	98%	100%	Bijsluiser firma
	Clarithromycine -resistentie	139	96%	97%	98%	95%	
MutaREAL®	HP detectie	188	93%	87%	91%	91%	Agudo et al. 2010 ³²
	Clarithromycine -resistentie	60	91%	96%	97%	88%	
ClariRes™RT-PCR	HP detectie	92	100%	98%	98%	100%	Schabereiter- Gurtner et al. 2004 ³⁵
	Clarithromycine -resistentie	45	82%	100%	100%	94%	
GenoTypeHelicoDR	HP detectie	35	93-100%	100%	100%	95%	Deyi et al. 2011 ³⁹
	Clarithromycine -resistentie		95-100%	86-100%	99%	94%	
	Fluoroquinolon en-resistentie		89-98%	80-97%	96%	96%	Cambau et al. 2009 ⁴⁰ Lee et al. 2005 ⁴¹ Tanih et al. 2013 ⁴²

Tabel 6: Performantie van de verschillende commerciële kits voor detectie van HP en resistentiemutaties

3.1.2 Antibioticaresistentie

Clarithromycineresistentie

De negatief voorspellende waarde (88-95%) voor het detecteren van clarithromycineresistentie ligt voor alle testen lager dan de positief voorspellende waarde (97-100%), m.a.w. bij een positief resultaat via PCR voor clarithromycineresistentie is de kans groot dat er effectief een resistente stam aanwezig is (tabel 6). Echter een positief resultaat met PCR, wilt uiteraard niet altijd zeggen dat de stam ook fenotypisch resistent is. Mogelijke verklaringen zijn dat het gemuteerd gen niet gecodeerd wordt of dat er sprake is van heteroresistentie. Een studie van De Francesco et al. in 2010 kon inderdaad een belangrijk verschil aantonen tussen gevoeligheidsbepaling voor clarithromycine via E-test (fenotypische resistentie) en detectie van een resistentiemutatie (genotypische resistentie). Hoewel er nog andere resistentiemechanismen aanwezig kunnen zijn die niet worden opgepikt door PCR, werden er in deze studie genotypisch meer resistente stammen gevonden dan fenotypisch (37,6% vs. 18,4%). In deze studie werd aangetoond dat discordantie tussen beide methoden in hoofdzaak te wijten is aan het voorkomen van heteroresistentie.⁴³ Dit is een potentiële major error gezien resistentie genotypisch kan worden overschat waardoor een patiënt een mogelijks effectieve therapie wordt ontzegd (zie verder).

RIDA[®] GENE, MutaREAL[®] en GenoType[®] HelicoDR zijn qua sensitiviteit en specificiteit in de detectie van clarithromycineresistentie vergelijkbaar en er wordt steeds een waarde van meer dan 90% gevonden.

Voor ClariRes[™] RT-PCR ligt de gevoeligheid van de detectie van clarithromycineresistentie maar op 82%. Dit is beduidend lager dan bij de andere assays. Echter, in de studie van Schabereiter-Gurtner et al. waarop deze resultaten gebaseerd zijn, werden slechts 11 gevallen met een resistente stam getest en schreven zij het missen van sommige resistente stammen toe aan het voorkomen van heteroresistentie waarbij het gevoelig fenotype het resistent fenotype zou onderdrukken. Hun specificiteit lag echter wel op 100%: alle 34 patiënten met via E-test gevoelige stammen, werden gevoelig bevonden via real-time PCR.³⁵

Detectie van heteroresistente stammen kan gebeuren met MutaREAL[®], ClariRes[™] RT-PCR en GenoType[®] HelicoDR via resp. smeltcurveanalyse (figuur 5) en hybridisatie op verschillende strips. De mogelijkheid van detectie van heteroresistentie via RIDA[®] GENE wordt nagevraagd bij de firma, gezien deze kit geen smeltcurveanalyse toepast.

Fluoroquinolonenresistentie

GenoType[®] HelicoDR is de enige van de beschreven testen die ook resistentie aan fluoroquinolonen opspoort. De resultaten uit verschillende studies vertonen een grotere variabiliteit dan voor clarithromycineresistentie. Het is beschreven dat detectie van resistentie aan fluoroquinolonen complexer is dan in het geval van macroliden.²¹ Mutaties kunnen sterk verschillend zijn op verschillende plaatsen in de wereld en zijn dus regio-afhankelijk. Het is dus belangrijk te weten dat deze kit ontworpen werd o.b.v. HP stammen die in Europa voorkomen.²¹ Dit verklaart mogelijks waarom de sensitiviteit van de test op een Zuid-Afrikaanse populatie veel lager is (89%).⁴²

3.1.3 Conclusie

Qua algemene performantie is RIDA®GENE voor eerste keuze. De resultaten kunnen echter niet kritisch bekeken worden gezien er tot hier toe geen onafhankelijke studie werd verricht. ClariRes™ RT-PCR piekt in het detecteren van HP maar heeft slechts een lage gevoeligheid in het oppikken van clarithromycineresistentie. De performantie van GenoType® HelicoDR is wisselend (de test kent ook de meeste publicaties) maar heeft als bijkomend voordeel dat fluoroquinolonenresistentie kan worden opgepikt. Deze test wordt in het Belgisch referentielaboratorium voor HP gebruikt. MutaREAL® kent over het algemeen de laagste performantie.

4. KLINISCHE IMPACT

Het meest gebruikte eradicateschema voor de eerstelijnsbehandeling van HP is nog steeds de standaard triple therapie (*PPI + clarithromycine 2x 500mg + amoxicilline 2x 1g of PPI + clarithromycine 2x 500mg + metronidazole 2x 500mg gedurende 7 of 10-14 dagen*). De European Helicobacter Study Group raadt echter aan onmiddellijk te starten met quadruple therapie (*PPI + bismuthsubsalicylaat 4x 525mg + metronidazole 4x 250mg + tetracycline 4x 500mg gedurende 10-14 dagen*) of sequentiële therapie (*PPI + amoxicilline 2x 1g 5d gevolgd door PPI + metronidazole 2x 500mg + clarithromycine 2x 500mg 5d*) indien de clarithromycineresistentiegraad voor HP in de regio de 15-20% overschrijdt. Indien toch triple therapie wordt overwogen in zulke regio's, wordt er geadviseerd eerst een kweek met gevoeligheidsbepaling uit te voeren.⁴

De recente Kyoto-consensus bevestigt dit en stelt met hoge graad van aanbeveling dat enkel eradicateschema's met een succesratio van meer dan 90% gebruikt mogen worden in de empirische therapie van HP gastritis.

In dit onderdeel van de CAT wordt nagegaan in hoeverre het nuttig is een gevoeligheidsbepaling van HP te doen bij patiënten die endoscopisch maagonderzoek hebben gehad vóór opstart van eerstelijns therapie. Gezien de snelheid, eenvoudigheid en goede performantie van de methode, zou PCR hiervoor een interessante tool zijn. Tevens wordt er ook beschreven wat het klinisch voordeel is om een genotypische resistentiebepaling te doen i.p.v. een fenotypische.

4.1 Klinische impact van resistentiebepaling vóór opstart van eerstelijns therapie

De gevoeligheid aan antibiotica van HP is de belangrijkste voorspeller voor het al dan niet slagen van therapie.⁴⁴ Dit is voornamelijk aangetoond voor triple therapie waarbij de gevoeligheid van HP aan clarithromycine bepalend is voor het succes van de behandeling. De literatuur over de eradicationgraad van verschillende therapieschema's en de invloed van HP resistentie is uitgebreid. De belangrijkste randomised controlled trials (RCT) en meta-analysen worden hieronder beschreven. De meeste studies werken retrograad nl. patiënten worden gerandomiseerd in 2 behandelingsgroepen, eradicationgraad wordt berekend en achteraf wordt 'baseline' antibioticagevoeligheid mee in rekening gebracht en het effect van deze gevoeligheid op de eradicationgraad bepaald.

Het is echter niet alleen van belang te weten of een bepaalde resistentie een effect heeft op de eradicationgraad van therapie maar ook of het wel zin heeft een gevoeligheidsbepaling te doen vóór de opstart van therapie. Er zijn dus prospectieve studies nodig die in aantal veel

beperkter zijn. Een belangrijke kanttekening is dat de meeste publicaties hieromtrent uit Aziatische landen komen.⁴⁵

4.1.1 Effect van antibioticaresistentie op de eradicationgraad van HP

Een overzicht van de belangrijkste studies over het effect van antibioticaresistentie op eradicationgraad van therapie wordt gegeven in tabel 7. De eradicationsschema's die bestudeerd werden zijn degene die aanbevolen worden in de belangrijkste richtlijnen (tabel 1). Voor triple therapie is dit een schema met PPI, amoxicilline en clarithromycine en voor quadruple therapie PPI, een bismuthpreparaat, tetracycline en metronidazole. Variaties in tijdsduur en concentraties van het product kunnen voorkomen en worden vermeld in de legenda van de tabel.

Clarithromycine Een grootschalige RCT uit 2011 op 440 volwassen patiënten uit 39 Europese centra vergeleek de eradicationgraad van patiënten met standaard clarithromycine-gebaseerde triple therapie (7 dagen) met deze van quadruple therapie (10 dagen). Ze vonden een eradicationgraad, gemeten als zijnde 2 negatieve ademtesten 28-56 dagen na stop van de behandeling, met triple therapie van 55% en met quadruple therapie van 80%. Bij triple therapie reduceerde de eradicationgraad van 85% naar 8% bij een resp. clarithromycinegevoelige en clarithromycineresistente stam (tabel 7).¹ Deze significante daling van eradicationgraad bij een clarithromycineresistente HP werd in nog andere studies aangetoond en is het belangrijkste argument om empirische therapie aan te passen aan de macrolidenresistentie in de regio of een gevoeligheidsbepaling uit te voeren. Dit wordt in de belangrijkste richtlijnen opgenomen.³⁻⁵

Metronidazole Metronidazole wordt voornamelijk gebruikt als onderdeel van quadruple therapie. Tot heden heeft metronidazoleresistentie geen bewezen negatief effect op het succes van deze therapie. Verschillende studies konden een lichte daling aantonen in eradicationgraad maar dit werd nergens significant bevonden (tabel 7).^{1,46} Een mogelijke verklaring hiervoor is dat metronidazole en bismuth een synergistisch effect zouden hebben. Wat schema's zonder bismuth betreffen (vb. triple therapie met metronidazole i.p.v. clarithromycine) worden in de literatuur tegenstrijdige resultaten gevonden: de ene studie toont geen significante daling in eradicationgraad bij metronidazoleresistente stammen aan, terwijl een meta-analyse afraadt metronidazole-gebaseerde triple therapieën toe te passen in regio's met hoge resistentiepercentages.^{47,48} Metronidazole doet de eradicationgraad van metronidazolegebaseerde triple therapie met ongeveer 25% dalen. De impact is echter wel minder duidelijk dan voor clarithromycine.

Fluoroquinolonen Levofloxacin-gebaseerde therapieën worden voorlopig enkel aanbevolen na het falen van eerstelijns therapieën/of bij het moeilijk te verkrijgen zijn van bismuthpreparaten in regio's met hoge clarithromycineresistentie. Sedert de opmars van fluoroquinolonen-gebaseerde therapieën in 2006 worden er meer en meer studies uitgevoerd over het effect van levofloxacineresistentie op het succes van therapie. Liou et al. toonde in een recent gepubliceerde grote gerandomiseerde studie op de Taiwanese bevolking een significant gedaalde eradicationgraad aan voor zowel levofloxacin triple- als sequentiële therapie indien de stam levofloxacineresistent testte.⁴⁹ Zodoende lijken er met levofloxacin dezelfde problemen op te treden als met clarithromycine nl. het toenemend resistentiecijfer, de sterke

regio-afhankelijkheid van deze resistentie en een significante daling van eradicationgraad indien bij een fluoroquinoloneresistentiestam.

Amoxicilline en tetracycline De invloed van amoxicilline- en tetracycline resistente stammen wordt hier niet besproken gezien het zeldzaam voorkomen van resistentie hiertegen en het niet beschikbaar zijn van moleculaire testen ter bepaling.

referentie	studie	Clarithromcine triple therapie(PPI/amoxi cilline/clarithromyci ne)	Quadruple therapie(PPI/ bismuth/TC/ MNZ)	Sequentiëlethera pie(PPI/amoxicilli ne 5d + PPI/CLAR/MNZ 5d)	Levofloxacin triple(PPI/amoxicilline/LEV) of sequentieeltherapie(PPI/amoxicilline 5d + PPI/MNZ/LEV 5d)
Malfertheiner et al. The Lancet, 2011	RCT N=440 Europa	Totaal: 55% CLAR S: 85% CLAR R: 8%* MNZ S: 71% MNZ R: 68%	Totaal: 80% CLAR S: 95% CLAR R: 91% MNZ S: 95% MNZ R: 91%		
Laine et al. Am J Gastroenterol 2003	RCT N=138 Noord- Amerika	Totaal: 83.2% CLAR S: 92.1% CLAR R: 21.4%*	Totaal: 87.7% MNZ S: 91.7% MNZ R: 80.4%		
Gatta et al. BMJ, 2013	Meta-analyse van 46 RCT's	Totaal: 71.5% (7d) 75.3% (10d) 81.3% (14d)	Totaal: 84.9%	Totaal: 80.8- 86.5% CLAR R: 72.8% MNZ R: 86.4%	Totaal: 90% (seq)
Venerito et al. Digestion, 2013	Meta-analyse van 12 RCT's	Totaal: 68.9% CLAR S: 88% CLAR R: 14.3*	Totaal: 77.6% MNZ S: 92% MNZ R: 84.2%		
Liou et al. Am J Gastroenterol 2016	RCT N=576 Taiwan Na falen eerstelijns- therapie				Totaal: 86.3% (seq), 78.8% (triple) genotypisch: gyrAmutatie negatief: 93.8% (seq) 78.8% (triple) gyrAmutatiepositief: 50% (seq)*, 29.4% (triple)* fenotypisch: LEV S: 96.3% (seq), 83.1% (triple) LEV R: 60% (seq)*, 29.4% (triple)* MNZ S: 91.8% (seq), 75% (triple) MNZ R: 88.2% (seq), 66.7% (triple) AMX S: 90.5% (seq), 72.5% (triple) AMX R: 50% (triple)

Tabel 7: Invloed van resistentie aan antibiotica op het succes van verschillende eradicationtherapieën afkortingen: RCT: randomised controlled trial, CLAR: clarithromcine, MNZ: metronidazole, AMX: amoxicilline, LEV: levofloxacin, TC: tetracycline, S: gevoelig, R: resistent; behandelingschema's: Malfertheiner et al. **triple therapie:** PPI/amoxicilline 2x1000mg/clarithromcine 2x500mg ged. 7 dagen, **quadruple therapie:** PPI/bismuthkaliumsubcitraat 4x420mg/tetracycline 4x375mg/metronidazole 4x375mg ged. 10; Laine et al.: **triple therapie:** PPI/amoxicilline 2x1000mg/clarithromcine 2x500mg ged. 10 dagen; **quadruple therapie:** bismuthkaliumsubcitraat 4x420mg/tetracycline 4x375mg/metronidazole 4x375mg; Gatta et al.: **triple therapie:** nietgespecificeerd, **quadruple therapie:** nietgespecificeerd, **sequentieel therapie:** PPI/amoxicilline 2x1000mg ged. 5 dagen gevolgd door PPI/clarithromcine 2x500mg/metronidazole ged. 5d, **levofloxacin-gebaseerde sequentieel therapie:** PPI/amoxicilline 2x1000mg ged. 5d gevolgd door PPI/levofloxacin 500mg of 1000mg/metronidazole ged. 5d; Venerito et al.: **triple therapie:** PPI/amoxicilline/clarithromcine, **quadruple therapie:** PPI/bismuth component/metronidazole/tetracycline, Liou et al. **Levofloxacin triple therapie:** PPI/amoxicilline 2x1000mg/levofloxacin 2x250mg ged. 10d; **Levofloxacin-gebaseerde sequentieel therapie:** PPI/amoxicilline 2x 1000mg ged. 5d gevolgd door PPI/metronidazole 2x 500mg/levofloxacin 2x250mg ged. 5d; *: significant verschil met gevoelige stam

4.1.2 Nut resistentiebepaling vóór opstart eerstelijns therapie

Er zijn reeds een (beperkt) aantal studies die het nut aantonen van detectie van clarithromycineresistentie vóór het start van eerstelijns therapie. Lee et al. vergeleek 616 patiënten met eerstelijns gerichte therapie (PPI/amoxicilline/clarithromycine of PPI/amoxicilline/metronidazole afhankelijk van de gevoeligheid van de stam voor clarithromycine) met 616 patiënten waarbij deze therapieën blind werden opgestart (zonder voorafgaande moleculaire gevoeligheidsbepaling) en zag een significant hogere eradicaatiegraad (91.2%) in de case groep met clarithromycineresistentie dan bij de controlegroep (75.9% voor PPI/amoxicilline/clarithromycine en 79.1% voor PPI/amoxicilline/metronidazole).⁵⁰ Een interessante opmerking is dat Lee et al. de gevoeligheidsbepaling in hun studie uitvoerden via DPO-PCR (Dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR). Bemerkingen bij deze studie zijn dat enkel 7-dagen durende therapieën werden gebruikt en het resistentiepercentage aan clarithromycine was 21.7%. Een recentere studie met 153 patiënten eveneens uit Japan, kon eveneens een hoog eradicaatiepercentage aantonen met gerichte antibioticabehandeling (>95%).⁵¹

Twee meta-analyses konden het nut van gerichte behandeling t.o.v. empirische behandeling bevestigen. De grootste en recentste (maart 2016) meta-analyse includeerde 3512 patiënten en kon de superioriteit van gerichte therapie t.o.v. 7-dagen triple therapie én quadruple therapie aantonen. Het verschil met 10-dagen durende triple therapie is echter minder duidelijk.⁴⁵

Dit zijn belangrijke gegevens en zouden kunnen leiden tot een aanpassing van de richtlijnen dewelke thans stellen een gevoeligheidsbepaling uit te voeren of een quadruple therapie op te starten in regio's met hoge clarithromycineresistentie.

4.2 Klinisch voordeel van genotypische resistentiebepaling t.o.v. fenotypische resistentiebepaling

De Francesco et al. heeft een belangrijke studie uitgevoerd naar het verschil tussen het bepalen van clarithromycineresistentie via genotypische of fenotypische methoden. Hij kon een significant groter percentage genotypische stammen (37.6%) identificeren dan fenotypische (18.4%). In zijn studie werd dit veroorzaakt door het voorkomen van heteroresistentie. Hij heeft echter ook beschreven dat detectie van genotypisch resistente stammen die fenotypisch gevoelig blijken nog steeds een eradicaatiegraad van >80% geven en niet <10% zoals beschreven is bij fenotypische resistentie.⁴³ Men kan dus stellen dat de genotypische bepaling van clarithromycineresistentie een overschatting geeft van de resistentiegraad wat de therapeutische opties sterk doet afnemen. Echter, indien heteroresistentie wordt uitgesloten, wordt wel een significante daling in eradicaatiegraad vastgesteld bij genotypisch resistente stammen. De beste correlatie met de klinische uitkomst wordt dus bekomen bij het uitvoeren van E-testen of bij genotypische resultaten waarbij heteroresistentie wordt uitgesloten.³¹ Een kleine opmerking is dat De Francesco et al. real-time PCR uitvoerde op biopten ingebed in paraffine.

Een andere studie uit 2011 beschreef dat genotypische resistentiedetectie na falen van eerstelijns therapie een betere merker is in het voorspellen van behandelingsuitkomst dan fenotypische resistentie en dit zowel voor clarithromycineresistentie als voor levofloxacineresistentie.⁵²

Een bijkomend voordeel van moleculaire resistentiedetectie is dat ze een inzicht kunnen geven in welke specifieke mutaties voorkomen. De A2143G-mutatie is inderdaad gekend te correleren met de fenotypisch hoogste resistentie en laagste eradicaatiegraad. Dit is een bijkomend voordeel van moleculaire resistentiedetectie t.o.v. fenotypische resistentiedetectie.⁴³

De mogelijkheid van detectie van heteroresistentie via RIDA® GENE wordt nagevraagd bij de firma gezien deze kit niet werkt met smeltcurveanalyses. Het probleem van heteroresistentie werd pas duidelijk naar het einde van deze studie toe en dus nadat deze test werd uitgekozen ter validatie.

5. BESLUIT

Er is een globaal toenemend prevalentie-en resistentiecijfer voor HP dat sterk regio-afhankelijk is. Resistentie tegen macrolidenantibiotica is de belangrijkste voorspeller in het al dan niet slagen van eerstelijns triple therapie en het is duidelijk aangetoond dat een clarithromycineresistente HP de eradicaatiegraad van deze therapie drastisch doet verlagen. Dit zelfs in die mate dat men in alle belangrijke richtlijnen een aanpassing van therapie adviseert in regio's waar het HP-clarithromycineresistentiepercentage groter is dan 20%. Gevoeligheidsbepaling van HP wordt aanbevolen na falen van eerstelijns therapie en ook in die regio's met een groot clarithromycineresistentiecijfer, zeker wanneer men standaard triple therapie wilt opstarten.

Meer en meer studies verschijnen die het nut aantonen van een onmiddellijke gevoeligheidsbepaling van HP vóór het opstarten van therapie waardoor een gerichte behandeling kan worden opgestart. Moleculaire methoden zijn hiervoor een interessante tool gezien zij snel en eenvoudig uit te voeren zijn en een hoge positief predictieve waarde hebben. Van alle PCR methoden heeft real-time PCR de hoogste sensitiviteit en het kleinste risico op contaminatie. De meeste commerciële kits sporen resistentiemutaties voor clarithromycine op en sommigen ook voor fluoroquinolonen. Voor de andere antibiotica is het nut minder duidelijk: metronidazoleresistentie blijkt, desondanks zijn hoge prevalentie, geen significante impact te hebben op het slagen van quadruple therapie en de aanwezigheid van amoxicilline- en tetracyclineresistentie is zeer zeldzaam (<1%). Daarenboven is de resistentie aan deze antibiotica complexer wat de detectie via PCR moeilijker maakt. Door genotypische resistentiedetectie kan er een overschatting zijn van het aantal resistente HP-stammen waarvan sommigen fenotypisch nog gevoelig kunnen zijn. Dit is een potentiële majeure error gezien in dat geval een adequate therapie aan de patiënt ontzegd kan worden. Wanneer heteroresistentie kan worden uitgesloten, correleert deze methode echter goed met de klinische uitkomst en is zij evenwaardig aan een gevoeligheidsbepaling via E-testen. Een bijkomend voordeel is dat meer inzicht kan geboden worden aan welke specifieke mutaties resistentie veroorzaken.

Niettegenstaande dat er nog andere factoren zijn die de eradicaatiegraad van therapie beïnvloeden, rijst de vraag of dit niet voldoende argumenten zijn om een gevoeligheidsbepaling voor clarithromycine m.b.v. moleculaire methoden uit te voeren voor alle patiënten vóór het opstarten van standaard triple therapie. Deze CAT includeert echter geen kosten-baten

analysen. Deze zijn onontbeerlijk in het maken van de beslissing om deze testen te implementeren in het laboratorium en zullen het vervolg van deze studie uitmaken.

Why do we hesitate?

TO DO/ACTIONS

- 1) Validatie RIDA[®]GENE met bepaling van analytische en diagnostische performantie: prospectief worden bij elke gastroscopie 2 extra bipten afgenomen: één voor PCR en één voor kweek + gevoeligheidsbepaling. Resultaten kunnen eveneens vergeleken worden met het resultaat van histopathologie (nagaan sensitiviteit en specificiteit van detectie van HP).
- 2) Bepaling van het klinisch flowchart: waar in de pathway van de aanpak van HP infecties kunnen we deze test implementeren?
- 3) Overleg met gastro-enterologen en pathologen.
- 4) Uitvoering van kosten-baten analyses: kosten-baten analyses dienen de meerprijs van PCR-testen vóór opstart empirische therapie af te wegen t.o.v. de kost van het falen van eerstelijns therapie en switchen naar een alternatieve therapie. Er zijn hierover nog maar weinig studies verricht en dit maakt een belangrijk onderdeel uit van de beslissing om de test te implementeren in het klinisch laboratorium.

ATTACHMENTS

Attachment I

Ruwe data experiment RIDA[®]GENE

I. Detectie HP



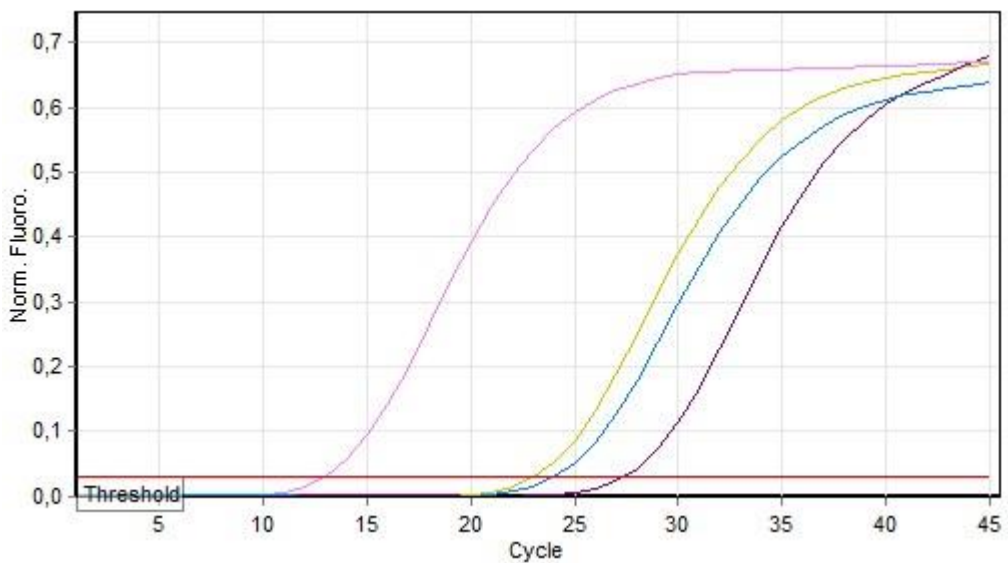
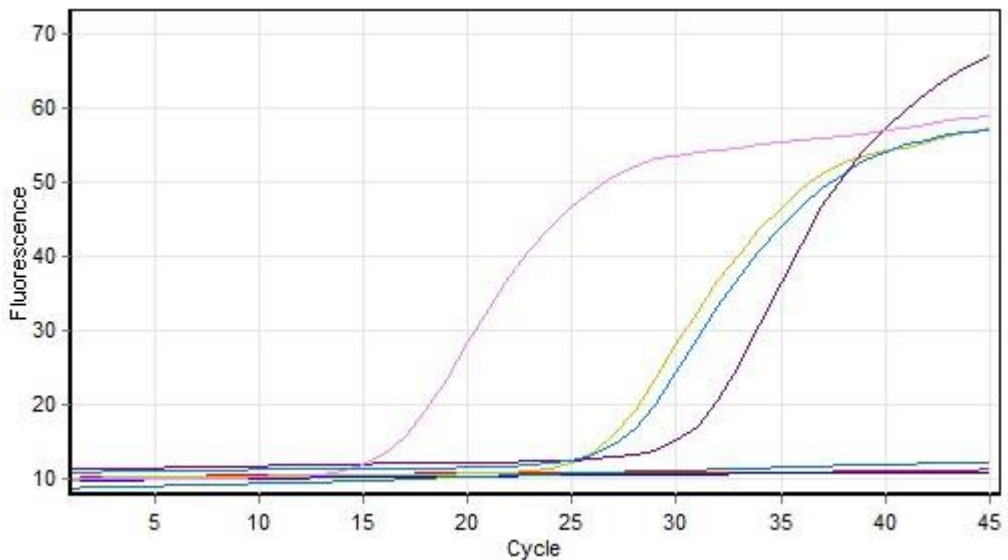
www.qiagen.com

Quantitation Report

Experiment Information	
Run Name	20160325_IM_BDPV_HP
Run Start	25/03/2016 16:06:36
Run Finish	25/03/2016 17:11:48
Operator	BVDP
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain H. pylori	5,
Gain Interne controle	5,
Gain Clarithromycin resistance	5,
Machine Serial No.	0111186
Quantitation Information	
Threshold	0,030
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes

No Template Control Threshold	% 10
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile	
Cycle	Cycle Point
Hold	Hold @ 95°C, 1min 0s
Cycling (45 repeats)	Step 1: Hold @ 95°C, 10s
	Step 2: Hold @ 60°C, 15s, acquiring to Cycling A([Clarithromycin resistance][4][7],[H. pylori][1][1],[Interne controle][2][2])



2. Interne controle



www.qiagen.com

Quantitation Report

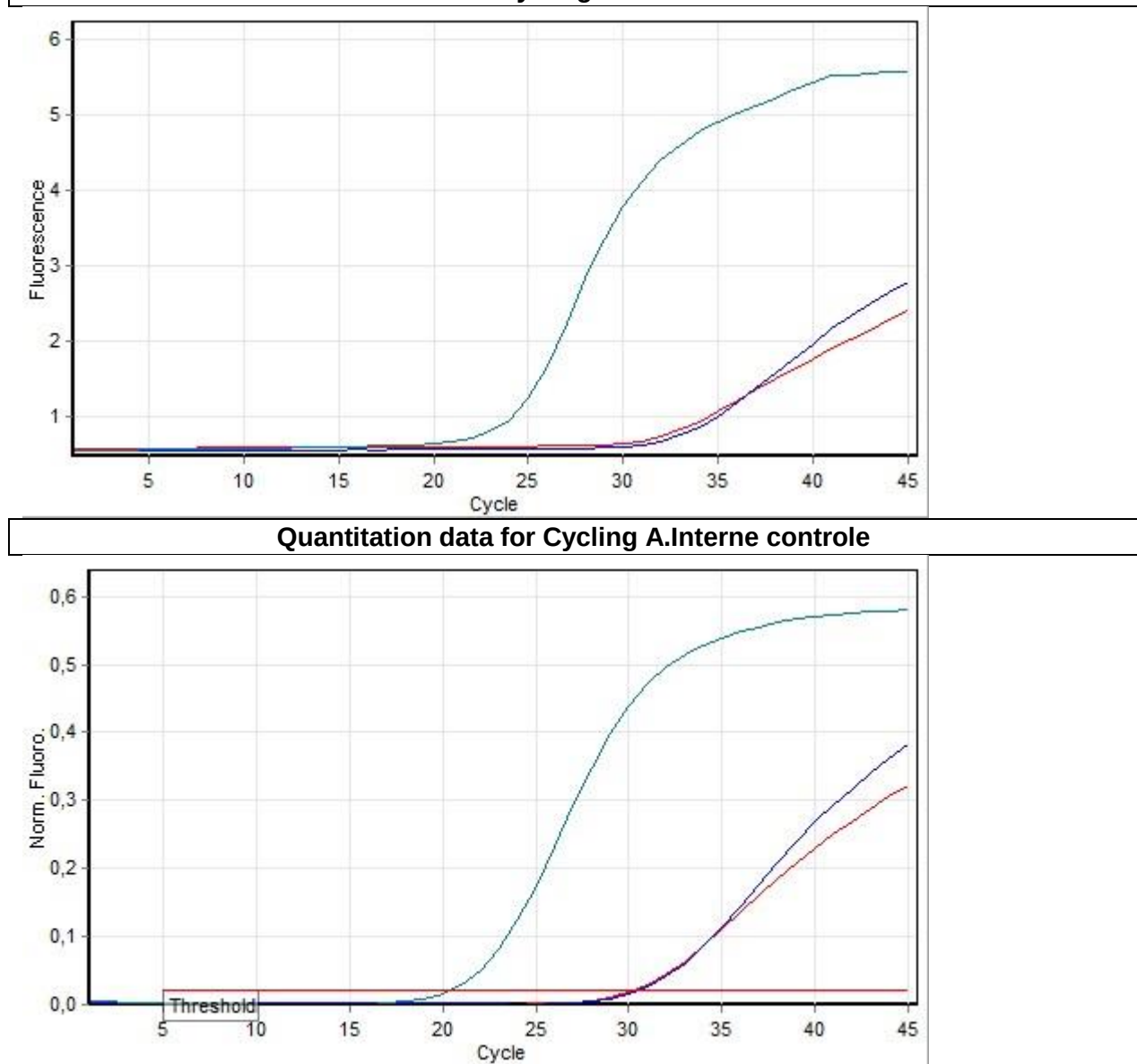
Experiment Information	
Run Name	20160325_IM_BDPV_HP
Run Start	25/03/2016 16:06:36
Run Finish	25/03/2016 17:11:48
Operator	BVDP

Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain H. pylori	5,
Gain Interne controle	5,
Gain Clarithromycin resistance	5,
Machine Serial No.	0111186

Quantitation Information

Threshold	0,020
Left Threshold	5,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 15
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile	
Cycle	Cycle Point
Hold	Hold @ 95°C, 1min 0s
Cycling (45 repeats)	Step 1: Hold @ 95°C, 10s
	Step 2: Hold @ 60°C, 15s, acquiring to Cycling A([Clarithromycin resistance][4][7],[H. pylori][1][1],[Interne controle][2][2])



-

Legend:

NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold.

NEG (R. Eff) - Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Build 49)
Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

3. Clarithromycinresistentie



www.qiagen.com

Quantitation Report

Experiment Information	
Run Name	20160325_IM_BDPV_HP
Run Start	25/03/2016 16:06:36
Run Finish	25/03/2016 17:11:48
Operator	BVDP
Notes	
Run On Software Version	Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain H. pylori	5,
Gain Interne controle	5,
Gain Clarithromycin resistance	5,
Machine Serial No.	0111186
Quantitation Information	
Threshold	0,020
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 15
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Profile	
Cycle	Cycle Point
Hold	Hold @ 95°C, 1min 0s
Cycling (45 repeats)	Step 1: Hold @ 95°C, 10s
	Step 2: Hold @ 60°C, 15s, acquiring to Cycling A([Clarithromycin resistance][4][7],[H. pylori][1][1],[Interne controle][2][2])

