

*Helicobacter pylori*  
– фактори на вирулентност,  
резистентност и  
серопревалиране

Дисертационен труд за придобиване на научна и образователна  
степен “доктор”

на

Даниел Валентинов Йорданов

Научна специалност ”Микробиология”

Научни ръководители

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, д.м.н.

Доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, д.м.

МУ-София  
2017

## СЪДЪРЖАНИЕ

	Използвани съкращения	5
I	УВОД	7
II	ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1	Исторически данни	9
2	Таксономия и описание на род <i>Helicobacter</i>	10
3	Морфология, физиология и метаболизъм на <i>H. pylori</i>	11
3.1	Морфология	11
3.2	Физиологични и културелни особености	12
3.3	Метаболизъм	13
4	Механизми на патогенност и вирулентност при <i>H. pylori</i>	14
4.1	Геномна и щамова вариабилност	14
4.2	Фактори на патогенност и вирулентност	16
4.2.1	Уреаза	17
4.2.2	Липополизахарид	18
4.2.3	<i>cag</i> – остров на патогенност ( <i>cagPAI</i> )	19
4.2.4	Цитотоксин-асоцииран ген А ( <i>cagA</i> )	21
4.2.5	Цитотоксин-асоцииран ген Е ( <i>cagE</i> ) и други гени от острова на патогенност <i>cagPAI</i>	25
4.2.6	Вакуолизиращ цитотоксин ( <i>VacA</i> )	26
4.2.7	Ген, промотиращ дуоденалните язви ( <i>dupA</i> )	30
4.2.8	<i>iceA</i> (индуциран от контакт с епитела ген А)	32
4.2.9	Адhezини като фактори на вирулентност при <i>H. pylori</i>	33
4.2.10	Функционален статус на гена за инфламаторен външномембранен протеин ( <i>oipA</i> )	34
4.2.11	<i>babA2</i> алел – адhezин, свързващ кръвно-групов антиген	35
4.2.12	Статус на гена за външномембранен протеин на <i>H. pylori</i> ( <i>homB</i> )	36
4.2.13	Други фактори на вирулентността	37
5	Епидемиология на инфекцията с <i>H. pylori</i>	39
5.1	Честота, рискови фактори и географско разпространение	39
5.2	Начини на предаване и източници на инфекцията	41
5.3	Спонтанен клирънс на инфекцията и реинфекция	43
6	Заболявания, свързани с <i>H. pylori</i>	45
6.1	Остър и хроничен гастрит	45
6.2	Пептични язви	49
6.3	Функционална диспепсия	50
6.4	Гастро-езофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ)	51
6.5	Атрофичен гастрит, интестинална метаплазия и стомашен карцином	52
6.6	Стомашен MALT лимфом	55
6.7	Извънстомашни заболявания	56
7	Диагноза на инфекцията	56
7.1	Инвазивни методи	57
7.1.1	Хистология	57
7.1.2	Култивиране	59
7.1.3	Полимеразно-верижна реакция (PCR)	59

7.1.4	Бърз уреазен тест (БУТ)	60
7.2	Неинвазивни методи	61
7.2.1	Серология	61
7.2.2	Уреен дихателен тест (UBT)	61
7.2.3	Фекален антигенен тест (ФАТ)	62
8	Лечение	62
8.1	Терапевтични схеми	65
III	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	71
IV	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	72
1	Пациенти и бактериални изолати	72
1.1	Бактериални изолати /биопсии/	72
1.2	Бактериални изолати /устна кухина/	72
1.3	Изолиране и идентификация	73
2	Молекулярно –генетични методи за определяне на факторите на вирулентност	75
2.1	Екстракция на ДНК	75
2.2	Амплификация на гени чрез полимеразно-верижна реакция (PCR)	75
2.2.1	Видова идентификация чрез PCR за ген, кодиращ уреазата ( <i>ureA</i> )	78
2.2.2	Детекция чрез PCR на мозаичните алели на гена за вакуолизиращ цитотоксин ( <i>vacA</i> )	79
2.2.3	Детекция на цитотоксин асоциирания ген А ( <i>cagA</i> ) чрез PCR	79
2.2.4	Детекция на цитотоксин асоциирания ген Е ( <i>cagE</i> ) чрез PCR	80
2.2.5	Детекция чрез PCR на други гени от острова на патогенност <i>cagPAI</i>	81
2.2.6	Детекция чрез PCR на гена, индуциран от контакт с епитела на стомаха <i>iceA</i>	81
2.2.7	Детекция чрез PCR на гена <i>babA2</i> , кодиращ адхезин свързващ кръвногрупов антиген	82
2.2.8	Детекция чрез PCR на гена, промотиращ дуоденалните язви ( <i>dupA</i> )	82
2.2.9	Детекция чрез PCR на гените <i>homA</i> и <i>homB</i> , кодиращи външноембранни протеини	82
2.2.10	Детекция чрез PCR на гена за гликозилтрансфераза <i>jhp0562</i>	83
2.2.11	Детекция на гена <i>oipA</i> , кодиращ инфламаторен външноембранен протеин	83
3	Определяне на наличието на IgG антитела към <i>H. pylori</i> и към CagA	84
4	Методи за определяне на антимикробната чувствителност	85
4.1	MIC strip	85
4.2	Метод на граничните стойности (Breakpoint Susceptibility Test, BST)	86
5	Определяне на механизмите на резистентност към макролиди	86
5.1	Алел-специфична полимеразно-верижна реакция за определяне на точкови мутации	86
6	Идентификация на смесени инфекции	87
7	Статистически анализ	87
V	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	89
1	Пациенти и бактериални изолати	89
1.1	Бактериални изолати /биопсии/	89
1.2	Бактериални изолати /устна кухина/	90
2	Определяне на фактори на вирулентност	91

2.1	Екстракция на ДНК	91
2.2	Амплификация на гени чрез полимеразно-верижна реакция (PCR)	92
2.1.1	Доказване на ген, кодиращ уреаза ( <i>ureA</i> )	92
2.2.2	Детекция чрез PCR на мозаичните алели на гена за вакуолизиращ цитотоксин <i>vacA</i>	92
2.2.3	Детекция на цитотоксин асоциирания ген А ( <i>cagA</i> )	100
2.2.4	Детекция на цитотоксин асоциирания ген Е ( <i>cagE</i> )	105
2.2.5	Детекция на други гени от острова на патогенност <i>cagPAI</i>	107
2.2.6	Детекция на гена, индуциран от контакт с епитела на стомаха <i>iceA</i>	112
2.2.7	Детекция на <i>babA2</i> (ген за адхезин, свързващ кръвно-групов антиген)	114
2.2.8	Детекция на гена, промотиращ дуоденалните язви ( <i>dupA</i> )	117
2.2.9	Детекция на гените <i>homA</i> и <i>homB</i> , кодиращи външномембранни протеини	120
2.2.10	Детекция на гена за гликозилтрансфераза <i>jhp0562</i>	123
2.2.11	Детекция на гена <i>oipA</i> , кодиращ инфламаторен външномембранен протеин	125
3	Установяване наличието на <i>H. pylori</i> в устната кухина на пациенти със стоматологични и/или гастродуоденални болести с помощта на културелно изолиране, бърз уреазен тест, имунофлуоресценция с моноклонални антители и PCR	131
4	Определяне на наличието на IgG антитела към <i>H. pylori</i> и към CagA	134
5.	Антимикробна чувствителност и механизми на резистентност при изолатите <i>H. pylori</i>	148
5.1	Определяне на чувствителността на изолатите <i>H. pylori</i> към clarithromycin и metronidazole	148
5.2	Определяне на механизмите на резистентност към макролиди – алел специфична полимеразно-верижна реакция за определяне на точкови мутации	150
VI	ИЗВОДИ	156
VII	ПРИНОСИ	158
VII	ЛИТЕРАТУРА	160
IX	Научни прояви, свързани с дисертационния труд	185

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФаза	Аденозинтрифосфатаза
БУТ	Бърз уреазен тест
ГЕРБ	Гастроезофагеална рефлуксна болест
ГТФаза	Гуанозинтрифосфатаза
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЗП	Зони на пластичност
ЛПЗ	Липополизахарид
МКА	Моноклонални антитела
МПК	Минимална потискаща концентрация
НСПВС	Нестероидни противовъзпалителни средства
рРНК	Рибозомна рибонуклеинова киселина
СЗО	Световна здравна организация
ФАТ	Фекален антигенен тест
AS-PCR	Алел-специфична полимеразно-верижна реакция
AUC	Площ под кривата
<i>babA2</i>	Ген, кодиращ адхезин, свързващ кръвногрупов антиген
BST	Метод на граничните стойности (Breakpoint susceptibility test)
<i>cag</i>	цитотоксин-асоцииран ген
Cag	протеин на цитотоксин-асоцииран ген
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> остров на патогенност
CI	Доверителен интервал
COX	Циклооксигеназа
dATP	Дезоксиаденозинтрифосфат
dCTP	Дезоксицитидинтрифосфат
dGTP	Дезоксигуанозинтрифосфат
dNTP	Дезоксинуклеозидтрифосфати
dTTP	Дезокситимидинтрифосфат
<i>dupA</i>	ген, промотиращ дуоденалните язви
EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина (ethylenediamine tetraacetic acid)
EIA	Имуоензимен тест
ELISA	Ензимно-свързан имуносорбентен тест (enzyme-linked immunosorbent assay)
ЕРІУА	Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala мотив
EUCAST	Европейска комисия по надзор на изследванията за антибиотична чувствителност
FISH	Флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизация
FITC	Флуоресцеин-изотиоцианат (fluorescein-isothiocyanate)
<i>iceA</i>	ген, индуциран от контакт с епитела
IgG	Имуноглобулин G
IL	Интерлевкин
MALT	Свързана с мукозата лимфоидна тъкан (Mucose-associated lymphoid tissue)
МАРК	Митоген-активирана протеинкиназа
MIC	Минимална потискаща концентрация (Minimal Inhibitory Concentration)
NHP	не- <i>pylori Helicobacter</i> -видове
NF-κB	Нуклеарен фактор κB

<i>oipA</i>	Ген за външномембранен инфламаторен протеин
OMP	Външномембранен протеин
OR	odds ratio/ съотношение на шансовете
PBS	Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (phosphatic buffered saline)
PCR	Полимеразно-верижна реакция (polymerase chain reaction)
PG	Простагландин
PPI	Инхибитори на протонната помпа
ROC	Receiver operating characteristics
RU	Относителна единица
SEM	Стандартно отклонение на средната на регресионните коефициенти
Th	T-хелпери
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	тумор-некротизиращ фактор – алфа
T4SS	Тип IV секреторна система
UBT	Уреен дихателен тест (urea breath test)
VacA	Вакуолизиращ цитотоксин А
<i>vacA</i>	Ген за вакуолизиращ цитотоксин А

## I. УВОД

След откриването на *Helicobacter pylori* от Marshall и Warren през 1982 г. много бързо се натрупват данни за значимостта на този микроорганизъм. *H. pylori* са Грам-отрицателни микроаерофилни извити бактерии. Те се предават по фекално-орален, гастро-орален и орално-орален път, като се приема, че заразяването е предимно в детска възраст. Повече от половината от хората по света са заразени с *H. pylori*, като без лечение той персистира в стомашната мукоза до края на живота, причинявайки гастрит.

Развитието на инфекцията и клиничният изход се определят от многобройните фактори на вирулентност на микроорганизмите, както и от имунния статус и социално-икономическите условия на живот на индивидите. Основните фактори на вирулентност са уреазата, *cag* островът на патогенност (*cagPAI*), тип IV секреторната система, протеинът на цитотоксин-свързания ген (*CagA*), вакуолизиращият цитотоксин *VacA*, адхезинът *BabA*, и много други. Установено е, че има географски вариации на факторите на вирулентност.

Понастоящем СЗО приема, че *H. pylori* са единствените бактерии с канцерогенно действие - от 1<sup>ва</sup> група. Те се асоциират с хронични гастрити, пептични язви и са кофактор за стомашен карцином и MALT (мукоза-асоциирана лимфна тъкан) лимфом.

Все още има много предизвикателства и нерешени въпроси по отношение на инфекцията с *H. pylori*. Като се има предвид, че тя е дългогодишна и често доживотна и носи дълготрайни рискове от хронични и сериозни гастродуоденални заболявания, необходимо е да се проучи детайлно щамовото разнообразие на *H. pylori* в България по отношение на факторите на вирулентност и резистентността на този важен микроорганизъм. Това ще бъде стъпало към постигането на по-добър контрол на инфекцията и би помогнало за правилното ерадикиране на свързаните инфекции.

За първи път у нас *H. pylori* са изолирани от Томов и съвт. (1990). Публикации върху теми, свързани с *H. pylori* инфекцията, имат също Мечков и Таков (1991); Младенова (Mladenova et al., 2000), Петров (2000), Кръстев и Чернев (1997), Митов и съвт. (1998); Владимиров и съвт. (Vladimirov et al., 1998) и др. В Катедрата по медицинска микробиология на Медицински университет-София се работи комплексно върху *H. pylori* инфекцията с инвазивни и неинвазивни методи.

## II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1. Исторически данни

През 1874 г. германски учени откриват спирално извити бактерии, колонизиращи мукусния слой на стомаха, но тъй като не успяват да ги култивират, открытията им бързо били пренебрегнати и забравени (Konturek, 2003). Впоследствие въпросните „спирални бактерии“ са споменавани от Bizzozero (1892) и Jaworski (1899), но и на тях не се обръща никакво внимание (Konturek, 2003). По онова време е било общоприето схващането, че стомахът е стерилен поради изключителната киселинност на стомашния сок. Въпреки това, след масовото навлизане на антимикробните лекарствени средства, през петдесетте години на 20-ти век Allende опитва да лекува язви с препарат, съдържащ пеницилин, а Lykoudis – със стрептомицинов препарат, но тези опити са отхвърлени от медицинската общност като необосновани (Rigas *et al.*, 1999; Unge, 2002). Едва през 1978 г. Американската гастроентерологична асоциация обявява, че лечението с антиацидни средства няма ефект при лечението на пептични язви (Peterson *et al.*, 2002).

През 80-те години на 20-ти век, обаче, тази представа се преобръща, след като Barry J Marshall и Robin Warren предполагат, че стомашните “извити бацили” са свързани с развитието на гастрити и пептични язви (Marshall и Warren, 1984). Дотогава общоприетото мнение е, че стресът и диетичните фактори са единствените причини за пептичните язви (Pajares и Gisbert, 2006), поради което първите реакции спрямо откритието са силно негативни. За това, през 1985 г. Marshall извършва опит, в който заразява сам себе си с цел да изпълни постулатите на Кох. След като ендоскопски е доказано, че няма гастрит, той поглъща суспензия от култивирани бактерии. Скоро след това, Marshall развива симптоматичен гастрит, който успешно излекува с metronidazole и бисмутов препарат (Marshall *et al.*, 1985).

Наблюдаваните стомашни бактерии са наименувани *Campylobacter pyloridis*, като впоследствие името е коригирано на *Campylobacter pylori*. Но, поради разликите между този вид и останалите видове в род *Campylobacter* по отношение на ултраструктурата,

мастните киселини, G+C % в молекулата на ДНК и др., през 1989 г. *C. pylori* е обособен в нов род и преименуван на *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989).

През 1991 г., проучванията установяват връзка между инфекцията и стомашния карцином и стомашния лимфом (Parsonnet *et al.*, 1991).

През 1994 г. *H. pylori* е обявен за причинител на пептичните язви от Националния здравен институт на САЩ и за канцероген от първа група (най-силните канцерогени) от Световната здравна организация (Kim *et al.*, 2016).

През 2005 г. откритието на Marshall и Warren заслужено е удостоено с Нобелова награда за физиология и медицина (Fock *et al.*, 2013).

Въпреки сравнително скорошното откриване на *H. pylori* този микроорганизъм бива изследван много обстойно и през последното десетилетие годишно има има по около 2000 публикации, свързани с него.

## **2. Таксономия и описание на род *Helicobacter***

Род *Helicobacter* принадлежи към клас *Epsilonproteobacteria* на тип *Proteobacteria*, разред *Campylobacterales*, семейство *Helicobacteraceae*, което включва още родовете *Wolinella*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*, *Sufurovum*, и *Thiovulum* (Mitchell *et al.*, 2014). Към настоящия момент род *Helicobacter* съдържа 33 вида, както и много видове, кандидати за официално признаване (Mitchell *et al.*, 2014). Всички представители на рода са микроаерофили, почти всички са каталазо- и оксидазо-положителни. Много от видовете, особено гастралните видове, са и уреаза-позитивни (Kusters *et al.*, 2006).

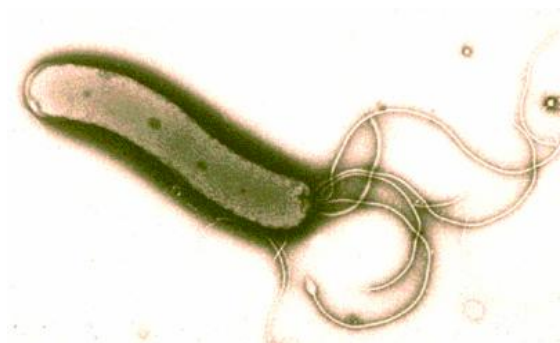
Видовете от род *Helicobacter* могат да се подразделят в две основни групи: основен и с най-голяма значимост *H. pylori*, а не-*pylori Helicobacter* видовете (NPH) се разделят на две подгрупи - обитаващи стомаха (гастрални) видове *Helicobacter* и ентерохепатални видове. И при двете групи се наблюдава високо ниво на органна специфичност (Kusters *et al.*, 2006, Flahou *et al.*, 2015). NPH носят различни гени за вирулентност и могат да причинят заболявания не само при животните, но и при човека. За стомашните NPH като *H. suis*, *H. felis*, *H. bizzozeronii* и *H. salomonis* са описвани връзки с хроничен гастрит и пептични язви у хора, а с особена важност е, че при тях се съобщава за по-висок риск от MALT лимфом в сравнение с *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006). Ентерохепаталните видове, напр. *H. hepaticus*, *H. bilis*, и *H. ganmani*, са откривани чрез PCR, но засега не са изолирани

от проби на пациенти с чернодробни и жлъчни заболявания. Освен това NPH могат да са асоциирани с болестта на Крон и с улцеративен колит (Flahou *et al.*, 2015).

### 3. Морфология, физиология и метаболизъм на *H. pylori*

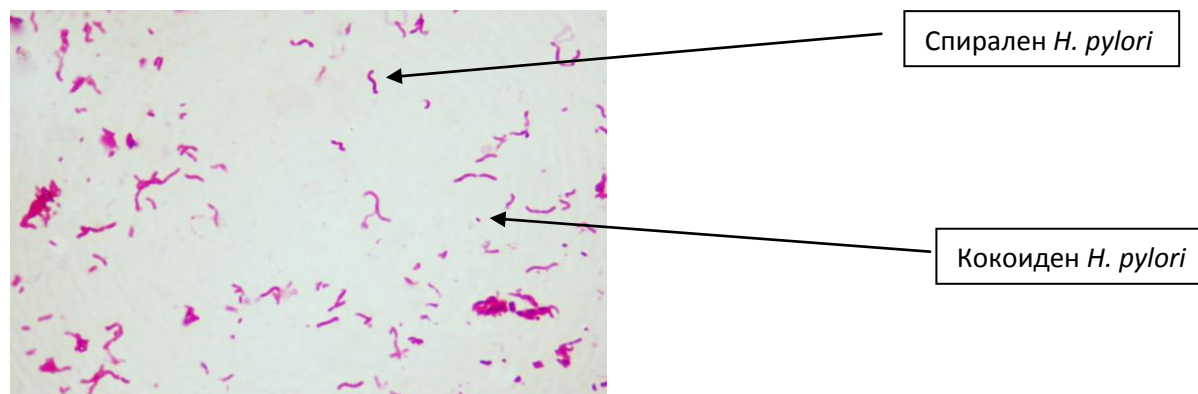
#### 3.1 Морфология

*H. pylori* са Gram-отрицателни спирално извити бактерии с размери 2-4x0.5-1  $\mu\text{m}$  (Фиг 1).



Фиг.1 *Helicobacter pylori*

Те са подвижни бавнорастящи микроаерофили (Kusters *et al.*, 2006). Младите клетки са спирално извити (Фиг. 2), но в стари култури след продължително инкубиране и в субкултури при неблагоприятни условия, като промени в температурата, контакт с кислород ( $\text{O}_2$ ) и лечение с антибиотици, клетките първо стават U-образни и впоследствие - кокоидни (Фиг. 2). (Mazaheri *et al.*, 2015).



Фиг.2 Препарат на субкултура на *Helicobacter pylori*

Кокоидните форми не могат да се субкултивират. Cellini *et al.* (2008) съобщават, че в случаите, когато *H. pylori* са доказвани културелно, повечето бактерии са били спирални, но в случаите, когато положителен резултат е получен само с полимеразно-верижна рекация (PCR), бактериите са били основно кокоидни и групирани в скупчвания, групи клъстери (Cellini *et al.*, 2008). Това е така, понеже PCR може да открие ДНК от живи некултивируеми и дори от неживи бактерии. Въпреки че вирулентността на кокоидните форми е слаба, те запазват своите гени *ureA* и *ureB*, както и уреазната си активност, ресните и адхезивните си свойства и, особено важно, способността да се превърнат отново в спирални форми и да индуцират развитието на гастрит (Sarem *et al.*, 2016).

*H. pylori* е лофотрих и има 2 до 6 покрити ресни с дължина около 3  $\mu\text{m}$ , които често в края си имат отчетливи удебеления (Qin *et al.*, 2017). Маншонът на ресните е продължение на външната мембрана и предпазва флагеларните протеини от действието на стомашната киселина. *H. pylori* притежава уникална решетъчна структура на периплазмата си с 18-стенна симетрия. Това дава възможност за една по-стабилна платформа за базалното телце на ресната, в което да има 18 генератора на въртящ момент; това спомага за ускоряване на придвижването във вискозен разтвор, какъвто е мукусният слой, покриващ стомашните епителни клетки (Qin *et al.*, 2017). За разлика от много други причинители на инфекции в гастроинтестиналния тракт *H. pylori* няма адхезивни пили (Kusters *et al.*, 2006).

### 3.2 Физиологични и културелни особености

*H. pylori* е микроаерофил и расте оптимално при кислородно съдържание 2 до 5% и допълнително се нуждае от 5 до 10%  $\text{CO}_2$  и висока влажност. Не се нуждае от  $\text{H}_2$ , но водородът не влияе отрицателно на растежа му. Най-често в лабораториите за култивиране на *H. pylori* се използват стандартни микроаерофилни условия в атмосфера с 85%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{CO}_2$  и 5%  $\text{O}_2$  (Kusters *et al.*, 2006).

Растеж се наблюдава при температури между 34°C и 40°C, с оптимум при 37°C. Независимо, че естественото му местообитание е киселата среда на стомашната лигавица, *H. pylori* се приема, че за растежа му оптимално е неутрално рН (Megraud & Lehours, 2007). Бактериите оцеляват при кратка експозиция на кисело рН <4, но развитие се наблюдава

само в относително тесни граници на киселинност рН от 5,5 до 8,0, като оптимален е растежът при неутрално рН (Burkitt *et al.*, 2017). Въпреки това, тези бактерии живеят тясно адаптирани със човешката стомашна мукоза, благодарение на това, че са способни да живеят в микроаерофилна атмосфера и да продуцират уреаза – ензим, който модулира средата, като увеличава рН вътре в самата бактериалната клетка; освен това чрез ресните си *H. pylori* може да достигне до дълбокия мукозен слой на стомашната стена, като използват механизмите на гостоприемника за предпазване на лигавицата и така заемат екологична ниша, в която да преживяват (Burkitt *et al.*, 2017).

### 3.3 Метаболизъм

*H. pylori* проявява тясна специализация към специфичен гостоприемник и орган, но инфекцията с този микроорганизъм обичайно е доживотна - това предполага силна приспособеност към естественото му местообитание – мукусния слой, покриващ стомашните епителни клетки (Burkitt *et al.*, 2017). В следствие на това при *H. pylori* липсват някои метаболитни пътища за биосинтез, които често се срещат при бактерии с по-широка екологична ниша (като например ентеробактериите) (Kusters *et al.*, 2006). От геномните сравнения и от метаболитните проучвания може да се заключи, че *H. pylori* има „скъсен” метаболитен път и при него липсват пътища за синтез на някои аминокиселини. Като резултат от това *H. pylori* може да расте само в среда с определен химичен състав с добавяне на аминокиселините аргинин, хистидин, левцин, метионин, фенилаланин и валин, като някои щамове се нуждаят и от аланин и/или серин (Kusters *et al.*, 2006). *H. pylori* е уреазо-, каталазо- и оксидазо-положителен, като тези характеристики често се използват при идентификацията му. Изследванията на генома и на биохимичната му активност на *H. pylori* показват, че глюкозата е единствената захар, която този микроорганизъм може да разгражда (Kusters *et al.*, 2006).

*H. pylori* е взискателен микроорганизъм и се нуждае от специални хранителни среди. Често в тези среди са добавени кръв или серум (Wang *et al.*, 2015). Тези суплемементи служат като допълнителен източник на хранителни вещества, както и за предпазване от токсичните ефекти на дълговерижните мастни киселини. Често използвани твърди среди за рутинна изолация и култивиране на *H. pylori* са Columbia или Brucella агар с добавена конска или овнешка кръв, или като алтернатива може да се добави серум от телешки

ембрион (Wang *et al.*, 2015). Има селективни антибиотични микстури за първична изолация и за култивиране, но те не са изрично необходими. Често използваният суплемент на Dent се състои от vancomycin, trimethoprim, cefsoludin и amphotericinB (Dent и McNulty, 1988). *H. pylori* образува малки (~1mm), прозрачни, гладки колонии, като изолирането на микроорганизма от проби от стомашни биопсии е трудно и невинаги е успешно (Kusters *et al.*, 2006). Културите трябва да се проследяват за растеж 3 до 10 дни при нелекувани пациенти и дори до четиринадесетия ден при болни след терапия (Garza-González *et al.*, 2014).

#### **4. Механизми на патогенност и вирулентност при *H. pylori***

Инфекцията с *H. pylori* на практика винаги води до развитие на хроничен гастрит, като повечето (около 80%) от заразените хора остават безсимптомни. Това се дължи на различния спектър на фактори на вирулентност при *H. pylori* - някои щамове са по-вирулентни от други (Kusters *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2016). Изходът от инфекцията зависи и от фактори на гостоприемника, например генни полиморфизми на интерлевкин-1(IL-1) и тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ), както и от диетични фактори (напр. прием на сол или месо) и фактори на средата (Israel и Peek, 2010).

##### **4.1 Геномна и щамова вариабилност**

Разчитането на генома на *H. pylori* рязко повиши познанията ни за този микроорганизъм. Множество гени на *H. pylori* силно повлияват началните етапи на стомашното възпаление и последващите заболявания. *H. pylori* е изключително добре приспособен към стомашната лигавица и притежава отворен пан-геном, което означава, че бактериите продължават да се променят чрез диверсификация на гените си или придобиване на нови гени (Furuta, 2014).

*H. pylori* показва огромно генетично разнообразие с висока честота на спонтанни мутации, вътрегеномни рекомбинации, допълвани от „повторни елементи” в генома, или интергеномни рекомбинации с несобствена ДНК посредством естествена трансформация при смесени инфекции (Dong *et al.*, 2009). Обичайната честота на мутациите при *H. pylori* е  $1 \times 10^{-6}$ , т.е. по-висока отколкото при видовете от семейство *Enterobacteriaceae*. Освен това, честотата на рекомбинации при някои нуклеотиди достига  $6.9 \times 10^{-5}$  (Dong *et al.*, 2009).

При *H. pylori* не е открита цялостна „mismatch repair” система, която да контролира конфиденциалността на репликацията, което обяснява високата честота на мутациите (Boyanova, 2011a).

Генетичното разнообразие на *H. pylori* се подпомага и от семейство хипервариабилни (RD) гени с повтарящи се ДНК-последователности (Fischer *et al.*, 2014). Моделите на RD генните повтори са свързани както с феномена „slipped-strand mispairing” („приплъзваща се верига” при репарацията на ДНК), така и с дубликации на домените. Наблюдава се голямо разнообразие при отделните щамове, което се дължи на броя, местоположението и подредането на RD гените (Fischer *et al.*, 2014).

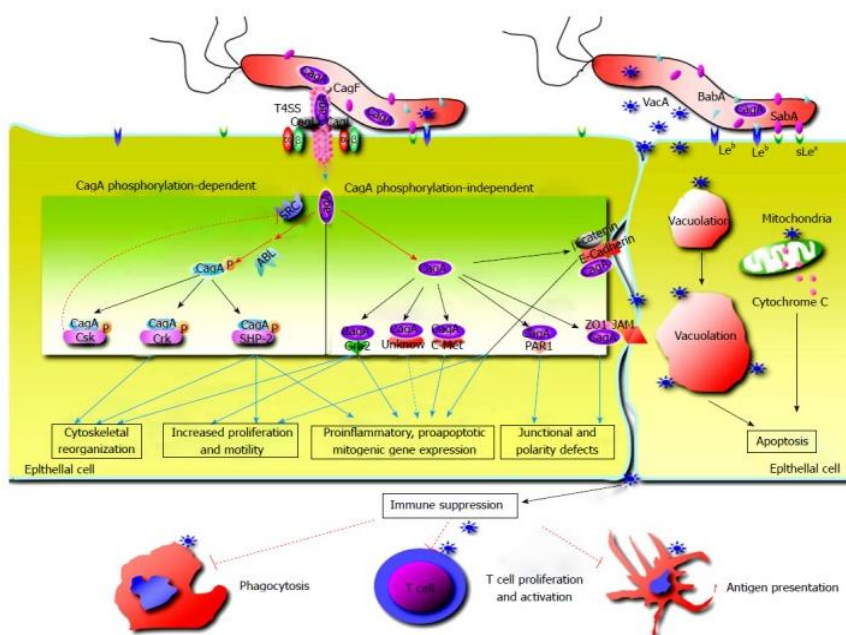
Процесът на естествена хомоложна трансформация е друг важен механизъм на геномното разнообразие на *H. pylori*, за приспособяването на бактериите и за обмяната на гени за резистентност към антибиотици – напр хинолони. Естествената трансформация при *H. pylori* е специфична, понеже ДНК не се внася в клетката посредством тип IV апарат, асоцииран с пили, а се поема от транспортна система, свързана с тип IV секреторна система (T4SS) – системата comB (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2014). При *H. pylori* са описани три типа T4SS: първата е T4SS, кодирана от *cag* острова на патогеност (*cagPAI*), втората е системата comB, която опосредства активния внос на свободна ДНК, а третата система е *tfs3* клъстер, чиято роля все още не е докрай установена (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2014). *H. pylori* използва своите R-М системи като преграда срещу хоризонтален трансфер на несобствени гени (Gorrell & Kwok, 2017).

Увреждането на ДНК може да индуцира естествена компетентност в *H. pylori* (Gorrell & Kwok, 2017). За разлика от други бактерии за *H. pylori* се съобщава, че може да активира едновременно и comB системата, и RecA-зависима експресия на протеин, наподобяващ лизозим. Този протеин може да уврежда прилежащи клетки с цел да освободи ДНК, която да се внесе в бактерия (Dorer *et al.*, 2010).

Наличието на хипервариабилни региони в *cagPAI* и други зони на пластичност предполага, че щамовете *H. pylori* могат да подобиват, губят и променят генетични структури по време на хронична инфекция, най-вече в зони на пластичност (Fischer *et al.*, 2014). Наблюдава се и адаптация на *H. pylori* към гостоприемника, основно дължаща се повече на рекомбинации, отколкото на загуба или придобиване на гени (de Reuse *et al.*, 2010).

## 4.2. Фактори на патогенност и вирулентност

В стомаха *H. pylori* може да бъде открит в мукуса, който покрива клетките, или вътреклетъчно, като в някои случаи (1% от клетките) вътреклетъчните бактерии могат да имат значение в патогенезата на инфекцията (Boyanova, 2011a). Инфекциозната доза при *H. pylori* вероятно варира между  $10^4$  и  $10^{10}$  бактерии (Graham *et al.*, 2004). Спиралната форма и наличието на ресни осигуряват въртеливиото движение на *H. pylori* през стомашния мукус, а множеството адхезини му позволяват селективно да се прикрепва към стомашните клетки. *H. pylori* произвежда големи количества уреаза, с което се предпазва от киселата среда в стомаха, и може да продуцира многобройни фактори на вирулентност, с които може да променя средата вътре в гостоприемника (Graham *et al.*, 2004) (Фиг. 3).



**Фиг. 3** Действие на факторите на вирулентност при *H. pylori* на ниво стомашна лигавица (Zhang *et al.* 2016)

Гените, отговарящи за вирулентността на *H. pylori* са щамово-специфични, фазово-вариабилни и имат вариабилни структури или генотипове (Yamaoka, 2008a; Oleastro *et al.*, 2009a). Щамово-специфичните гени, напр. *cagPAI* и гените, промотиращи дуоденалната язва (*dupA*), са представени в част от щамовете. Фазово-вариабилните гени, напр. инфламаторният външномембранен ген *oipA* и сиалова киселина свързващият адхезин *sabA*, се откриват във всички щамове, но поради фазовите вариации само някои гени

произвеждат активни генни продукти. В щамовете са представени и гени с вариабилни структури, тяхната активност и количеството на произведените протеини варират при различните щамове; примери за това са алелните мозайки на *vacA* и 3'-регионът на *cagA* (Yamaoka, 2008a; Oleastro *et al.*, 2009a). Факторите на вирулентност са от полза за *H. pylori*, що се отнася до доставянето на хранителни вещества и до условията, необходими за оцеляването в стомашната среда (Atherton & Blaser, 2009). За гостоприемника наличието на факторите на вирулентността, съчетани с хроничното възпаление в стомаха, могат да доведат до по-сериозен изход от инфекцията, т.е. пептични язви, стомашен карцином и лимфом на мукозо-асоциираните лимфоидни тъкани (MALT лимфом). Някои фактори на вирулентност могат да повлияят и успешната ерадикация на *H. pylori* (Zhang *et al.*, 2016).

#### 4.2.1 Уреаза

*H. pylori* се е приспособил да живее и оцелява в киселата среда в лумена на стомаха, където рН е 1-4.5 (Seo *et al.*, 2015). Уреята преминава през външната бактериална мембрана и навлиза в цитоплазмата (Ge *et al.*, 2013). Уреазата на *H. pylori* хидролизира уреята до CO<sub>2</sub> и амоняк, който неутрализира рН вътре в цитоплазмата на *H. pylori* и в периплазменото пространство, но в много по-малка степен в образуването на буферизиран „облак“ около бактериалната клетка (Kusters *et al.*, 2006). Уреазата и ресните на *H. pylori* са есенциални за колонизацията на стомаха при използване на модели от опитни животни (Kusters *et al.*, 2006).

Ензимът уреаза се състои от 12 UreA и 12 UreB субединици, кодирани от оперона *ureAB* (Scott *et al.*, 2010). За да се осъществи ефективна колонизация *H. pylori* се нуждае от множество фактори, сред които са активността на уреазата, инфлуксът на урея през специфични контролирани от рН уреини каналчета (UreI канали), които са уникални за стомашните *Helicobacter* spp., и от периплазмена  $\alpha$ -карбоанхидраза (Scott *et al.*, 2010).

Адаптацията на *H. pylori* към кисела среда зависи и от гените *rocF* (кодиращ аргиназа), *nixA* (никелов импортер) и *nikR* (транскрипционен фактор, отговарящ на никелов стимул) (Ge *et al.*, 2013). Наличието на никел е абсолютно необходимо за активността на уреазата. Освен това уреазната активност може да бъде редуцирана от кадмий-цинк-никелов ефлуксен комплексен протеин (CznC), който отговаря за експорта на никела. Този метало-

ефлуксен CznC протеин е есенциален за колонизацията на гостоприемника при животински модели (Duckworth *et al.*, 2009).

Освен че обуславя устойчивост към киселини, уреазата на *H. pylori* има и други ефекти, например взаимодействие с имунната система на гостоприемника. Индуцирането на производството на амоняк и на хипохлориста киселина от неутрофилните левкоцити е токсично за стомашните клетки. Уреазата на *H. pylori* може да осъществи *in vitro* активиране на моноцитите в периферната кръв и на макрофагите в лигавицата, като по този начин индуцира освобождаването на проинфламаторни цитокини и спомага за химиотаксиса на човешките моноцити (Kusters *et al.*, 2006). Уреазата на *H. pylori* стимулира индуцибелната NO-синтаза в макрофагите, която представлява важен фактор на вродения имунитет. Освен това, хеликобактерната UreB е способна да активира нуклеарния фактор- $\kappa$  (NF- $\kappa$ B) и да стимулира освобождаването на интерлевкин 8 (Seo *et al.*, 2015). IL-8 е химиотаксисен агент за неутрофилите и следователно е основният цитокин в патогенезата на инфекцията с *H. pylori* (Fazeli *et al.*, 2016). В обобщение, уреазната активност на *H. pylori* е с огромно значение за оцеляването на бактериите в киселинната среда в стомаха, но и уврежда стомашната лигавица, като усилва възпалението (Kusters *et al.* 2006; Seo *et al.*, 2015).

#### 4.2.2 Липополизахарид

Бактериалният липополизахарид (ЛПЗ) съдържа липид А, константен олигозахариден сърцевинен регион и силно вариабилна полизахаридна О-антигенна верига. В сравнение с други Грам-отрицателни бактерии, обаче, липид А на *H. pylori* е с много по-ниска ендотоксинова активност (Li *et al.*, 2016). Специфично за О-антигенните вериги при *H. pylori* е, че съдържат фукозилирани олигозахаридни антигени от системата Lewis, които помагат на бактериите да избегнат разпознаването от страна на имунната система, понеже притежават функционално сходство с подобни антигени по повърхността на човешките еритроцити и стомашни клетки (Nilsson *et al.*, 2008).

Поне пет гликозилтрансферазни гена при *H. pylori* водят до фазови вариации в Lewis антигените, сред които са *futA* и *futB*, кодиращи  $\alpha$  1,3-фукотрансферази (Nilsson *et al.*, 2008).

Наличието на гена *jhp0562* (за глюкозилтрансфераза) е отчетено като рисков фактор за пептична язва при проучване сред френски деца (Oleastro *et al.*, 2010). Клиничното значение на *jhp0562* се нуждае от допълнително доизясняване.

Силно киселинната среда в стомаха индуцира продължително във времето адаптиране на ЛПЗ по време на инфекция с щам *H. pylori* (Skoglund *et al.*, 2009). Наличието на антигените от група Lewis на повърхността на *H. pylori* представлява функционална мимикрия и може да доведе до промени в разпознаването от страна на гостоприемника, до стомашен аутоимунен отговор. Това улеснява бактериалната адхезия към стомашните клетки, т.е. – високото ниво на колонизация и по-честото навлизане на бактериите вътре в клетките (Skoglund *et al.*, 2009).

В обобщение, ЛПЗ на *H. pylori* е фактор на вирулентност с отношение към имунитета от страна на гостоприемника и индуцира имунен отговор, който може да е необходим за дълготрайната защита срещу инфектиране с *H. pylori*. От друга страна, ЛПЗ на *H. pylori* може да доведе както до имуносупресия, така и до имуностимулация в гостоприемника, и по този начин до персистирането на инфекцията и евентуално по-тежък клиничен резултат (Zhang, 2016; Dixon *et al.*, 2016).

#### **4.2.3 *cag* – остров на патогенност (*cagPAI*)**

В генома на *H. pylori* има региони (т.нар. „зони на пластичност” (ЗП)), които са с по-ниско (34-35%) G+C съдържание, и така изглеждат, като че ли са „чужда” ДНК в сравнение с хромозомата като цяло. Това би могло да в резултат на хоризонтален ДНК-пренос от генетично отдалечени бактериални видове (Yamaoka, 2008a). При различните изолати тези региони проявяват големи генетични вариации. Силно вариабилните гени в зоните на пластичност сериозно повлияват патогенезата на инфекцията и някои от тях служат като маркери за клиничния изход (Yamaoka, 2008a). Един от тях е *cagPAI*, размера му е (37-40 kb) и кодира 27-31 протеина (Olbermann *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). Островът може да бъде разделен на два региона, горен (ляв) *cagII* регион, който съдържа гени като *cagT*, *caga* (*virB11*) и LEC, и долен (десен) *cagI* регион, съдържащ *cagA*, *cagE*, *cagL*, *cagM* и много други гени (Olbermann *et al.*, 2010). Три свойства на *cagPAI* влияят най-силно върху патогенезата на инфекцията с *H. pylori*: инжектирането на *cagA* протеина от T4SS системата, вмъкването на пептидогликанни фрагменти в стомашните клетки и

стимулирането на отделяне на инфламаторни цитокини от клетките, например IL-8 (Alzahrani *et al.* 2014). Проинфламаторният цитокин IL-8, наричан още и неутрофил-активиращ фактор, мобилизира и активира неутрофилите и лимфоцитите, което води до възпаление (Shao *et al.*, 2014). Освен това увеличава и отделянето на гастрин, в резултат на което епителните клетки пролиферират (Shao *et al.*, 2014). Друг важен ефект на IL-8 е активирането на нуклеарния фактор-kB (NF-kB) и експресията на COX-2 (циклооксигеназа-2), като по този начин се осъществява про-ангиогенна активност и туморогенеза (Shao *et al.*, 2014).

Някои проучвания показват, че *H. pylori* е придобил *cagPAI* преди човешкия род да е започнал своята първоначална миграция от Африка към останалите континенти (Olbermann *et al.*, 2010).

*cag-T4SS* представлява апарат с множество субединици, който е оформен като „молекулярна инжекция“ с отвор на иглата (100-200 nm), която преминава през вътрешната и външната мембрани на *H. pylori* и се издава над клетъчната повърхност посредством пилус (Frick-Cheng *et al.*, 2016). Основата на *cag-T4SS* иглата е покрита от протеините CagT (VirB7 хомолог) и CagW (VirB9) (Johnson *et al.*, 2014). CagT, кодиран от гена *cagT* в региона *cagII*, стабилизира комплекса чрез дисулфиден мост с VirB9 хомолог (Johnson *et al.*, 2014; Frick-Cheng *et al.*, 2016). *cag-T4SS* пилусът носи CagC, CagX (VirB9) и CagT и е покрит до известна степен от голям силно антигенно вариабилен и киселинно-устойчив протеин CagY (VirB10), който протектира пилуса (Johnson *et al.*, 2014; Backert *et al.*, 2015). Пилусът може да носи CagA, CagL и CagI. *cagX*, *cagT*, и *cagY* мутантите на *H. pylori* са загубили способността си да въвеждат CagA в стомашните клетки на гостоприемника и не могат добре да колонизират опитни мишки. Променливият размер на CagY (VirB10 хомолог), дължащ се на делеции или дупликации в повтарящи се мотиви вътре в CagY-повторния регион, допринася за избягване на имунния отговор от страна на бактериите (Atherton & Blaser, 2009; Backert *et al.*, 2015).

В най-голямо количество сред протеините, кодирани от *cagPAI*, е CagC, който изгражда субединиците на пилуса (Backert *et al.*, 2015). CagA (една АТФаза, VirB11-хомолог) в комплекс с Hp1451 регулаторен протеин служат като молекулярен портал за преноса на CagA към вътрешната мембрана (Backert *et al.*, 2015). CagF е CagA-свързващ секреторен каперон, който контролира стъпката преди разпознаването на CagA и е „врата“, през която

CagA навлиза в секреторния канал (Backert *et al.*, 2015). CagD, разположен както интра-, така и екстрацелуларно, е с огромно значение за транслокацията на CagA и за стимулацията на отделянето на IL-8 (Backert *et al.*, 2015). Като цяло всеки един от компонентите на cag-T4SS изпълнява специфични задачи, въпреки че функциите на много от гените в острова на патогенност все още не са докрай изяснени (Backert *et al.*, 2015).

Системата T4SS се активира при контакт с човешки стомашни клетки (Backert *et al.*, 2015). След прикрепването cag-T4SS инжектира CagA онкопротеин в цитоплазмата на стомашните клетки и силно повлиява функционирането на тези клетки (Backert *et al.*, 2015). CagL усилва и стомашното възпаление, като без друга помощ, отключва разпространението на клетките и активира няколко тирозин-кинази (Tegtmeyer *et al.*, 2011).

Наличието на гена *cagA* не означава задължително, че *cagPAI* е интактен. За да „работи“ добре, *cagPAI* трябва да бъде интактен (*cagPAI*<sup>+</sup>) (Kusters *et al.*, 2006, Olbermann *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2016). Наличието на функционален *cagPAI* се свързва с развитието на пептични язви и стомашен карцином (da Costa *et al.* 2015; Matos *et al.* 2013). Интактен *cagPAI* е открит в около 50-60% щамове в Западните страни, но в >90% от тези в Япония, която е държава с много висока честота на стомашен рак, докато в Индия и Турция, които са държави с ниска честота на стомашния карцином *cagPAI*<sup>+</sup> щамове се срещат доста рядко (Boyanova, 2011a). *cagPAI* е в голяма степен запазен (57,1%) в японски щамове и по-слабо запазен в европейските (3-15,8%) щамове (Boyanova, 2011a). Следователно интактният *cagPAI* е изключително фажен фактор на вирулентността на *H. pylori* (da Costa *et al.* 2015; Matos *et al.* 2013).

#### 4.2.4 Цитотоксин-асоцииран ген А (*cagA*)

CagA е високоимуногенен протеин на *H. pylori* с молекулна маса 120-145-kDa и се кодира от гена *cagA* (da Costa *et al.*, 2015). Той се инжектира от описаната в предишната точка кодираната от *cagPAI* тип 4 секреторната машина. Преди инжектирането му в клетките на гостоприемника CagA е разположен по вътрешната повърхност на клетъчната мембрана, където се подлага на тирозиново фосфорилиране. Инжектиран от тип 4 секреторната машина CagA попада в клетката и се фосфорилира от тирозин кинази (SRC). Активираният кинази фосфорилират CagA в 3' региона на гена *cagA* на специфични

тирозинови места в повтарящ се Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) мотив, който е важен фактор на вирулентността на *H. pylori* (Yamaoka, 2012; Da Costa *et al.*, 2015).

Фосфорилираният CagA взаимодейства с широк спектър на сигнални молекули, напр. SHP-2, което води до морфологични промени и пролиферация в епителните клетки (Atherton & Blaser, 2009). В гостоприемника, считаната за онкопротеин SHP-2 тирозин-фосфатаза, взема участие в контрола на адхезията, клетъчния растеж и придвижването на клетката (Umeda *et al.*, 2009). *cagA*<sup>+</sup> щамовете на *H. pylori* се откриват в близост до стомашните клетки или в междуклетъчните пространства, докато *cagA*-отрицателните щамове се намират в мукозния гел или по апикалната повърхност на епителните клетки (Kusters *et al.*, 2006).

CagA води до промени в клетъчния цитоскелет, в тъканите на гостоприемника като клетъчно пролифериране, и допринася за доставянето на пептидогликанови фрагменти, които индуцират освобождаването на проинфламаторни цитокини – основно IL-8 (da Costa *et al.*, 2015). Нивата на IL-8 показват зависимост от функционалността на EPIYA-C мотивите (Papadakos *et al.*, 2013). CagA може при инжектирането си в епителните клетки на гостоприемника да действа директно като индуцира секрецията на IL-8, независимо от фосфорилирането (Lamb и Chen, 2013). Секрецията на IL-8 зависи основно от инжектираните пептидогликанови фрагменти (Yong *et al.*, 2015).

Резултатите най-вече в Западните страни показват, че CagA увеличава риска от пептични улцерации и не-кардиален стомашен карцином (Kusters *et al.*, 2006, da Costa *et al.*, 2015).

Най-общо, фосфорилираният CagA модулира активирането на ГТФаза, индуцираща цитоскелетни пренареждания, като се получава повишен мотилитет и елонгация на стомашните клетки и увеличена ангиогенеза. Нефосфорилираният CagA повлиява множество сигнални каскади, което води до промени в поляритета на клетките, нарушаване на междуклетъчните връзки, клетъчна пролиферация, възпаление и редуциране на апоптозата (Backert *et al.*, 2010, da Costa *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2016).

Комбинираните ефекти на CagA могат да доведат до тежко възпаление и увреждане на стомашната лигавица, активиране на протоонкогени и риск за развитие на пептична язва или стомашен карцином. Клетъчната пролиферация, митотичните увреждания и хромозомна нестабилност могат да иницира туморогенезата (Umeda *et al.*, 2009). CagA

може също така да модулира индуцирания от *H. pylori* сигнал за апоптоза и така да увеличи риска за канцерогенеза, но точния механизъм все още не е напълно изяснен (Hagymasi and Tulassay, 2015).

Освен това CagA потиска и клатрин-независимата пиноцитоза и по този начин и навлизането и действието на VacA в клетките на гостоприемника (El Khadir *et al.*, 2017).

Цитотоксин-асоциираният ген (*cagA*) е силно дивергентен в Източноазиатските в сравнение със Западните щамове (Duncan *et al.*, 2013). Генът *cagA* присъства в повечето щамове *H. pylori* от Япония, но само в 50-70% от щамове в западните страни. Честотата на *cagA*<sup>+</sup> щамове при пациенти с пептични язви или стомашен карцином обикновено е >66.7%, като достига и до 100%. В Източна Азия (Япония, Южна Корея и Китай) и някои други държави, напр. Нигерия и Южна Африка, се открива висока (често >90%) честота на *cagA*<sup>+</sup> щамове, което обикновено води до липса на статистически значима връзка с типа на заболяването (Shiota *et al.*, 2013). Високата честота на *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* щамове в Източна Азия корелира с високата честота на стомашния рак в този регион (Zhang *et al.*, 2016).

Сред европейските щамове честотата на *cagA*<sup>+</sup> е от 51.3% във Франция до 93.8% в Сърбия и Черна Гора, като в страните от Югоизточна Европа (напр. Гърция, Турция, Сърбия и Черна Гора) обичайно е висока (>77%) (Boyanova 2011a). Обаче пептични язви, стомашен карцином и особено MALT лимфом могат да се наблюдават и при някои пациенти с *cagA*-негативен статус (Yamaoka & Graham, 2014). Независимо от всичко, клиничният резултат от инфекцията с *H. pylori* зависи не само от CagA, но и от наличието на интактен *cagPAI* и CagA EPIYA последователностите (Shiota *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2015).

Вариациите в активността на *cagA* зависят от броя на повторните последователности в 3' региона на гена (Yamaoka, 2012). Фосфорилирането на CagA настъпва в тирозиновите остатъци на EPIYA мотивите. Те са фланкирани от повтарящи се ДНК-последователности, които участват в рекомбинации (Yamaoka, 2012).

CagA EPIYA включва EPIYA-A, B, C, и D мотиви в зависимост от аминокиселинните последователности, обграждащи EPIYA последователността (Yamaoka 2012). EPIYA-A и EPIYA-B мотивите присъстват във всички щамове по света. Мотивът EPIYA-C допълнително присъства в Западните щамове (в Европа, Северна Америка, Австралия, Южна Азия и Африка). EPIYA-D мотивът е много чест в Източна Азия (Япония, Китай и Корея (Yamaoka *et al.*, 2012; Hagymási & Tulassay, 2014). Известно е, че азиатските страни

са такива с висок риск от стомашен карцином, напр. Япония, Китай и Корея; средно висок риск, напр. Vietnam; или с нисък риск, напр. Тайланд и Индонезия (Ang *et al.*, 2014). Следователно са известни два основни типа CagA протеин (Източноазиатски и Западен). CagA протеините обичайно имат EPIYA-A и EPIYA-B места (сайтове), последвани от 1-3 (максимум до 5) EPIYA-C повтори при Западните CagA или EPIYA-D мотиви в Източноазиатските CagA (Yamaoka, 2012). Сред Източноазиатските изолати най често със стомашен рак се асоциира EPIYA-ABD (Yamaoka, 2012).

Източноазиатските CagA проявяват изключителна вирулентност. Фенотипът колибри”, т.е. появата на силно удължени клетки с дълги протрузии, се свързва с появата на стомашен карцином. Предполага се, че повишената подвижност на тези клетки участва при растежа и инвазирането на рака (Yong *et al.*, 2015). Индуцирането на „фенотип колибри” и онкогенните свойства на CagA са свързани с типа на EPIYA мотивите, като ABD >ABCCC >ABCC >ABC (Megraud, 2008). В Западните държави силата на CagA тирозин-фосфорилирането се свързва с увеличения брой CagA EPIYA-C мотиви, които стимулират фосфоорилазо-зависимата активност на CagA и са основният фактор за метаплазия и стомашен карцином (Bridge and Merrell, 2013).

Важно значение има фактът, че наличието на *cagA* гена се асоциира с успех на антихеликобактерната терапия. Нисковирулентните *cagA*-отрицателни/*vacA* s2 тип щамове, които превалират при неязвените пациенти, са с по-висок риск за неуспех при ерадикационната терапия, отколкото вирулентните *cagA*<sup>+</sup>/*vacA* s1 щамове, които са чести сред язвено-болните (Boyanova, 2011a).

Диетичните фактори изглежда повлияват вирулентността на *H. pylori*. Например, високата консумация на сол може да увеличи вирулентността на бактериите (Gaddy *et al.*, 2013). Съвместното култивиране на СЕК с *H. pylori* при високи концентрации на сол показва повишени нива на тирозин-фосфорилиран CagA и по-висока секреция на IL-8 от клетките в сравнение с онези, които са култивирани при ниски концентрации на NaCl (Gaddy *et al.*, 2013).

#### 4.2.5 Цитотоксин-асоцииран ген E (*cagE*) и други гени от острова на патогенност *cagPAI*

Генът *cagE*, локализиран преди *cagA* в дясната половина на *cagPAI*, кодира протеин, който опосредства цитоскелетни промени в стомашните клетки на гостоприемника и взема участие при отделянето на IL-8 в клетките (da Costa *et al.*, 2015). Приема се, че *cagE* е много сигурен маркер за наличието на *cagPAI* заедно с *cagA* (Ramis *et al.*, 2013). Установено е също така, че *CagE*, *CagM*, и *CagL* осъществяват репресия върху транскрипцията на  $\alpha$  субединицата на Н/К-АТФазата на париеталните клетки а следователно и на експресията на протонната помпа в стомашната мукоза, което води до хипохлорхидрия и повишен риск от стомашен карцином (Hammond *et al.*, 2015). *cagE* повлиява свойствата на биофилма *in vitro*, като *cagE* мутантите показват повишен растеж на биофилм от *H. pylori* в присъствието на стомашен муцин (Cole *et al.*, 2004). Следователно *cagE* мутантите осигуряват по-висока резистентност към механизмите на клирънса и фагоцитозата при бактериите в биофилмите в сравнение с планктонните бактерии; все пак тези резултати следва да се потвърдят в повече проучвания (Cole *et al.*, 2004).

Според някои проучвания не само *cagA* и *cagE*, но и други гени от *cagPAI* се свързват с по-тежки заболявания, напр. *cagM*, *cagT*, *cagA(virB11)*, *cagY/7* (*VirB10* хомолог) и *LEC* (Ling *et al.*, 2013). В Бразилия, *cagA* и *cagE* гените са свързани с по-висока честота на пептични язви, а *cagE* и *virB11* са свързани със стомашния карцином, като при това заболяване, *cagE+virB11+* е бил най-честия генотип (50%) (Lima *et al.*, 2011). В едно друго бразилско проучване генът *virB11* се открива в почти всички щамове, докато асоциация с пептични язви е доказана за гена *cagT* (Pacheco *et al.*, 2008). Отново в Бразилия *cagA*, *cagM*, *cagT* и *LEC* се свързват с пептични язви, но само за гените *tnpA* и *LEC* се доказва връзка със стомашния карцином (Mattar *et al.*, 2010). В Турция *cagA*, *cagE* и *vacA sla* генотип са асоциирани с дуоденални язви и стомашен карцином, като *cagE* и *vacA sla* генотипът са независими предиктори за дуоденалната язва, а *cagE* и кръвногруповия антиген-свързващ адхезин (*babA2*) са рискови фактори за стомашен рак (Erzin *et al.*, 2006).

Независимо от всичко гореизложено асоциацията на гените от *cagPAI* със заболяванията не е абсолютна и отсъства в щамове от Източна Азия, поради високата *cagE*<sup>+</sup> и *cagA*<sup>+</sup> честота (Chomvarin *et al.*, 2008; Yamaoka, 2012). При проучване сред деца от САЩ честотите на *cagA*<sup>+</sup> и *cagE*<sup>+</sup> щамове са сходни, докато в Турция и Тайланд *cagA*<sup>+</sup> генотипът е по-чест (Podzorski *et al.*, 2003; Erzin *et al.*, 2006; Chomvarin *et al.*, 2008). От диагностична гледна точка наличието на *cagE* може по-добре да предскаже наличието на интактен *cagPAI*, отколкото статусът на *cagA*. (Lima *et al.*, 2011).

#### 4.2.6 Вакуолизиращ цитотоксин (VacA)

За разлика от *cagA*, генът за вакуолизиращия токсин (*vacA*) присъства във всички щамове *H. pylori*, но биологично активната форма на VacA обикновено се открива едва в 40-50% от случаите (Atherton & Blaser, 2009) и това се дължи на вариации в последователностите на *vacA* гена, поради което се получава „мозаична структура” на сигналните (s), средните (m) и междинните (i) алели (Yamaoka, 2012).

Прекурсорът на VacA протоксин с молекулна маса 140-kDa, който бива протеолизиран по време на секрецията си и се получават сигнална последователност от 33 аминокиселини, и секреторен пептид с маса 12-kDa и С-терминален домен, свързан с бактериалната клетка (Foegeding *et al.*, 2016). VacA се свързва с протеините RPTPα и RPTPβ и със сфингомиелина по повърхността на епителните стомашни клетки, с фибронектина и с различни липиди по Т-клетките и др. (Yahiro *et al.*, 2016). Сфингомиелинът е важен за свързването на VacA с клетъчните мембрани и за вакуолизиращата му активност (Isomoto *et al.*, 2010).

Протеинът VacA има ключово значение в патогенезата на инфекцията с *H. pylori*. За разлика от други бактериални токсини, които образуват пори в мембраните, токсинът VacA действа вътреклетъчно (Foegeding *et al.*, 2016).

В зависимост от местоположението на VacA този токсин притежава няколко вида активности. Ако след олигомеризация токсинът се погълне чрез ендоцитоза от стомашните епителни клетки, тогава се образува комплекс от шест VacA субединици и се получава хексамерен анион-селективен мембранен канал в мембраните на ендозомите (Isomoto *et al.*, 2010). Така токсинът индуцира изтичане на хранителни вещества от клетките и в тях се образуват големи вакуоли (Isomoto *et al.*, 2010).

VacA може да се свърже с митохондриалните мембрани и да образува пори в тях (Foegeding *et al.*, 2016). Той индуцира апоптоза на стомашните клетки, активирайки проапоптотичното семейство Bcl-2 протеини, които са в огромни количества в митохондриите и индуцират освобождаването на цитохром с (Isomoto *et al.*, 2010).

Когато е свързан с рецептори по клетъчната мембрана, VacA причинява промени в клетъчните функции и индуцира развитието на проинфламаторен отговор (Chung *et al.*, 2010). VacA усилва секрецията на IL-8 и на простагландин E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) чрез активиране на p38 MAPK (митоген-активирана протеин киназа)/ ATF-2 (транскрипционен активиращ фактор 2) каскада (Chung *et al.*, 2010).

В случай че токсинът премине през здравите межклетъчни връзки, той води до имуномодуляция на Т-клетките и на други имунни клетки (Djekic & Müller, 2016; Isomoto *et al.*, 2010).

В обобщение, когато бива приет в клетките чрез ендоцитоза, VacA образува мембранни канали и и вакуолизация на стомашните епителни клетки, или инициира проинфламаторен отговор, ако се свърже на повърхността на клетките, или модулира активирането/пролиферацията на Т- и В клетките, в случай че токсинът премине през здравите межклетъчни връзки, или, ако VacA достигне до митохондриите, индуцира клетъчна апоптоза (Isomoto *et al.*, 2010). VacA е мултифункционален фактор на вирулентността на *H. pylori*, който действа и на стомашните епителни клетки, и на имунните клетки (Palframan *et al.*, 2012).

Сигналният регион на *vacA* кодира сигналния пептид и N-края на зрелия протеин и има s1 (тип sla, sib или sic) и s2 алели. Средният (mid) регион съществува като m1 (m1a, m1b и m1c) или m2 (m2a и m2b) алели. Междинният (i) регион на *vacA* има три алелни типа i1, i2 и сравнително по-скоро открития i3 (Chung *et al.*, 2010).

Различията в честотата на стомашния карцином според географския регион се дължат, поне отчасти, на вариации в *cagA* и *vacA* генотиповете. Западната група обхваща щамове със Западен тип 3' регион на *cagA* и *vacA* s2 или sla/mla генотип, докато тези с Източноазиатски тип 3' на *cagA* и *vacA* slc/mlb генотип оформят източноазиатската група, която е свързана с висока честота на стомашния рак (Yamaoka, 2012). Вероятно това има връзка с мозаичните комбинации на *vacA* в трите алелни типа, като всеки алел може да демонстрира по-слаба или по-силна активност (Yamaoka, 2012).

Сигналният *vacA* регион повлиява вакуолизиращата активност на цитотоксина. Почти всички форми на *s1* притежават цитотоксична активност, докато при *s2* формата тази активност е блокирана от един хидрофилен сегмент от 12 аминокиселини (Dong *et al.*, 2009). Средният (mid) регион е детерминанта на специфичността на свързването на *VacA* към различни епителни клетки (Chung *et al.*, 2010). Щамове с *vacA m1* тип са свързани с по-силно увреждане на стомаха, отколкото тези с тип *m2*; типът *vacA s1a* причинява по-сериозна инфилтрация на стомаха от неутрофили и лимфоцити, отколкото типа *s1b*, а в същото време типът *s2* не показва забележима активност спрямо стомашните клетки (Podzorski *et al.*, 2003). От друга страна в Коста Рика *cagA*<sup>+</sup> статус и *vacA s1b* алелът се свързват със стомашния карцином (Con *et al.*, 2009). При турски пациенти с хроничен гастрит неутрофилната инфилтрация в корпуса на стомаха е по-висока при щамове *H. pylori* с *m1*, отколкото с *m2* (Umit *et al.*, 2009). В Германия *vacA m1* алелът е най-често срещаният при пациенти с MALT лимфом (Koehler *et al.*, 2003).

Има данни, че типът на *vacA i* е по-добър предиктор за щамова вирулентност в сравнение с типовете на *vacA s* и/или *m* (Douraghi *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010). При пациенти от Италия и Иран е съобщена връзка между алела *vacA i1* и стомашния карцином или с пептични язви (Rhead *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008). Алелът *vacA i3*, който вероятно проявява активност подобна на *i2*, се открива по-често в щамове от Турция (25.7%), отколкото в Китай (3.3%; Chung *et al.*, 2010).

Въпреки това, по подобие на много други гени на вирулентността, в Източна Азия не се установява връзка между *vacA s1* и *i1* и стомашното увреждане (Yamaoka *et al.*, 2008a) поради високата честота на тези алели - повечето Източноазиатски щамове имат вирулентния *vacA i1* алел, чиято честота достига 93.3% в Китай (Ogiwara *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010). В сравнение със Западните щамове Източноазиатските имат по-често и генотиповете *vacA s1*, *m1*. В Западните държави *vacA m1*, *i1* повишават риска от стомашен карцином (Ogiwara *et al.*, 2008).

Честотата на различните *vacA* генотипове варира в различните страни. Примери за преваляращи типове са *vacA s1c* и *m1b* в източна Азия, *s1a* и *m1c* в Южна Африка, и *m1a* в Европа и Африка (Yamaoka *et al.*, 2008a). Алелът *vacA s1a* се среща често при щамове от Америка и Северна и Източна Европа, докато *s1b* е чест в Латинска Америка, Испания и

Португалия (Boyanova, 2011a). Откриват се и различия в честотите на *vacA* алелите по региони в една и съща страна, както и при различни възрастови групи (Boyanova 2011a).

Някои комбинации от алели на *vacA* имат значение за клиниката. Количеството на цитотоксина е голямо при щамове с генотип *s1/m1*; междинно при типа *s1/m2* и ниско или липсващо при типа *s2/m2* (Backert & Tegtmeyer, 2010). Типът *s2/m1* е рядък и не отделя токсин (Backert & Tegtmeyer, 2010). В Западните държави щамовете от тип *s1/m1* се свързват с наличие на пептични язви и стомашен карцином (Kusters *et al.*, 2006). В държави с висока честота на стомашния рак, каквито са Япония и Корея, почти всички щамове *H. pylori* показват генотип *vacA s1/m1*, докато в страни, в които стомашният карцином е по-рядко срещан, като Турция и Тайланд, <60% от щамовете проявяват този генотип (Nguyen *et al.*, 2008). Пациентите със стомашен карцином обикновено имат щамове с генотип *s1/m1* (Yamaoka *et al.*, 2008a).

Високовирулентните тройни алелни комбинации също следва да се вземат предвид. Повечето *s1/m1* щамове проявяват и вирулентния *i1* подтип, докато повечето *s2/m2* щамове са от подтип *i2*. От друга страна, честотата на *vacA i1* сред *s1/m2* щамовете варира според държавата, напр. повечето *s1/m2* щамове са били от подтипа *i1* в щамове от Китай (93,3%) за разлика от Турция (27,3%), въпреки високата честота на *CagA* в тази страна (Chung *et al.*, 2010). Сред *s1/m2* щамовете само малка част (8%) от Източноазиатските щамове са *i2*, спрямо около половината при Западните щамове (Yamaoka *et al.*, 2008a). Често изолатите от типове *s1* и *s1/m1* са свързани с *cagA*<sup>+</sup> статуса (Chung *et al.*, 2010).

Важно е обаче, че вакуолираща активност и асоциация с най-тежките стомашни заболявания показват не само щамовете с *s1/i1/m1*, но и тези с *s1/i1/m2* тип (Rhead *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008). Високото превалиране на щамове от типовете *vacA s1/i1/m1* и *s1/i1/m2* в Източна Азия е фактор, който допринася за високата честота на стомашния рак в този регион (Atherton & Blaser, 2009).

Освен това, токсинът *VacA* може да покаже еволюция *in vivo* и да промени нивото си на токсичност чрез рекомбинации с други щамове *H. pylori* в случаи на смесени инфекции. Смесените инфекции са с по-голяма честота в някои региони, най-вече в развиващи се страни като Венецуела (55%) и Тунис (31,4%), отколкото в Северна Америка, Словения или България (10,2-11,5%); Boyanova, 2011a). Щамовете от смесени инфекции са по-

резистентни на антибиотици и по-вирулентни в сравнение с тези при инфекции с единичен щам (Boyanova, 2011a).

Важно е, че вирулентните щамове от тип *cagA<sup>+</sup>/vacA s1a* се ерадикират по-лесно, отколкото останалите (Boyanova, 2011a). VacA и CagA могат взаимно да „регулират надолу“ активностите си спрямо стомашната лигавица и да предотвратяват ексцесивно увреждане. CagA може да инхибира по два механизма апоптозата, индуцирана от VacA. Както ранната активност на фосфорилирания CagA, която пречи на пиноцитирания VacA да достигне до митохондриите, така и късното действие на нефосфорилирания CagA, който блокира индуцираната от VacA клетъчна смърт на митохондриално ниво, предпазват стомашните клетки от действието на VacA (El Khadir *et al.*, 2017). VacA подтиска EGF-рецепторната сигнализация, която е необходима за клетъчното разпръскване и елонгация (Pachathundikandi *et al.*, 2013). В СЕК *cagA*<sup>-/-</sup> и *cagE*<sup>-/-</sup> мутантите промотират индуцираната от VacA вакуолизация, а *vacA* мутантите провокират по-широкото разпространение на индуцирания от CagA „фенотип колибри“ в сравнение с щамовете от дивия тип. Така CagA намалява вакуолизацията, а VacA пък намалява образуването на клетки с „фенотип колибри“ (Argent *et al.*, 2008). Посредством CagA *H. pylori* защитава прикрепените стомашни клетки от токсина VacA, образувайки едновременно и защитени, и незащитени популации от клетки (El Khadir *et al.*, 2017). Следователно, противоположните ефекти на CagA и VacA спомагат за хронифицирането на инфекцията и причиняват разнообразието на заболяванията, индуцирани от *H. pylori* (El Khadir *et al.*, 2017).

#### 4.2.7. Ген, промотиращ дуоденалните язви (*dupA*)

Генът *dupA* в зоната на пластичност на *H. pylori* кодира хомолог на VirB4 АТФаза, която взема участие в импорта и преноса на ДНК и протеини. В генома на щам J99 *dupA* включва два припокриващи се гена (*jhp0917* и *jhp0918*), но в повечето (>97%) от останалите щамове *dupA* има инсерция от 1 bp след позиция 1385, което води до изместване на рамката на четене и се получава по-дълъг ген (Lu *et al.*, 2005; Yamaoka, 2008a). Щамовете се отчитат като *dupA<sup>+</sup>*, ако са положителни за двата гена и са с гореупоменатата еднобазова инсерция (Yamaoka, 2008a).

Данните за значимостта на *dupA* са противоречиви. Доказано е, че генът индуцира секрецията на IL-8 от стомашните клетки посредством активиране на транскрипционни фактори, отговарящи за промоторната активност на IL-8, както и за стабилността на щамовете в среда с ниско рН (Lu *et al.*, 2005). От друга страна Schmidt *et al.*, (2009) не откриват връзка между *dupA* и индуцирането на IL-8 *in vitro* (Schmidt *et al.*, 2009). Сред мутантите с делеции в *dupA* активирането на транскрипционните фактори за тумор-супресорния ген p53 е слабо (Lu *et al.*, 2005b), което предполага, че генът има антитуморен ефект. Hussein *et al.*, (2010) докладват два типа *dupA*: по-дълъг *dupA* (1884bp; *dupA1*), който присъства в повечето щамове, и „орязан” тип (*dupA2*). Типът *dupA1* може да причини стомашно възпаление посредством увеличение на отделянето на индуцирани от *H. pylori* IL-12p40 и IL-12p70 от CD14<sup>+</sup> мононуклеарните клетки (Hussein *et al.*, 2010).

При изследване на 500 щамове *H. pylori* от Източна Африка и Южна Америка, *dupA* е бил съобщаван като рисков фактор за дуоденална язва; откъдето и името, дадено на гена. Генът се е оказал два пъти по-често срещан (42%) при пациенти с язва на дванадесетопръстника, отколкото при такива с гастрит (21%; Lu *et al.*, 2005). Връзката между *dupA* и дуоденалната язва, обаче, не е универсална. Проучвания в Белгия, Бразилия, Иран и Швеция не показват такава връзка, за разлика от съобщаваното в Източна Азия (Китай, Южна Корея и Япония) и Колумбия (Lu *et al.*, 2005; Douraghi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009, Pereira *et al.*, 2014).

Някои автори считат *dupA* за протективен срещу стомашен карцином (Hagymasi & Tulassay, 2014), но според Schmidt *et al.*, (2009), независимо че *dupA* е висококонсервиран ген, той не показва значима връзка с риск от язва на дванадесетопръстника, нито със стомашния карцином (Schmidt *et al.*, 2009). Що се отнася до действието на *dupA*, наблюдават се географски различия. Щамовете с *dupA*<sup>+</sup> генотип показват негативна асоциация със стомашни язви и карциноми в Южна Америка, но пък в Китай имат връзка със същите тези заболявания (Hussein, 2010).

По света честотата на *dupA*<sup>+</sup> щамовете варира от <20% до 89%, като общата тенденция е те да са по-редки в страни, където стомашният карцином е често срещан (Hussein, 2010). Мета-анализ показва, че *dupA* в едни държави се свързва с дуоденалните язви, докато в други – със стомашни язви и стомашен карцином (Hussein, 2010). В друг мета-анализ се твърди, че положителният *dupA* генотип увеличава риска от язва на дванадесетопръстника

1.41 пъти, без да има връзка със стомашни язви и карциноми (Shiota *et al.*, 2010). В обобщение, в различни региони на света *dupA*<sup>+</sup> щамовете са свързани с промотиране или на пептичните язви, или на стомашния карцином, или са без значение за клиничния изход от инфекцията с *H. pylori*. Вероятно този ген е с по-важно значение за резултата от инфекцията в страните от източна Азия, отколкото в Западните държави (Shiota *et al.*, 2010).

Gomes *et al.*, (2008) наблюдават мутация с изместване на рамката на четене при 16% от секвенираните *dupA*<sup>+</sup> проби. Инсерция на една аденинова база след позиция 1426 на *dupA* или при позиция 2998 на *jhp0917-jhp0918* гена на щама J99 води до преждевременен стоп-кодон, което може да намали активността на генния продукт (Gomes *et al.*, 2008). Откриването на цялостен DupA протеин е важно за диагностиката и следователно може да се мисли за прилагане на имуоблот техника. Точната детекция на *dupA* следва да включва още и PCR-секвениране или PCR с няколко вместо с една двойка праймери (Yamaoka, 2008a; Matteo *et al.*, 2010). Чрез тези методи е възможно да се определи мутация с изместване на рамката, която води до промяна на генната експресия на протеина DupA (Matteo *et al.*, 2010).

#### **4.2.8. *iceA* (индуциран от контакт с епитела ген А)**

Генът *iceA* има два алела *iceA1* и *iceA2* (Huang *et al.*, 2016). Алелът *iceA1* кодира CATG-специфична рестрикционна ендонуклеаза и се индуцира при контакт на *H. pylori* със стомашните клетки. *iceA* модулира освобождаването на IL-8 от стомашните епителните клетки на гостоприемника (Shiota *et al.*, 2012).

По-вирулентният *iceA1* алел е чест в Източна Азия, докато *iceA2* се среща по-често в Америка (Shiota *et al.*, 2012).

Значимостта на *iceA* алелите все още е спорен въпрос. В някои държави (особено в Китай) *iceA1*<sup>+</sup> щамовете увеличават риска от развитие на тежки заболявания като пептични язви или стомашен карцином, но други проучвания не откриват такава връзка (Huang *et al.*, 2016). *iceA2* не корелира с тежестта на клиничната картина (Huang *et al.*, 2016), но в Турция и Венецуела *iceA2* алелът – с хроничния гастрит (Caner *et al.*, 2007; Chiurillo *et al.*, 2010). Всичко това предполага, че е по-важно да се изследва координирания ефект от всички гени на вирулентността на *H. pylori*, отколкото само на *iceA* алелите.

Комбинациите на *iceA1* с други фактори на вирулентност могат да имат важно значение. В Аржентина не се открива връзка между стомашното увреждане и статуса на *iceA1* или *cagA*, но тройно вирулентния генотип (*cagA*<sup>+</sup>, *vacA* s1/ m1 and *iceA1*) се среща по-често при пациенти с пептични язви, отколкото в случаи на неязвени заболявания (Vega *et al.*, 2010).

#### 4.2.9. Адхезини като фактори на вирулентност при *H. pylori*

Адхезията на *H. pylori* към стомашните епителни клетки е от съществено значение за установяването на инфекцията и за се предотврати клирънсът на бактериите от стомаха при преминаването на течности и при перисталтика (Boyanova, 2011a). Бактериите се свързват със стомашната мукоза, като процесът на прикрепване и отделяне от епителните клетки е много динамичен (de Reuse *et al.*, 2010). Около 4% от генома на *H. pylori* кодира гени за външномембранни протеини (OMP), което е много повече, отколкото при повечето други бактериални видове (Dossumbekova *et al.*, 2006), а това показва, че адхезията е важна предпоставка за инфекцията с *H. pylori*. Този микроорганизъм използва множество OMP адхезини, като BabA, SabA, OipA, AlpA и AlpB (Dossumbekova *et al.*, 2006). Много от гените, които ги кодират, напр. *oipA*, *sabA*, *sabB*, *babB*, *babC* и *hopZ* претърпяват фазова вариация чрез slipped-strand mispairing. Този процес включва делеция или инсерция на нуклеотиди по време на ДНК-репликацията в повторни последователности, обичайно в близост до 5' краищата на гените, което променя рамките им на четене (Odenbreit *et al.*, 2009). Така гените биват в активно („включено“) или неактивно („изключено“) състояние, т.е. един и същи ген може да произвежда или да не произвежда функционални протеини, което е адаптационен механизъм (Boyanova, 2011a).

Муцините са гликозилирани гликопротеини с висока молекулна маса, които овлажняват и предпазват стомашни епителни клетки. *H. pylori* може да се свързва с муцините по различни механизми, включително свързване на BabA към фукозилирани и на SabA към сиалирани структури (Linden *et al.*, 2010). Специфичната адхезия към слюнчени, но не и към стомашни муцини при някои щамове *H. pylori* може да доведе до колонизация в устната кухина и вероятно до предаване на инфекцията по орално-орален механизъм (Linden *et al.*, 2010). В устната кухина, където рН е неутрално, муцинът може да се свърже чрез свързващия сиалова киселина адхезин SabA и BabA (Linden *et al.*, 2010).

#### 4.2.10. Функционален статус на гена за инфламаторен външноембранен протеин (*oipA*)

Инфламаторният външноембранен протеин (*OipA*, 34kDa) действа като адхезин и индуцира, макар и не в такава степен, както *CagA*, освобождаването на IL-8 от лигавицата, което води до развитието на дуоденална язва и стомашен карцином; тази връзка, обаче, не е универсална (Yamaoka & Graham, 2014). Генът *hp0638*, който кодира протеина *OipA*, присъства във всички щамове *H. pylori*, но експресията му зависи от фазова вариация с различен брой СТ динуклеотидни повтори в 5' региона (регион, кодиращ сигнален пептид) на гена *oipA* (Kusters et al, 2006). Мутация с изместване на рамката на четене (загуба или добавяне на СТ динуклеотиди) може да „изключи” рамката на четене и да инактивира гена. За определяне на статуса *oipA* по броя на СТ динуклеотидните повтори се използва нуклеотидно секвениране (Kausser et al., 2005a,b; Matteo et al., 2010). При 5, 7 или 8 (и по-рядко при 4, 9, 10 и 12) динуклеотидни повтора в сигналния регион рамката се измества и генът се „изключва” (off), докато при 6, 9 или 5 + 2 СТ повтора генът е „включен” (on) (Kausser et al, 2005b; Dossumbekova et al., 2006). Въпреки това някои щамове с 9 СТ повтора могат да са извън рамката на четене поради делеции.

*CagA*<sup>+</sup>/*OipA* “on” щамовете произвеждат най-много IL-8, над два пъти повече, отколкото при *CagA*<sup>+</sup>/*OipA* “off” щамове и многократно повече, отколкото при двойно-отрицателните щамове (Odenbreit et al, 2009). Други проучвания, обаче, не откриват връзка на *oipA* “on” статуса с продукцията на IL-8 (Dossumbekova et al. 2006). Според друго проучване *OipA* индуцира секрецията не само на IL-8, но и на други проинфламаторни цитокини от СЕК, като IL-1, IL-8 и IL-17 (Yamaoka et al, 2008a).

При *cagPAI*<sup>+</sup> щамовете често се открива функционален („включен”) *oipA*. Сред щамове обикновено всички *cagA*-отрицателни щамове са с *oipA* извън нормалната рамка на четене срещу много малък процент от *cagA*<sup>+</sup> щамовете (Yamaoka & Graham, 2014). Все пак, както и за много други фактори на вирулентността на *H. pylori*, географските вариации в честотата на този ген са много сериозни.

При Западните щамове статуса на *oipA* в рамката на четене е свързан с тежки заболявания (Yamaoka & Graham, 2014). Сред щамове от САЩ и Колумбия статусът на *OipA* е независим рисков фактор за стомашен карцином и дуоденална язва. *OipA* се

открива по-често при пациенти с язва на дванадесетопръстника (88%), отколкото при такива с гастрит (Yamaoka & Graham, 2014).

В обобщение може да се каже, че *oipA* сериозно допринася за развитието на сериозна стомашна патология и това важи с особена сила в Западните страни (Yamaoka & Graham, 2014).

#### **4.2.11. *babA2* алел – адхезин, свързващ кръвно-групов антиген**

BabA адхезинът на *H. pylori* (75 kDa, кодиран от *babA2*) се свързва с фукозилираните кръвнорупови антигени H-тип 1 и Le<sup>b</sup>, експресирани по нормалната стомашна лигавица на секреторните индивиди, и така взема участие в ранните етапи на инфекцията (Hage *et al.*, 2015). Le<sup>b</sup> е основният антиген в стомашната лигавица при повечето (секреторно-позитивни) индивиди, докато секреторно-негативните проявяват доминантен Le<sup>a</sup> фенотип (Hage *et al.*, 2015).

От трите *babA* алела (*babA1*, *babA2* и *babB*) само *babA2* може да кодира активен BabA адхезин. Непродуциращите BabA щамове често имат нефункционални, „тихи“ последователности на гена *babA* (Chen *et al.*, 2013). Генът *babA* може да носи мутации с изместване на рамката на четене, което води до неефективна транслация или липса на инициращ кодон за транслацията; могат да се получат и химерни алели. Във всички тези случаи щамовете не произвеждат BabA (Chen *et al.*, 2013).

BabA протеинът играе роля в адхезията на *H. pylori*. В животински модели BabA<sup>+</sup> щамовете индуцират по-силно възпаление и по-силна секреция на IL-8 от стомашните епителни клетки, отколкото BabA-отрицателните щамове (Atherton & Blaser, 2009). BabA се свързва с пептичните язви и със стомашния карцином, въпреки че тази връзка не е универсална (Chen *et al.*, 2013). Когато *babA2* се открива заедно с *cagA* и *vacA s1* рискът от развитие на сериозна гастродуоденална патология се увеличава (da Costa *et al.*, 2015). Тройно-позитивните щамове са свързани с дуоденални язви в Германия, Португалия и Финландия, но в други държави, напр. Швеция, не е открита такова зависимост (Olfat *et al.*, 2005). Свързването на BabA към Le<sup>b</sup> е важно и за индуцирането на прекъсвания в двете ДНК вериги на клетъчни линии от СЕК и може да промотира мутации, свързани с канцерогенеза (da Costa *et al.*, 2015). Адхезията чрез BabA увеличава и способността на тип IV секреторния апарат да осъществи контакт с клетките на гостоприемника, което води до по-силен възпалителен отговор (da Costa *et al.*, 2015). Следователно, BabA е от значение не

само за прикрепянето на *H. pylori* to към стомашните клетки, но и за „закотвянето” на бактериалната секреторна система към повърхността им, така че да може да се осъществи по-ефективно инжектиране на бактериални фактори в цитозола на стомашните клетки (da Costa *et al.*, 2015).

В обобщение, *babA2* алелът показва връзка (макар и не универсална) с клиничния изход от инфекцията с *H. pylori*, особено в комбинация с други фактори на вирулентността (Olfat *et al.*, 2005).

#### **4.2.12. Статус на гена за външномембранен протеин на *H. pylori* (*homB*)**

Генът *homB* кодира протеин HomB (~75 KDa), който се експресира във външната мембрана на *H. pylori* (Oleastro & Ménard, 2013). HomB също така активира секретията на проинфламаторния цитокин IL-8 и увеличава способността на *H. pylori* да адхерира към клетките на гостоприемника (Oleastro *et al.*, 2010). *homB* е съобщаван като фактор на вирулентност и като маркер за развитието на стомашен карцином (Kang *et al.* 2012), или на пептични язви (Oleastro *et al.* 2009b). Някои щамове *H. pylori* имат *homA*, който е откриван по-често при пациенти с неязвени заболявания и най-често се комбинира с по-слабо вирулентни генотипове на *H. pylori* (Oleastro *et al.* 2009b). *homA* и *homB* имат 90% идентичност на последователностите си, особено в 5' и 3' краищата, като различията между двата са в средния регион на съответните отворени рамки на четене (Oleastro and Ménard, 2013).

Засега по света има твърде малко данни, що се отнася до значението на *homB* гена за прогресията на стомашните заболявания, причинени от *H. pylori*; резултатите относно точния механизъм, по който HomB влияе на развитието на дуоденалните язви и на стомашния карцином са противоречиви (Oleastro *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012) и могат да варират според географския регион (Oleastro and Ménard, 2013).

В ДНК на *H. pylori* може да присъстват едно или две копия на *homB* или *homA* (Oleastro *et al.*, 2009a). Двойните копия на *homB* се свързват с пептични язви, докато единично копие на *homA* се свързва с неязвена диспепсия (Oleastro *et al.*, 2009). В Западните щамове са откривани и единични, и двойни копия на *homB/homA*, но в Източна Азия се откриват само генотипове с по едно копие (Oleastro *et al.*, 2009a). В Западните страни двата гена са със сходни честоти: (*homB* - 56% и *homA* - 60.4%), докато в Източна Азия *homB* е много

по-чест (77-95.9%); Oleastro *et al.*, 2009a). Това потвърждава значимите разлики между Западните и Източноазиатските щамове *H. pylori*, както е случаят и при много други гени на вирулентността.

#### 4.2.13. Други фактори на вирулентността

Изследва се ролята на **външномембрания протеин *hopQ*** в адхезията на *H. pylori*. *hopQ* алелите на *H. pylori* са от две семейства; тип I и тип II, като при някои щамове *HopQ* протеин от тип II намалява бактериалната адхеренция към стомашни епителни клетки (Belogolova *et al.*, 2013). Тип I *hopQ* генотипът не се счита за основен рисков фактор за улцерация или злокачествено развитие на инфекцията, но показва съвместно действие с други фактори на вирулентността на *H. pylori* (Belogolova *et al.*, 2013). *HopQ* е есенциален за транслокацията на *CagA* и за медираните от *CagA* отговори в клетките на гостоприемника, като образуването на фенотип „колибри”. Освен това, делецията на *hopQ* намалява T4SS-независимото инактивиране на NF-κB, и секрецията на интерлевкин-8 (IL-8) в СЕК, но не повлиява подвижността на бактериите, прикрепени към тези клетки, поради което *HopQ* се определя като кодиран извън *cagPAI* кофактор на функционирането на T4SS (Belogolova *et al.*, 2013).

**Подвижността** е важна както за колонизацията на лигавицата, така и за избягването на имунния отговор при *H. pylori*. *H. pylori* мутанти без функционални ресни губят способността си да колонизират стомашната лигавица (Duckworth *et al.*, 2009).

Допълнителни фактори, промотиращи колонизацията от *H. pylori*, са фосфолипаза А, която смила фосфолипидите на клетъчните мембрани, и периплазмените деамидази γ-глутамилтранспептидаза и L-аспарагиназа. Те извеждат аминокиселините навън от стомашни епителни клетки и произвеждат амоняк, който е токсичен за клетките (Leduc *et al.*, 2010). Освен това *ggt* гена за γ-глутамилтранспептидазата провокира апоптоза в стомашни епителни клетки и инхибира T-клетъчната пролиферация (Ling *et al.*, 2015).

**Аргиназата** на *H. pylori* (RocF) увеличава хилядократно *in vitro* устойчивостта на *H. pylori* към киселини и стимулира хронифицирането на инфекцията - ензимът намалява стомашното възпаление (Romero-Adrian *et al.*, 2010).

TNF-α-индуциращият протеин (*Tipa*) е уникален канцерогенен фактор, който винаги се открива в *H. pylori* и се кодиран от гена *tipa* (HpOS96) gene (Jang *et al.*, 2009). Той се

свързва с клетъчния рецептор нуклеолин, произвеждан от нуклеолите на стомашни епителни клетки, който има мощно ДНК-свързващо действие и тумор-промотиращ потенциал в случаите, когато туморогенезата вече е стартирала (Jang et al, 2009).

***H. pylori* противодейства на оксидативния стрес и на имунния отговор на гостоприемника посредством много ензими**, например каталаза (KatA), супероксид-дисмутаза (SodB), алкил-хидропероксид редуктаза, NADPH-хинолон редуктаза (MdaB), неутрофил-активиращ протеин (Hp-NAP) и др. (Israel and Peek, 2010).

В обобщение може да се каже, че генетичното разнообразие на *H. pylori*, молекулярната и функционалната мимикрия, някои фактори на вирулентността и индуцираната имуномодулация заедно допринасят за хронифицирането на инфекцията, като резултатът от тази инфекция зависи от комбинацията от фактори на вирулентността на микроорганизмите, от факторите на гостоприемника и от факторите на околната среда (Zhang et al., 2016). Въпреки че тежките заболявания са свързани най-силно с *cagA*, *cagPAI* и *vacA* статуса на щамовете, основно в Западните страни, изглежда, че и много други гени (напр *oipA*) са от значение за патогенезата на инфекцията с *H. pylori* (Zhang et al., 2016). Едновременното действие на десетки фактори на вирулентността на *H. pylori*, които действат пряко или посредством стимулиране на хроничното възпаление, може да доведе до развитието на пептични язви или злокачествени заболявания на стомаха при някои пациенти (Zhang et al., 2016).

От съществено значение за развитието на инфекцията е и имунният отговор на организма на човека. В патогенезата на заболяванията, свързани с *H. pylori* се включват и полиморфизми на гените, кодиращи фактори на вродения имунитет, а полиморфизмите в гените за цитокини (Dixon et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Обичайният отговор на гостоприемника спрямо инфекцията с *H. pylori* е от проинфламаторен Т-хелперен (Th) тип 1 и 17 отговор, което води до развитие на хроничен гастрит. Взаимодействието на *H. pylori* с дендритните клетки стимулира стомашния регулаторен Т-клетъчен имуен отговор, като инхибира Th17 клетките и нивата на отделяните проинфламаторни IL-17, IL-21 и IL-22 (Bagheri et al., 2015; Dixon et al., 2016). Цялостното взаимодействие може да защити бактериите от имунния клирънс и да установи имунна супресия и дълготрайна инфекция. По последни данни TLR играят роля както в разпознаването на *H. pylori*, така и в стомашната канцерогенеза, а полиморфизмите

на гените, отговорни за TLR-сигналните пътища модулират риска от стомашен карцином (Smith, 2014; Zhang *et al.*, 2016) .

За много фактори на вирулентност има противоречиви данни в литературата, също така от съществено значение е географската вариабилност на изолатите *H. pylori*, което налага допълнителни изследвания в тази насока.

## 5. Епидемиология на инфекцията с *H. pylori*

### 5.1. Честота, рискови фактори и географско разпространение

*H. pylori* е причинител на втората най-честа хронична бактериална инфекция при хората (Kao *et al.*, 2016). Над половината световно население е заразено с *H. pylori* като някои от заразените индивиди развиват сериозни заболявания, напр. пептични язви (10-20%), стомашен карцином (1-3%) и MALT лимфом (<1%); (Kao *et al.*, 2016). Ако не се ерадикира, инфекцията обикновено е доживотна (Kao *et al.*, 2016).

Честотата на *H. pylori* показва големи географски вариации (Eshraghian *et al.*, 2014). В някои развиващи се страни с *H. pylori* са заразени над  $\geq 70\%$  от населението, и  $\geq 50\%$  сред децата (Khalifa *et al.*, 2010). Една от най-високите честоти на *H. pylori* е регистрирана в Бангладеш – 92% (Khalifa *et al.*, 2010). В развитите държави като цяло честотата на *H. pylori* е под 40% и е много по-ниска (<15%) при децата и юношите, отколкото при възрастните и старите хора (Khalifa *et al.* 2010). Интересен е фактът, че някои популации в развиващи се страни показват странно ниска честота на инфекцията с *H. pylori* . Например <18% в Индонезия и Малайзия (Sasidharan & Uyub, 2009). В географски аспект честотата на *H. pylori* показва обратна корелация със социално-икономическото състояние, в частност с условията на живот по време на детството (Peleteiro *et al.*, 2014). Докато в развиващите се държави честотата на инфекцията с *H. pylori* остава почти постоянна, то в развитите страни тя бързо намалява (Peleteiro *et al.*, 2014). Това се дължи на по-добрата лична и обществена хигиена и на активното елиминиране на носителството посредством антибактериална терапия. В развиващите се страни честотата на инфекцията с *H. pylori* нараства рязко през първите 5 години от живота, след което остава постоянно висока, което показва, че *H. pylori* се придобива в ранна детска възраст (Khalifa *et al.*, 2010)., В развитите страни, обаче, (напр. в Германия) честотата на инфекцията е ниска при децата и след това бавно нараства (Fischbach *et al.*, 2009). В Пакистан 73,6% от децата на възраст 3-

8 години са били положителни за *H. pylori* в сравнение със само 1,2% от децата в Холандия на възраст 2-4 години (Khalifa *et al.*, 2010). Честотата на de novo инфектиране с *H. pylori* сред възрастни в Западните страни е незначителна; следователно по-високата честота на инфекцията сред по-възрастните хора отразява ефекта на кохортите, който отчита подобряването на условията и спадане на нивото на инфектиране при децата и младите хора. (van Blankenstein *et al.*, 2013). Елиминирането на *H. pylori* от популацията и подобрените хигиенни и жилищни условия са довели до по-ниска честота на заразяване сред децата, което се отразява в разпределението по възраст на тези доживотно колонизиращи бактерии (van Blankenstein *et al.*, 2013).

Лошите санитарно-хигиенни условия са докладвани от много автори като рисков фактор за инфекцията, поради улесняване на фекално-оралния път на предаването ѝ (Khalifa *et al.*, 2010). Високата честота на инфекцията в Африка се асоциира с многобройни рискови фактори, напр. пренаселеност на домакинството, спане на няколко души в общо легло, пиене на недезинфекцирана вода, непастеризирано мляко или консумация на немити плодове/зеленчуци; пиене от една и съща чаша, къпане или миене на ръце от един и същ съд с вода и др. (Etokudo *et al.*, 2012; Khalifa *et al.*, 2010).

Съществено значение има и регионалното разпределение на честотата на инфекцията с *H. pylori* в рамките на една държава. Инфекцията се среща по-често в селски провинциални райони, отколкото в развитите урбанизирани региони (Vale & Vitor, 2010).

Кърменето може да осигури защита срещу заразяване с *H. pylori*, но тази протекция трае по-малко от една година и не изглежда да повлиява честотата на инфекцията в по-късните етапи от живота (Boyanova, 2011b).

Нарастващата антибиотична употреба се свързва с намалена честота на *H. pylori*. (Blaser *et al.*, 2008). Независимо че ерадикационните режими за *H. pylori* включват по няколко антибиотика, монотерапията с макролиди или  $\beta$ -лактами може да понякога да доведе до спонтанна ерадикация на инфекцията (Blaser *et al.*, 2008).

Захарният диабет, тютюнопушенето и пола (по-често мъжкият пол, макар че немалко проучвания съобщават и обратното) са споменавани като допълнителни рискови фактори за инфекцията или за вирулентността на щама (Boyanova *et al.*, 2011b). Връзката между захарния диабет и инфекцията с *H. pylori* не е напълно изяснена. Някои проучвания откриват по-висока честота на инфекцията при пациенти с диабет, което вероятно се дължи

на нарушения гастроинтестинален мотилитет и на отслабения неспецифичен имунитет; (Tseng *et al.*, 2014; Dai *et al.*, 2015). От друга страна, при диабетични пациенти реинфектирането с *H. pylori* изглежда е по-често, което вероятно се дължи на имunosупресията и повишената възприемчивост към инфекции като цяло при такива пациенти (Tseng *et al.*, 2014).

Факторите на околната среда и диетичните фактори (например консумация на кисело мляко, алкохол, пресни плодове и зеленчуци и др.) могат силно да модифицират честотата на инфекцията с *H. pylori* но има доста различия в резултатите от различните проучвания и тези връзки следва да се потвърдят от по-мащабни проучвания в повече държави, както сред възрастни пациенти, така и сред деца (Boyanova, 2011c).

## **5.2 Начини на предаване и източници на инфекцията**

Точните механизми на инфектирането на гостоприемника с *H. pylori* не са напълно изяснени. *H. pylori* има голяма специфичност към гостоприемника и се среща почти изключително само при човека и някои човекоподобни примати (Kusters *et al.*, 2006). В изключително редки случаи *H. pylori* е изолиран от домашни животни, но няма убедителни налични доказателства за предаване на инфекцията от животни и се счита, че новите инфекции се предават от човек на човек орално-орално посредством слюнка (при целувка или при допир на контаминирани предмети), фекално-орално (директно от човек на човек или чрез контаминирана вода и евентуално храна) гастро-орално чрез повръщане и регургитация (García *et al.*, 2014; Momtaz *et al.*, 2014). *H. pylori* е откриван в слюнка, повърнати материи, рефлуксна течност и фецес, но няма категорични доказателства за това, кой от тези материали има преобладаващо значение за предаването на инфекцията (Paуão *et al.*, 2016).

Съобщава се за ендоскопско предаване на *H. pylori* при около 0,8-3% от пациентите в случаите, когато дезинфекцията на ендоскопите се извършва ръчно, а не автоматизирано (Buzas, 2010).

От съществено значение е, че *H. pylori* инфекцията често се разпространява вътресемейно. В развитите държави инфекцията обикновено се придобива от заразна майка (най-често) или от друг член на семейството, което подчертава ролята на близкия контакт при орално-оралното предаване (Boyanova, 2011b).

Възможно е и предаване на инфекцията между съпрузи, което се случва по-често в страни/популации с по-висока честота на инфекцията (Boyanova, 2011b; Linz *et al.*, 2013). Когато се лекуват всички инфектирани членове на семейството ерадикация на инфекцията се постига по-често (92,9%), отколкото когато е лекуван само изследвания пациент (61,4%), (Sari *et al.* 2008).

Според някои автори не съществува по-висок риск за носителство на *H. pylori* сред стоматолози, гастроентеролози, медицински сестри, партньори на *H. pylori* -позитивни съпрузи и посетители на клиники за полово-предавани инфекции (Megraud, 1995). Това също подкрепя тезата, че инфекцията се придобива основно в ранна детска възраст, най-вероятно от близки членове на семейството (Boyanova, 2011b).

Пренаселеността по време на детството вътре и извън семейството са свързани с повишена честота на *H. pylori* (Hamed *et al.*, 2013).

Фекално-оралният път на разпространение на *H. pylori* е доказан в много проучвания. *H. pylori* е изолиран от проби от повърнати материи, диарични изпражнения и слюнка (Vale & Vitor, 2010). Въпреки това обилната интестинална флора и активността на жлъчните соли в чревния тракт може да затрудни изолирането на микроорганизма от фекални проби. Освен това фекалните *H. pylori* често са в жизнеспособна, но некултивируема форма (Vale & Vitor, 2010).

*H. pylori* е доказван с най-различни методи (най-често молекулярни) в околната среда, напр. във водата. (Boyanova, 2011b). Ролята на водата се подчертава и от съобщенията, че пиенето на неdezинфекцирана или кладенчова вода е рисков фактор за инфекцията в развиващите се страни (Aziz *et al.*, 2015). Видът на водоизточника може да е свързан с други рискови фактори за инфекцията, напр. местоживеенето, държавата и нивото на образование, поради което значението на жизнеспособните, но некултивируеми форми за предаването на инфекцията тепърва има нужда от по-задълбочена оценка (Kusters *et al.*, 2006).

Освен това, подобно на много други бактерии, *H. pylori* може да живее в полизахарид-съдържащи биофилми на повърхности, изложени на вода (на границата между въздуха и водата) или върху повърхности от неръждаема стомана, както и върху стъклени повърхности *in vitro* (Yonezawa *et al.*, 2009).

Предполага се и роля на храната, особено на суровото мляко, за предаването на инфекцията. ДНК на *H. pylori* е детектирана чрез PCR в 26-72% от проби сурово козе, овче и краве мляко, като в много редки случаи бактериите са били изолирани от такива проби (Vale & Vitor, 2010).

**Гастро-орален** път - ролята на оралните *H. pylori* за стомашната инфекция е спорна (Adler *et al.*, 2014; Al Sayed *et al.*, 2014). Все пак *H. pylori* е откриван чрез PCR и е изолиран от слюнка, зъбна плака и проби от повърнати материи, а при пациенти със стомашна *H. pylori* инфекция бактериите могат а достигнат до устната кухина посредством гастро-езофагеален рефлукс, повръщане и регургитация (Payão *et al.*, 2016). Методът на изследване е от голямо значение в тези случаи. Бързият уреазен тест и оцветяването по Грам не са надеждни методи за идентификация на оралните *H. pylori*, тъй като в устната кухина има както много други уреазо-позитивни бактерии, така и Грам-отрицателни бактерии с извита спирална форма (Boyanova, 2011b). Тоест, стомашните *H. pylori* лесно могат да се идентифицират посредством фенотипни тестове, докато при извънстомашните локализации наличието на *H. pylori* следва да се потвърди и чрез молекулярни методи с двойки праймери за поне два различни специфични гена (Megraud & Lehours, 2007). Трябва да се има предвид и че PCR не може да отдиференцира живи от умрели бактерии.

### **5.3. Спонтанен клирънс на инфекцията и реинфекция**

Повторното активиране на *H. pylori* инфекцията включва реинфекциите и рецидивите. Реинфекция представлява инфекция с нов щам >12 месеца след успешна ерадикация, докато рецидив е появата на същия щам в рамките на една година след ерадикация (Raumong *et al.*, 2016). За да се отдиференцират случаите на реинфекция, е необходимо да се докажат генетични разлики между изолатите преди и след терапията (Raumong *et al.*, 2016). Рецидивите, особено в развитите страни, са резултат от неуспешна ерадикация и, следователно, в тези държави от първостепенна важност са както подобряването на режимите за ерадикация, така и комплайънсът - сътрудничеството от страна на пациентите (Raumong *et al.*, 2016). Реинфекциите съществено се влияят от подобрената профилактика на инфекцията (Boyanova, 2011b). Ерадикационните режими по-лесно постигат успех, когато пациентите са заразени с по-вирулентни щамове *H. pylori* (Boyanova, 2011d). Обикновено е прието контрол на ерадикацията да се извърши един

месец след приключване на терапията, но по-информативни са резултатите, получени след около 2,5-3,5 месеца и когато се ползват повече молекулярни техники (Zhang *et al.*, 2009b). Реинфекциите са по-чести при деца, което корелира с обичайно по-високата честота на придобиване на инфекцията в ранното детство (Boyanova, 2011b).

От значение е, че през последните години годишната честотата на реинфектиране навсякъде по света е доста ниска освен в някои развиващи се страни като Бангладеш и Иран, където е >10% (Zhang YY *et al.*, 2009). Обичайните рискови фактори за реинфекция са възрастта на пациентите и близкия контакт между заразени индивиди, лошите санитарно-хигиенни условия и генетични фактори на гостоприемника, като общата честота на инфекцията в съответната страна не винаги влияе върху реинфекциите (Zhang YY *et al.*, 2009).

Спонтанният клирънс на инфекцията с *H. pylori* (загуба на инфекцията при *H. pylori* - положителни индивиди без да се провежда ерадикационна терапия) е необичаен и се среща рядко. Клирънсът може да се дължи на различия в имунния отговор към антигени на *H. pylori* при децата и възрастните или на предшестваща употреба на антибиотици, които имат активност срещу *H. pylori* (Boyanova, 2011b). При 13% от децата в САЩ и Мексико употребата на един или повече антибиотика (активни срещу *H. pylori*) с цел лечение на други заболявания е била свързана с клирънс на инфекцията (Broussard *et al.*, 2009).

В обобщение, подобрените санитарно-хигиенни условия, урбанизацията и увеличената антибиотична употреба за лечение на *H. pylori* и на други инфекции в последните години водят до глобално намаляване на честотата на инфекцията и реинфекцията с *H. pylori* развитите, но и в някои от развиващите се страни. Въпреки това инфекцията все още засяга поне половината от населението на света (Boyanova, 2011b). Това означава, че около 500 милиона души, основно в развиващия се свят, ще развият пептични язви и около 30 милиона души биха развили стомашен карцином (Salih, 2009). Следователно и профилактиката, и терапията на инфекцията трябва значително да се подобрят и за тази цел е нужно да се събере допълнителна информация по важи проблеми, като механизмите на предаване и резервоарите на инфекцията .

## 6. Заболявания, свързани с *H. pylori*

Инфекцията с *H. pylori* може да доведе до развитието на заболявания на гастроинтестиналния тракт. Изследването за *H. pylori* се провежда с цел да се открие причината за съответно състояние или за превенция на заболяване, например при индивиди с фамилна история за стомашен рак. В такива случаи положителен резултат от изследване оправдава последваща терапия, а при отрицателен резултат следва да се потърсят други етиологични фактори и да се вземат превантивни мерки. Затова е необходимо добро и правилно разбиране на клиничния ход на заболяванията, свързани с *H. pylori* и на ефектите от ерадикацията му (Kusters *et al.*, 2006).

Независимо че колонизацията на стомаха от *H. pylori* индуцира хистологично доказуем гастрит у всички заразени индивиди, само малка част от тях развиват клинични симптоми. Изчислено е, че пациентите положителни за *H. pylori* имат 10 до 20% риск през живота си да развият язвено заболяване и 1 до 3% риск да развият стомашен карцином (de Vries & Kuipers, 2010; Nagymási & Tulassay, 2014; Zhang *съмп.*, 2016). Рискът от развитие на тези заболявания в присъствието на инфекция с *H. pylori* зависи от множество фактори от страна на микроорганизма, на гостоприемника и на околната среда, като тези фактори са свързани най-вече с типа и тежестта на гастрита (Фиг. 4; Kusters *et al.*, 2006; Zhang *съмп.*, 2016).

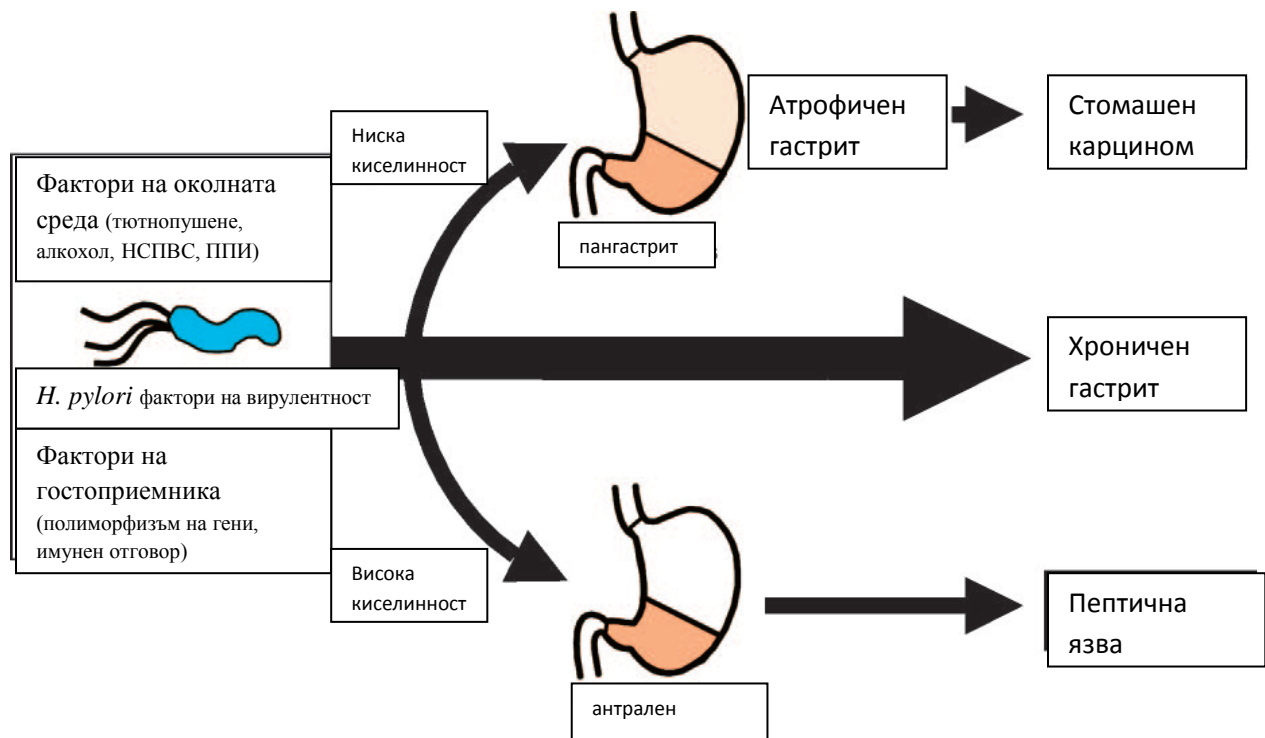
### 6.1. Остър и хроничен гастрит

Колонизацията с *H. pylori* винаги води до инфилтрация на лигавицата и в антрума, и в корпуса на стомаха с неутрофилни и мононуклеарни клетки (Фиг. 4 Kusters *et al.*, 2006). Този хроничен активен гастрит е първичното състояние, свързано с колонизацията от *H. pylori*, а останалите свързани с *H. pylori* заболявания са резултат от този хроничен възпалителен процес (Kusters *et al.*, 2006).

**Остър гастрит.** Данните за острата фаза на инфекцията са оскъдни и показват, че острата фаза на колонизацията с *H. pylori* може би е свързана с неспецифични симптоми като тежест в стомаха, гадене и повръщане, както и със значително възпаление на лигавицата и в проксималната, и в дисталната част на стомаха, или пък с развитие на пангастрит (Rhee *et al.*, 2014). Тази фаза често е свързана с хипохлоридия, която може да продължи с месеци наред. Не е ясно дали тази начална колонизация може да се последва

от спонтанен клирънс и оздравяване от гастрита и, ако е така, то колко често се случва това (Kusters *et al.*, 2006). Проучванията в които деца предполагат, че в тази възраст е възможно инфекцията може спонтанно да изчезне; това обаче не се наблюдава при възрастни, освен при специфични обстоятелства, например развитие на атрофичен гастрит (Kusters *et al.*, 2006).

**Хроничен гастрит.** Когато колонизацията стане постоянна, вече има силна корелация между нивото на киселинна секреция в стомаха и разпространението на гастрита (Фиг. 4.; Kusters *et al.*, 2006). Тази корелация е резултат от взаимните ефекти на стомашната киселина върху бактериалния растеж и обратно – на бактериалния растеж и свързаното с него възпаление на лигавицата върху секрецията на солна киселина и механизмите за регулацията и (Ruggiero, 2012). Това взаимодействие е изключително важно за резултата от инфекцията с *H. pylori*. При индивиди с нормална секреция на киселина *H. pylori* в частност колонизира стомашния антрум, където има по-малко киселинно-секретиращи париетални клетки. Този модел на колонизация е свързан с предимно антрален гастрит (Ruggiero, 2012).



**Фиг. 4.** Схематично представяне на факторите, допринасящи за стомашната патология и клиничния изход от инфекцията с *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006).

Той се свързва с мощна секреция на гастрин и солна киселина и съответно с дуоденални и препилорни язви. Хистологичното изследване на биопсични проби от корпуса на стомаха в такива случаи показва ограничено неактивно хронично възпаление и много малък брой повърхностно колонизиращи *H. pylori* (Ruggiero, 2012).

При пациенти с нарушена секреция на солна киселина (независимо по какъв механизъм) разпределението на бактериите е по-равномерно в антрума и корпуса, като тези в корпуса са в по-близък контакт с лигавицата, което води до пангастрит с корпусно превалиране (Kusters *et al.*, 2006). Някои автори определят този тип гастрит като стомашно-карциномен фенотип. Той се характеризира с атрофия с мултифокална интестинална метаплазия, хипохлоридия или ахлоридия и е свързан с язви на корпуса и фундуса на стомаха и с възможност за развитие на стомашен карцином (Ruggiero, 2012; Nagymási и Tulassay 2014). Скоростта на прогресия и типа на гастрита, както и киселинно-секреторният статус на пациента са важни за определяне на заболяванията, свързани с причинения от *H. pylori* гастрит (Ruggiero, 2012). Намалената киселинна секреция може да се дължи на загуба на париетални клетки в резултат от атрофичен гастрит, но може и да се получи, когато има запазен капацитет за киселинна секреция, но нарушена функция на париеталните клетки поради ваготомия или употреба на лекарствени препарати, потискащи киселинната секреция, в частност – инхибитори на протонната помпа (PPI) (Kusters *et al.*, 2006). В резултат на това активното възпаление в корпусната лигавица още повече усилва хипохлоридията, тъй като локалните фактори на възпалението, например цитокините като интерлевкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) силно потискат функцията на париеталните клетки (Yin *et al.*, 2016). Това се илюстрира от много наблюдения. Първо, корпусния гастрит от *H. pylori* често е свързан с хипохлоридия и ерадикационната терапия води до увеличение на киселинната секреция (Yin *et al.*, 2016). Второ, при корпусния гастрит, причинен от *H. pylori*, се увеличава антиацидния ефект на PPI (Kusters *et al.*, 2006). Трето; има данни, че пациентите с проинфламаторни генотипове *H. pylori* имат по-висок риск от корпусно-превалиращ пангастрит, което ги предразполага към атрофичен гастрит, интестинална метаплазия и стомашен карцином (Wroblewski *et al.*, 2013).

Въпреки че гастритът в повечето случаи се дължи на колонизация с *H. pylori*, все пак има и други причини за това заболяване, като инфекции с цитомегаловирус, хронични идиопатични възпалителни и автоимунни заболявания, напр. болестта на Crohn и

пернициозната анемия, и химични увреждания на стомаха, дължащи се на прекомерна употреба на алкохол или нестероидни противовъзпалителни средства (НСПВС) (Kusters *et al.*, 2006).

В ранните стадии на инфекцията с *H. pylori* гастритът е свързан с усилен гастринов отговор към храна и други стимули, в резултат на което се усилва и секрецията на солна киселина, което при някои пациенти е достатъчно да причини язва на дванадесетопръстника (Waldum *et al.*, 2016).

Предполага се, че инфекцията с *H. pylori* може да отключи развитието на автоимунен гастрит и пернициозна анемия (de Vries & Kuipers, 2010). Обсъжда се и ролята на инфекцията с *H. pylori* в развитието на стомашни хиперпластични полипи; такива полипи понякога изчезват след ерадикацията на *H. pylori* (Furuta & Delchier, 2009).

Вид на гастрита	Хистология на стомаха	Хистология на дуоденума	Киселинност	Клиника
 Пан-гастрит	Хронично възпаление Атрофия Интестинална метаплазия	Нормална	Намалена	Стомашна язва Стомашен карцином
 Антрален	Хронично възпаление Активност на полиморфните левкоцити	Стомашна метаплазия Активно хронично възпаление	Увеличена	Дуоденална язва

**Фиг. 5.** Киселинната секреция и свързаният тип на гастрита играят важна роля в клиничния изход от инфекцията с *H. pylori*. Фигурата показва корелациите между типа на колонизация с *H. pylori*, възпалението, киселинната секреция, стомашната и дуоденална хистология и клиничния изход (Kusters *et al.*, 2006).

Бактериалните фактори са важен рисков фактор за атрофичен гастрит, но за интестиналната метаплазия от съществено значение са и факторите от страна на гостоприемника и на околната среда. Следователно е необходимо да се намери маркер,

който да предсказва индивидуалния отговор към инфекция с *H. pylori* във връзка с факторите на околната среда (Correa *et al.*, 2012).

## 6.2. Пептични язви

**Определения.** Стомашните или дуоденални язви (често наричани пептични язви) се дефинират като мукозни дефекти с диаметър поне 0,5 cm, пенетриращи през lamina muscularis mucosae (Yeomans & Naesdal, 2008). Язвите на стомаха (ЯС) най-често се срещат по малката кривина на стомаха, в частност при прехода от корпусна към антрална лигавица (Kolesnikova *et al.*, 2012). Язвите на дванадесетопръстника обикновено са в bulbus duodeni, която е най-изложената на стомашната киселинност област. В Западните страни дуоденалните язви са около 4 пъти по-чести от стомашните; в други части на света, обаче, язвите на стомаха са по-чести. В частност язвите на дванадесетопръстника се срещат най-вече при пациенти между 20 и 50-годишна възраст, докато стомашните язви преобладаващо настъпват при над 40-годишни индивиди (Kusters *et al.*, 2006).

**Връзка с *H. pylori*.** И стомашните, дуоденалните язви са силно свързани с *H. pylori*. Патогенетичната роля на инфекцията с *H. pylori* се демонстрира от факта, че тя е налична в >80-90% от случаите на стомашни и до 70% от тези с дуоденални язви (Hagymási и Tulassay 2014).

Доживотният риск от развитие на язвена болест при *H. pylori* -позитивни индивиди е не повече от 10-20%; и е 3 до 10 пъти повече, отколкото при *H. pylori* -негативни (de Vries and Kuipers, 2010). Това има огромно значение за лечението и клиничния ход на пептичната язвена болест в ежедневната клинична практика. Навремето това е било хронично рекурентно заболяване с висока смъртност, при което често е имало нужда от антиацидна поддържаща терапия или хирургично лечение. И въпреки това около половината от свързаните с *H. pylori* случаи на пептична язвена болест са имали рецидиви в рамките на една година (Rauws& Tytgat, 1990). Ерадикацията на *H. pylori* съществено намалява честотата на рецидивите – от 80% и 60% за дуоденални и стомашни язви съответно до по-малко от 5% (Kusters *et al.*, 2006; Hagymási и Tulassay, 2010).

Много проучвания показват, че през последните десетилетия честотата и на стомашните и особено на дуоденалните язви в Западните страни, постоянно спада, до

около 2 случая на 1000 души население (Kusters *et al.*, 2006). Спада и смъртността от язвената болест навсякъде по света (Shirin *et al.*, 2008).

Развитието на язви при наличие на *H. pylori* се повлиява от многобройни фактори от страна на гостоприемника и на микроорганизмите. Язвите най-често се развиват на местата с силно възпаление (Hagymási & Tulassay, 2010), (Фиг. 5). При пациенти с намалена киселинна секреция това обичайно е преходната зона между корпуса и антрума и резултатът е стомашна язва. Ако секрецията на солна киселина е нормална или повишена, най-сериозно е възпалението в дисталната част на стомаха и в началото на дванадесетопръстника, което води до пилорна или дуоденална язвена болест (Kusters *et al.*, 2006).

**Усложнения на язвите.** Усложненията на пептичните язви включват кървене, перфорация и образуване на стриктури (Chung & Shelat, 2017). Най-честото усложнение е кървенето, което се случва в 15 до 20% от случаите на пептични язви (Barkun *et al.*, 2010). Силно препоръчително е всички пациенти с пептични язви да се изследват за наличие на инфекция с *H. pylori* (Barkun *et al.*, 2010), като пациентите с положителен резултат следва да започнат ерадикационна терапия с последващо ново изследване за доказване на ефект от терапията (Kamburov *et al.*, 2007). Отрицателен резултат за *H. pylori* през обострена фаза на заболяването следва да се потвърди впоследствие. Препоръката за ерадикация при пациенти с пептична язва включва и индивиди с кървящи язви (Barkun *et al.*, 2010). Ерадикацията на *H. pylori* значително променя естествения ход на язвената болест. Липсата на рецидиви на стомашните и на дуоденалните язви абсолютно зависи от успеха на ерадикационната терапия и персистирането на инфекцията е лош прогностичен белег, включително за усложнения като кървене (Kusters *et al.*, 2006).

Прогресията на инфекция с *H. pylori* до язвена болест зависи от вирулентността на щама, от генетиката на гостоприемника и от фактори на околната среда, като имунният отговор на гостоприемника може би играе ключова роля (de Vries and Kuipers, 2010).

### **6.3. Функционална диспепсия**

Функционалната диспепсия е хетерогенно състояние, що се отнася до своята етиология, патогенеза и лечение (Fang *et al.*, 2014), и се дефинира като наличие и на поне един от следните симптоми: неприятно постпрандиална тежест в стомаха, бързо насищане,

епигастрална болка или парене при пациенти без структурирано гастроинтестинално заболяване, включително и при ендоскопско изследване (Talley, 2016). Диагнозата се поставя при наличие на симптоми за период от 3-6 месеца (Talley, 2016). Според Rome III Consensus функционалната диспепсия се подразделя на синдром на епигастрална болка и на постпрандален дистрес синдром с цел да се прецизира терапията (Talley, 2016).

Ролята на инфекцията с *H. pylori* при функционална диспепсия не е напълно изяснена и ефектът от ерадикацията на бактериите е спорен. Честотата на *H. pylori* в случаи на функционална диспепсия варира в различни географски региони, но като цяло е много по-ниска, отколкото в случаите на язвена болест (Boyanova, 2011). Например, 30-40% от диспептичните пациенти в България са били положителни при серологично изследване за *H.pylori*, което е около два пъти по-рядко, отколкото при пептичните язви (Mateva *et al.*, 2001). Наличието на *H. pylori* се свързва с постпрандиален дистрес синдром, като тази връзка вероятно се дължи на по-сериозната стомашна атрофия в областта на антрума (Fang *et al.*, 2014). Различни проучвания съобщават за положителен ефект от анти-*H. pylori* терапия при пациенти с функционална диспепсия, като ерадикационната терапия е особено препоръчителна в популации с висока честота на пептични язви и стомашен карцином (Chey & Wong, 2007). Тази терапевтична стратегия се нуждае от по-обстойна оценка, като се отчита и дългосрочното потискане на киселинната секреция в стомаха (de Vries and Kuipers, 2010).

#### **6.4. Гастро-езофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ)**

Ролята на *H. pylori* в патогенезата на ГЕРБ не е напълно изяснена (de Vries и Kuipers, 2010). Според Maastricht III Consensus Report съществува отрицателна връзка между честотата на *H. pylori* и ГЕРБ, но причината за това не е съвсем ясна (Malfertheiner *et al.*, 2007). Инфекцията с *H. pylori* е с по-ниска честота при пациенти с ГЕРБ, отколкото в общата популация и вероятно има протективен ефект върху развитието на ГЕРБ (Furuta & Delchier, 2009). Това се подкрепя и от факта, че повечето страни с висока честота на *H. pylori* ГЕРБ се среща сравнително по-рядко (Hong & Kim, 2015). У нас също се открива с 20% по-ниска честота на *H. pylori* сред нелекувани пациенти с рефлукс-езофагит, отколкото при такива с пептични язви (Boyanova, 2007).

Възможната роля на ерадикацията на *H. pylori* за подобряването или за обострянето на симптомите при ГЕРБ също е спорен въпрос (Furuta & Delchier, 2009; Hong & Kim, 2015). Излекуването на антралния гастрит, който се асоциира с пациенти с дуоденална язва, намалява киселинната секреция в стомаха до нормални нива посредством намаляване на производството на гастрин и това води до намален риск от ГЕРБ след ерадикацията. При преобладаващо корпусния гастрит без атрофични промени, който се свързва със стомашни язви, ерадикацията на *H. pylori* може да усилва секрецията на стомашна киселина и по този начин би могла да доведе до по-висок риск от ГЕРБ (de Vries & Kuipers, 2010). Стомашната атрофия, свързана с инфекция с *H. pylori*, има протективен ефект срещу езофагеалния аденокарцином и неговия прекурсор – Баретовият хранопровод, както и срещу рефлукс-езофагита, но остава въпросът дали индуцираната от *H. pylori* атрофия на стомашния корпус е единственият фактор за намалението на ГЕРБ (Furuta & Delchier, 2009).

#### **6.5. Атрофичен гастрит, интестинална метаплазия и стомашен карцином**

През 1994 г. Международната агенция за проучване на рака класифицира *H. pylori* като клас I канцероген при хората и най-чест етиологичен фактор на карцином, свързан с инфекция (de Martel *et al.*, 2012; Torre *et al.*, 2015). Случаите на *H. pylori* -свързания карцином представляват 5,5% от общия брой на раковите заболявания по света (Wroblewski *et al.*, 2013). Стомашният карцином е петото по честото злокачествено заболяване по света, но е на трето място по брой на смъртни случаи годишно (8,8%) сред раковите заболявания (Villain *et al.*, 2015).

Стомашен рак се развива при 2.9% от *H. pylori* инфектираните пациенти (Mishra *et al.*, 2013; Nagymási & Tulassay, 2014). Хроничното възпаление, индуцирано от *H. pylori*, в крайна сметка може да доведе до загуба на нормалната лигавица с разрушаване на стомашните жлези и последващото им заместване от фиброзна тъкан и епител от тънко-чревен интестинален тип (интестинална метаплазия) (Kusters *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Атрофичен гастрит и интестинална метаплазия се случват в приблизително половината от хората, колонизирани с *H. pylori*, като най-напред това се случва при индивидите и местата в стомаха с най-тежко възпаление (Kusters *et al.*, 2006). Рискът за атрофичен гастрит зависи от разпределението и типа на хроничния гастрит. При

индивидите с намалена секреция на солна киселина и корпусен гастрит атрофията се развива много по-бързо и се наблюдава интестинална метаплазия (Kusters *et al.*, 2006), (Фиг. 5). С времето зоните, засегнати от загубата на жлези и интестинална метаплазия се разрастват и в случаите на атрофичен пангастрит при почти всички пациенти се наблюдава интестинална метаплазия (Hagymási и Tulassay, 2014; Watari *et al.*, 2014). Този феномен, въпреки че не води до специфична промяна в симптомите, увеличава 5 до 90 пъти риска от стомашен карцином (Kusters *et al.*, 2006). При антралният гастрит половината от пациентите могат да покажат наличие на интестинална метаплазия (Kusters *et al.*, 2006).

Въпреки намаляването на честотата на стомашния карцином в Западните страни, в обширни географски региони, в частност Източна Азия и Южна Америка честотата на нововъзникващите случаи остава висока (Sugano, 2015; Coelho & Coelho, 2014). В резултат на персистиращата висока честота в тези страни с бързо нарастващо население се очаква броят на новите случаи на стомашен карцином да нарастне до около един милион на година и това нарастване да продължи и в следващите десетилетия (Kusters *et al.*, 2006). По тази причина съвременните проучвания са фокусирани върху превантивния ефект от ерадикацията на *H. pylori* спрямо рака, както сред общата популация, така и сред пациентите с преканцерозни състояния като атрофичен гастрит и интестинална метаплазия. Немалко проучвания съобщават за регресия на метапластичните лезии и донякъде на атрофията след ерадикационна терапия. (Kusters *et al.*, 2006). Не така стоят, обаче, нещата по отношение на превенцията на стомашния карцином. В няколко проучвания се съобщава, че при няколкогодишно проследяване ерадикацията на *H. pylori* няма значим ефект върху честотата на стомашния карцином (Kusters *et al.*, 2006). Други проучвания все пак отчитат превантивен ефект на ерадикацията спрямо стомашния карцином, особено в Азия (Takenaka *et al.*, 2007). През последните десетилетия почти няма подобрене в дългосрочната преживяемост от това злокачествено заболяване, тъй като в повечето държави то се диагностицира в много късен стадий (Akhondi-Meybodi *et al.*, 2017). Стомашният карцином е предимно (над 90%) аденокарцином и се подразделя на два хистологични типа - интестинален и дифузен (Kumar *et al.*, 2014). И двата се свързват с инфекция с *H. pylori* (Chmiela *et al.*, 2017). Доживотният риск от стомашен карцином сред *H. pylori* -положителни индивиди в Западните страни се оценява на 1 – 3% (Kusters *et al.*, 2006; Hagymási & Tulassay, 2014).

Индивидуалният риск от стомашен рак се оформя от съвкупността от бактериалните фактори на вирулентност, генетичните фактори на гостоприемника и фактори от околната среда (Correa *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Канцерогенният ефект на *H. pylori* може да бъде модифициран от диетични фактори и други фактори на околната среда. Честотата на инфекциите с *H. pylori* е по-висока в развиващите се страни, но парадоксално при тях честотата на стомашния карцином е по-ниска (това е така наречената Азиатска и Африканска загадка) (Hagymási & Tulassay, 2014; Suzuki *et al.*, 2012). Тези данни говорят, че не само инфекцията, но и други фактори влияят на развитието на стомашен карцином.

Индивиди с висока експресия на IL-1 $\beta$  полиморфизми имат повишен риск от хипохлоридия, стомашна атрофия и дистален стомашен аденокарцином в сравнение с хората с ниска експресия на полиморфизми. Генни полиморфизми (-308 G>A) на проинфламаторния цитокин TNF- $\alpha$ , които увеличават експресията на цитокина, и полиморфизмите (промоторни полиморфизми в позиции -592, -819 и -1082), които намаляват производството на антиинфламаторни цитокини (IL-10), се свързват с повишен риск от дистален стомашен рак (Hagymási & Tulassay, 2014). Ефектите на проинфламаторните генотипове (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-10) са адаптивни (Wroblewski *et al.*, 2013).

Консумацията на големи количества сол увеличава риска от стомашен рак посредством пряко увреждане на стомашния мукус и стомашната лигавица, чрез подобряване на временната пролиферация на стомашния епител, увеличаване на честотата на ендогенните мутации, „регулация нагоре” на цитокиновата продукция и чрез модулиране на генната експресия на *H. pylori*, особено експресията на факторите на вирулентност (Nagini, 2012). Интересно е, при пациенти с *H. pylori* с ниско базално ниво на CagA, високата консумация на сол усилва щамовата вирулентност, докато при тези с високо базално ниво на CagA, високата консумация на сол има слабо влияние (Loh *et al.*, 2012). Индуцираната от консумацията на сол повишена експресия на CagA е била по-честа при щамове с две копия TAATGA мотив в областта на *cag* промотора, които са по-чести в Европа, спрямо такива с едно копие, които са по-чести в Африка (Loh *et al.*, 2012).

Коинфекцията с хелминти (*Ascaris lumbricoides* и *Toxoplasma gondii*) намалява тежестта на гастрита, индуциран от *H. pylori*, посредством намален Th1 отговор с високи нива на цитокините, отделяни от Th2 клетките (Ek *et al.*, 2012).

Плодовете и зеленчуците, които са богати на каротиноиди, витамин С, фолиева киселина и фитохимикали, могат да модулират ензимите, метаболизиращи ксенобиотици, и имат антоксидантно действие, поради което биха могли да изиграят превантивна роля срещу канцерогенезата (Wroblewski *et al.*, 2013; Tsugane & Sasazuki 2007; Ma *et al.*, 2012). Тютюнопушенето също се смята за рисков фактор за развитието на стомашен карцином (Santibáñez *et al.*, 2015), както и консумацията на голямо количество сол (Wroblewski *et al.*, 2013).

### **6.6. Стомашен MALT лимфом**

Стомашната лигавица нормално не съдържа лимфоидна тъкан, но като отговор на колонизацията с *H. pylori* почти винаги се появява лимфом на мукозно-асоциираната лимфоидна тъкан (MALT) (Perreira *et al.*, 2014). В редки случаи от тази тъкан може да се разрастне моноклонална популация от В-клетки и бавно да пролиферира до MALT лимфом (Perreira *et al.*, 2014). MALT лимфомите представляват около 7% от всички новодиагностицирани лимфоми, като честотата им по света е 1-1,5 случая на 10 хиляди индивида за година, което е 5 до 10 пъти по-рядко, отколкото са новите случаи на стомашния карцином (Perreira *et al.*, 2014). Както и при много други лимфоми, честотата на това заболяване нараства с възрастта, като повечето от пациентите са над 50-годишни (Perreira *et al.*, 2014).

Почти всички пациенти с MALT лимфом са *H. pylori* - позитивни (Kusters *et al.*, 2006), а *H. pylori* -позитивните индивиди са със значимо повишен риск от развитие на стомашен MALT лимфом (Fischbach, 2014). Точната честота на заболяването в *H. pylori* -позитивни индивиди не е известна, но MALT лимфомите се срещат при по-малко от 1% от тези пациенти (Kusters *et al.*, 2006).

MALT лимфомите са свързани с фактори на вирулентността на *H. pylori* и наличието на анти-CagA IgG антитела е предполагаем рисков фактор за развитието на лимфоидни фоликули у пациенти с гастрит (Perreira *et al.*, 2014). Ерадикацията на *H. pylori* се препоръчва като първа линия на терапия при *H. pylori* -позитивни индивиди с I степен MALT лимфом (Fischbach, 2014). Много проучвания съобщават за постигане на пълна

ремисия при 60%-80% от пациентите с нискостадийна MALT лимфом след ерадикация на *H. pylori*, както и ремисия над 10 г. при 64% от излекуваните. (Fischbach, 2014; Nagymási & Tulassay, 2014). Терапията на MALT лимфома в по-късните стадии е по-малко успешна.

### **6.7. Извънстомашни заболявания**

Връзка на *H. pylori* с извънстомашни заболявания е доказана за идиопатичната тромбоцитопенична пурпура (Kusters *et al.*, 2006). При пациенти с това заболяване се открива зависимост с колонизацията с *H. pylori* и ерадикационната терапия се оказва със значим ефект спрямо плацебо, що се отнася до увеличаването на броя на тромбоцитите (Tan & Goh, 2012). При такива пациенти следва да се обсъди изследване и лечение за *H. pylori* (Kusters *et al.*, 2006).

Мета-анализи са показали връзка на инфекцията с *H. pylori* и с рака на панкреаса, и с колоректалния карцином, но резултатите между отделните проучвания съществено се разминават, поради което за потвърждаване на тези зависимости са необходими по-задълбочени проучвания (Michaud *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013). За други заболявания също се предполага връзка - исхемична болест на сърцето, дерматологични заболявания като розацея и идиопатична уртикария, автоимунен тиреоидит, желязо-дефицитна анемия, склеродерма, метаболитен синдром и инсулинова резистентност, хронична уртикария и синдром на Guillain-Barre (Tan & Goh, 2012; Nagymási и Tulassay, 2014). Възможните хипотетични механизми включват хронична нискостепенна активация на каскадата на кръвосъсирването, усилване на атеросклерозата и антигенна мимикрия между *H. pylori* и епитопи на гостоприемника, което води до автоимунни проблеми (Kusters *et al.*, 2006). При тези състояния засега не е напълно ясно, доколко ерадикацията на *H. pylori* играе някаква роля, поради което са необходими по-мощни бъдещи проучвания (Kusters *et al.*, 2006).

### **7. Диагноза на инфекцията**

Има много различни методи за доказване на *H. pylori*, като всеки от тях има свои предимства, недостатъци и ограничения. Класическото им подразделяне е на инвазивни и неинвазивни в зависимост от това дали има нужда от ендоскопия (Garza-González *et al.*, 2014).

**Таблица 1.** Методи за детекция на инфекция с *H. pylori*

<b>Инвазивни методи</b>	<b>Неинвазивни методи</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Хистологично изследване</li><li>• Култивиране</li><li>• Бърз уреазен тест (БУТ)</li><li>• Полимеразо-верижна реакция (PCR)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Уреен дихателен тест (UBT)</li><li>• Серологично изследване</li><li>• Фекален антигенен тест (ФАТ)</li></ul>

## **7.1 Инвазивни методи**

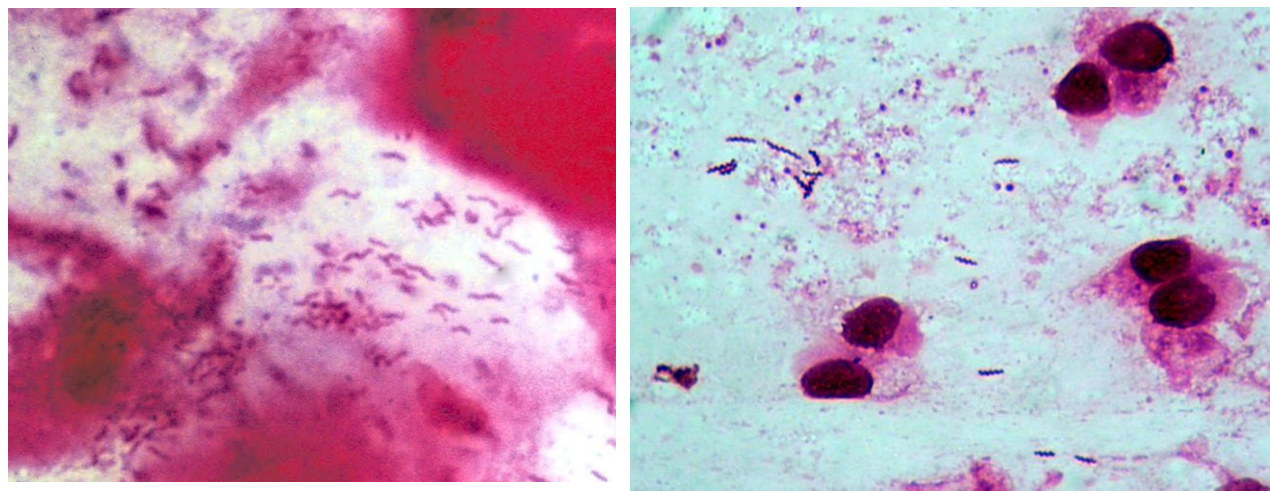
### **7.1.1. Хистология**

Хистологичното изследване е „класика“ в диагностиката на инфекцията с *H. pylori*, тъй като дава изключително важна информация за състоянието на лигавицата (напр. наличие на възпаление и за тежестта му, за поява на интестинална метаплазия, атрофия на стомашните жлези, дисплазия или неопластични промени), (Garza-González *et al.*, 2014). Препоръчително е да се вземат едновременно биопсични проби от антрума и от корпуса на стомаха (Lan *et al.*, 2012). „Златният стандарт“ за взимане на стомашни биопсии е в съответствие с осъвременената Sydney класификационна система, според която трябва да се вземе по една проба от следните 5 места: от малката кривина на корпуса; от малката и от голямата кривина на антрума; от средата на голямата кривина на корпуса; и от *incisura angularis* (Dixon *et al.*, 1996), но поради прекалената инвазивност и дискомфорт, причинен от взимането на толкова голям брой биопсични проби, този подход се ползва рядко; взимането на по-малък брой биопсии, обаче, е свързано с по-голяма грешка и възможни фалшиво-отрицателни резултати (Garza-González *et al.*, 2014).

За детекция на *H. pylori* в биопсични проби могат да се използват различни оцветявания, като съвременните наръчници препоръчват използването на поне две различни оцветителни техники. В практиката най-често се ползва оцветяване

хематоксилин-еозин за оценка на възпалението и Giemsa за детекция на *H. pylori*, тъй като тези методи са с евтини бои и са лесни за изпълнение (Garza-González *et al.*, 2014).

Основните ограничения при хистологичното изследване са свързани с нуждата от ендоскопия (поради което се прилага рядко при децата) и с това, че специфичността и чувствителността на метода варират силно (от 53% до 90%) в зависимост от опита и субективната оценка на изследващия. Често *H. pylori* засяга стомашната лигавица мозаично, поради което трябва да се вземат биопсии от различни места в стомаха (Garza-González *et al.*, 2014). В хистологични проби *H. pylori* се вижда като спирално извит бактерий по повърхността на епитела, в мукозния слой и в стомашните жлези (Фиг. 6). В стомаха (макар и много рядко) могат да се открият и други представители на рода като *H. heilmannii*, с който човек се инфектира от котки или кучета и може да причини хроничен гастрит. *H. heilmannii* е по-дълъг и с повече извивки и лесно се различава от *H. pylori* (Фиг. 6) (Garza-González *et al.*, 2014).



**Фиг. 6** Морфология на *H. pylori* (вляво) и *H. heilmannii* (вдясно)

Флуоресцентната *in situ* хибридизация (FISH) е нов метод, използван за детекция не само на *H. pylori*, но и на различни гени за резистентност, например към clarithromycin, в хистологични проби (Demiray-Gürbüz *et al.*, 2016). FISH използва маркирани олигонуклеотидни сонди за специфичен ген; най-често се ползват сонди, насочени към гени на 16S и 23S рРНК. Методът е бърз (отнема около 3 часа) и специфичен, като позволява да се открие точното местоположение на бактериите в лигавицата, но е

трудоемък и скъп, поради което не се използва в клиничната практика (Garza-González *et al.*, 2014).

### **7.1.2. Култивиране**

Култивирането е най-добре да се извърши от свежа биопсична проба, поради пониския риск от контаминация с коменсална флора (при пациенти с хипоацидитет е възможно да има по-обилен растеж на коменсали). Културелно може да се изследва и стомашен сок, но такова изследване е с по-ниска чувствителност и специфичност (Whitmire *et al.*, 2012). Обичайно култивирането има 100% специфичност и >90% чувствителност, но чувствителността на метода може сериозно да се влоши (до 40%) при пациенти с кървене от стомаха (Choi *et al.*, 2012; Ramis *et al.*, 2012).

*H. pylori* е много възискателен микроорганизъм и трябва да се култивира възможно най-скоро след вземането на пробата. Културелните му особености са описани по-горе в точки II 3.2 и II 3.3.

Култивирането е най-специфичният метод за доказване на *H. pylori*, макар че резултатите зависят от опитността на микробиолога, от качеството на пробата и използваната транспортна среда (Garza-González *et al.*, 2014). В миналото ролята на културелния метод в диагностиката на инфекцията с *H. pylori* се е ограничавала само до научни и епидемиологични проучвания (Garza-González *et al.*, 2014). В клиничната практика култивирането се е ползвало основно за да се изпита чувствителността към антибиотици след 2 неуспешни терапевтични курса за ерадикация при пациента и в повечето лечебни заведения по света не е налично и не се счита за рутинен диагностичен метод. В последно време, обаче, нивата на резистентност, особено към clarithromycin и metronidazole, бързо се покачват и е желателно повече лаборатории да бъдат в състояние да извършат култивиране и да изследват чувствителност на изолата и по-рано (преди да се стигне до два неуспешни курса за ерадикация) (Garza-González *et al.*, 2014).

### **7.1.3. Полимеразно-верижна реакция (PCR)**

PCR позволява да се открие и идентифицира *H. pylori* в малки проби с много малък брой на бактериите. PCR може да се извърши на проби, които се взети както с инвазивни,

така и с неинвазивни методи. Освен това PCR е дава крайния резултат по-бързо от много други диагностични методи, които се ползват в епидемиологичните проучвания. Значим недостатък на метода е, че може да открие ДНК на неживи бактерии в стомашната лигавица след терапевтичен курс и по този начин да даде фалшиво-положителен резултат (Duš *et al.*, 2013; Rimbara *et al.*, 2013). Молекулярната детекция на *H. pylori* с PCR може да се извърши и на материали, взети чрез неинвазивни методи или такива с минимална инвазивност; напр стомашен сок, слюнка, изпражнения, зъбна плака и др. Освен това молекулярните методи за с изключително значение за проби, които не могат да бъдат успешно култивирани, поради забавяне на транспорта им или поради прекомерна контаминация на пробата с коменсална флора (Garza-González *et al.*, 2014).

Молекулярните методи са ключови при откриването на *H. pylori* и на резистентност към флуорохинолони и clarithromycin, които се дължат съответно на точкови мутации в гените за гиразата и в 23S рРНК (Duš *et al.*, 2013). Един от тези методи е GenoType HelicoDR (Hain Lifescience). Тъй като в много държави в висока честота на инфекция с *H. pylori* резистентността се увеличава, молекулярните методи могат да бъдат реални алтернативи в диагностиката на *H. pylori* (Schweizer *et al.*, 2012).

#### **7.1.4. Бърз уреазен тест (БУТ)**

Принципът на БУТ е, че *H. pylori* разгражда големи количества урея, което може да се използва за диагностика на инфекцията. Парченце от биопсия се поставя в среда с урея и химичен индикатор за киселинност. Ако има уреазна активност, уреята се разгражда до въглероден диоксид и амоняк, при което рН на средата се увеличава, което води до промяна в цвета на индикатора. БУТ позитивира в рамките на няколко минути до 24 h в зависимост от броя на бактериите в биопсията. БУТ е евтин, бърз и високоспецифичен метод (Moon *et al.*, 2012). Уреазата се продуцира и от някои микроби в устната кухина, които могат да бъдат открити в пробата след преглъщане на слюнка, но оралната уреазата почти моментално се разгражда от стомашната киселина. Понякога, обаче, в следствие на терапия с антибиотици, бисмутови соли и/или инхибитори на протонната помпа активността на уреазата намалява и това може да е причина за фалшиво-отрицателен резултат (Moon *et al.*, 2012). Чувствителността на БУТ се влияе силно от количеството на бактериите в пробата – за положителен резултат в биопсията трябва да има поне  $10^5$

бактериални клетки. При наличие на кръв в пробата намаляват както чувствителността, така и специфичността (Moon *et al.*, 2012). Рискът от фалшиво-положителен резултат се увеличава при по-дълго инкубиране. Специфичността на търговските БУТ е >95%, но чувствителността им не е толкова висока (85%-95%), (Garza-González *et al.*, 2014).

## **7.2. Неинвазивни методи**

### **7.2.1. Серология**

Има няколко типа тестове за доказване на антитела срещу *H. pylori*. Най-често се ползват имуноензимни тестове (EIA), като повечето от тях доказват IgG, и специфичността и чувствителността им варират от 60% до 100% (в зависимост от възрастовата група); тестове, съдържащи смес от антигени на различни щамове, показват най-висока чувствителност (Garza-González *et al.*, 2014). Серологичните тестове са предпочитан метод на избор при пациенти, които доскоро са лекувани с антибиотици или PPI, при пациенти с кървящи язви или с атрофия на стомашната лигавица (Malfertheiner *et al.*, 2007). В останалите случаи, обаче, нито кръвните изследвания, нито изследването за антитела в урина или в слюнка са с достоверност близка до останалите тестове, поради което се използват най-вече за масов скрининг и епидемиологични проучвания (Malfertheiner *et al.*, 2007). Друг недостатък е дългото време (до 6 месеца) за спадане на титъра на антителата след ерадикация на инфекцията, което прави серологичните тестове неподходящи за доказване на ефект от терапията (Garza-González *et al.*, 2014). Като цяло, серологията е добър метод за точно определяне на пациентите с отрицателен резултат и е добра алтернатива на БУТ (Garza-González *et al.*, 2014).

Серологията може да се използва и за откриване на антитела срещу определени протеини на *H. pylori*, които са свързани с вирулентността на щама, напр. CagA (Garza-González *et al.*, 2014).

### **7.2.2. Уреен дихателен тест (UBT)**

UBT се основава на способността на *H. pylori*, в случай че присъства в стомаха, да разгражда приета перорално маркирана с  $^{13}\text{C}$  или с  $^{14}\text{C}$  урея до  $\text{CO}_2$  и амоняк.  $^{13}\text{CO}_2$  или  $^{14}\text{CO}_2$  дифузира в кръвта и, достигайки белите дробове, бива издишан и може да се измери

в издишания въздух. Тестът е лесен за изпълнение и не изисква ендоскопия (Garza-González *et al.*, 2014; Honar *et al.*, 2016). Чувствителността и специфичността на УВТ са >90% (Cosgun *et al.*, 2016). Както и при други диагностични тестове, УВТ може да даде фалшиво-отрицателен резултат след скорошна терапия, която потиска *H. pylori* и уреазната активност, напр. прием на PPI и антибиотици (Garza-González *et al.*, 2014).

### **7.2.3. Фекален антигенен тест (ФАТ)**

ФАТ използва имуноензимен метод за детекция на антигени на *H. pylori* във фекални проби. Той е надежден метод за диагностициране на активна инфекция и за потвърждаване на ефект от терапията. Фекалните проби могат да се съхраняват за няколко часа на стайна температура или за 72 h на 4°C (Garza-González *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2011; Pourakbari *et al.*, 2011). Резултатите от ФАТ се влияят от състояния (напр. констипация) на гастроинтестиналния тракт, лечение с PPI и наличие на кървящи язви (Garza-González *et al.*, 2014). Има налични търговски ФАТ с използване на поликлонални или на моноклонални антитела (Leal *et al.*, 2011).

## **8. Лечение**

Ерадикацията – т.е. липсата на *H. pylori* най-малко един месец след проведената терапия за инфекцията - се постига все по-трудно в последните години (Boyanova, 2011d). Има много схеми за лечение на инфекцията с *H. pylori*, но няма точно определено оптимално лечение и не е възможна ерадикация само с един антибиотик (Garza-González *et al.*, 2014). Използват се комбинации от различни антибиотици, напр. clarithromycin, amoxicillin, metronidazole или tinidazole, tetracycline, флуорохинолони и др. Те се комбинират с антисекреторни средства, като PPI, или с бисмутови соли. Различните комбинации на такива лекарствени средства са показали различна ефективност и различен процент на ерадикация на инфекцията и на поносимост от страна на пациентите (Garza-González *et al.*, 2014). Ефективността на антибиотичите е свързана с много фактори, вкл. активността, цена, странични ефекти, продължителност на терапията, поносимост от пациента, обща употреба на антибиотици в съответния регион и резистентността на микроорганизмите (Bang *et al.*, 2014). Ефективността на повечето обичайни терапии все

повече намалява, като най-вероятните причини за неуспех от терапията са увеличаващата се резистентност на *H. pylori* към един или повече антибиотици, както и сътрудничеството (комплайънс) от страна на пациента; в много региони тези фактори са редуцирали ефективността от лечението до нива от  $\leq 80\%$  и даже до  $50\%$  (Graham *et al.*, 2012; Maltferheiner *et al.*, 2012). В резултат на това, особено в страни с висока резистентност към clarithromycin (което е рисков фактор за неуспех при ерадикацията) се въвеждат нови терапевтични режими (Mégraud *et al.*, 2013a). Резистентността към amoxicillin остава на относително постоянно ниво, докато резистентностите към metronidazole и clarithromycin постоянно нарастват в много държави (Lee *et al.*, 2013; Mégraud *et al.*, 2013b; Su *et al.*, 2013). Честотата на антибиотичната резистентност варира значително според региона и е свързана с националната антибиотична консумация, т.е., цялостната употреба на антибиотици (особено на clarithromycin и metronidazole) за лечение на други видове инфекции и в много страни се наблюдава увеличаването ѝ с течение на времето (Garza-González *et al.*, 2014, Graham *et al.*, 2015).

Увеличаването на резистентността се дължи на различни механизми при различните групи антимикробни средства.

**Amoxicillin** е бактерициден бета-лактам антибиотик със средно широк спектър. Основните механизми, по които се развива резистентност към него, са промени в пеницилин-свързващите протеини (РВР), намаляване на мембранный пермеабилитет или комбинация от горните два. Други възможни механизми при *H. pylori* са експресията на ефлуксни помпи и точкови мутации в гена *pbp1A*, като са откривани мутации и в други гени, като *pbp2*, *hefC*, *hopC* и *hofH* (Qureshi *et al.*, 2014).

Понастоящем резистентността към amoxicillin все още е незначителна (0 to  $<2\%$ ) в Европа, напр. в Германия и Холандия (Selgrad *et al.*, 2014). Все още резистентността на *H. pylori* към amoxicillin не представлява проблем за терапията (Thung *et al.*, 2016).

**Clarithromycin** е бактериостатик, който инхибира бактериалната синтеза на белтъци, като обратимо се свързва с 50S субединицата на рибозомите – таргетното място на този антибиотик е пептидил-трансферазната примка на домен V на 23S рибозомната РНК. Резистентността към clarithromycin обичайно се дължи на точкови мутации в ген на 23S рРНК, сред които най-често се открива A2143G (69,8%), следвана от A2142G (11,7%) и A2142C (2.6%) (Mégraud *et al.*, 2004). Тези мутации пречат на свързването на

макролидите към мишената им (Mégraud *et al.*, 2004). За други мутации (напр. A2115G, G2141A, C2147G, T2190C, C2195T, A2223G и C2694A) също се предполага, че водят до развитие на резистентност към clarithromycin, но точната им роля им засега не е изяснена (Klesiewicz *et al.*, 2014). От най-голямо значение за избора на терапия е резистентността към clarithromycin, която нараства сравнително бързо, като честота ѝ достига приблизително 30% в Япония и Италия, 40% в Турция и 50% в Китай. От друга страна тя се среща доста по-рядко в държави като Тайван и Швеция (<15%), (Liou *et al.*, 2015; Thung *et al.*, 2016). Подобни тенденции за увеличаване на резистентността има и по отношение на други използвани антибиотици, макар че тенденциите при тях не са така ясно изразени (Thung *et al.*, 2016) (Фиг. 7).

**Metronidazole** е бактерицидно антимикробно средство от групата на нитроимидазолите. Неговата молекула се активира от нитроредуктази в цитоплазмата на микробната клетка, което води до образуване на токсичен метаболит. В щамове *H. pylori*, резистентни на metronidazole, се откриват мутации в гена *rdxA*, който кодира NADPH-нитроредуктаза, нечувствителна на кислород (RdxA), необходима за вътреклетъчното активиране на лекарството (Mizraei *et al.*, 2014).

Като цяло, в много държави процентът на резистентност към metronidazole расте (Фиг. 7). (Boyanova *et al.*, 2014; Okamura *et al.*, 2014; Tsay *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). В Европа и Северна Америка честотата на резистентността на *H. pylori* към metronidazole варира между 20% и 40% освен в Северна Италия, където е била 14.9% (Thung *et al.*, 2016). Общият процент на резистентност към metronidazole в Европа е била 33.1%, като няма съществени разлики между северните и южните европейски страни (Thung *et al.*, 2016). В развиващите се страни се докладва по-висока честота (50%–80%), например в Мексико (76,3%), а в Япония (9–12%), Канада (18-22%) и САЩ (21,5%) резистентност към metronidazole се открива по-рядко; възможно обяснение за това би могло да е разликите в общата употреба на metronidazole в различните държави (Thung *et al.*, 2016).

**Tetracycline** е антибиотик, който инхибира протеиновата синтеза посредством свързване с 30S рибозомната субединица; това блокира свързването на аминок-ацил-tРНК и съответно се спира синтезът на новите пептидни вериги. Резистентността към tetracycline се дължи на увеличен ефлукс на tetracycline-катионни комплекси през клетъчната мембрана, което става с помощта на мембранно-свързани ефлуксни протеини; в резултат

намалява вътреклетъчната концентрация на антибиотика (Thung *et al.*, 2016). Друг механизъм за резистентност към tetracycline е чрез рибозомни защитни протеини. Те намаляват афинитета на рибозомите за свързване с антибиотичната молекула или разрушават връзката между антибиотика и рибозомата. Възможно е и ензимно инактивиране на tetracycline, както и точкови мутации в гени на 16S рРНК, които повлияват мястото на свързване на антибиотика (Thung *et al.*, 2016).

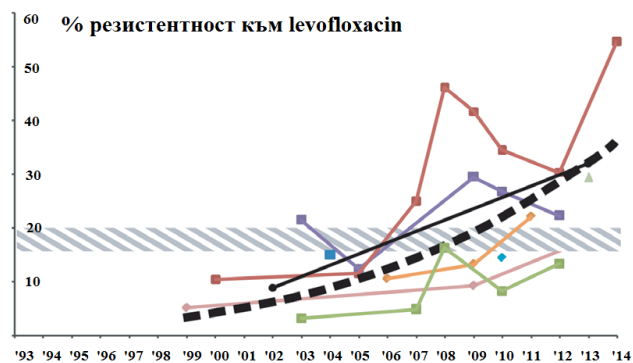
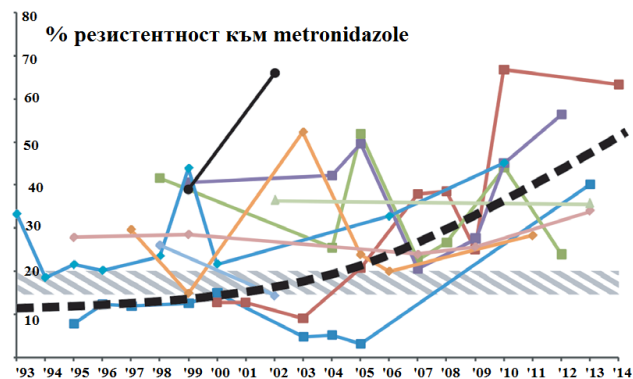
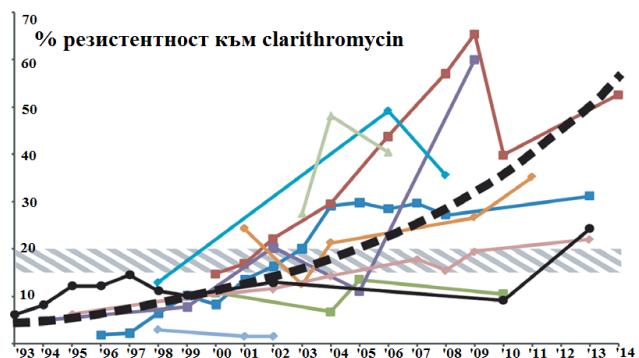
**Levofloxacin** - За резистентността към флуорохинолони са отговорни точкови мутации, основните от които се откриват в позициите на кодоните, кодиращи аминокиселини 87, 88, 91 или 97 на гените, кодиращи гиразата (Thung *et al.*, 2016). Някои флуорохинолони, напр. sitafloxacin могат да преодолеят резистентността, дължаща се на точкови мутации (Hirata *et al.*, 2012).

Честотата на резистентността към флуорохинолони е изследвана в сравнително малко на брой проучвания (Maltferheiner *et al.*, 2012). При възрастни пациенти в Европа се съобщава честота от 14.1% (Mégraud *et al.*, 2013b). В Китай, САЩ и Италия резистентност към levofloxacin е съобщавана съответно в 34,5%, 31,9% и 22,1% (Saracino *et al.*, 2012; Shiota *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Въпреки че резистентността към този клас антибактериални средства не е проучвана толкова подробно, има тенденция към бързо увеличаване на устойчивите на levofloxacin *H. pylori* (Фиг. 7), (Saracino *et al.*, 2012; An *et al.*, 2013; Mégraud *et al.*, 2013b; Boyanova *et al.*, 2014; Caliskan *et al.*, 2015; Liou *et al.*, 2015; Shiota *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

## 8.1.Терапевтични схеми

Една от първите стратегии, използвани за лечението на инфекцията с *H. pylori*, е стратегията test-and-treat („изследвай и лекувай”), която се базира на откриването на *H. pylori* и последващото му ерадикиране. Този подход се препоръчва за пациенти на възраст <45 години, които имат персистираща диспепсия, пептична язвена болест, нискостепенен MALT лимфом и атрофичен гастрит (Garza-González *et al.*, 2014). Test-and-treat се ползва основно в региони с висока честота на инфекцията, докато в райони с умерена честота на *H. pylori* ( $\geq 10\%$  to  $20\%$ ) следва да се търси алтернатива, а емпирична PPI стратегия е за предпочитане в популации с ниско превалиране на *H. pylori*, понеже в такива популации диагностичните тестове с по-ниска точност (Maltferheiner *et al.*, 2012).

Понастоящем се препоръчва да се раздели емпиричната терапия на първа линия за две групи (Таблица 2): популации с ниска и популации с висока резистентност към clarithromycin, като границата на резистентността към този антибиотик се поставя на 15% до 20% (Maltferheiner *et al.*, 2012).



— Япония — Китай — Тайван — Ю. Корея — Испания  
 — Италия — Швеция — България — Турция — САЩ

**Фиг. 7.** Динамика в резистентността на *H. pylori* към антибиотици в някои държави (Thung *et al.*, 2016). Прекъснатата линия показва прага, при който следва да има промяна в терапевтичното поведение.

**Терапия на първа линия в региони с ниска (<15%) резистентност към кларитромицин** е класическата тройна терапия: включва PPI, clarithromycin и amoxicillin (Bang *et al.*, 2014). Този режим се ползва отдавна, но ефективността му намалява в световен мащаб (Khalifa *et al.*, 2010). При пеницилинова алергия amoxicillin може да се замени с metronidazole, като ефективността на терапията се запазва (Garza-González *et al.*, 2014). Основна причина за неуспех от стандартната тройната терапия е резистентността към clarithromycin (Khalifa *et al.*, 2010), поради което някои автори препоръчват в региони с високи проценти на резистентност към clarithromycin този антибиотик да не се включва в емпиричните терапии на първи избор (Graham *et al.*, 2014). Съгласно Maastricht guidelines при популации, където антибиотичната резистентност на *H. pylori* надвишава 20%, се препоръчва да се изследва чувствителността на микроорганизма към антибиотици, преди да се започне терапия (Maltferheiner *et al.*, 2012). Необходимо е да се вземе предвид и дали пациентът е взимал антибиотици по друг повод, понеже предшестващи курсове с макролиди могат да повишат процента на резистентност към clarithromycin (Thung *et al.*, 2016). Въпреки това, според европейските правила се препоръчва 7-дневен курс с тройна терапия в популации с <15% резистентност към clarithromycin, а ако тази резистентност се среща в >20% курсът следва да е 14-дневен (Maltferheiner *et al.*, 2012).

**Терапия на първа линия в региони с висока (>20%) резистентност към clarithromycin** е четворната терапия, при която се комбинират PPI, бисмутови соли и два антибиотика - metronidazole и tetracycline за 10-14 дни. Този режим се толерира сравнително добре и комплайънсът на пациентите е добър, но не навсякъде по света е възможен, напр. при липса на бисмутови препарати. Поради това е добре да се имат предвид и алтернативни режими (Maltferheiner *et al.*, 2012). Като алтернативи на четворната терапия, могат да се ползват секвенциална, конкомитантна и хибридна терапии (Thung *et al.*, 2016).

**Секвенциална терапия:** предложена е от група италиански учени и включва комбинация от PPI и amoxicillin за 5 дни, последвана от PPI и clarithromycin+metronidazole за 5 дни (Zullo *et al.*, 2013). Повечето проучвания показват, че няма разлика в успеха на секвенциалната терапия и на четворната терапия с бисмут (Lloyd *et al.*, 2011).

**Конкомитантна терапия:** включва едновременното прилагане на три антибиотика (metronidazole, clarithromycin и amoxicillin) и на PPI за 10 дни и се използва вместо секвенциалната в райони с висока резистентност към clarithromycin и където не е налична четворна терапия, включваща бисмутови съединения (Zullo *et al.*, 2013). Този режим е достатъчно ефективен и се понася добре в сравнение с класическата тройна терапия (Thung *et al.*, 2016).

**Хибридна терапия:** Състои се от две стъпки: (1) лечение с PPI и amoxicillin за 7 дни, последвано от (2) PPI + 3 антибиотика: amoxicillin, metronidazole и clarithromycin за още 7 дни (Thung *et al.*, 2016).

**Терапия на втора линия:** При провал на класическите тройна или четворна терапии се препоръчва тройна терапия с PPI, levofloxacin и amoxicillin (Garza-González *et al.*, 2014). Въпреки това използването на levofloxacin може да се компрометира поради увеличаващата се резистентност към това антибактериално средство, поради което преди началото на втория терапевтичен курс следва да се направи изследване за чувствителност (Garza-González *et al.*, 2014).

**Терапия на трета линия („спасителна” терапия):** След два неуспешни терапевтични курса не е удачно да се предписват последващи антибиотични курсове без данни за антибиотичната чувствителност на щама. Винаги, когато това е възможно, трябва да се вземе биопсична проба, и да се извърши културелно изследване и изследване за антибиотична чувствителност (Maltferheiner *et al.*, 2012).

Антибиотици, които могат да се включат в „спасителните” режими, са: rifabutin, furazolidone и др.

### **Ерадикация на *H. pylori* по време на бременност**

Ако диагнозата бъде поставена на бременни жени или кърмачки, лечението трябва да е само с антиацидни средства. Към ерадикация може да се пристъпи едва след раждането, понеже бисмутовите съединения, хинолоните и тетрациклините са категорично

противопоказани по време на бременност, а metronidazole също трябва да се избягва (Garza-González *et al.*, 2014).

**Таблица 2.** Режими за начална терапия за ерадикация на *H. pylori*

Стандартни и режими	Препоръки	Терапевтичен режим	Продължителност на терапията
Тройна терапия	В региони с ниска резистентност към clarithromycin или при пациенти без предшестващо лечение с макролиди	Стандартна доза PPI 2 x ден - Clarithromycin 500 mg 2 x ден - Amoxicillin 1000 mg	10-14 дни
Четворна терапия	В региони с висока резистентност към clarithromycin или при пациенти с предшестващо лечение с макролиди	Стандартна доза PPI Bismuth 525 mg 4 x ден - Tetracycline 500 mg 4 x ден - Metronidazole 250 mg	10-14 дни
<b>Алтернативни режими</b>			
Секвенциална терапия		първите 5 дни: стандартна доза PPI два пъти на ден + Amoxicillin 1000 mg два пъти на ден	5 дни
		• следващите 5 дни: стандартна доза PPI два пъти на ден + Clarithromycin 500 mg два пъти на ден + Metronidazole 500 mg два пъти на ден	5 дни
Конкомитантна терапия		2 x ден - стандартна доза PPI 2 x ден - Metronidazole 500 mg 2 x ден - Clarithromycin 500 mg 2 x ден - Amoxicillin 1000 mg	
Хибридна терапия		Първите 7 дни: стандартна доза PPI 2 x ден + Amoxicillin 1000 mg 2 x ден	7 дни
		• Следващите 7 дни: стандартна доза PPI 2 x ден + Amoxicillin 1000 mg 2 x ден + Clarithromycin 500 mg 2 x ден + Metronidazole 500 mg 2 x ден	7 дни

### **Пробиотици при лечение на инфекция с *H. pylori***

Пробиотиците се конкурират с *H. pylori* за адхезионни места по лигавицата, а могат да увреждат и пряко *H. pylori* като произвеждат бактериоцини. Добавянето на пробиотици в терапевтичния режим може да доведе до по-висок успех на ерадикацията и до по-малко странични ефекти (диария и/или повръщане); това обаче зависи много от това какъв точно щам пробиотични бактерии се използват, от продължителността на приема и от използваните дози (Ahmad *et al.*, 2013).

По отношение на инфекцията с *H. pylori* все още има много предизвикателства и нерешени въпроси. Тя често е доживотна и носи дълготрайни рискове от хронични гастродуоденални заболявания, язви и тумори; освен това тези бактерии са със силно изразена щамова вариабилност и има големи различия в разпространението и клиничната роля на отделните фактори на вирулентност на *H. pylori* в различните географски региони по света. Това дава основание в настоящия дисертационен труд да се проучат детайлно характеристиките на инфекцията с *H. pylori* в България.

### III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертационна работа е да се извърши комплексно проучване на вирулентността на щамове *H. pylori*, тяхната антимикробна резистентност и разпространението на инфекцията в България.

За постигане на тези цели си поставихме следните **ЗАДАЧИ**:

1. Да се изолират и идентифицират щамове *H. pylori* с конвенционални и молекулярно-генетични методи.
2. Комплексно да се проучат факторите на вирулентност чрез молекулярно-генетични методи и да се потърси връзка с данни на пациентите и с други характеристики на щамовете.
3. Да се установи наличието на *H. pylori* в устната кухина на пациенти със стоматологични и/или гастродуоденални болести с помощта на няколко метода: културелна изолация, бърз уреазен тест, имунофлуоресценция с моноклонални антитела и PCR.
4. Да се установи серопревалирането на анти-*H. pylori* IgG и анти-CagA IgG сред безсимптомни кръводарители посредством ензимно-свързан имуносорбентен тест (ELISA).
5. Да се установи и анализира чувствителността на изолатите чрез MIC strip и/или метода на граничните стойности към clarithromycin и metronidazole, като най-често използвани средства за ерадикация.

## IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Пациенти и бактериални изолати

#### 1.1. Бактериални изолати /биопсии/

В проучването бяха включени последователно 479 *H. pylori* изолати от лекувани и нелекувани пациенти изолирани за периода януари 2005 – декември 2015 г. в Катедрата по Медицинска микробиология - МУ-София. От всички възрастни пациенти, както и от родителите на децата, беше взето писмено информирано съгласие. От всеки пациент бяха взети по две биопсии /антрална и корпусна/. Те бяха пренасяни в транспортна среда на Stuart (Merck, Darmstadt, Germany). Пробите от 36 лекувани пациенти бяха вземани най-малко един месец след приключване на терапията за ерадикация на *H. pylori*, която включваше amoxicillin, clarithromycin, metronidazole и инхибитор на протонната помпа (PPI) или amoxicillin, clarithromycin, tetracycline, бисмутово съединение и PPI в различни тройни или четворни комбинации.

Изследваните пациенти бяха от университетска болница „Св. Екатерина”, Катедрата по хепатобилиарна и панкреатична хирургия, Университетската педиатрична болница, Университетска болница „Св. Иван Рилски” и Клиника по гастроентерология при Клиничния център по гастроентерология, УМБАЛ Царица Йоанна МУ- София на Медицински университет – София, Отделение спешна ендоскопия- МБАЛСМ “Пирогов”- София и МБАЛ „Токуда Болница София”. Единични пациенти бяха от други центрове.

Проучванията бяха одобрени от етичната комисия на Медицински университет-София, София, България.

#### 1.2 Бактериални изолати /устна кухина/

Допълнително бяха включени 56 проби от зъбна плака (от вътрешната повърхност на долните моларни зъби ) на 43 пациенти от София , нелекувани за *H. pylori* инфекция, от които 9 деца. От всички изследвани, 8 имаха орални заболявания, 13 стомашни

заболявания и 9 души и стомашни и орални заболявания. Общо 13 души нямаха нито орални, нито стомашни болести. Пробите от зъбна плака бяха изследвани културелно, микроскопски, с бърз уреазен тест, имунофлуоресценция с моноклонални антитела и PCR от чисти култури. Проучванията бяха одобрени от етичната комисия на Медицински университет- София, София, България.

### 1.3. Изолиране и идентификация

Всяка биопсична проба се разделяше на три части. От едната част се приготвяше натривка върху предметно стъкло. Натривката се фиксираше и се оцветяваше по модифициран метод на Gram, с използване на карбол-фуксин вместо сафранин за по-добро оцветяване на *H. pylori*. Втората част се използваше за приготвен на място **бърз уреазен тест (БУТ)**, като от биопсичната проба се поставяше в агарова среда, съдържаща 10% w/v урея. За БУТ се използваше на Urea agar base (Merck, Darmstadt, Germany) и се добавяше стерилизирана чрез филтриране урея (Merck, Darmstadt, Germany), след като агарът е автоклавиран и охладен до 48°C. Като положителна и отрицателна контроли се използваха съответно клинични щамове *Proteus mirabilis* и *Escherichia coli*. БУТ се инкубираше на 35°C. Преглеждаше се за промяна на цвета след инкубиране за 30 min и за 3h. Последната част от биопсичната проба се хомогенизираше в 0,1 ml стерилен физиологичен разтвор, като за тази цел се ползваха стерилни игли. След това хомогенизираният материал се използваше за посевка. Култивирането се извършваше на неселективен агар (Columbia agar base; Becton Dickinson, или Oxoid), съдържащ 10% v/v овнешка кръв, както и на селективна среда с кръв (както по-горе), съдържаща 1% v/v Isovitalex (Becton Dickinson), vancomycin 10 mg/l, trimethoprim 5 mg/l, cefsulodin 5 mg/l и amphotericin B 5 mg/l. За първичното култивиране на биопсичните проби се използваха по едно петри със селективна и едно петри с неселективна среда (Boyanova, 2007). Петритата се инкубираха при 35-37° C за до 12 дни в микроаерофилна атмосфера (най-често CampyGen на Oxoid, или Campy Pak; Becton Dickinson). Идентификацията на *H. pylori* се основаваше на оцветяването по Gram на колониите, липсата на аеробен растеж на петрита с кръвен агар, и тестовете за наличие на уреаза, оксидаза и каталаза. Пробите се считаха за положителни за *H. pylori*, ако

култивирането е показало положителен резултат, или, в случай на липса на растеж при култивиране, ако са положителни и двата други теста (оцветяване по Gram и БУТ).



**Фиг. 8.** Растеж на *H. pylori* на неселективна среда

Микроскопски типичната морфология на *H. pylori* при оцветяване по Грам е Грам +/- спирален микроорганизъм с 2-3 извивки; за разлика от него *H. heilmannii* има форма на тирбушон с 3 до 8 извивки, които са по-големи от тези при *H. pylori* (фиг. 8). *H. heilmannii* не се култивират и позитивират уреазния тест едва след 24-часова инкубация.

**При изолата от устна кухина** беше допълнително проведена имунофлуоресцентната микроскопия с 4 моноклонални антитела (МКА) (121F3, 122E9, 123B11 и 161 F8) произведени в Катедра медицинска микробиология, Медицински университет-София. Проучвания върху антителата, използвани в настоящия дисертационен труд са показали, че тези антитела не дават кръстосани реакции с *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus* и *Yersinia enterocolitica* (Mitov *et al.*, 1998). Препаратите бяха фиксирани трикратно на пламъка на спиртна лампа и с метанол (за 10 мин.) и върху тях са накапвани 25–50 µl от специфичните МКА поотделно, както и смес от тях. Препаратите бяха инкубирани във влажна камера на 37<sup>0</sup> C за 60 мин. След това препаратите бяха промивани трикратно с фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS), рН 7.3. Добавяха се 25–50 µl от FITC (Fluorescein Isothiocyanate)-маркирани анти-миши антитела (НЦЗПБ, София, България), след което препаратите бяха инкубирани във влажна камера на 37<sup>0</sup> C за 60 min и след това се промиваха трикратно с PBS. Накрая върху препаратите се накапваше имерсионно масло и

се наблюдаваха с флуоресцентен микроскоп. Резултатите се отчитаха според интензитета на флуоресценцията. Използвана беше и отрицателна контрола без МКА (конюгат FITC).

## **2. Молекулярно –генетични методи за определяне на факторите на вирулентност**

### **2.1 Екстракция на ДНК**

Беше използвана термоекстракция. Изолираните щамове *H. pylori* с помощта на стерилен тампон бяха суспендирани в 500 µl стерилен фосфатен буферен разтвор (PBS) (рН 7.3). Бактериалната суспензия беше центрофугирана на 12000 rpm в хладилна центрофуга (HERMLE, Германия) на 4°C и ресуспендирана в TE буфер (10 mM Tris; 1 mM EDTA; рН ~8.0-8.3) буфер. ДНК беше екстрахирана посредством последващо варене на 100°C за 10 минути. Термоекстрактите бяха съхранявани във фризер на -30°C.

По отношение на пробите от устна кухина беше използвана екстракция с кит по указанията на производителя - Illustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Lifesciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

### **2.2. Амплификация на гени чрез полимеразно-верижна реакция (PCR)**

PCR-амплификацията беше проведена в следните термосайкълъри: TechGene Thermal Cycler модел: FTGENE5D (Techne, Cambridge, UK); GenePro Thermal Cycler модел: TC-E-96G (BIOER, Hangzhou, Китай) и LifeECO модел: TC-96/H(b)C (BIOER, Hangzhou, China). PCR протоколите са според цитираните в Таблица 3 източници, като амплификационната реакция включва начална денатурация при 94 °C или 95, последвана от съответен брой амплификационни цикли включващи а) денатурация при 94°C или 95°C; б) свързване на праймерите (annealing) (Таблица 3) и в) полимеризация при 72°C, след което се приключва с крайна екстензия при 72°C. Използваните праймери, температурите на свързване и времетраенето на отделните етапи както и размерите на амплификационните продукти са представени в Таблица 3. Всички използвани праймери са от публикувани статии (Таблица 3) и са синтезирани от Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK , Alpha DNA, USA и Metabion, Germany.

**Таблица 3.** PCR праймери за генотипиране на *H. pylori*.

Ген	Праймери	Размер (bp) на продукт	Температура на свързване на праймерите	Литература
<i>Urea</i>	HPU1 F 5'-GCC AAT GGT AAA TTA GTT-3' HPU2 R 5'-CTC CTT AAT TGT TTT TAC-3'	411	45 °C	Smith et al., 2004
<i>cagPAI</i>	Emsite2872F 5'-CCA AAT ACA TTT TGG CTA AAT AAA C-3' Emsite3326R 5'- CTC TTT TTG TGC CTT TGA TTG AA-3'	680	61°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>cagA</i>	cagAF 5'-AGG GAT AAC AGG CAA GCT TTT GA-3' cagAR 5'-CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A-3'	352	60°C	Podzorski et al., 2003
	A1 5'-GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG GGA-3' A2 5'-CCA TGA ATT TTT GAT CCG TTC-3'	394	58°C	Broutet et al., 2001
	A3 5'-ATG GGG AGT CAT GAT GGC ATA GAA CC-3' A4 5'-ATT AGG CAA ATT AAA GAC AGC CAC C-3'	717	58°C	Broutet et al., 2001
<i>cagE</i>	cagEF 5'-TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC-3' cagER 5'-GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C-3'	508	59°C	Tomasini et al., 2003
	cagE0544F 5'- CTC ATA GAG TTA CAC GCT TC-3' cagE0544R 5'- CAA ATC GCT CTG TGA TTT AGG-3'	627	54°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>cagM</i>	cagM0537F 5'-GAA AGA AAC AAG TTT GAC TC-3' cagM0537R 5'-TAA TAT AGA TTT TTT GGA TTG GG-3'	294	50°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>cagT</i>	cagT0532-F 5'- GAT TAC GCT CAT AGG CGA TG-3' cagT0532-R 5'-ATC ACA TTC TGC CTC ATT TGA-3'	435	54°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>cagW</i>	cagW0529-F 5'-AGT TTA TTG CAT GCT GAT ACC G-3' cagW0529-R 5'-CAG CTG TAA TAT TCG TAG AAG C-3'	452	54°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>CagY</i>	cagY0527-F 5'-AGG TTG CAT CAA GCA AGC G-3' cagY0527-R 5'-GTG GGA TCA CTC TTG CCT A-3'	648	54°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>Caga</i>	caga 0525 F 5'-CCT CTA AGG CAT GCT ACT G-3' caga 0525 R 5'-TTC TTC ACT GCT CCC TGC-3'	759	54°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>CagY</i>	cagY 0523F 5'-AGT AAC CAT CAG TTT CAA GCA A-3' cagY 0523R 5'-CAT TTC TAC TAA TTG ATA CAC GC-3'	349	54°C	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>Cagδ</i>	cagδ 0522F 5'-CAA GCG CTT TTT GAT ATA TAC GA-3' cagδ 0522R 5'-TAT AAG CTA TAA GGA GCA ATG ATA-3'	545	54°C 30 s	Olbermann <i>et al.</i> , 2010
<i>vacA</i>	S1aF 5'-GTC AGC ATC ACA CCG CAA C-3'	190	55 °C	Podzorski et al., 2003
<i>s1a</i>	S1aR 5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C -3'		30 s	

Ген	Праимери	Размер (bp) на продукт	Температура на свързване на праимерите	Литература
<i>vacA</i> <i>s1b</i>	S1bF 5'-AGC GCC ATA CCG CAA GAG-3' S1bR 5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C-3'	187	55 °C 30 s	Podzorski et al., 2003
<i>vacA s2</i>	S2F 5'-GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC-3' S2R 5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C-3'	199	58 °C 30 s	Podzorski et al., 2003
<i>vacA m1</i>	M1F 5'-GGT CAA AAT GCG GTC ATG G-3' M1R 5'-CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC-3'	290	55 °C 30 s	Podzorski et al., 2003
<i>vacA m2</i>	M2F 5'-GGA GCC CCA GGA AAC ATT G-3' M2R 5'-CAT AAC TAG CGC CTT GCA C-3'	352	56 °C 30 s	Podzorski et al., 2003
<i>vacA i1</i>	i1-F1 5'-GTT GGG ATT GGG GGA ATG CCG-3' i1-C1R 5'-TTA ATT TAA CGC TGT TTG AAG-3'	426	53 °C 1 min	Rhead et al., 2007
<i>vacA i2</i>	i2 – F1 5'-GTT GGG ATT GGG GGA ATG CCG-3' i2 – C2R 5'-GATCAACGCTCTGATTTGA-3'	432	53 °C 1 min	Rhead et al., 2007
<i>homA u</i> <i>homB</i>	<i>homB</i> -F 5'-AGA GGG TGT TTG AAA CGC TCA ATA-3 <i>homB</i> -R 5'-GGT GAA TTC TTC TGC GGT TTG-3'	128 ( <i>homA</i> ) 161 ( <i>homB</i> )	60°C	Oleastro et al., 2006
<i>jhp0562</i>	GalT- <i>jhp0562</i> F 5'-TGA AAA GCC CTT TTG ATT TTG-3' GalT- <i>jhp0563</i> R 5'-GCT GTA GTG GCC ACA TAC ACG-3'	301	58 °C	Oleastro et al., 2010
<i>iceA1</i>	iceA1F 5'-GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC-3' iceA1R 5'-CTA TAG CCA STY TCT TTG CA-3'	247	48 °C	Yamaoka et al., 1999
<i>iceA2</i>	iceA2F 5'-GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT-3' iceA2R 5'-TTR CCC TAT TTT CTA GTA GGT-3'	229	48 °C	Yamaoka et al., 1999
<i>babA2</i>	babA2F 5'-AAT CCA AAA AGG AGA AAA AGT ATG AAA-3' babA2R 5' -TGT TAG TGA TTT CGG TGT AGG ACA-3'	832	56°C	Podzorski et al., 2003
<i>dupA</i>	JHP0917 F 5'-TGG TTT CTA CTG ACA GAG CGC-3' JHP0917 R 5'-AAC ACG CTG ACA GGA CAA TCT CCC-3' JHP0918 F 5'-CCT ATA TCG CTA ACG CGC GCT C-3' JHP0918 R 5'- AAG CTG AAG CGT TTG TAA CG-3'	307  276	52°C	Lu et al., 2005
<i>oipA</i>	HP0638-F 5'-GTT TTT GAT GCA TGG GAT TT-3' HP0638-R 5'-GTG CAT CTC TTA TGG CTT T-3'	401	52°C	Kauser et al., 2005b

Всички продукти от PCR бяха анализирани електрофоретично на 1.5% агарозен гел. Агарозата Standard EEO (Applichem, Germany; Serva, Germany или SeaKem LE Agarose, LONZA, Rockland, ME) беше разтопявана в 100 ml 1x TAE (40mM Tris, 20mM оцетна киселина, 1mM EDTA) буфер в микровълнова фурна на 200 W за около 2 min до достигане на хомогенна стопилка. След това беше добавян етидиев бромид до крайна концентрация 0,5 µg/ml. Агарозата се изливаше във ваничка за хоризонтална електрофореза, поставена в камера за електрофореза. Поставяше се гребен за електрофореза. След полимеризиране на агарозата в електрофоретичната вана се наливаше 1x TAE буфер, гребенът се отстраняваше и се накапваха пробите. Предварително 10 µl от PCR-продукт се смесваха с 1-2 µl 6x DNA Loading Dye (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada) или Gel Loading Dye (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Във всяка електрофореза се оставяше един старт, в който се накапва молекулен маркер PCR Sizer 100 bp DNA Ladder (Norgen Biotek Corp., Ontario, Canada), или New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA. Електрофорезата се провеждаше за 50 до 90 минути при 400 mA и 120V. Амплификационните продукти бяха визуализирани на UV-лъчев трансилюминатор TFX-35M (Vilber Lourmat, France).

### **2.2.1. Видова идентификация чрез полимеразо-верижна реакция (PCR) за ген, кодиращ уреаза (*ureA*)**

За доказване на *H. pylori* беше използвана PCR за специфичния за този бактериален вид ген за уреаза - *ureA*. Реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), съдържащ 2 mmol MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Prime Taq DNA polymerase ( GenetBio Inc, Korea) или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, UK).

PCR протоколът включваше начална денатурация на 94 °C за 5 минути, последвана от 35 амплификационни цикъла от денатурация на 94 °C за 50 секунди, свързване на праймерите при 45 °C за 50 секунди и полимеризация на 72 °C за 1 минута. Крайната екстензия беше за 5 минути при 72 °C. Използваните праймери бяха според Smith *et al.* (2004). Размерът на продукта е 411 bp (Табл. 3).

### **2.2.2. Детекция чрез PCR на мозаичните алели на гена за вакуолизиращ цитотоксин (*vacA*)**

За доказването на *vacA* s1a, s1b, s2, m1, m2, i1 и i2 бяха използвани праймери от литературата (Podzorski *et al.*, 2003; Rhead *et al.*, 2007) и следния протокол: начална денатурация на 95°C за 5 минути, последвана от 35 амплификационни цикъла от денатурация на 94°C за 30 секунди, свързване при 55°C (за *vacA* s1a, s1b и m1), 56°C (за *vacA* s2), 58°C (за *vacA* m2) за 30 секунди или на 53°C за 1 минута (за *vacA* i1 и i2) и удължаване на 72 °C за 30 секунди. Крайната екстензия е за 5 минути при 72°C. Размерите на продуктите, използваните праймери и температурите и времетраенето на свързването са представени в Таблица 1. Реакционната смес се приготвяше в обем 25 µl включваше 1,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (ABgene, Epson, Surrey, UK), крайна концентрация 1.5 mmol MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Taq Polimerase (ABgene, Epson, Surrey, UK). 1x reaction buffer (ABgene, Epson, Surrey, UK), съдържащ 2 mmol MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP),

### **2.2.3. Детекция на цитотоксин асоциирания ген А (*cagA*) чрез PCR**

За доказването на *cagA* бяха използвани праймери от литературата (Podzorski *et al.*, 2003) и следния протокол: начална денатурация на 95°C за 5 минути, последвана от 35 амплификационни цикъла от денатурация на 94°C за 45 секунди, свързване на праймерите при 60°C за 30 секунди и полимеризация на 72 °C за 30 секунди. Крайната екстензия беше за 5 минути при 72°C. Размерът на продукта е 352 bp (Табл. 3). Реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), съдържащ 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Prime Taq DNA polymerase ( GenetBio Inc, Korea) или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, UK)

Допълнително статусът на *cagA* беше определен и посредством амплификация по метода описан от Broutet *et al.* (2001) с използване на две двойки праймери: с първата двойка (A1-A2) се постига амплификация на фрагмент с големина 394 bp, а с втората (A3-A4) се амплифицира 717 bp фрагмент (Табл. 3). Втората амплификация се извършваше, само когато първата е отрицателна. Статусът на *cagA* се определяше като положителен,

ако PCR реакцията даде положителен резултат с поне една от двете двойки праймери (Broutet *et al.*, 2001). Посочените праймери се ползваха в един и същ протокол за PCR, включващ 40 цикъла, както следва: 1 min при 94°C, 1 min при 58°C и 1 min при 72°C.. Реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), съдържащ 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Prime Taq DNA polymerase ( GenetBio Inc, Korea) или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, UK).

#### **2.2.4. Детекция на цитотоксин асоциирания ген E (*cagE*) чрез PCR**

За доказването на *cagE* бяха използвани праймери от литературата (Tomasini *et al.*, 2003) и следния протокол: начална денатурация на 95°C за 5 минути , последвана от 35 амплификационни цикъла от денатурация на 94°C за 45 секунди, свързване при 59°C за 30 секунди и полимеризация на 72 °C за 45 секунди. Крайното удължаване беше за 5 минути при 72°C. Размерът на продукта беше 508 bp (табл. 1). Реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), съдържащ 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea) или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, UK).

При 150 ДНК-екстракта бяха използвани и праймери, публикувани от Olberman *et al.*, (2010) и следния протокол: начална денатурация на 95°C за 5 минути, последвана от 35 амплификационни цикъла от денатурация на 95°C за 45 секунди, свързване при 54°C за 30 секунди и полимеризация на 72°C за 45 секунди. Крайното удължаване беше за 5 минути при 72°C. Размерът на продукта беше 627 bp (табл. 1). Мастър-миксът включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 5x KAPA Taq Buffer C (KAPABiosystems, Boston, Massachusetts, USA), 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l концентрация на всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), KAPATaq DNA Polymerase (KAPABiosystems, Boston, Massachusetts, USA).

### **2.2.5. Детекция чрез PCR на други гени от острова на патогенност *cagPAI***

Използваха се протоколи според Olbermann et al. (2010). Изследвани бяха следните гени от *cagPAI*: *cagM*, *cagT*, *cagW*, *cagY*, *caga*, *cagy*, *cagδ*. Използваните праймери са представени в Табл. 3. След 5-минутна начална денатурация при 95°C следваха 35 цикъла, включващи 45 s на 95°C, 30 s анилинг на 54°C (50°C за *cagM*) и 45 s на 72°C. Крайната екстензия беше на 72°C за 5 min. Мастър-миксът включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 5x КАРА Taq Buffer С (КАРАBiosystems, Boston, Massachusetts, USA), 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), КАРАТaq DNA Polymerase (КАРАBiosystems, Boston, Massachusetts, USA).

Отсъствието на острова на патогенността *cagPAI* (empty site) беше доказвано посредством PCR с използване на праймери от публикувана литература (Olbermann et al., 2010). Използваният протокол беше: 95°C за 5 минути, последвана от 30 амплификационни цикъла от денатурация на 95°C за 45 секунди, свързване при 61°C за 30 секунди и удължаване на 72 °C за 45 секунди. Крайната екстензия беше за 5 минути при 72°C. Използваните праймери са представени в таблица 1. Мастър-миксът включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 5x КАРА Taq Buffer С (КАРАBiosystems, Boston, Massachusetts, USA), 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), КАРАТaq DNA Polymerase (КАРАBiosystems, Boston, Massachusetts, USA).

### **2.2.6. Детекция чрез PCR на гена, индуциран от контакт с епитела на стомаха - *iceA***

При генотипирането на *iceA* алелите *iceA1* и *iceA2* бяха амплифицирани посредством праймери, описани от Yamaoka et al. (1999). PCR реакциите бяха проведени в реакционна смес с обем 25 µl, съдържащ 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer IV (ABgene, Epsom, Surrey, UK), 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 50 mmol/L KCl (ABgene, Epsom, Surrey, UK) 1,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 U Taq Polimerase (ABgene, Epsom, Surrey, UK) и 1,5 µl от ДНК-екстракта. PCR се провеждаше при следните условия: денатурация при 95°C за 5 min и 35 цикъла, състоящи

се от 30 s при 95<sup>o</sup>C, 45 s при 48<sup>o</sup>C и 45 s при 72<sup>o</sup>C. След последния цикъл следваше 10 min финална екстензия на PCR продуктите.

### **2.2.7. Детекция чрез PCR на гена *babA2*, кодиращ адхезин свързващ кръвногрупов антиген**

За генотипирането на *babA2* мастър-миксът за PCR се приготвяше в обем 25 µl, в който се съдържат 1x reaction buffer IV (ABgene, Epsom, Surrey, UK), 2 mmol MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mmol dNTP, 0.75U Taq Polymerase (ABgene, Epsom, Surrey, UK), 25 pmol от всеки праймер и 1,5 µl от ДНК-екстракта. Условието за амплификацията включваха 5 min преинкубация на 95<sup>o</sup>C, последвано от 35 цикъла от 45 s при 95<sup>o</sup>C, 45 s на 55<sup>o</sup>C и 1 min при 72<sup>o</sup>C. След последния цикъл следваха 5 min финална екстензия на PCR продуктите. Използваха се праймери от публикувана литература (Podzorski *et al.*, 2003).

### **2.2.8. Детекция чрез PCR на гена, промотиращ дуоденалните язви (*dupA*)**

Праймерите за *jhp0917* амплифицират фрагмент от 307 bp, а праймерите за *jhp0918* – фрагмент с дължина 276 bp. PCR амплификацията включваше начална стъпка на 95<sup>o</sup>C за 5 min, последвана от 35 цикъла от 1 min при 95<sup>o</sup>C, 1 min при 52<sup>o</sup>C и 1 min при 72<sup>o</sup>C. Финалната екстензия продължаваше 7 min. Реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки нуклеотид (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea), или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, UK).

Наличието на гена *dupA* се определяше с положителни резултати и за двата продукта на *jhp0917* (307 bp) и на *jhp0918* (276 bp). При отрицателен PCR за някой от тях изолатът се определяше като отрицателен за *dupA* (Lu *et al.*, 2005).

### **2.2.9. Детекция чрез PCR на гените *homA* и *homB*, кодиращи външноембранни протеини**

За детекция на двата *hom* гена, които имат 90% хомоложност, се използваша една и съща двойка праймери, избрани от публикуваната литература (Oleastro *et al.*, 2006). При наличие на *homA* се амплифицира фрагмент с размер 128 bp, а продуктът на амплификацията на *homB* е с дължина 161 bp. PCR амплификацията включваше начална стъпка на 95<sup>o</sup>C за 5 min, последвана от 35 цикъла от 30 s при 95<sup>o</sup>C, 30 s при 60<sup>o</sup>C и 20 s при

72°C. Финалната екстензия при 72°C продължаваше 7 min. Реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM от всеки дезоксинуклеотидтрифосфат (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 U Prime Taq DNA polymerase (GenetBio Inc, Korea), или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, Epsom, Surrey, UK).

Използваните праймери, температурите на отгряването и размерите на амплификационните продукти са представени в Таблица 3.

#### **2.2.10. Детекция чрез PCR на гена за гликозилтрансфераза *jhp0562***

За доказване на гена *jhp0562* реакционната смес (master mix) се приготвяше в обем 25 µl и включваше 2,5 µl от термоекстракта, 25 pmol от всеки праймер, 1x reaction buffer (от съответния производител), 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, dNTP - 2,5 mmol/l от всеки дезоксинуклеотидтрифосфат (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0.75 U Prime Taq DNA polymerase ( GenetBio Inc, Korea) или Taq Polymerase ABgene (Thermo Scientific, UK). PCR протоколите са според цитираните по-долу източници, като амплификационната реакция включва начална денатурация на 95 °C за 5 min, последвана от 35 амплификационни цикъла от денатурация на 30 s 95°C, анийлинг 30 s на 58°C и полимеризация 30 s на 72 °C. Крайната екстензия беше за 7 min на на 72 °C. Използваните праймери, температурите на отгряването и размерите на амплификационните продукти са представени в Таблица 3.

#### **2.2.11. Детекция на гена *oirA*, кодиращ инфламаторен външномембранен протеин**

За детекция на гена на вирулентност *oirA* беше използвана PCR, като продуктите на реакцията бяха впоследствие секвенирани, с цел да се определи функционалното състояние на този ген, което може да бъде “включено” или “изключено”. Сигналната последователност на HP0638, включваща СТ повтори беше амплифицирана с използване на праймери, описани в литературата (Kausser et al., 2005b). PCR беше проведена с KAPA Taq DNA Polymerase (KapaBiosystems, Boston, Massachusetts, USA) и reaction buffer IV — 1×, 1.5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mmol от всяко dNTP, 1 µl от ДНК-екстракта, 1 pmol/µL от всеки праймер. PCR се провеждаше при следната програма: начална денатурация за 5 min на 95°C последвани от 30 цикъла, състоящи се от 30 s денатурация на 94°C, свързване на

праймерите при 52°C за 30 s и елонгация при 72°C, като програмата завършваше с 10 min крайна екстензия. PCR продуктите бяха пречистени с ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, UK). Секвенирането беше извършено по Sanger в ABI Prism 3100DNA SequenceGenetic Analyzer (Applied Biosystems, California, USA). Нуклеотидните последователности бяха анализирани чрез DNAMAN и системата BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **3. Определяне на наличието на IgG антитела към *H. pylori* и към CagA**

Между декември 2010 г и февруари 2011 в Центъра по трансфузионна хематология към УМБАЛ „Св. Анна” - София бяха събрани 294 серумни проби от безсимптомни кръводарители на възраст между 18 и 69 години. Всички участници бяха попълнили информирано съгласие и въпросник включващ данни относно пол, възраст, професия, брой братя и сестри, местоживееие (актуално и по време на детството), ниво на образованието, както и това на родителите; тютюнопушене и диетични фактори като консумация на алкохол, кафе, пресни плодове и зеленчуци, зелен чай, мед, зехтин, суров чесън, суров лук, червено вино и кисело мляко. Изследванията бяха одобрени от етичната комисия към МУ-София.

Преди да се изследват серумите бяха отделени, замразени съхранени на -30°C. Изследвана беше по една проба на човек. *H. pylori* и CagA антитела от клас имуноглобулин G (IgG) бяха доказвани с търговски китове за ензимно-свързан имуносорбентен тест (ELISA, Euroimmun, Medizinische Laborordiagnostika AG, Германия), съответно Anti-*Helicobacter pylori* ELISA (IgG) и Anti-*Helicobacter pylori* CagA ELISA (IgG). Всяка партида от изследвани проби съдържаеше проби от всички изследвани подгрупи. Изследването беше проведено изцяло според инструкциите на фирмата-производител. Всяка проба се разреждаше 1:101 в буферен разтвор. Всички проби, контроли и калибратори се инкубираха в предварително натоварени ямки на плаката, след което се промиваха петкратно. Прибавяше се ензимен конюгат и се провежда 30-минутна инкубация, след което наново се промиваше петкратно. След това се добавяше хромоген/субстрат във всяка ямка и след 15-минутна инкубация реакцията се прекратяваше чрез прибавяне на стоп-разтвор.

Веднага след прибавянето на стоп-разтвора се извършваше фотометрично измерване на интензитета на цветната реакция при дължина на вълната 450 nm (референтна дължина, 630 nm). Чрез плотиране „точка-до-точка“ на екстинкцията на трите калибратора се получиха стандартни криви. Всяка плака се мереше по два пъти и се отчитаха средните стойности от двете измервания. Пробите с гранични резултати ( $\geq 16$  до  $< 22$  относителни единици - RU/ml) се изследваха наново и се отчитаха средните стойности от двата теста. Накрая всички резултати  $> 20$  RU/ml бяха отчетени като положителни. Според производителя тестовете показват 100% чувствителност и специфичност, с изключение на граничните случаи.

#### 4. Методи за определяне на антимикробната чувствителност

Чувствителността на клиничните изолати *H. pylori* беше изследвана с MIC strip, или с метода на граничните стойности (Breakpoint Susceptibility Test, BST), въведен и валидиран от Boyanova (Boyanova *et al.*, 2008). Последният беше използван, тъй като през 2007-2008 г. е била проучена надеждността на метода на граничните стойности за 5 антибиотика. Съвпадението на резултатите от метода на граничните стойности и MIC strip, или метода на серийните разреждания в агар са били много добри: 95% за clarithromycin, 100% за amoxicillin, 96.8% за tetracycline, 93.5% за ciprofloxacin и 93.3% за metronidazole (Boyanova *et al.*, 2008).

##### 4.1 MIC strip

Чувствителността на клиничните щамове към clarithromycin беше изследвана чрез **MIC strip** (MIC Evaluator; Oxoid, Basingstoke, UK, или Liofilchem; Roseto degli Abruzzi, TE, Italy). Бактериалните суспензии, (отговарящи на оптичен стандарт 2-3 по McFarland) бяха инокулирани на петрита с кръвен Mueller-Hinton agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). След като петритата изсъхваха, върху тях бяха поставяни МПК лентички и петритата бяха инкубирани при 37 °C за 48 – 72 h в микроаерофилни условия (CampyGen; Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). Минималните потискащи концентрации (МПК) бяха отчитани според препоръките на доставчика. Поради възможни фалшиво-положителни резултати Etest не е оптимален метод за определяне на чувствителност на *H. pylori* към

metronidazole. Затова чувствителността към metronidazole беше изследвана само посредством метода на граничните стойности (BST).

#### **4.2. Метод на граничните стойности (Breakpoint Susceptibility Test, BST)**

Методът на граничните стойности беше използван за определяне на чувствителността към clarithromycin и metronidazole. Суспензии на *H. pylori* с мътност, отговаряща на оптичен стандарт 2 – 3 по McFarland, бяха посявани на петрита Mueller-Hinton агар (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) с 5% овнешка кръв, които съдържаха следните антибактериални лекарствени средства: metronidazole 4, 8 и 16 mg/l, или clarithromycin 0,25, 0,5, 1, 2 и 4 mg/l, (Boyanova et al. 2015). Антибиотиците бяха закупени от SigmaAldrich, Saint Louis, Missouri, USA (metronidazole) и Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, USA (clarithromycin). Петритата бяха инкубирани на 37°C в микроаерофилни условия (CampyGen, Oxoid, UK) за 48-72 ч.

Категориите на щамовата чувствителност бяха определени с граничните стойности на EUCAST за *H. pylori* и преди използваните гранични стойности (PBP<sub>s</sub>). Най-често използваните антибиотици за терапия на инфекцията са amoxicillin, към който резистентността е рядка и също така metronidazole и clarithromycin, към които резистентността в някои страни е висока (Megraud *et al.*, 2013b). Допълнително основание да се тестват тези антибиотици беше, че при национални/регионални честоти на първична резистентност на *H. pylori*  $\geq 15$ –20% за clarithromycin и  $\geq 40$ % за metronidazole, агентите не трябва да се включват в тройна терапия, ако не е известна щамовата чувствителност (Malfertheiner *et al.*, 2007; Boyanova & Mitov, 2010)

Граничните стойности на EUCAST за резистентност на *H. pylori* бяха >8 mg/l metronidazole и >0.5 mg/l clarithromycin, а с предишните използвани стойности бяха >8 mg/l metronidazole и  $\geq 1$  mg/l clarithromycin. (Megraud & Lehours, 2007).

### **5. Определяне на механизмите на резистентност към макролиди**

#### **5.1. Алел-специфична полимеразно-верижна реакция за определяне на точкови мутации**

За да се докажат мутациите A2143G и A2142G, беше проведена **алел-специфична полимеразно-верижна реакция PCR (AS-PCR)** по методиката, описана от Furuta *et al.* (2007). За PCR амплификациите беше използвана Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase

(New England Labs). Реакциите бяха проведени в общ обем 20  $\mu$ L, включващ 0.4 единици Fusion Taq polymerase за всяка реакция, 4 mmol dNTP, 1 x крайна концентрация 5X Phusion HF и 5 pmol праймери FP-1 (5'-TCGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'), RP-1 (5' - GACTCCATAAGAGCCAAAGCCCTTAC-3') и 10 pmol RP2142G (5' - AGTAAAGGTCCACGGGGTATTCC-3') и FP2143G (5'- CCGCGGCAAGACAGAGA-3'). Проведена беше алел-специфична PCR, както следва: денатурация при 98°C за 30s, последвана от 35 цикъла, включващи денатурация при 98°C за 10 s, анилинг (свързване на праймерите) при 61,5°C за 20 s и екстензия при 72°C за 20 s, с финална екстензия на 72°C за 5 min. Фрагмент с големина 320 bp показваше наличието на дивия тип *H. pylori* 23S рPHK ген, докато 238 bp и 118 bp фрагменти показваха наличието съответно на мутациите A2142G и A2143G, които причиняват резистентност към clarithromycin.

За детекция на точковата мутация A2142C беше проведена 3'-mismatched PCR с използване на праймери, описани от Alarcon et al. (2000). Използваните праймери бяха CLA 18 (AGTCGGGACCTAAGGCGAG) и CLA 3 (AGGTCCACGGGGTCTTG) (Alarcon et al., 2000).

## **6. Идентификация на смесени инфекции**

Смесените инфекции (от повече от един шам *H. pylori* едновременно) бяха идентифицирани въз основа на доказване чрез PCR на повече от един от алтернативни алели на *vacA*, *iceA* или *dupA* гените. Щамовете *H. pylori* от смесени инфекции бяха изключени от анализа на данните за факторите на вирулентност, който включва само щамове, изолирани от инфекция с единичен шам.

## **7. Статистически анализ**

За статистическият анализ бяха използвани тестът за независимост  $\chi^2$  и екзактният тест на Fisher ( в случаи с  $\leq 5$  единици в някоя от групите). Те бяха използвани за сравняване честотата на различните показатели като генотипове и други характеристики на щамовете или пациентите. Стойности на  $p < 0.05$  бяха отчетени като статистически значими.

Логистична регресия беше използвана за избора на сигнификантни предикторни променливи и за да се изчислят отношенията на шансовете за възникване на дадено събитие (odds ratios, ORs) на тези променливи и, ако е възможно, да се предвидят резултатите. Тя беше извършена чрез софтуерна статистическа програма SPSS 15.0. За да се оцени способността на модела на логистична регресия да разкрие наличието на положително събитие бяха построени ROC (receiver operating characteristic) криви. От съществено значение е площта под кривата (AUC, area under curve), която отразява едновременно чувствителността и специфичността на метода на изследване спрямо референтния до момента.

## V. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Пациенти и бактериални изолати

#### 1.1. Бактериални изолати /биопсии/

В проучването бяха включени 479 изолата *H. pylori*, от лекувани и нелекувани пациенти, изолирани за периода януари 2005г. – декември 2015 г. в Катедрата по Медицинска микробиология - МУ - София.

От изпратените биопсии бяха изолирани 479 щама *H. pylori*, като всички те позитивираха при бързия уреазен тест, имаха типична морфология при оцветяването по Gram, липса на аеробен растеж на петрита с кръвен агар, и положителни тестове за наличие на уреазата, оксидаза и каталаза. Комбинацията от няколко диагностични метода, които бяха използвани, се счита за „златен стандарт“ за изолиране и идентификация на вискателни бактерии, каквито са *H. pylori*, понеже всеки един от методите има специфични предимства и недостатъци (Garza-González *et al.*, 2014). Културелният метод има много висока специфичност, но е твърде зависим от условията на вземане и транспортиране на пробите. Директното наблюдение под микроскоп на препарат от биопсична проба, оцветен по Gram, също е зависимо от условията на вземане на пробата и от опитността на микробиолога. Бързият уреазен тест (БУТ) може да даде фалшиво-отрицателен резултат при ниска концентрация на *H. pylori* в пробата, а понякога е възможно и фалшиво да позитивира, ако в пробата попадне слюнка от устната кухина, в която се съдържат други уреазо-продуциращи бактерии. Затова от практическа гледна точка най-подходящо е да се ползва комбинация от тези три класически метода (културелен, директен микроскопски препарат и БУТ), (Garza-González *et al.*, 2014).

Доказахме наличието на смесени инфекции при 5,8% (28 изолата) въз основа на едновременно присъствие на алтернативни алели на *vacA* виж т. 5.2.2.2. Останалите 451 изолата (94,2%) бяха от инфекции с единичен щам *H. pylori* и те бяха включени в последващите проучвания. Разпределението на 451 щама *H. pylori* изолирани от пациенти с инфекция от единичен щам според годината на изолиране е както следва: през 2005 г. – 7 изолата; през 2006 г. - 32 изолата, през 2007 г. -12 изолата, през 2008 г. -73 изолата; през

2009 г. – 115 изолата; през 2010 г. – 46 изолата; през 2011 г. 34 изолата; през 2012 г. – 33 изолата; през 2013 г. – 10 изолата; през 2014 г. – 61 изолата и през 2015 г. – 28 изолата.

Някои от характеристиките на пациентите, от които са изолирани *H. pylori* от инфекции с единичен щам са представени на Таблица 4.

**Таблица 4.** Характеристики на пациентите, от които са изолирани *H. pylori* от инфекции с единичен щам:

Характеристика на пациентите	изолати	
	Брой	%
<i>Пол</i>		
Жени	207	45,9
Мъже	244	54,1
<i>Възраст</i>		
Деца 0-17 г.	42	9,3
Възрастни 18-64 г.	335	74,3
Възрастни ≥65 г.	74	16,4
<i>Местоживеене*</i>		
София	237	52,5
Провинция	133	29,5
<i>Заболяване</i>		
Язва на стомаха	34	7,5
Язва на дванадесетопръстника	77	17,1
Язва на стомаха и язва на дванадесетопръстника	4	0,9
Стомашен карцином	1	0,2
Гастроезофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ)	95	21,1
Хроничен гастрит	212	47,0
ГЕРБ + хроничен гастрит	9	2,0
Остър гастрит	8	1,8
Ерозивен хроничен гастрит	9	2,0
Портална хипертония	1	0,2
Киста на панкреаса	1	0,2
Хепатит	1	0,2
<i>Предшестващо лечение**</i>		
Лекувани	36	8,0
Нелекувани	295	65,4
<b>Общо</b>	<b>451</b>	

\* За 81 пациента липсваха данни за местожителството им.

\*\* За 120 пациента липсваха данни за предшестващо лечение

Общо 115 изолата *H. pylori* бяха от пациенти с пептични язви. Сред изследваните мъже пептичните язви се срещаха по-често (30,7%; 74 от 241 пациента) отколкото при изследваните жени (19,8%, 41 от 207 пациента; P=0,009). Само едно от изследваните 42

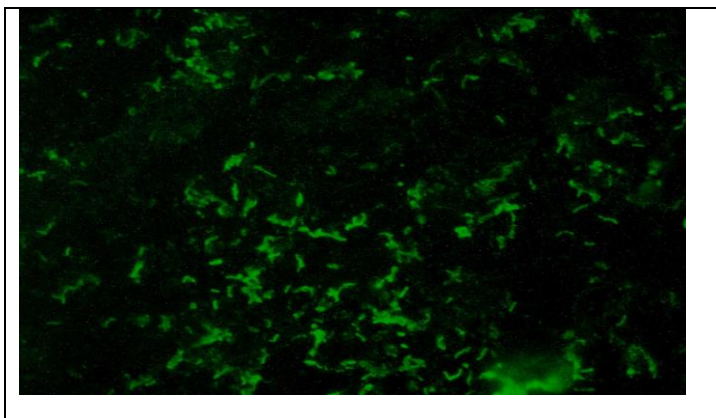
(2,4%) деца беше с пептична язва, за разлика от 27,9% (114 от 409 случая) от възрастните, ( $P < 0,0001$ ).

### **1.2 Бактериални изолати /устна кухина/**

При изследването на зъбна плака от 43-ма нелекувани пациенти беше открит един щам *H. pylori*. Той беше изолиран от 9-годишно дете с катарален гингивит и симптоматичен хроничен гастрит (доказан с фекален антигенен тест, HpSA; Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA).

Оралният изолат *H. pylori* беше уреазо-, каталазо- и оксидазо-положителен извит Gram-отрицателен микроорганизъм, който не растеше на аеробната контрола, което е типично за *H. pylori*.

Щамът даде положителен резултат за имунофлуоресценция с 3 от 4-те използвани МКА (122E9, 123B11 и 161 F8) срещу *H. pylori* – (Фиг. 9) и беше положителен при PCR за видовоспецифичния за *H. pylori* ген *ureA*. По-подробно резултатите от изследването на оралния изолат *H. pylori* са представени и дискутирани по-долу в т. 5.4.



Фиг. 9. Имунофлуоресценция на *H. pylori*

## **2. Определяне на фактори на вирулентност**

### **2.1 Екстракция на ДНК**

От всички 479 изолата беше екстрахирана ДНК (вж. Точка 4.2.1.), като продуктите на екстракцията бяха доказани чрез електрофореза в агарозен гел (вж. Точка 4.2.2.).

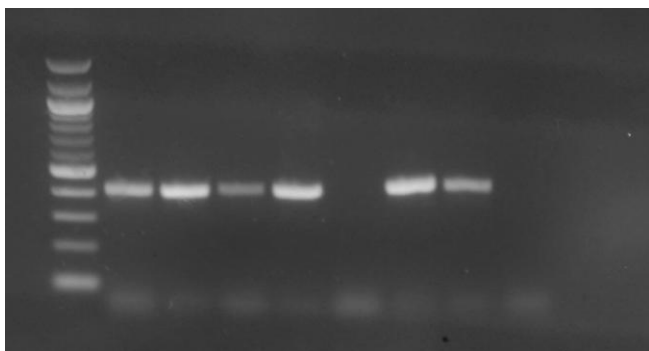
## 2.2. Амплификация на гени чрез полимеразно-верижна реакция (PCR)

### 2.2.1. Доказване на ген, кодиращ уреаза (*ureA*)

Идентификацията с използване на комбинация от класически методи на всички 479 изолата *H. pylori* беше потвърдена чрез провеждане на PCR за амплификация на специфичния за този бактериален вид ген за уреаза – *ureA*. Всички 479 ДНК-екстракта дадоха положителен резултат за наличие на *ureA*, като продуктите на амплификацията (с размер 411 bp – Фиг. 10) бяха визуализирани чрез електрофореза в агарозен гел.

Използването на PCR за видова идентификация е метод с висока акуратност, но може да се повлияе от наличието на инхибиторни вещества в пробата. Освен това доказването на бактериални гени директно в биопсияния материал не е категоричен показател за наличието на жизнеспособни микроорганизми. Тези недостатъци на метода, обаче, не са налице, когато се амплифицира ДНК, екстрахирана от чиста бактериална култура, което прави PCR за видовоспецифичния ген *ureA* много надежден метод за идентификация на *H. pylori* (Garza-González *et al.*, 2014).

**Потвърждаването на идентификацията на всички изолирани щамове *H. pylori* чрез молекулярно-генетични методи в настоящия дисертационен труд е показател за надеждността на използваните класически методи за изолиране и идентификация.**



**Фиг. 10.** Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *ureA* (411 bp)

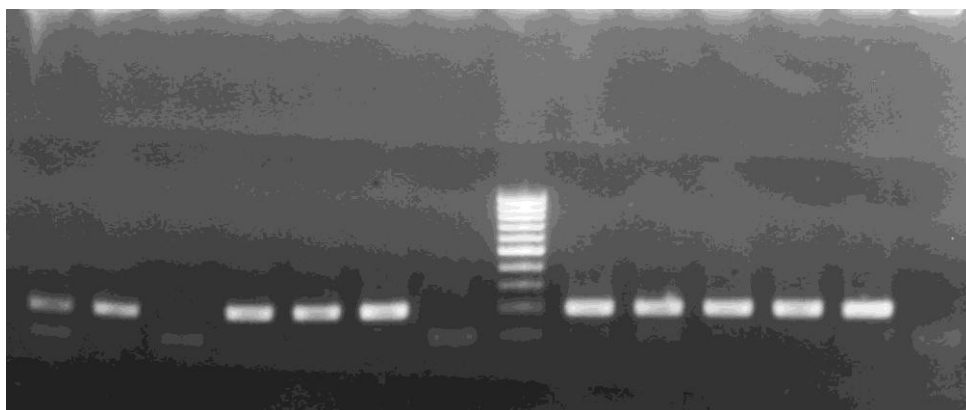
### 2.2.2. Детекция на мозаичните алели на гена за вакуолизиращ цитотоксин *vacA*

От изследваните 479 изолата 451 (94,2%) бяха от инфекции с единичен щам *H. pylori*, а 28 (5,8%) бяха доказани като смесени инфекции въз основа на едновременно присъствие на алтернативни алели на *vacA* – m1 и m2 и/или s1a и s2 и/или i1 и i2.

От пациентите със смесени инфекции 6 бяха с пептични язви (4 пациента бяха с дуоденална язва, 1 – със стомашна язва и 1 – едновременно със стомашна и дуоденална

язва), а 22 - с неязвени заболявания (гастроезофагеална рефлуксна болест (4 пациента), хроничен гастрит (19) и един пациент с ерозивен гастрит). Честотата на смесените инфекции (5,8%) беше сравнително ниска в сравнение с данните, публикувани в други държави (0–41%, най често 10–18%) (El Khadir *et al.*, 2017; Kauser *et al.*, 2005b; Lai *et al.*, 2016; Podzorski *et al.*, 2003).

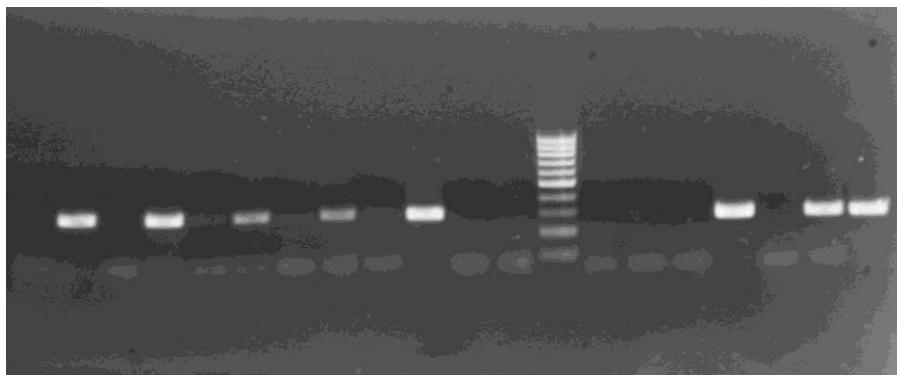
Протеинът VacA е един от основните фактори на вирулентност при *H. pylori*, който се кодира от гена *vacA* и има множество активности, например, вакуолизация в епителни клетки *in vitro*, образуване на пори и нарушаване на активността на ендозомите/лизозомите, влияние върху сигналните пътища в клетката, апоптоза на стомашни епителни клетки и др. (Liu *et al.*, 2016). Честотите на мозаичните алели на *vacA* сред изследваните 451 изолата от инфекции с единичен щам *H. pylori* са представени в Табл. 5. PCR детекцията на алелите на *vacA* е показана на Фиг. 11 – *vacA* s1a и Фиг. 12 – *vacA* m1 и Фиг. 13 *vacA* m2.



**Фиг. 11.** Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *vacA* s1a (190 bp)

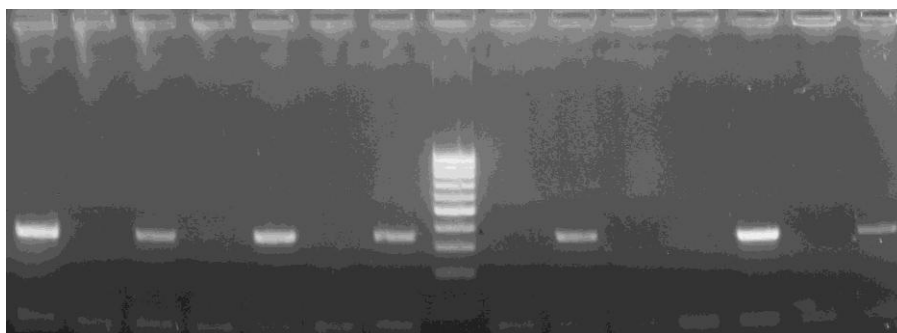
Генът *vacA* се открива във всички щамове *H. pylori*, но само около половината щамове произвеждат функционален VacA протеин, понеже продукцията му зависи от секвенционната вариабилност на *vacA*, която включва мозаична комбинация на s, m и i алелни типове. Приема се, че тип s1a води до по-мощна инфилтрация на неутрофили и лимфоцити в лигавицата, отколкото s1b, докато при s2 липсва такава активност, подобно m1 е свързан с по-сериозна увреда на стомашната мукоза, отколкото m2; (Liu *et al.*, 2016). Наличието на тип s1a се свързва с продукцията на IL-8, мощен проинфламаторен цитокин (Lee *et al.*, 2013). Междинният регион (i) на *vacA* е описан по-наскоро, i1 вариантите на

VacA показват по-силна вакуолизираща токсичност, отколкото токсините с i2 региони (Rhead *et al.*, 2007).



**Фиг. 12.** Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *vacA* m1 (290 bp)

При анализа на данните прави впечатление, че общата честота на токсигенния тип щамове *vacA* s1 беше сравнително висока (83,8%) и е сред най-високите проценти, обичайно съобщавани в Европа (43,9–91,8%) (Almeida *et al.*, 2015; Kauser *et al.*, 2005a; Miciuleviciene *et al.*, 2008; Ozbey *et al.*, 2013), но са по-ниски от стойностите, съобщавани за държавите от Източна Азия, като Корея (100%, Kim *et al.*, 2014) и Тайланд (98%) (Linpisarn *et al.*, 2007).



**Фиг. 13.** Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *vacA* m2 (352 bp)

Всички щамове бяха от типовете *vacA* s1a, *vacA* s1b или *vacA* s2. Тези резултати съответстват на данните в почти всички Западни страни, където няма доказателства за наличие на *vacA* s1c (Almeida *et al.*, 2015). Най-токсигенният подтип *vacA* s1a беше доказан в България по-често (82,0%), отколкото в Португалия (24,3%) и Холандия (61%), докато в Турция (88,8%) се съобщава за подобни честоти (Almeida *et al.*, 2015; Erzin *et al.*, 2006).

Алелът *vacA s1a* често се открива в щамове от Северна Америка, Северна и Източна Европа, докато *s1b* се среща често в Латинска Америка и на Иберийския полуостров (Yamaoka, 2012). Разликите в честотата на стомашните заболявания в различните географски райони са свързани, поне отчасти, с вариациите в *vacA* генотиповете. (Yamaoka, 2012).

Честотата на *vacA* генотиповете варира в различните държави. Примери за превалиращи подтипове са *vacA s1c/m1b* в Източна Азия (Yamaoka *et al.*, 2008a).

Пациентите с пептични язви по-често имаха щамове с тип *vacA s1*, отколкото тези с неязвени заболявания (90,4%, 104 от 115 случая, спрямо 79,2%, 266 от 336; P=0,007) – Табл. 5. *vacA s1b*, и *vacA s2* бяха редки генотипове и се откриваха при пациенти с неязвени заболявания. Независимо от малкия брой случаи (8) с *s1b* интерес представлява, че бяха откривани само в пациенти с неязвена патология.

**Таблица 5.** Честота на мозаичните алели на *vacA* сред 451 изолата от инфекции с единичен щам *H. pylori*.

Генотип	Пептични язви (n=115)		Неязвени заболявания (n=336)		P*	Общо (n=451)	
	брой	%	брой	%		брой	%
<i>vacA s1a</i>	104	<b>90,4</b>	266	79,2	<b>P=0,007</b>	370	82,0
<i>vacA s1b</i>	-	-	8	2,4	NS	8	1,8
<i>vacA s2</i>	11	9,6	62	<b>15,8</b>	<b>P=0,026</b>	73	16,2
<i>vacA i1</i>	94	<b>81,7</b>	189	56,3	<b>P&lt;0,0001</b>	283	62,7
<i>vacA i2</i>	21	18,3	145	<b>43,7</b>	<b>P&lt;0,0001</b>	168	37,3
<i>vacA m1</i>	58	<b>50,4</b>	123	36,6	<b>P=0,005</b>	181	40,1
<i>vacA m2</i>	57	49,6	213	<b>63,4</b>	<b>P=0,005</b>	270	59,9

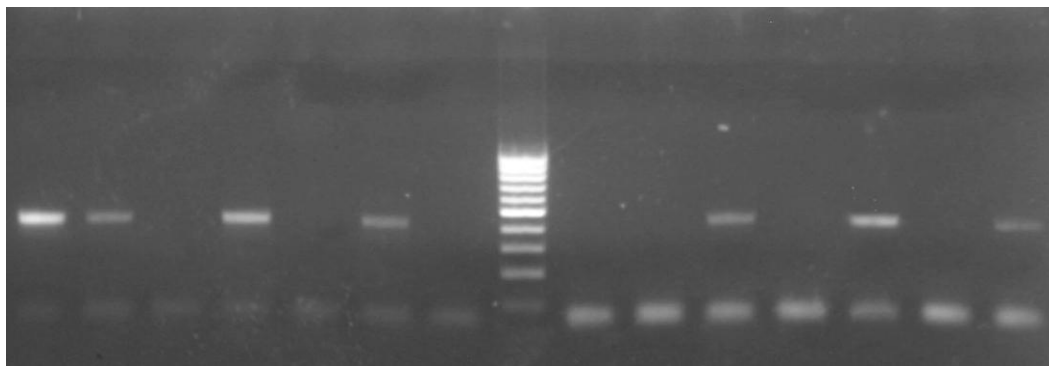
**Забележка:** \*Включени са само статистически значимите P<0,05. Сравнявани са съответните алели при изолати от пациенти с язвени и неязвени заболявания. NS- несигнификантна разлика

Подобно на *s1a* и при *m1* алела установихме по-висока честота при пациентите с язвени заболявания – Табл 5. Интерес представлява фактът, че в някои популации връзка

между *vacA* m1 и типа на гастродуоденалната патология не се открива (Memon *et al.*, 2014). Настоящото проучване не потвърди тези изследвания.

В настоящото проучване *vacA* i1 беше със сравнително висока честота сред българските щамове *H. pylori* – Фиг. 14.

Той беше наличен при 283 изолата (62,7%) от пациенти, инфектирани от единичен щам, докато останалите 168 (37,2%) изолата имаха генотип *vacA* i2. Честотата на *vacA* i алелите варира в различни части на света. Резултатите в настоящата работа са близки до стойностите, съобщавани за Италия (Basso *et al.*, 2008), но, въпреки географската ни близост, силно се различават от честотата в Турция, където преобладаващият тип е *vacA* i2 (42,9%), а се открива и i3 в 25,7% (Chung *et al.*, 2010). В Китай честотата на i1 е била много висока - 93.3%, при афроамериканците в САЩ – 80%, докато в Уругвай (46,7%), и най-вече в съседна Турция (22,9%) е много по-ниска (Chung *et al.*, 2010).



**Фиг. 14.** Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *vacA* i1/i2 (426/432bp)

Настоящото проучване показва, че ***vacA* i1 е свързан с пептичните язви** ( $p < 0,0001$ ). Подобна връзка (между i1 и стомашните язви) е открита в Италия (Basso *et al.*, 2008). От друга страна, в Иран и в Мароко се съобщава връзка на *vacA* i1 със стомашния карцином, но не и с дуоденалните язви (El Khadir *et al.*, 2017; Mottaghi *et al.*, 2016). В проби от стомашни биопсии алелът *vacA* i1 е бил силно свързан с преканцерозна интестинална метаплазия, докато при индивиди, заразени с i2 щамове липсва метаплазия, дори при наличие на *vacA* s1 и *cagA*<sup>+</sup> (Winter *et al.*, 2014). Както и при много други гени за

вирулентност, в Източна Азия не се открива връзка между *vacA* i1 и стомашната патология (Yamaoka, 2008a), което се свързва с много високата честота на този вирулентен генотип.

Въпреки че в настоящия дисертационен труд генотиповете *vacA* s1 (s1a) и m1 също бяха преобладаващи сред изолатите *H. pylori* от пациенти с пептични язви, статистическата зависимост не беше толкова силна ( $p=0,007$  за s1a, и  $p=0,005$  за m1). Тези резултати показват, че генотипът на *vacA* i е по-добър предиктор на щамовата вирулентност, отколкото s и m типове. До такива изводи достигат и няколко други автори (Douraghi *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010).

Честотата на алелните комбинации на *vacA* при 451 изолата *H. pylori* от пациенти с пептични язви и с язвени заболявания са представени в Табл. 6. В настоящото проучване най-вирулентната комбинация ***vacA* s1a/i1/m1** **показва зависимост с развитие на язвено заболяване**. Пациентите с този вирулентен генотип на *H. pylori* имаха много по-често язвени заболявания отколкото останалите - **47,8% срещу 32,1%** ( $P=0,003$ ).

**Таблица 6.** Алелни комбинации на *vacA* при 451 изолата *H. pylori* от пациенти с пептични язви и с неязвени заболявания.

Генотип	Пептични язви (n=115)		Неязвени заболявания (n=336)		P*	Общо (n=451)	
	брой	%	брой	%		брой	%
<i>vacA s1a/i1/m1</i>	55	<b>47,8</b>	108	32,1	P=0,003	163	36,1
<i>vacA s1a/i1/m2</i>	34	29,6	69	20,5	NS	103	22,8
<i>vacA s1a/i2/m1</i>	1	0,9	5	1,5	NS	6	1,3
<i>vacA s1a/i2/m2</i>	14	12,2	84	<b>25,0</b>	P=0,004	98	21,7
<i>vacA s1b/i1/m1</i>	-	-	2	0,6	NS	2	0,4
<i>vacA s1b/i1/m2</i>	-	-	1	0,3	NS	1	0,2
<i>vacA s1b/i2/m2</i>	-	-	5	1,5	NS	5	1,1
<i>vacA s2/i1/m1</i>	1	0,9	6	1,8	NS	7	1,6
<i>vacA s2/i1/m2</i>	4	3,5	3	0,9	NS	7	1,6
<i>vacA s2/i2/m1</i>	1	0,9	2	0,6	NS	3	0,7
<i>vacA s2/i2/m2</i>	5	4,3	51	<b>15,2</b>	P=0,002	56	12,4

**Забележка:** \*Включени са само статистически значимите  $P < 0,05$ . Сравнявани са съответните алелни комбинации при изолати от пациенти с язвени и неязвени заболявания. NS- несигнификантна разлика.

В настоящото проучване алелният тип *vacA i1* показва много силна връзка ( $P < 0,0001$ ) с *vacA s1a* и *m1*, като 266 от всички 283 *i1* щамове (94,0%) притежават подтипа *s1a*, а 172 от 181 изолата с *vacA m1* (95,0%) бяха с *i1* генотип. В литературата някои двойни и тройни комбинации от алели на *vacA* също са съобщавани като такива с клинична значимост. Например в Мароко, страна със сравнително висок процент *H. pylori*, над 50%, процентът на болни със стомашен карцином е много нисък (El Khadir *et al.*, 2017). Скорошно проучване за тази страна показва наличието на преобладаване на *H. pylori s2/m2/i2* тип. Авторите установяват зависимост между наличието на *H. pylori s1/m1/i1* тип и язвена патология (El Khadir *et al.*, 2017). В Западните страни *vacA s1/m1* щамове са били свързани с пептични язви и със стомашния карцином (Kusters *et al.*, 2006; Yamaoka, 2008a). Повечето *s1/m1* щамове са имали вирулентния *i1* подтип, докато

повечето s2/m2 щамове са били с подтипа i2. Важно е обаче, че *vacA* s1/m2 щамовете показват различни профили на i-подтипа в зависимост от държавата. Например, повечето s1/m2 щамове са имали подтип i1 в Китай (93,3%), и сред афроамериканците в САЩ (71,4%), но не и в Турция (27,3%), независимо от високата честота на *cagA* в нашата съседна страна (Chung *et al.*, 2010). Половината от Западните s1/m2 щамове показват подтип i2, за разлика от само 8% от Източноазиатските щамове (Yamaoka, 2008a).

В настоящото проучване алелният тип *vacA* i1 показва много силна връзка ( $p < 0,0001$ ) с s1a и с m1, като 266 от всички 283 i1 щама (94,0%) притежават подтипа s1a, а 172 от 181 изолата с *vacA* m1 (95,0%) бяха с i1 генотип.

Западните щамове от типа *vacA* s1a/m1/ i1 произвеждат напълно активен VacA и са били по-често срещани сред изолати от пациенти със стомашен карцином (Rhead *et al.*, 2007), отколкото тези с тип s2/i2/m2, които произвеждат неактивен VacA. От значение е и m алелът - някои автори установяват, че типът s1/i1/m1 е с по-голяма активност върху епителни клетъчни линии, отколкото типа s1/i1/m2 (Atherton & Blaser, 2009). Въпреки това, и s1/i1/m1, и s1/i1/m2 щамовете са показали значима вакуолизираща цитотоксичност и връзка с най-сериозната стомашна патология (Rhead *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010).

В настоящото проучване генотипът *vacA* s1a/i1/m2 се срещаше по-често сред изолатите от пациенти с пептични язви (29,6%) в сравнение с изолатите от пациенти с неязвена патология (20,5%), но тази разлика не беше статистически значима ( $P=0,07$ ).

Най-слабо вирулентната комбинация *vacA* s2/i2/m2 беше открита едва в 12,4% (56 случая), като се срещаше **значително по-рядко ( $P=0,002$ ) сред изолати от пациенти с пептични язви** (4,3%; 5 случая), отколкото сред изолати от пациенти с неязвена патология (15,2%; 51 случая). Също така и генотипът *vacA* s1a/i2/m2 **се откри значително по-рядко ( $P=0,004$ ) сред изолати от пациенти с пептични язви** (12,2%; 14 случая), отколкото сред изолати от пациенти с неязвена патология (25,0%; 84 случая) (Таблица 6). При останалите тройни алелни комбинации на *vacA* не беше открита връзка с типа на заболяването.

Най-вирулентната алелната комбинация *vacA* s1a/i1/m1 беше открита **по-често ( $P=0,033$ ) при изолати *H. pylori* от мъже** (40,6%; 99 от 244 случая), отколкото при жени

(64 от 207 случая; 30,9%), което е логично, тъй като при мъжете пептичните язви се срещаха с по-висока честота. От друга страна *vacA* s1/i2/m2 генотипът се срещаше често при жените (55 случая, 26,5%), отколкото при мъжете (24 случая, 17,6%), ( $p=0,021$ ). Останалите алелни комбинации не показаха статистически зависими разлики в честотата си, що се отнася до пол на пациента.

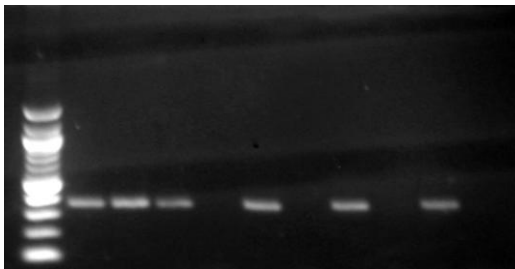
Интересно е, че настоящото проучване откри **връзка ( $p=0.021$ ) между нисковирулентния генотип *vacA* s1a/i2/m2 и пола на пациентите**. Честотата на този генотип беше 1,5 пъти по-висока при изолати от жени (26,5%), отколкото при мъже (17,6%), което може да обясни, поне частично, по-високата честота и по-тежката клиника на гастродуоденални заболявания (напр. язва на дванадесетопръстника) при мъжете, отколкото при жените, както се съобщава в някои проучвания (Feinstein *et al.*, 2010).

Настоящото проучване не откри връзка между генотипите на *vacA* и възрастта на пациентите.

**В заключение, резултатите от настоящото проучване показват, че е висока честотата на вирулентните алели на *vacA* (s1a, m1 и i1) поотделно или в комбинация, като и в двата случая те се асоциират с пептични язви при пациентите ( $p=0.003$ ). Важно да се извършва генотипиране и на междинния регион на *vacA*, тъй като алелът *vacA* i1 показва по-силна връзка с пептичните язви, отколкото s или m алелите, която да е от комбинациите на *vacA* алели. Затова статусът на междинния регион на *vacA* е подобър предиктор за наличието на вирулентни щамове *H. pylori*. Наличието на висок процент на високо вирулентната комбинация *vacA* (s1a/m1/i1) при българските щамове *H. pylori* показва необходимостта от по-агресивно поведение за откриване и терапия за ерадикация на инфекцията.**

### 2.2.3. Детекция на цитотоксин асоциирания ген А (*cagA*)

Сред 451 изолата *H. pylori* от пациенти, инфектирани с единичен щам, 358 (79,3%) дадоха положителен резултат за наличие на *cagA* при PCR, проведена с двойката праймери, описана от Podzorski *et al.*, (2003) – Фиг 15.



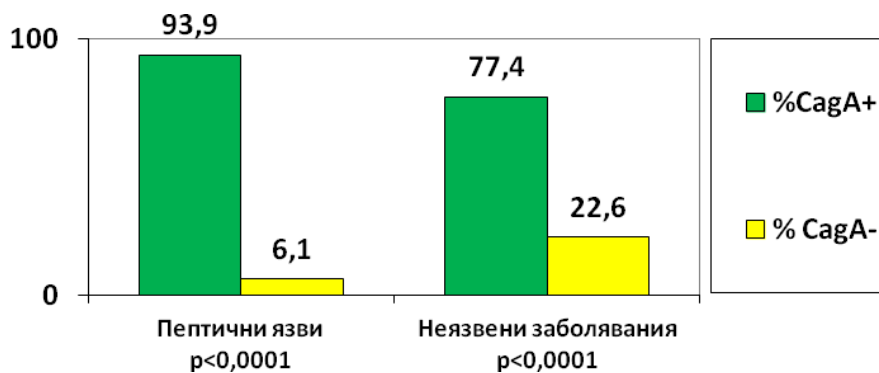
**Фиг 15.** Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *cagA* (352 bp)

Всички *cagA*<sup>-</sup> и 30 *cagA*<sup>+</sup> изолати *H. pylori* бяха изследвани чрез PCR с две допълнителни (A1-A2 и A3-A4) двойки праймери (Broutet *et al.*, 2001). Според Broutet *et al.*, (2001) статусът на *cagA* се определя като положителен, ако се докажат амплификационни продукти при поне една от двете PCR реакции, като първо се провежда амплификация с двойката праймери A1-A2, след което отрицателните проби се изследват и чрез A3-A4 праймерите (Broutet *et al.*, 2001). С двойката праймери A1-A2 позитивираха само 30-те контролни *cagA*<sup>+</sup> изолата. При последващата амплификация на ДНК-екстракти от останалите 93 изолата *H. pylori* с двойката праймери A3-A4, като *cagA*<sup>+</sup> статус беше доказан в още определени още 10.8% от тях (10 случая). Така общият брой на *cagA*<sup>+</sup> изолатите в настоящото проучване беше **368 (81,6%)**.

За клиниката е от особена важност да се извършва надеждна детекция на *cagA* статуса на щамове *H. pylori*, за да се оцени риска от тежки заболявания като пептична язва или стомашен карцином. Broutet *et al.* (2001) съобщават за подобряване на детекцията на *cagA* (от двойката праймери A1-A2) с 12%, когато се използва и втори чифт праймери (A3-A4). Подобни резултати получихме и в настоящото проучване; използването на праймерите A3-A4 (Broutet *et al.*, 2001) при 34 щамове с отрицателен *cagA* статус при изследване с двойката праймери, предложена от Podzorski *et al.* (2003), води до подобрена детекция на *cagA*. Използването на втория чифт праймери води до повишение в детектирането на *cagA*-положителните щамове в над 10% от *cagA* отрицателните щамове след използване само на първата двойка праймери. Може да се препорча използването на втори чифт праймери (A3-A4) за гена *cagA*, особено в страни като България, където има висока честота на *cagA*<sup>+</sup> щамове.

**Изолатите от пациенти с пептични язви по-често бяха *cagA*<sup>+</sup> (93,9%; 108 от 115 случая) спрямо 77,4% при останалите пациенти (260 от 336 случая; P<0,0001) (Фиг. 16).**

Пациентите с неязвени заболявания по-често бяха инфектирани от нисковирулентни *cagA* щамове в сравнение с пациентите с язви (съответно 22,6% спрямо 6,1%,  $P < 0,0001$ ), което предполага значимостта на *cagA* за развитието на тежки заболявания.



**Фиг. 16** Честота на *cagA*<sup>+</sup> изолати при пациенти с язвени и неязвени заболявания.

Подобни резултати с висока честота на *cagA*<sup>+</sup> щамове при тежка гастроинтестинална патология са съобщавани често (Megraud & Lehours, 2007; El Khadir *et al.*, 2017). Други проучвания, обаче, не са откривали разлика в честотата на *cagA* сред пациентите с язвена и с неязвена патология (Dabiri *et al.*, 2017).

*cagA*-положителните щамове *H. pylori* често са свързани с апоптоза на Т-клетките, индуциране на секрецията на интерлевкин-8 (IL-8) от лигавицата, усилване на възпалението в стомашната мукоза и по-висок риск от развитие на пептични язви и стомашен карцином в Западните държави. От друга страна, в Източна Азия >85% от изолатите притежават *cagA*, като не се доказва връзка между статуса на *cagA* и клиничния изход от инфекцията (Pinto-Ribeiro *et al.*, 2016; Uchida *et al.*, 2015; Yamaoka & Graham, 2014). Най-вероятно това се дължи на много високата честота на *cagA* при пациентите в този регион (Shiota *et al.*, 2013).

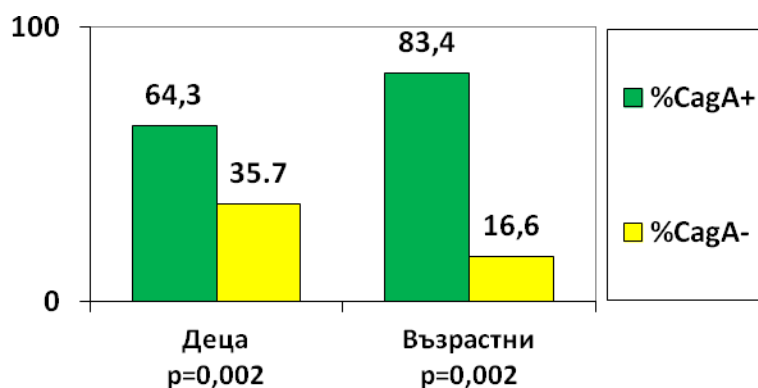
В настоящото проучване честотата (93,9%) на *cagA*<sup>+</sup> сред пациентите с пептични язви беше сравнима с най-високите честоти, докладвани в други проучвания (обичайно 72–93,8%), а общата честота на този вирулентен генотип (81,6%) беше сходна на честотите в близки държави, като Гърция, Кипър, Сърбия и Турция (41,5–93,8%, >77%)

(Apostolopoulos *et al.*, 2002; Ozbey *et al.*, 2013; Krashias *et al.*, 2013; Sokic-Milutinovic *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2015).

Не се наблюдаваше значима разлика в честотата на *cagA* при двата пола. *cagA*<sup>+</sup> бяха изолирани от 82,8% от изследваните мъже (202 от 244 случая) и при 80,2% от жените (166 от 207 случая). При пациентите от столицата малко по-често бяха доказвани *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* (201 от 237 случая; 84,8%) в сравнение с пациентите от провинцията (103 от 133 случая; 77,4%), но тази разлика не беше статистически значима (P=0,076).

**Значимо по-ниска (P=0,002), обаче, беше честотата на *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*, изолирани от деца (64,3%; 27 от 42 случая) в сравнение с възрастни (83,4%; 341 от 409 случая) – Фиг. 17.**

Подобни резултати, при които *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori* се срещат по-рядко при децата, са съобщавани и от други автори. Secka *et al.* (2011) са намерили *cagA* само в 16.7% от изолатите от деца до 3-годишна възраст спрямо в 85.5% от изолатите *H. pylori* от пациенти на възраст между 30 и 59 години (Secka *et al.*, 2011). От друга страна, има съобщения за липса на каквато и да е разлика в честотата на *cagA* между деца и възрастни (Perreira *et al.*, 2014).



**Фиг. 17.** Честота на *cagA*<sup>+</sup> изолати при деца и възрастни.

Инфекциите с щамове тип I (*CagA*<sup>+</sup>/*VacA*<sup>+</sup>) обикновено корелират с риск от пептични язви, стомашен карцином и MALT лимфом в Западните държави, като е открита връзка между по-вирулентните *vacA* s1 и s1/m1 типове и *cagA*<sup>+</sup> щамове (Chung *et al.*, 2010). Chung *et al.* (2010) са открили подобна връзка - наличие на *cagA*<sup>+</sup>, *vacA* s1 и *vacA* i1

щамове при болни с пептични язви в Китай, Уругвай и САЩ, като единственото изключение са щамовете от Турция (Chung *et al.*, 2010).

В настоящото проучване *cagA* показва силна връзка с всички вирулентни алели на *vacA* – *s1a*, *i1* и *m1*. *vacA s1a* беше открит в 91,3% от *cagA*-положителните щамове (336 от 368 случая), спрямо само 34 от 83 *cagA*<sup>-</sup> изолата (41,0%; P<0,001). *vacA i1* също беше доказан по-често при *cagA*<sup>+</sup> изолати *H. pylori* (272 случая; 73,9%); за сравнение само 11 от 83 *cagA*<sup>-</sup> изолата притежаваха алела *vacA i1* (13,3%; P<0,001). Също толкова значима е разликата в честотата на *vacA m1* – 47,0% при *cagA*<sup>+</sup> изолатите (173 случая) спрямо 9,6% при *cagA*<sup>-</sup> (8 случая), (P<0,001). **Комбинацията от най-вирулентните алели *vacA s1a/i1/m1* се срещаше в 42,9% от всички *cagA*<sup>+</sup> щамове *H. pylori* (158 от 368 случая), и само при 5 от 83 случая с *cagA*<sup>-</sup> (6,0%; P<0,001).**

Тези много вирулентни щамове *H. pylori* с генотип *cagA*<sup>+</sup>/*vacA s1a/i1/m1* се срещаша значимо по-често при пациенти с пептични язви (47,0%; 54 случая от 115), отколкото при неязвени изолати (30,4%; 102 случая от 336), (P=0,001).

Логично, щамовете *H. pylori* с *cagA*<sup>-</sup> генотип показаха връзка с по-слабо вирулентните алели на *vacA* – *s2*, *i2* и *m2*, както и с тяхната тройна комбинация. При 83 *cagA*<sup>-</sup> изолати се откриха 58% *vacA s2* (47 случая), 86,7% *vacA i2* (72 случая) и 90,4% *vacA m2* (75 случая). *vacA s2/i2/m2* се срещаше в 54,2% от всички *cagA*<sup>-</sup> изолати *H. pylori* (45 от 83 случая), докато в случаите на *cagA*<sup>+</sup> генотип тази тройна алелна комбинация на *vacA* беше доказана в едва 3,0% (11 от 368 случая). При всички изброени по-горе случаи стойностите на статистическата зависимост бяха P<0,001.

В настоящото проучване честотата на *cagA* не беше свързана с местоживеенето на пациентите.

В обобщение, щамовете *H. pylori* в настоящото проучване показаха висока вирулентност – с висока честота на *cagA* (93,9%). Този генотип се асоциираше във висока степен с язвени заболявания (P<0,0001). Силно вирулентния генотип *cagA*<sup>+</sup>/*vacA s1a/i1/m1* беше открит в 34,6% и също така беше свързан с пептичните язви (P=0,001). Значимо по-ниска (P=0,002) беше честотата на *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*, изолирани от деца (64,3%) в сравнение с възрастни (83,4%).

#### 2.2.4. Детекция на цитотоксин асоциирания ген E (*cagE*)

Друг ген от острова на патогенност *cagPAI* е *cagE* (цитотоксин-асоциран ген E), който е свързан със силна индукция на секрецията на IL-8 в стомашните епителни клетки (GholizadeTobnagh *et al.*, 2017). Някои проучвания съобщават, че *cagE* може по-добре да предскаже наличието на цялостен *cagPAI*, отколкото *cagA* (GholizadeTobnagh *et al.*, 2017; González-Vázquez *et al.*, 2016). Въпросът е противоречив - в Турция само *cagE* и *vacA s1a* генотипите са определени като рискови фактори за дуоденална язва и само генотиповете на *cagE* и кръвнотиповият антиген-свързващ адхезин *babA2* – като рисков фактор за стомашен карцином (Erzin *et al.*, 2006), но друго проучване в Иран не открива връзка между *cagE* статуса и тежестта на стомашното заболяване (GholizadeTobnagh *et al.*, 2017).

В настоящото проучване от 451 изолата *H. pylori* от инфекции от единичен щам, изследвани с PCR, *cagE*-положителните (*cagE*<sup>+</sup>) бяха 282 (62,5%). От тях 279 бяха *cagA*<sup>+</sup>/*cagE*<sup>+</sup>, а само при 3 изолата беше доказан *cagA*<sup>-</sup>/*cagE*<sup>+</sup> генотип, т.е. **между *cagA* и *cagE* беше доказана силна връзка (P<0,0001)**. *cagE*<sup>-</sup> бяха 169 изолата (37,5%), от които 89 с генотип *cagA*<sup>+</sup>/*cagE*<sup>-</sup>, а 80 – с *cagA*<sup>-</sup>/*cagE*<sup>-</sup> (Табл. 7).

**Таблица 7.** Честоти на *cagE* и на *cagA/cagE* генотипове при изолати от пептични язви и от неязвени заболявания.

Генотип	пептични язви (n=115)		неязвени заболявания (n=336)		P	общо	
	брой	%	брой	%		NS	брой
<i>cagE</i> <sup>+</sup>	89	<b>77,4</b>	193	57,4	<b>P=0,0001</b>	282	62,5%
<i>cagE</i> <sup>-</sup>	26	22,6	143	<b>42,6</b>	<b>P&lt;0,0001</b>	169	37,5
<i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>cagE</i> <sup>+</sup>	89	<b>77,4</b>	190	56,5	<b>P&lt;0,0001</b>	279	61,9%
<i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>cagE</i> <sup>-</sup>	19	16,5	70	20,8	NS	89	19,7
<i>cagA</i> <sup>-</sup> / <i>cagE</i> <sup>-</sup>	7	6,1	73	<b>21,7</b>	<b>P=0,0002</b>	80	17,7
<i>cagA</i> <sup>-</sup> / <i>cagE</i> <sup>+</sup>	-	-	3	0,9	NS	3	0,7

NS- несигнификантна разлика

Подобна връзка е съобщавана и от други автори и не е изненадваща, тъй като двата гена *cagA* и *cagE* са част от един и същ остров на патогенност *cagPAI* при *H. pylori* (Yakoob *et al.*, 2013).

**Щамове от пациенти с пептични язви по-често бяха  $cagE^+$  (77,4%; 89 от 115 случая) в сравнение с 57,4% (193 от 336 случая) при пациентите без язви, ( $P=0.0001$ ) – Табл. 7. Всички  $cagE^+$  изолати от пациенти с язвена патология бяха положителни и за  $cagA$ . Неязвените пациенти по-често бяха инфектирани от нисковирулентни щамове с отрицателен статус за  $cagE$  (42,6% в сравнение с пациентите с язви 22,6%,  $P<0,0001$ ), както и от изолати с генотип  $cagA^-/cagE^-$  (21,7%; 73 случая) спрямо 6,1% (7 случая) при пациентите с язви ( $p=0,0002$ ).**

Интерес представлява генотипът  $cagA^+/cagE^-$  - при 89 изолата. Въпреки че и  $cagA$ , и  $cagE$  са свързани поотделно или в комбинация с наличието на язвена патология, то при този генотип ( $cagA^+/cagE^-$ ) не беше открита такава зависимост. Такива изолати бяха доказани в 19 от 115 пациенти с пептични язви (16,5%) и в 70 от 336 пациента с неязвени заболявания (20,8%). Данните показват, че наличието на  $cagE$  е по-добър предиктор за развитие на пептична язва от наличието на  $cagA$  самостоятелно. Изследването на  $cagA$  не трябва да се използва самостоятелно като маркер за вирулентност. Тестването и за двата  $cag$  гена би могло да определи по-вирулентните щамове *H. pylori*, които изискват по-агресивна ерадикация на инфекцията (Ramis et al., 2013).  $cagE$  е откриван значимо по-често в биопсии от пациенти с ерозивен гастрит, т.е. има връзка между  $cagE$  и по-тежкото увреждане на стомашната лигавица, което вероятно се дължи на факта, че този ген е пряко свързан с увеличената продукция на IL-8 в стомашните епителни клетки (Ramis et al., 2013). Комбинацията  $cagA/cagE$  също е била по-честа при по-тежко стомашно възпаление, което предполага, че  $cagE$  самостоятелно или в комбинация с  $cagA$  е важен маркер на вирулентността на *H. pylori* (Ramis et al., 2013).

Важно е, че при 19,0% от изолатите *H. pylori*, включително 17,6% от пациенти с язви и 19,6% от пациенти с неязвени заболявания, наличието на  $cagA^+$  генотип беше свързано с липса на  $cagE$  и, вероятно, с непълен и нефункциониращ остров на патогенност  $cagPAI$ .

Важна находка в настоящото проучване е фактът, че честотата на  $cagE$  нараства с възрастта на пациентите. **При пациентите деца  $cagE^+$  и  $cagA^+/cagE^+$  генотипове се срещаха 2 пъти по-рядко (33,3%, 14 от 42 случая за  $cagE^+$  и 31,0% - 13 случая за**

*cagA*<sup>+</sup>/*cagE*<sup>+</sup>), отколкото при възрастните (съответно 65,0%; 268 от 409 случая за *cagE*<sup>+</sup> и 69,0% - 266 случая за *cagA*<sup>+</sup>/*cagE*<sup>+</sup>), като и в двата случая  $P < 0,0001$ . Освен това, **при изолатите от деца** генотипът *cagA*<sup>+</sup>/*cagE*<sup>-</sup> е по-чест (33,3% - 14 от 42 деца), отколкото при възрастните (18,3% 75 от 409 възрастни,  $p = 0,02$ ). Също така **при децата са по-чести *cagA*<sup>-</sup>/*cagE*<sup>-</sup>** - (33,3% - 14 случая), докато възрастните пациенти, при които се изолира този генотип са 16,1% (66 от 409 случая;  $P = 0,006$ ). Това би могло да означава, че вирулентността на щамовете в цялостната популация през последните години намалява в съответствие с феномена на кохортите, (т.е. придобиването на *H. pylori* инфекцията в ранното детство), или пък може да се дължи на промяна във вирулентността на щама в хода на доживотната инфекция при отделни пациенти като резултат от щамова адаптация към променящата се стомашна среда. И двете хипотези могат да обяснят, защо при деца, заразени с *H. pylori* тежките заболявания се срещат по-рядко, отколкото при старите хора. Следователно, динамиката на *cagE* и на комбинацията *cagA/cagE* с възрастта е важен въпрос, който следва да се оцени в бъдещи проучвания.

**В заключение, въпреки че и двата *cag* гена са свързани с тежки заболявания при симптоматични български пациенти, вирулентните щамове се откриват точно чрез комбинацията *cagA/cagE*. Освен това, за разлика от *cagA*, генът *cagE* е силно свързан с възрастта на пациента. Генът *cagE* би трябвало да се изследва в повече страни и болници, с цел да се оптимизира детекцията на *H. pylori* щамовете с висока вирулентност. Доколкото ни е известно, досега не са съобщавани данни за зависимост между *cagA/cagE* генотиповете и възрастта на пациента.**

### 2.2.5. Детекция на други гени от острова на патогенност *cagPAI*

От общо 451 изолата *H. pylori*, 117 (колекционирани от 2012 г. до 2015 г.) бяха изследвани за наличието на **гени от острова на патогенност *cagPAI*** (Табл. 8). Разпределението по пол беше – 58 изолата от мъже (49,6%) и 59 от жени (50,4%). Разпределението по възраст беше - изолирани от деца (0-17 г.) – 16 щама 13,7%, от възрастни (18-64 г.) – 84 щама (71,8%) и от хора на >65 г. - 17 щама (14,5%).

Разпределението според диагнозата на пациентите беше:

- с неязвени заболявания – 92 пациента (78,6%)

- с пептични язви – 25 пациента (21,4%) – 18 – с язва на дванадесетопръстника, 6 – със стомашна язва и 1 - с дуоденална и със стомашна язва едновременно.

Честотата на **cagPAI** гените при язвено и неязвено болни са показани на Таблица 8., от която се вижда, че ако гените на острова се разгледат поотделно статистически значимо по-висока е честотата при язвено болни на *cagY*, *cagA*, *cagW*, и, както беше коментирано по-горе, на *cagA* и на *cagE*.

**Всички пациенти с липсващ остров на патогенност, при които се установи наличие на empty site, бяха с неязвени заболявания (15 от 92 случая; 16,3%),** докато никой от 25-те изолата от пациенти с язвена патология не амплифицира с empty site праймерите ( $p=0,038$ ), което показва значимостта на липсата на *cagPAI* за по-благоприятното клинично развитие на заболяването. При 8 от тези 15 изолата (53,3%) не се доказва нито един от гените на острова на патогенност *cagPAI*. При 6 изолата (40,0%) беше доказано наличие на само един от изследваните гени на *cagPAI* (*cagM*, *cagT*, *cagW* *cagY*, или *cagδ*), а при един изолат (6,7%) се доказаха два от тези гени (*cagE* и *cagW*).

**Таблица 8.** Честота на гени от *cagPAI* при изолати *H. pylori*

Ген	Общо (n=117)		При пептични язви (n=25)		При неязвени заболявания (n=92)		P
	брой	%	брой	%	брой	%	
<i>cagA</i>	98	83,8	25	<b>100,0</b>	73	<b>79,3</b>	<b>0,012</b>
<i>cagE</i>	83	70,9	22	<b>88,0</b>	61	<b>66,3</b>	<b>0,046</b>
<i>cagM</i>	99	84,6	23	92,0	76	82,6	>0,05
<i>cagT</i>	99	84,6	24	96,0	75	81,5	>0,05
<i>cagW</i>	102	87,2	25	<b>100,0</b>	77	<b>83,7</b>	<b>0,038</b>
<i>CagY</i>	90	76,9	21	84,0	69	75,0	>0,05
<i>Caga</i>	99	84,6	25	<b>100,0</b>	74	<b>80,4</b>	<b>0,012</b>
<i>Cagγ</i>	99	84,6	25	<b>100,0</b>	74	<b>79,8</b>	<b>0,012</b>
<i>Cagδ</i>	99	84,6	24	96,0	75	81,5	>0,05
<b>Empty site<sup>1</sup></b>	15	12,8	0	<b>0,0</b>	15	<b>16,3</b>	<b>0,038</b>

1- Положителният резултат за **Empty site** доказва липсващ остров на патогенност, p – статистическа значимост при  $P<0,05$

В настоящето проучване беше много висока честотата на щамове, при които имаше пълния брой на проучваните гени за острова на патогенност, т.е, наличие на всички гени, използвани за синтеза на апарата, инжектиращ CagA в клетката. Всичките 9 изследвани гена от *cagPAI* (*cagA*, *cagE*, *cagM*, *cagT*, *cagW*, *cagY*, *cagα*, *cagγ*, *cagδ*) бяха позитивни при **75 изолата (64,1%)**.

При 15 изолата (12,8%) бяха налице всички изследвани гени от *cagPAI*, освен един. В 7 случая липсващият ген беше *cagE*, в 6 случая *cagY*, в един изолат липсваше *cagA* и в един *cagα*.

При 5 изолата (4,3%) липсваха 2 от гените в *cagPAI*. И в петте случая единият от двата липсващи гена беше *cagE*, а другият е *cagY* (3 случая), *cagM* (1) и *cagγ* (1). При останалите 7 изолата, които не бяха положителни за empty site, липсваха поне 4 от изследваните гени на *cagPAI*. Тези изолати бяха от пациенти с неязвени заболявания. Независимо от липсата на амплификация с праймерите за empty site приемаме, че при повече от два липсващи гена островът на патогенност *cagPAI* не е интактен. И други автори докладват, че липсата на един или два гена може да не се отрази на интактноста на *cagPAI* (Olbermann, 2010). При такива щамове авторите установяват секреция на IL-8 – тоест наличие на възпалителна реакция (Olbermann, 2010). Интересен е фактът, че при това проучване авторите са установили изолат с липсващ *cagE*, но с наличие на продукция на IL-8 (Olbermann, 2010).

**Щамове** с неинтактен *cagPAI* нямат почти никаква способност да индуцират секреция на IL-8, нито образуването на фенотип „колибри” в клетъчни линии от стомашен епител (Nguyen *et al.*, 2010). Интактният *cagPAI* е важно условие за правилното функциониране на тип IV секреторната система, чрез която *H. pylori* се прикрепва за клетките на гостоприемника, разрушава междуклетъчните връзки чрез пренос на CagA в цитоплазмата и индуцира секрецията на инфламаторни цитокини; по този начин *H. pylori* може да избегне механичния клирънс и киселата среда в стомашния лумен, да оцелее и ефективно да колонизира стомашния епител (Nguyen *et al.*, 2010). Концентрацията на *H. pylori* с интактен *cagPAI* в стомашните биопсии е много по-голяма, което показва, че

такива щамове по-добре колонизират стомашната мукоза в сравнение с изолатите с неинтактен *cagPAI* (Nguyen *et al.*, 2010).

Следователно, в настоящото проучване **общият брой щамове с интактен *cagPAI* беше 95 (81,2%), а изолатите, при които *cagPAI* не беше интактен, бяха 22 (18,8%).** Подобни резултати са докладвани и в Турция, където изолатите с неинтактен *cagPAI* са били 18.4% (Salih *et al.*, 2014).

При изолатите *H. pylori* от пациенти с пептични язви всички гени заедно присъстваха в 17 случая (68%). При 4 изолата (16%) липсваше само един, а при 3 изолата (12%) липсваха само два от изследваните гени и нямаше амплификация с empty site праймерите, при което приехме наличие на интактен остров на патогенност. По този начин **процентът на интактност на острова на патогенност *cagPAI* при язвено болните беше 96%** (24 от 25 случая). Само в един случай (4%) се доказа изолат от язвено болен пациент с 4 липсващи гена (*cagE*, *cagM*, *cagT* и *cagY*) от *cagPAI*. Честотата на интактен ***cagPAI* при неязвено болните беше 77,2%** (71 от 92 изолата, от които 55 бяха положителни за всички изследвани 9 гена, 14 – отрицателни само за един от гените и 3 бяха отрицателни за два от изследваните гени на *cagPAI*). **Разликата в честотата на интактния *cagPAI* при язвени и неязвени изолати *H. pylori* беше статистически значима (P= 0,043).**

Разпространението на *cagPAI* може да варира според възрастта на пациента. Така например, по-малко деца (41%) от Северна Америка са имали щамове с интактен *cagPAI* спрямо възрастните (62%), (Talarico *et al.*, 2009). Настоящото проучване, обаче, не откри статистически значима разлика в честотата на отделните гени, нито в наличието на интактен *cagPAI* според възрастта, пола и местоживеенето на пациентите (Табл. 9).

Важно е, че наличието на *cagA* не показва непременно наличието на интактен *cagPAI*, който е необходим на бактериалната клетка, за да функционира островът на патогенността добре (Kusters *et al.*, 2006). С клинично значение е фактът, че наличието на интактен (функционален) *cagPAI* е било свързано с пептичните язви и стомашния карцином в много страни по света с изключение на тези в Източна Азия. *cagPAI* е запазен

във висок процент (57,1%) при японските щамове, по-слабо (3-15,8%) в европейските и африканските щамове, както и в щамовете от Перу и Индия (12-18,6%), (Boyanova 2011a).

**Таблица 9. Разпределение на гените от *cagPAI* според възрастта на пациентите.**

Ген	Деца (0-17 г.) n=16	Възрастни (18-64 г.) n=84	Възрастни (≥65 г.) n=17
empty site	3 (19,8%)	10 (11,9%)	2 (11,8%)
<i>cagA</i>	13 (81,3%)	71 (84,5%)	14 (76,5%)
<i>cagE</i>	8 (50,0%)	62 (73,8%)	13 (76,5%)
<i>cagM</i>	14 (87,5%)	70 (83,3%)	15 (88,2%)
<i>cagT</i>	12 (75,0%)	73 (86,9%)	14 (82,4%)
<i>cagW</i>	13 (81,3%)	73 (86,9%)	16 (94,1%)
<i>cagY</i>	13 (81,3%)	62 (73,8%)	15 (88,2%)
<i>Caga</i>	12 (75,0%)	75 (86,2%)	14 (82,4%)
<i>Cagγ</i>	11 (68,8%)	73 (86,9%)	15 (88,2%)
<i>Cagδ</i>	14 (87,5%)	70 (83,3%)	15 (88,2%)

Други автори откриват доста по-висока честота на интактен *cagPAI* - 50-60% при щамовете от Западните страни, и в почти всички (често >90%) щамове в Източна Азия, където честотата на стомашния карцином е висока (Nguyen *et al.*, 2010). Интактният *cagPAI* е с важно клинично значение и се среща по-често в случаи на тежък активен гастрит, отколкото на хроничен гастрит (Ahmadzadeh *et al.*, 2015). По-чест е интактният остров на патогенност и в случаите на пептични язви и на стомашен карцином; Следователно, интактният *cagPAI* е ключов фактор на вирулентността на *H. pylori* (Yadegar *et al.*, 2015).

Настоящото проучване откри **много висока честота на интактен *cagPAI* (81,2%), която е сравнима с честотата на *cagA* (81,6%, виж по-горе т. 5.2.2.3.). И при *cagPAI*, и при *cagA* се открива зависимост с пептичните язви. Като се има предвид това, е трудно да се определи, дали доказването на интактен *cagPAI* посредством амплификация на избрани гени от този остров на патогенността на *H. pylori* е по-добър предиктор на по-агресивен последващ ход на инфекцията, отколкото статусът на *cagA*. Освен това, за**

точно доказване на *cagA* са необходими само две двойки праймери, докато за определяне на *cagPAI* – много повече, което прави доказването на интактността на острова на патогенност по-скъп и трудоемък метод. По-голяма прецизност би могла да се постигне, ако се изследва влиянието на щамове с активен и неактивен *cagPAI* върху секрецията на IL-8 от стомашната мукоза.

**В заключение, настоящото проучване за пръв път показва честотата на разпространение на много гени от острова на патогенност *cagPAI* на *H. pylori*, както и честотата на интактен *cagPAI* в България, която е по-висока от съобщаваната за други европейски страни. Освен *cagA* и още няколко гена от *cagPAI* (*cagY*, *cagA* и *cagW*) показват връзка с пептичните язви. При щамове от язвено болни също така по-често се открива интактен *cagPAI*.**

#### **2.2.6. Детекция на гена, индуциран от контакт с епитела на стомаха - *iceA***

Алелът *iceA1* кодира CATG-специфична рестрикционна ендонуклеаза и се индуцира при контакт на *H. pylori* със стомашните клетки. *iceA* модулира освобождаването на IL-8 от стомашните епителните клетки на гостоприемника (Shiota *et al.*, 2012). Литературните данни за значението на *iceA1* като фактор на вирулентността са противоречиви. Метаанализи показват, че алелът *iceA1* се свързва с пептични язви (Huang *et al.*, 2016; Shiota *et al.*, 2012), въпреки че някои автори не се открили подобна връзка (Erzin *et al.* 2006; Kusters *et al.*, 2006; Miciuleviciene *et al.*, 2008).

За детекция на *iceA* генотиповете бяха изследвани 176 изолата *H. pylori*, избрани на случаен принцип, от същия брой пациенти, вкл. 108 мъже и 68 жени; пациенти с дуоденални язви (39), стомашна язва (16), стомашна и дуоденална язва едновременно (3), хроничен гастрит (97) и гастроэзофагеална рефлуксна болест (ГЕРБ - 21 случая). Сред пациентите имаше 13 деца на възраст между 8 и 17 години, 137 възрастни (18-65-годишни) и 26 възрастни (66- до 81- годишни).

Честотите на алелите на *iceA* при изолатите *H. pylori* сред пациентите с инфекция от единичен щам бяха: 69,3% за *iceA1* (122 случая) и 30,7% (54 случая) за *iceA2*.

В настоящото проучване честотата на *iceA1* при изолати от пациенти с пептични язви беше 77,6% (45 от 58 случая), докато при изолатите от пациенти с неизвена патология

честотата на *iceA1* беше малко по-ниска - 65,3%; (77 от 118 случая), но тази разлика не беше статистически значима ( $P = 0,095$ ). Тези резултати са представени в Таблица 10.

Въпреки, че не установихме връзка на *iceA* алелите с типа на заболяването, все пак комбинациите на алела *iceA1* с *vacA s1* или с *cagA* бяха открити по-често при изолати от пациенти с пептични язви, отколкото при пациенти с неязвена патология. Комбинацията *iceA1/vacA s1* присъстваше в 75.9% от изолатите от пациенти с пептични язви спрямо 60.2% ( $P = 0.040$ ) от тези с неязвени заболявания; аналогично комбинацията *iceA1/cagA*<sup>+</sup> беше открита при 72.4% от пациентите с язви спрямо 55.9% ( $P=0.035$ ) при останалите (Табл. 10). Вероятно това се дължи на наличието на вирулентните *vacA s1* и *cagA*<sup>+</sup> алели.

**Таблица 10.** Честоти на *iceA1* и *iceA2* и на техни комбинации с други гени на вирулентност на *H. pylori* при изолати от язвено и неязвено болни.

Генотип	Общо изолати (n=176)		от пептични язви (n=58)		от неязвени заболявания (n=118)	
	брой	%	брой	%	брой	%
<i>iceA1</i>	122	69,3	45	77.6	77	65.3
<i>iceA2</i>	54	30,7	13	22,4	41	34,7
<b><i>iceA1/cagA</i><sup>+</sup></b>	108	61,4	<b>42</b>	<b>72,4 (P=0,035)</b>	66	55,9
<b><i>iceA1/vacA s1</i></b>	115	65,3	<b>44</b>	<b>75,9 (P=0,04)</b>	71	60,2
<b><i>iceA1/vacA s1a</i></b>	115	65,3	<b>44</b>	<b>75,9 (P=0,04)</b>	71	60,2
<i>iceA1/vacA m1</i>	54	30,7	17	29,3	37	31,4
<i>iceA1/vacA m2</i>	68	38,6	28	48,3	40	33,9
<i>iceA1/cagA</i> <sup>+</sup> / <i>vacA s1/m1</i>	52	29,5	17	29,3	35	29,7

**Легенда:** Отбелязани са генотиповете, при които има статистическа разлика в честотата при изолати от пептични язви и от неязвени заболявания.

Най-вирулентната комбинация *iceA1/cagA*<sup>+</sup>/*vacA s1/m1* не показва връзка с тежестта на гастроинтестиналната патология, като беше налична в общо 30.2% (52 случая), включително в 29.3% (17 случая) на изолати от пациенти с пептични язви и в 29.7% (35 случая,  $P = 0.9618$ ) от изолати от пациенти с неязвена диспепсия. Данните от настоящия

труд не могат да подкрепят значимостта на *iceA1* алела за по-тежко развитие на заболяването.

Настоящото проучване откри превалиране на *iceA1*, което е характерно за нашия географски регион. Честотата на *iceA1* (69,3%) сред симптоматични български пациенти беше сходна с тази, открита при деца в Словения (62%), но беше по-висока от съответните честоти сред възрастни пациенти в Източна Турция (41,4%) и Литва (43,2%) (Noman *et al.*, 2009; Miciuleviciene *et al.*, 2008; Ozbey *et al.*, 2012). Тези данни предполагат, че генотипът *iceA1* вероятно е разпространен повече в страните от Югоизточна Европа. Алелният вариант *iceA1* се среща често и в Япония и Корея, докато генотипът *iceA2* превалира в Америка (Shiota *et al.*, 2012, Feliciano *et al.*, 2015).

В настоящото проучване честотата на *iceA1* не беше свързана с възрастта, нито с пола на пациентите ( $P = 0.368$ ).

**В заключение може да се каже, че резултатите показаха сравнително висока честота на щамове с *iceA1*, но не се установи връзка между *iceA* алелите и тежестта на гастро-дуоденалната патология.**

### **2.2.7. Детекция на *babA2* (ген за адхезин, свързващ кръвно-групов антиген)**

Оценка на *babA2* генотипа беше извършена при 162 изолата *H. pylori*, избрани на случаен принцип, от същия брой инфектирани с единичен щам пациенти, от които 54 с пептични язви и 108 с неязвени заболявания; 96 мъже и 66 жени, 12 деца (на възраст  $\leq 17$  години), 124 възрастни (18-65 години) и 26 възрастни  $>65$  години).

**Честотата на *babA2* при изолатите *H. pylori* сред пациентите с инфекция от единичен щам беше 48,8%.**

Според някои автори щамове с генотип *babA2* са показали корелация с пептични язви и стомашен карцином, най-вече в Западните държави, но тази зависимост не се потвърждава от други проучвания и липсва в страните от Източна Азия (Chen *et al.*, 2013; Miftahusurur & Yamaoka 2015). При пациенти с дуоденални язви от четири европейски страни честотата на генотипа *babA2* е била 35–60% (Olfat *et al.*, 2005). Въпреки това *in vitro* е доказано, че щамове *H. pylori* с добра адхезия могат да са и *babA2*-отрицателни при изследване с PCR, което вероятно се дължи на алелни вариации (Olfat *et al.*, 2005). Yamaoka (2008b) препоръчва ползването на имуоблот за оценка на BabA, както и

ползването на няколко различни двойки праймери за PCR заради възможни вариации в секвенциите.

В настоящото проучване, *babA2* се доказва малко по-често (**59,3%**, 32 от 54 случая) при изолати от болни с пептични язви, отколкото при пациенти с неязвена патология (**43,5%**, 47 от 108 случая), но тази разлика не попадна в границите на статистическата значимост ( $P = 0,059$ ). Честотата (48,8%, 79 от 162 изолата) на *babA2*-положителните щамове сред симптоматични български пациенти беше подобна на тази в други европейски държави като Португалия, Франция, Швеция и Германия, където *babA2* е открит в 32-60% от неязвените изолати и в 50-83% от изолатите от пептични язви (Chen *et al.*, 2013). От друга страна, в Източна Азия *babA2* е откриван в >90% от изолатите *H. pylori* в Тайланд и в 100% от изолатите в Япония, Тайван и Южна Корея, пореди което в този регион на света и не се открива никаква зависимост между наличието на алела и тежестта на гастродуоденалната патология (Chen *et al.*, 2013)

Честотите на някои комбинации от гени бяха: 48,8% за *babA2/vacA s1*, 45,0% за *babA2/ cagA<sup>+</sup>*, 21,0% за *babA2/cagA<sup>+</sup>/vacA s1/m1* и 35,2% за *babA2/iceA1*.

Честотата на *babA2* и на комбинациите му с други гени на вирулентността на *H. pylori* са представени на Таблица 11.

Алелът *babA2* често е показвал свързаност с *vacA s1* и *cagA* статуса на изолатите (Olfat *et al.* 2005; Yamaoka 2008b). В настоящото проучване всички 79 *babA2*-положителни изолата показаха наличие на алела *vacA s1a*, а 92,4% (73 случая) от *babA2*-положителните щамове бяха и *cagA<sup>+</sup>*. Освен това 72,2% (57 случая) от *babA2*-положителните *H. pylori* бяха и с *iceA1* генотип.

**Въпреки че нито *iceA1*, нито *babA2* бяха по-чести при изолати от пептични язви, комбинацията от двата алела при такива пациенти беше значимо по-честа (48,1%, 26 от 54 случая), отколкото при пациентите с неязвена патология (28,7%, 31 от 108 случая,  $P = 0,015$ ).**

**Таблица 11.** Генотипове на *H. pylori* изолирани от инфекции с единичен щам.

Генотип	Общо изолати (n=162)	%	Язвени изолати (n=54)		Неязвени изолати (n=108)	
			брой	% положителни	брой	% положителни
<i>babA2</i>	79	48.8	32	59.3	47	43.5
<i>babA2/vacA s1</i>	79	48.8	32	59.3	47	43.5
<i>babA2/vacA s1a</i>	79	48.8	32	59.3	47	43.5
<i>babA2/cagA+</i>	73	45.0	29	53.7	44	40.7
<b><i>babA2/vacA m1</i></b>	34	21.0	18	<b>33.3 (P = 0,006)</b>	<b>16</b>	<b>14.8</b>
<i>babA2/vacA m2</i>	45	27.8	14	25.9	31	28.7
<b><i>babA2/iceA1</i></b>	57	35.2	<b>26</b>	<b>48.1 (P = 0,015)</b>	<b>31</b>	<b>28.7</b>
<i>babA2/iceA2</i>	22	13.6	6	11.1	16	14.8
<b><i>babA2/cagA<sup>+</sup>/vacA s1/m1</i></b>	34	21.0	<b>18</b>	<b>33.3 (P = 0,006)</b>	<b>16</b>	<b>14.8</b>

В настоящия дисертационен труд пациентите с пептични язви по-често имаха изолати с генотип *babA2/vacA m1* (33,3%, 18 от 54 случая) и с генотип *babA2/iceA1* (48,1%, 26 от 54 случая), отколкото пациентите с неязвени заболявания (14,8% с *babA2/vacA m1*, 16 от 108 случая, **P = 0,006**) и 28,7% с *babA2/iceA1*, 31 от 108 случая, **P = 0,015**).

Не бяха открити значими разлики в честотите при изолати от язви и от неязвени заболявания за генните комбинации *babA2/vacA s1* (P = 0,059), *babA2/vacA s1a* (P = 0,059), и *babA2/cagA<sup>+</sup>* (P = 0,118). Въпреки това генотипът *babA2/cagA<sup>+</sup>/vacA s1/m1* беше по-чест (33,3%, 18 от 54 случая) при пациенти с пептични язви, отколкото при такива с неязвена диспепсия (14,8%, 16 от 108 случая, **P = 0,006**), най-вероятно това се дължи на наличието на вирулентната комбинация *cagA<sup>+</sup>/vacA s1/m1*.

Честотата на *babA2* не беше свързана с възрастта, нито с пола на пациентите (P=0.368).

В заключение, установихме съществена зависимост само при наличието на комбинация между *babA2/cagA/vacA* алелите, като най-интересна е значимата връзка

между *babA2* и *iceA1*. Тази комбинация превалява значимо при изолати от болни с пептична язва.

### 2.2.8. Детекция на гена, промотиращ дуоденалните язви (*dupA*)

В световен мащаб все още има твърде малко данни относно разпространението и ролята на гена, промотиращ дуоденални язви - *dupA*. Освен това резултатите от тези проучвания са доста противоречиви (Abadi & Perez, 2016), което ни подтикна в настоящото проучване да изследваме честотата и разпределението на този ген при изолати *H. pylori* от български пациенти с гастродуоденална патология.

*dupA* включва две хомоложни молекули *virB4* (*jhp0917* и *jhp0918*), (Lu *et al.*, 2005). Гените *jhp0917* и *jhp0918* са компоненти на *dupA* и двете заедно са индикатор за наличието на целия ген. Щамове се отчитат като *dupA*-положителни само в случай че се амплифицират и двата гена (Abadi & Perez, 2016). Според Lu *et al.* (2005) *dupA* е важен маркер, свързан с повишен риск от язва на дванадесетопръстника и с по-нисък риск от стомашна атрофия и стомашен карцином (Lu *et al.*, 2005). *dupA* е свързан с по-висока киселинна устойчивост на щамове и индуцира секреция на IL-8 от стомашните клетки (Hussein *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2005). След първоначалното съобщение на Lu *et al.* (2005) относно значението на *dupA* за клиничното проявление на инфекцията с *H. pylori* се натрупват доста противоречиви данни от други проучвания (Abadi & Perez, 2016; Alam *et al.*, 2015; Hussein *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2012)

В настоящия дисертационен труд значимостта на гените *jhp0917* и *jhp0918* беше изследвана при 192 изолата *H. pylori* от инфекция с единичен щам. *dupA*<sup>+</sup> бяха 34,4% (66 изолата) (положителни и за двата гена). Останалите 126 бяха отрицателни от които 120 бяха негативни за двата гена, 4 бяха *jhp0917*-положителни/*jhp0918*-отрицателни изолати и два изолата бяха *jhp0917*-отрицателни/*jhp0918*-положителни. Двата гена *jhp0917* и *jhp0918* са силно свързани, като, подобно на нашите резултати, по литературни данни само много малък процент щамове *H. pylori* са били *jhp0917*-отрицателни и *jhp0918*-положителни; останалите щамове са били или положителни, или отрицателни по отношение и на двата гена (Schmidt *et al.*, 2009). Резултати, показващи наличието и на *jhp0917*-положителни/*jhp0918*-отрицателни, и на *jhp0917*-отрицателни/*jhp0918*-положителни са

съобщавани от Arachchi *et al.* (2007), докато други автори откриват само единият от тези варианти (Lu *et al.*, 2005).

Данните за честотата на *dupA* от настоящото проучване са сходни със съобщаваните стойности за Ирак, Китай, Индия и Колумбия (31,3-35,3%), но по-високи от честотите в Япония и Корея (19,5-21,0%) и по-ниски от данните за САЩ, Белгия, Иран, Южна Африка и Бразилия (43,5-92,3%), (Lu *et al.*, 2005; Douraghi *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009). Глобалната честота на *dupA* сред изолати от пациенти с гастрит се съобщава около 45%, като този процент варира много според държавата, в която се провежда изследването (31% в Азия до 64% в Западните страни; Abadi & Perez, 2016). Съответно, в страните от Азия се съобщава за значима връзка между развитието на гастродуоденални заболявания и статуса на *dupA* (Haddadi *et al.*, 2015; Miftahussurur *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2015; Parzecka *et al.*, 2013; Matteo *et al.*, 2010).

По литературни данни *dupA* е бил откриван два пъти по-често (42%) при пациенти с дуоденални язви, отколкото в случаите на гастрит (21%), (Lu *et al.*, 2005). Други проучвания, обаче, не откриват зависимост между *dupA* и клиничния резултат от инфекцията, но пък показват зависимост между *dupA*-отрицателните щамове *H. pylori* и премалигнени стомашни лезии (Douraghi *et al.*, 2008). Някои автори сравняват честотата на *dupA* в клинични щамове от няколко различни континента и установяват, че, когато е наличен, *dupA* е силно запазен, но без да има връзка с дуоденалните язви или стомашния карцином. Освен това е имало големи разлики в честотата на *dupA* в различните контролни групи (Schmidt *et al.*, 2009). Същите автори не са установили връзка между *dupA* и индуцирането на секрецията на IL-8 *in vitro* (Schmidt *et al.*, 2009).

В настоящото проучване не беше открита статистическа разлика ( $P > 0,05$ ) в честотата на *dupA* между изолати от пациенти с дуоденални язви (41,5%, 17 от 41 случая) и такива със стомашни язви (40,0%, 6 от 15 случая,  $P = 0,922$ ), или неязвени заболявания (31,6% 43 от 136 случая,  $P = 0,243$ ) – Табл. 12.

Тези резултати показват липса на значимо по-висока честота в България на *dupA* при пациенти с дуоденални язви в сравнение с останалите пациенти. Подобни резултати са съобщавани и в други държави, напр. Белгия, Бразилия, Иран, Швеция и др., но се

различават от резултатите от Индия, Ирак, Китай, Колумбия, Корея и Япония (Douraghi *et al.*, 2008; Arachchi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2005). От друга страна, наличието на гена *dupA* се счита като маркер за протекция срещу стомашен карцином (Douraghi *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2005; Souod *et al.*, 2015), но това не беше възможно да се установи в настоящото проучване, тъй като то включваше само един изолат *H. pylori* от пациент със стомашен карцином. Като цяло, резултатите от настоящото проучване са в подкрепа на данните за големите различия в географското разпространение на *dupA*.

Не беше открита статистическа разлика в честотата на *dupA*–положителните *H. pylori* според пола и възрастта на пациентите (Табл. 12).

**Таблица 12.** Честота на *dupA* според профила на пациентите

Група пациенти	брой изследвани изолати	<i>dupA</i> <sup>+</sup>	<i>dupA</i> <sup>-</sup>
<i>Заболяване</i>			
Дуоденална язва	41	17 (41,5%)	24 (58,5%)
Стомашна язва	15	6 (40,0%)	9 (60,0%)
неязвени заболявания	136	43 (31,6%)	93 (68,4%)
<i>Възраст</i>			
8-17 години	17	6 (35,3%)	11 (64,7%)
18-65 години	139	49 (35,3%)	90 (64,7%)
66-81 години	36	11 (30,6%)	25 (69,4%)
<i>Пол</i>			
мъже	106	34 (32,1%)	72 (72,5%)
жени	86	32 (37,2%)	54 (63,2%)
<b>Общо</b>	<b>192</b>	<b>66 (34,4%)</b>	<b>126 (65,6%)</b>

Настоящото проучване не откри връзка между *dupA* и статуса на *cagA* и/или генотипа *vacA*. Общо 35,2% (57 от 162 случая) от *cagA*–положителните, както и 20,0% (6 от 30, P= 0.103) от *cagA*–отрицателните щамове бяха *dupA*–положителни. Също така *dupA* беше наличен и в 35,3% (60 от 170) *vacA* s1 изолата и в 37,5% (6 от 16, P=0.456) от изолатите с генотип *vacA* s2. Сред изолатите с *vacA* i1 *dupA*–положителни бяха 43 от 120 (35,8%), а сред тези с *vacA* i2 – 23 от 72 (31,9%; P=0.583). *dupA*<sup>+</sup> бяха 27 от 75 изолата (36,0%) с генотип *vacA* m1 и 39 от 117 изолата с *vacA* m2 (33,3%; P=0,704).

**В заключение може да се каже, че в настоящият дисертационен труд не беше открита зависимост между наличието на *dupA* и типа на гастродуоденалната патология, пола и възрастта на пациентите. Следователно, за България не се препоръчва изследването на *dupA* като маркер за вирулентността на *H. pylori*.**

### **2.2.9. Детекция на гените *homA* и *homB*, кодиращи външномембранны протеини**

Изследвани бяха общо 190 щамове *H. pylori*. От тях 16 щамове бяха *homA*<sup>+</sup>/*homB*<sup>+</sup>, а 5 щамове не притежаваха нито *homA*, нито *homB*. От оставащите 169 щамове 84 бяха *homB*<sup>+</sup> (49,7%), а 85 (50,3%) бяха *homA*<sup>+</sup>.

Най-проучваният ген от семейството *Hom* от външномембранны протеини е *homB*, който кодира протеин *HomB* (с молекулна маса ~75 KDa), експресиращ се във външната мембрана. *homB* има близкородствен паралог *homA*, като между двата гена има 90% идентичност в последователността на нуклеотидите, особено в 5' и 3' краищата, като различията между гените са основно в средния район на съответните отворени рамки на четене (Oleastro & Ménard, 2013).

Настоящото проучване откри *homB* в 49,7% от щамове, докато *homA* бе наличен в 50,3%. Проучване в Иран е показало сходни честоти: 54% за *homA* и 43% за *homB* (Talebi Bezzmin Abadi *et al.*, 2011). Резултатите от настоящото проучване отговарят и на тези на Oleastro *et al.*, (2009b), които проучват 449 щамове от различни държави и откриват, че гените *homB* (56%) и *homA* (60,4%) имат сходна честота в Западните държави. (Oleastro *et al.*, 2009b). Различни данни се установяват при проучване сред деца в Словения - *homB* е бил с по-ниска честота (34%), отколкото *homA* (64%), (Šterbenc *et al.*, 2012). Сред щамове *H. pylori* от Португалия, Франция, Швеция, САЩ и Бразилия *homA* е бил с малко по-висока честота, докато *homB* превалира в Германия и Колумбия, а в Източна Азия (Япония и Корея) - той се среща много по-често (>77-95.9% от всички щамове), (Oleastro *et al.*, 2009b). Това потвърждава изразените различия между Източноазиатските и Западните щамове *H. pylori* по подобие на много други гени, кодиращи фактори на вирулентността при *H. pylori*.

Таблица 13 показва честотите на *homA* и *homB* според характеристиките на пациентите. Нито един от двата *hom* гена не показва значими разлики в честотата си, що се отнася до пола, възрастта и местоживеенето на пациентите, нито с клиничната проява на инфекцията с *H. pylori*.

**Таблица 13.** Честота на *homA* и *homB* в зависимост от характеристиките на пациентите.

Пациенти	Брой щамове	<i>homA</i> <sup>+</sup> щамове (n=85)		<i>homB</i> <sup>+</sup> щамове (n=84)	
		n	%	n	%
<i>Пол</i>					
Мъже	87	44	50,6	43	49,4
Жени	82	41	50,0	41	50,0
<i>Възраст</i>					
0-17 години	16	7	43,8	9	56,3
18-64 години	130	66	50,8	64	49,2
≥65 години	23	12	52,2	11	47,8
<i>Местожителство</i>					
София	79	41	51,2	38	48,8
провинция	90	44	48,9	46	51,1
<i>Заболяване</i>					
пептични язви	35	16	45,7	19	54,3
неязвени заболявания	134	69	51,5	65	48,5
<b>Общо</b>	<b>169</b>	<b>85</b>	<b>50,3</b>	<b>84</b>	<b>49,7</b>

Въпреки че *homB* беше с малко по-висока честота сред щамове *H. pylori* от пациенти с дуоденални язви (54,3%), отколкото при пациенти с неязвена диспепсия (48,5%), тази разлика не беше статистически значима. Честотата на *homA* също така не варираше значимо според типа на заболяването. Не бяха открити и различия в честотите нито на *homA*, нито на *homB*, що се отнася до пола и възрастта на пациентите.

Тези находки не подкрепят резултатите, получени от Oleastro *et al.*, (2009a), които са открили, че *homB* е по-чест сред западните щамове *H. pylori* от пациенти с пептични язви, докато *homA* е показал по-висока честота сред неязвените щамове (Oleastro *et al.*, 2009a). От друга страна нашите резултати подкрепят липсата на връзка между статуса на *hom* и клиничната проява на инфекцията с *H. pylori* в държави близки до България, каквито са Ирак и Турция (Husseini, 2011), и Словения (Šterbenc *et al.*, 2012). Подобни находки са съобщавани още от Kang *et al.* (2012) в Южна Корея, които също така отбелязват, че

връзката на *homB* с тежестта на гастродуоденалната патология зависи силно от географския произход на щамовете (Kang *et al.* 2012). Въпреки ролята на *HomB* за адхезията, точният механизъм, по който той участва в развитието на дуоденалната язва или на стомашния карцином, не е изяснен и не е известен неговият рецептор в клетките на гостоприамника (Oleastro & Ménard, 2013).

Таблица 14 показва честотата на *cagA* и мозаичните гени *vacA* и техните връзки с *homA* и *homB*. Алелите *vacA s1a* и *i1* бяха значимо по-чести сред *homB*<sup>+</sup> изолатите (88,1% и 75,0% спрямо съотв. 71,8% за *vacA s1a* (P=0,009) и 51,8% за *vacA i1* (P=0,002) сред *homA*<sup>+</sup> щамове). Логично, *vacA s2* и *i2* бяха по-чести при *homA*<sup>+</sup> (съответно 24,7% за *vacA s2* и 48,2% за *vacA i2*), отколкото при *homB*<sup>+</sup> щамове (съответно 9,5% за *vacA s2* (P=0,008) и 25,0% за *vacA i2* (P=0,002)). Що се отнася до средния регион на *vacA*, *m1* алелът беше по-чест сред *homB*<sup>+</sup> щамове (46,4% спрямо 31,8%), докато *vacA m2* преваляваше при *homA*<sup>+</sup> щамове (68,2% спрямо 53,6%), но тези разлики не бяха достатъчно статистически значими (P=0,05). Също така честотата на *cagA* беше по-висока сред *homB*<sup>+</sup> щамове (81,0% спрямо 76,5% при *homB*<sup>-</sup>), но тази разлика не беше статистически значима (p>0,05).

**Таблица 14.** Честоти на *cagA* и *vacA* сред *homA*<sup>+</sup> и *homB*<sup>+</sup> изолати *H. pylori*.

	<i>cagA</i> (n=133)		<i>vacA s1a</i> (n=135)		<i>vacA s2</i>		<i>vacA m1</i>		<i>vacA m2</i>		<i>vacA i1</i>		<i>vacA i2</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>homA</i> <sup>+</sup> (n=85)	65	76.5	61	71.8	21	<b>24.7</b>	27	31.8	58	68.2	44	51.8	41	<b>48.2</b>
<i>homB</i> <sup>+</sup> (n=84)	68	81.0	74	<b>88.1</b>	8	9.5	39	46.4	45	53.6	63	<b>75.0</b>	21	25.0
p		>0.05		<b>0.008</b>		<b>0.009</b>		0.05		0.05		<b>0.002</b>		<b>0.002</b>

Подобни връзки между *homB* и гени, определяни като фактори на вирулентността на *H. pylori*, са наблюдавани и в други проучвания (Oleastro *et al.*, 2009b; Talebi Bezmin Abadi *et al.*, 2011), което предполага, че *homB* е поне ко-фактор на вирулентност за *H. pylori*.

Не бяха открити хибридни *hom* с междинни размери (повече от 128 bp – което е размерът на амплифицирания продукт на *homA*, и по-малко от 161 bp – размерът на последователността на *homB*). Такива хибридни гени са откривани в други проучвания, но честотата им е била много ниска (1.4% сред щамове от Корея и Япония (Oleastro *et al.* 2008), 2.8% сред щамове *H. pylori* от Ирак (Hussein, 2011). От друга страна, нито един от 64 изследвани щамове от Турция не е имал хибридни гени (Hussein, 2011) и значението на такива щамове при *H. pylori* тепърва следва да се изяснява.

**В заключение, въпреки че не беше открита връзка на *hom* гените с типа на заболяването, *homB* беше статистически по-чест при *vacA s1a* и *i1*, което предполага възможно комбинирано действие на горепосочените гени в патогенезата на инфекцията.**

#### **2.2.10. Детекция на гена за гликозилтрансфераза *jhp0562***

Бяха изследвани 121 случайно избрани изолата *H. pylori*, изолирани от същия брой пациенти с инфекция от единичен щам, от които 63 мъже и 58 жени. От пациентите 23 бяха с пептични язви (15 с дуоденални язви и 8 – със стомашни язви), а 98 – с неязвени заболявания (хроничен гастрит или гастроэзофагеална рефлуксна болест).

В Таблица 15 са представени честотите на *jhp0562* според характеристиките на пациентите.

Lewis (Le) антигените са фукозилирани олигозахариди, намиращи се в липополизахарида на *H. pylori*. Експресията на тези антигени е с важно значение за колонизацията с този микроорганизъм, понеже Le антигени се експресират и по стомашните епителни клетки в гостоприемника (Pohl *et al.*, 2012). От съществено значение за продукцията на тип 1 (Le(a) и Le(b)) антигени е галактозилтрансфераза, кодирана от гена  $\beta$ -(1,3)*galT*. Генът *jhp0562* е разположен точно преди  $\beta$ -(1,3)*galT* и е наличен в много, но не всички щамове *H. pylori*. *jhp0562* е хомоложен на  $\beta$ -(1,3)*galT* и функцията му не е докрай изяснена, но е от значение за продукцията както на тип 1, така и на тип 2 Le антигени, като предоставя субстрат за вътрегеномна рекомбинация, която генерира различни ензими за синтез на Le антигени (Pohl *et al.*, 2012).

**Таблица 15.** Честота на *jhp0562* според характеристиките на пациентите

Пациенти	брой	<i>jhp0562</i> <sup>+</sup>	
		брой	%
<b>Пол</b>			
Мъже	63	34	54,0
Жени	58	31	53,4
<b>Възраст</b>			
0-17 години	5	1	20,0
18-65 години	94	54	57,4
≥66 години	22	10	45,5
<b>Заболяване</b>			
Дуоденални язви	15	7	46,7
Стомашни язви	8	6	75,0
Неязвени заболявания (гастроезофагеална рефлуксна болест, хроничен гастрит и др.)	98	52	53,1

Генът *jhp0562* не показва статистически значима разлика в честотата си в зависимост от пола и от възрастовата група на пациента. Не се наблюдаваше и такава разлика между щамове *H. pylori*, изолирани от пациенти с пептични язви и такива с неязвени заболявания. Това показва, че при български пациенти изследването на *jhp0562* не може да се използва като самостоятелен дискриминиращ тест за определяне на клинична прогресия на инфекцията с *H. pylori*.

Според екип френски изследователи *jhp0562* е бил асоцииран с пептични язви при децата (Oleastro *et al.*, 2010). В настоящото проучване обаче броят на изолираните от деца щамове *H. pylori* бе твърде малък (само 5), при това нито един от тези 5 пациента в детска възраст не беше с пептична язва, което не ни позволява да направим извод за значението на *jhp0562* за прогресията на *H. pylori* инфекцията при децата у нас. Все пак, това е проблем, който си струва да бъде изследван в бъдеще.

От друга страна интересно е дали *jhp0562* показва асоциация с някои други от водещите фактори на вирулентност на *H. pylori*. Matsuda *et al.* (2011) съобщават, че *cagA* статусът сигнификантно корелира с този на *jhp0562* в САЩ, но не и в Япония; т.е. значението на *jhp0562* за клиничния изход от *H. pylori*-инфекцията варира според географския регион (Matsuda *et al.* 2011). В настоящото проучване 98 от изследваните 121 щамове *H. pylori* бяха *cagA*-позитивни. Честотата на *jhp0562* сред *cagA*-позитивните щамове

беше 56,1% (55 щамове), а сред *cagA*-отрицателните щамове тази честота беше 43,5% (10 от 23 *cagA*-отрицателни щамове). Тази разлика обаче не е статистически значима ( $P>0,05$ ), което отново показва, че у нас *jhp0562* статусът на *H. pylori* не може да се използва като маркер за клинична прогресия на инфекцията.

Проучването на гена *jhp0562* на *H. pylori* сред щамове, изолирани от български пациенти показва, че у нас той няма връзка с клиничната изява на от *H. pylori*-инфекцията. Този резултат допринася за разбирането, че значението на *jhp0562* като фактор на вирулентност варира в огромна степен в зависимост от географския произход на щамовете. Необходими са по-нататъшни проучвания, за да се установи специфичното значение на *jhp0562* като фактор за клиничната прогресия при деца.

#### **2.2.11. Детекция на гена *oipA*, кодиращ инфламаторен външномембранен протеин**

На случаен принцип бяха избрани и изследвани общо 69 щамове от 69 пациента с инфекция от единичен щам *H. pylori* и с ендоскопска находка за дуоденална язва (23 пациента), стомашна язва (7), дуоденална +стомашна язва (4), хроничен гастрит (25) и ГЕРБ (10). Щамовете са изолирани в периода 2008 г. до 2010 г. От всички пациенти 91,3%; (64/69) не са били лекувани. Характеристиките на пациентите и изолатите са представени на Табл. 17.

##### Секвенционен анализ на региона на гена *oipA*, кодиращ сигнален пептид

OipA е външномембранен протеин с адхезионна функция (Shiota et al., 2012). Той участва в патогенезата на различни увреждания на стомашната лигавица, които могат да доведат до пептични язви или карцином (Kusters et al., 2006; Miftahussurur & Yamaoka, 2015). Множество мутации и рекомбинации позволяват на бактериите бързо да се приспособяват към околната среда, като увеличават своето генетично разнообразие (Yamaoka et al., 2006). Външно-мембранните протеини като OipA се кодират от фазово-вариабилни гени и хипермутабилни повтори на прости последователности с различен брой СТ динуклеотиди в 5' региона на гена. По този начин се повлиява функционалният статус на гена, което води до синтез на функционален протеин или на изместване на рамката на четене и получаване на стоп-кодон (Yamaoka et al., 2006). Мутантите с „изключен” статус

имат значимо по-слабо прикрепване към стомашните епителни клетки (Miftahussurur & Yamaoka, 2015). Рамката на четене може да се измести чрез загуба или добавяне на СТ динуклеотиди. Експресията на HP0638, който кодира протеина OipA, корелира с индуцирането на IL-8 и адхезията на бактериите, като така увеличава честотата на дуоденалните язви и на стомашния карцином (Yamaoka *et al.*, 2006). Много често щамовете с интактен *cagPAI* са имали и „включено” функционално състояние на *oipA* (Yamaoka, 2012). Въпреки това в географското разпространение на факторите на вирулентност на *H. pylori* има огромни различия (Shiota *et al.*, 2013), като дори и в една и съща държава (напр. в Индонезия) са откривани значими разлики в честотата на „включеното” функционално състояние на *oipA* при изолати от хора от различни етнически групи (Miftahussurur *et al.*, 2015). Находките относно връзката на „включеното” функционално състояние на *oipA* с други фактори на вирулентност и с клиничните прояви на инфекцията са доста противоречиви (Dossumbekova *et al.*, 2006; Yamaoka, 2012; Odenbreit *et al.*, 2009). Щамовете *H. pylori* показват голямо разнообразие според географския регион. При определени етнически групи в Малайзия и Сингапур Schmidt *et al.* (2010) са открили 90-95% щамове с „включен” *oipA* статус (Schmidt *et al.*, 2010). Повечето източноазиатски щамове са с „включен” статус на *oipA*, като СТ-повторните последователности в сигналния регион на *oipA* са полупрекъснати (например японският щам JK51 съдържа СТGCCTTTCT повторна последователност и е с „включено” статус); което предполага, че тази промяна е част от еволюционен механизъм на бактериите целящ предотвратяване на „изключването” (Miftahussurur & Yamaoka, 2015). Интересен факт е, че при секвениране на цялостен геном при източноазиатските щамове се установяват два *oipA* гена в различни локуси, докато в Западните страни няма подобна находка (Kawai *et al.*, 2011).

Всички 69 изолата дадоха положителни резултати с използваните праймери за *oipA*, като 81% показаха „включено” функционално състояние. При секвенирането на *oipA* бяха открити общо 9 различни модела (Таблица 16).

Най-честият статус със запазена рамка на четене и „включено” състояние беше този с 6 СТ повтора, което е видно и от други проучвания (Kauser *et al.*, 2005a; Matteo *et al.*, 2010). Сред „изключените” състояния с изместена рамка на четене най-често се откриваше вариантът със 7 СТ повтора. В настоящото проучване щамовете бяха с повече от 5 СТ повтора в 5' региона на *oipA*, което е специфично за европейските щамове (Kauser *et al.*,



**Таблица 17.** Честота на гена *oipA* при изолати *H. pylori* от 69 пациента инфекция от единичен щам и връзка с характеристики на пациентите и на изолатите.

Групи пациенти или характеристики на изолатите	Брой изолати	Брой на изолати с „включено” функционално състояние (%)	Брой на изолати с „изключено” функционално състояние (%)	P
Заболяване				
Пептична язва	34	33 ( <b>97%</b> )	1 (3%)	<b>0.0009</b>
Неязвено заболяване	35	23 (66%)	12 ( <b>34%</b> )	
Пол				
Мъжки	46	37 (80%)	9 (20%)	0.83
Женски	23	19 (83%)	4 (17%)	
Възраст				
8-17 години	4	2 (50%)	2 (50%)	0.19
18-65 години	46	38 (83%)	9 (17%)	0.24
66-81 години	12	10 (83%)	2 (17%)	1.00
Местоживеене				
София	40	32 (80%)	8 (20%)	1,00
Провинция	29	24 (83%)	5 (17%)	
<i>cagA</i>				
<i>cagA</i> -положителни	58	54 ( <b>93%</b> )	4 (7%)	<b>&lt;0.0001</b>
<i>cagA</i> -отрицателни	11	2 (18%)	9 ( <b>82%</b> )	
<i>vacA</i> мозаични алели				
<i>vacA</i> s1	56	54 ( <b>96%</b> )	2 (4%)	<b>&lt;0.0001</b>
<i>vacA</i> s2	13	2 (15%)	11 ( <b>85%</b> )	
<i>vacA</i> m1	29	28 ( <b>97%</b> )	1 (3%)	<b>0.0049</b>
<i>vacA</i> m2	40	27 (68%)	12 ( <b>32%</b> )	
<i>vacA</i> i1	41	38 ( <b>93%</b> )	3 (7%)	<b>0.0054</b>
<i>vacA</i> i2	23	14 (57%)	9( <b>43%</b> )	

**Легенда:** Удебеленият текст показва статистическа зависимост ( $P < 0,05$ )

Щамовете с най-вирулентни комбинации, т.е. *cagA*<sup>+</sup> и *vacA* s1/m1/i1, бяха 35%, като това беше най-често срещаният генотип, и почти всички щамове (96%) с този генотип бяха

със запазена рамка на четене и „включено” функционално състояние на *oipA*. Около две трети от тях бяха изолирани от пациенти с пептични язви. Почти всички (9 от 10) щамове с *cagA<sup>-</sup>/vacA s2/m2/i2* генотип показаха „изключен” функционален статус на *oipA* и бяха изолирани от пациенти с хроничен гастрит. Интересно е, че един щам с генотип *cagA<sup>-</sup>/vacA s2/m2/i2* и „изключен” функционален статус на *oipA* беше изолиран от пациент с дуоденална язва. Вторият по честота генотип беше *cagA<sup>+</sup>/vacA s1a/m2/i1*, който бе доказан в 16 щамове (15 от които с „включено” функционално състояние на *oipA*), а 11 (69%) от тези щамове бяха от пациенти с пептични язви.

Настоящият дисертационен труд откри **висока честота (81%) на *oipA* с „включен” функционален статус**, който не зависи от възрастта и пола на пациентите, нито от местоживеенето им. Този ген се експресираше **при почти всички щамове от пациенти с пептични язви (97%)**, но в много по-малка степен **при пациенти с гастрит (66%)**, което предполага, че това може да се използва като маркер за предвиждане на клиничния резултат от инфекцията.

**Таблица 18.** Разпространение на специфични генотипни комбинации

Генотипна комбинация	Брой изолати	“включено” функционално състояние на <i>oipA</i>	“изключено” функционално състояние на <i>oipA</i>	Брой пациенти с пептични язви (% от всички изолати)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s1a m1 i1</i>	24	23	1	15 (63)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s1a m1 i2</i>	2	2	0	2 (100)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s1a m2 i1</i>	16	15	1	11 (69)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s1a m2 i2</i>	9	8	1	4 (44)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s1a m2</i>	2	2	0	0 (0)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s1a m1</i>	3	3	0	0 (0)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s2 m2 i1</i>	1	0	1	1 (100)
<i>cagA<sup>+</sup>/vacA s2 m2 i2</i>	1	0	1	0 (0)
<i>cagA<sup>-</sup>/vacA s2 m2 i2</i>	10	1	9	0 (0)
<i>cagA<sup>-</sup>/vacA s1a m2 i2</i>	1	1	0	1 (100)

Тези резултати са подобни на находката на Yamaoka *et al.* (2006), които са открили, че 88% от пациентите в Колумбия и САЩ са с „включено” функционално състояние на гена,

и заключават, че статусът на *oipA* има значима връзка с пептичните язви (Yamaoka *et al.*, 2006).

Oleastro *et al.* (2008) също съобщават за 88% „включен” статус на *oipA* при изолати от пациенти с пептични язви спрямо само 60% при изолати от неязвена диспепсия (Oleastro *et al.*, 2008). Относително по-ниска честота на активен *oipA* е открита в Англия (70,5%, Kauser *et al.*, 2005a), Германия (59%, Dossumbekova *et al.*, 2006), Сицилия (55%, Fasciana *et al.*, 2015) и Иран (55%, Dabiri *et al.*, 2017), а в някои проучвания не се открива връзка между статуса на *oipA* и клиничните прояви на инфекцията (Aghdam *et al.*, 2017; Chiarini *et al.*, 2009). Метаанализ на Liu *et al.*, (2013) заключава че „включеното” функционално състояние на *oipA* има връзка най-вече с дуоденалните язви, докато просто наличието на този ген (без да се изследва функционалния му статус) не може да се използва като предиктор за клиничния резултат от инфекцията с *H. pylori* (Liu *et al.*, 2013).

Връзката между „включеното” функционално състояние на *oipA* и по-тежкото клинично проявление на инфекцията с *H. pylori* в настоящото проучване може да се обясни с възможността на цялостния OipA протеин да индуцира по-голяма продукция на IL-8, който играе важна роля при възпалението на стомашната лигавица (Miftahussurur & Yamaoka *et al.*, 2015). Инактивирането на функционален *oipA* намалява многократно производството на IL-8, което е установено при опити с лабораторни живони и с доброволци (Miftahussurur & Yamaoka *et al.*, 2015), макар че други автори не са открили такова сигнификантно намеление в продукцията на IL-8 (Dossumbekova *et al.*, 2006).

В настоящото проучване наличието на *cagA* корелираше с „включен” статус на *oipA* 93% от случаите, спрямо при само 18% при *cagA*-отрицателните изолати ( $P < 0,0001$ ). Подобна връзка е съобщавана и от други автори (Dossumbekova *et al.*, 2006; Yamaoka *et al.*, 2006).

Резултатите от настоящата работа показаха връзка между наличието на *oipA* във функционално активно състояние и алелите *vacA* s1, m1 и i1 (Табл. 17). Генотиповете *cagA*<sup>+</sup>, *vacA* s1, m1 и i1, и „включеното” функционално състояние на *oipA* всички бяха силно свързани с наличието на пептична язвена болест (Табл. 18). Важна находка е, че повечето щамове с генотип *vacA* i1 (93%) съдържат и „включен” *oipA*, който се среща при

само 57% от щамовете с генотип *vacA i2*. Такава връзка между „включен” функционален статус на *oipA* и алела *vacA i1* е съобщавана досега само от Schmidt *et al.*, (2010). Понеже *vacA i1* се среща по-рядко, отколкото *cagA* или *vacA s1*, настоящите резултати биха могли да означават комбинирано действие на двата гена *oipA* и алела *vacA i1* върху стомашните епителни клетки. Съвсем скорошно проучване показва възможност OipA протеина да се използва като ваксина за предотвратяване на инфекции с *H. pylori* (Mahboubi *et al.*, 2017).

**В заключение, високата честота на гена *oipA* с включен функционален статус (81%) беше свързана значимо с наличието на пептични язви, както и с генотиповете *cagA*<sup>+</sup>, *vacA s1*, *m1* и, особено важно - с *vacA i1*, което е индикатор за силен синергизъм между факторите на вирулентност на *H. pylori* в патогенезата на тази много често срещана сред населението инфекция.**

**3. Установяване наличието на *H. pylori* в устната кухина на пациенти със стоматологични и/или гастродуоденални болести с помощта на културелно изолиране, бърз уреазен тест, имунофлуоресценция с моноклонални антитела и PCR.**

Механизмите на предаването на инфекцията с *H. pylori* са фекално-орален, орално-орален и гастро-орален чрез повръщане (Adler *et al.*, 2014). Връзката между наличието на орални *H. pylori* и гастродуоденална инфекция със същия микроорганизъм не е абсолютно установена (Paуão *et al.*, 2016). Все още не е решен проблемът дали *H. pylori* присъстват само транзиторно в устната кухина или могат да са част от резидуалната флора в тази част на организма (Al Sayed *et al.*, 2014; Paуão *et al.*, 2016). Доколкото ни е известно, досега не е провеждано комплексно проучване на оралните *H. pylori* по отношение на техния тип на имунофлуоресценция, фактори на вирулентност и чувствителност към антимикробни средства.

При изследването на зъбна плака от 43-ма нелекувани пациенти беше открит един шам *H. pylori*. Той беше изолиран от 9-годишно дете с катарален гингивит и симптоматичен хроничен гастрит (доказан с фекален антигенен тест, HpSA; Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA).

Оралният изолат *H. pylori* беше уреазо-, каталазо- и оксидазо-положителен извит Gram-отрицателен бактерий, който не растеше на аеробната контрола, което е типично за *H. pylori*.

Изолятът даде положителен резултат за имунофлуоресценция с 3 от 4-те използвани МКА (122E9, 123B11 и 161 F8) срещу *H. pylori* и беше положителен при PCR за видовоспецифичния за *H. pylori* ген *ureA*, както и за гена *cagA*, което е типично за силно вирулентните щамове (Таблица 19). PCR за мозаичните алели на *vacA* показва, че изолатът е с по-вирулентния генотип *vacA s1*.

Оралният изолат беше резистентен на metronidazole (MIC, 32 mg/L) и clarithromycin (MIC, 1 mg/L).

Като рискови фактори за наличието на орални *H. pylori* са описвани стомашната инфекция, лошата орална хигиена, и периодонтитът (Paуão *et al.*, 2016). В настоящото проучване оралният изолат *H. pylori* беше изолиран от дете с гингивит и хроничен гастрит. Добре известно е, че инфектирането с *H. pylori* става основно в детска възраст (Khalifa *et al.*, 2010). Интересно е, че след две години същото момче беше изследвано отново и тази втора порална проба беше отрицателна; като през това време не е била провеждана терапия за ерадикация на *H. pylori*. Все пак междуременно детето е било лекувано за друга инфекция с сefугохime.

**Таблица 19. Характеристики на орален изолат *H. pylori* от дете.**

Тест	Параметър	Резултат
Подтип според имунофлуоресценция с МКА	121F3	отрицателен
	122E9	положителен
	123B11	положителен
	161F8	положителен
Фактори (гени) на вирулентност	<i>ureA</i>	положителен
	<i>cagA</i>	положителен
	<i>vacA</i>	s1 m2
	<i>babA2</i>	отрицателен
Изследване за чувствителност	metronidazole	R (MIC=32 mg/L)
	Clarithromycin	R (MIC=1 mg/L)

Легенда: S = чувствителност; R = резистентност.

Изборът на праймери, типът на пробата и на популацията, от която са вземани материалите също така съществено повлиява резултатите за честотата на оралните *H. pylori*, която варира от 0 до 53.2% сред клинично здрави индивиди и от 0 до 72% при пациенти с гастрити (Assumpção *et al.*, 2010). Понякога в зъбната плака *H. pylori* се изолира по-често, отколкото в слюнка, докато други проучвания не откриват такава разлика (Medina *et al.*, 2010). Интересен е фактът, че индивиди с добра орална хигиена по-рядко имат орални *H. pylori*, което вероятно се дължи на инхибиране на *H. pylori* от оралните стрептококи и други бактерии, участващи в ранната колонизация на денталния биофилм (Suzuki *et al.*, 2008). От друга страна при пациенти с орални *H. pylori* по-често се срещат окултни кръвоизливи и анаеробни периодонтопатогени, като *Prevotella intermedia* или *Tannerella forsythia* (Suzuki *et al.*, 2008) в слюнката. Според някои автори терапията на стомашните и орални хеликобактери дава по-добри резултати от тази само на стомашните хеликобактери (Boyanova *et al.*, 2011b).

Ролята на устната кухина като резервоар за *H. pylori* не е убедителна, понеже оралните щамове могат да се различават от тези в стомаха и оралните щамове да липсват в стомаха (Leclerc, 2006). Въпреки това в Бразилия 89% от зъбните плаки, които са позитивирали за *H. pylori*, са имали същия *vacA* и *cagA* генотип в изолати от стомашна лигавица (Assumpção *et al.*, 2010). Също така се съобщава за свързан риск от рецидив на инфекцията или неуспешна ерадикация при наличие на орален *H. pylori* (Boyanova, 2011b). Следователно, наличието на щам *H. pylori* с вирулентен генотип и резистентност към антимикробни лекарствени средства е интересна находка, която е предпоставка за последващи проучвания.

**В заключение, доколкото ни е известно, настоящият дисертационен труд описва за първи път едновременно имунофлуоресцентен тип, фактори на вирулентност и двойна антибиотична резистентност на орален изолат *H. pylori*. Макар и рядко, вирулентни *H. pylori* може да присъстват в орални проби от пациенти с хронични орални и стомашни заболявания.**

#### 4. Определяне на наличието на IgG антитела към *H. pylori* и към CagA

Общата честота на *H. pylori* IgG в 294 изследвани серума беше 72,4% (213 случая), а CagA IgG се откриха в 145 случая (49,3%). Подробно резултатите са представени в Таблица 20.

Трима души бяха *H. pylori* IgG-отрицателни, но CagA IgG-положителни. Серопревалирането на CagA IgG (CagAIgG) при *H. pylori*-серопозитивни индивиди беше 66,7% (142 случая). Честотата на *H. pylori* IgG (**HpIgG**) беше по-ниска при индивиди на възраст 18-30 години в сравнение с всички по-възрастни изследвани ( $P<0,001$ ) и по-висока при жените в сравнение с мъжете ( $P=0,018$ ).

HpIgG се срещаха по-често при пациенти, които имат братя и/или сестри в сравнение с такива, които нямат ( $P=0,043$ ). По-високото ниво на образование на майката и на бащата показва обратна връзка с наличието на HpIgG ( $P=0,001$  и в двата случая); HpIgG се срещаха по-често и при тези, които понастоящем или по време на детството си са живели в провинцията, в сравнение с тези, които живеят/са живели през детството си в София (съответно  $P=0,027$  и  $P=0,009$ ); Честотата на CagAIgG показва отрицателна връзка с висшето на образование на майката и на бащата (съответно  $P=0,007$  и  $P=0,001$ ) и с групата на най-младите на възраст 18-30 г. ( $P=0,005$ ). При другите изследвани фактори не се установи статистическа разлика в честотата на HpIgG и CagAIgG.

Логистичният регресионен анализ потвърди връзката на серопревалирането на **HpIgG** с възрастта (OR (odds ratio) 1,038; 95% доверителен интервал [CI], 1,014-1,063;  $P=0,002$ ), с женския пол (OR 2,083; 95% CI = 1,045- 4,154;  $P=0,037$ ), с по-ниското ниво на образование на майката (висше спрямо по-ниско ниво) (OR 0,674; 95% CI = 0,470-0,965;  $P=0,031$ ) и наличието на братя/сестри (OR 1,456; 95% CI = 1,019- 2,079;  $P=0,039$ ). По отношение на **CagAIgG** логистичната регресия потвърди връзка с възрастта (OR 1,031; 95% CI, 1,010-1,052;  $P=0,003$ ) и нивото на образование на бащата (OR, 0,527; 95% CI, 0,364-0,762;  $P=0,001$ ).

**Таблица 20.** Честота на *H. pylori* и CagA IgG антитела според социо-демографските характеристики при 294 безсимптомни български кръводарители.

Рисков фактор	Общ брой индивиди		<i>H. pylori</i> IgG положителни		P *	CagA IgG положителни		P *
	брой	%	брой	%		брой	%	
Пол								
мъжки	218	74,1	150	68,8	NS	101	46,3	NS
женски	76	25,9	63	<b>82,9*</b>	<b>P=0,018</b>	44	57,9	NS
Възраст (години)								
18-30	75	25,5	40	<b>53,3*</b>	<b>P&lt;0,001</b>	24	<b>32,0*</b>	<b>P=0,006</b>
31-40	75	25,5	58	77,3	NS	39	52,0	NS
41-50	75	25,5	59	78,7	NS	42	56,0	NS
51-69	69	23,5	56	81,2	NS	40	58,0	NS
Брой братя и/или сестри								
0	44	15,0	26	<b>59,1*</b>	<b>P=0,043</b>	17	38,6	NS
1	178	60,5	129	72,5	NS	90	50,6	NS
≥2	72	24,5	58	80,6	NS	38	52,8	NS
Образование на индивида								
основно или по-ниско	43	14,6	37	86,0	NS	27	62,8	NS
средно	178	60,6	125	70,2	NS	87	48,9	NS
висше	73	24,8	51	69,9	NS	31	42,5	
Образование на майката								
основно или по-ниско	98	33,3	82	83,7	NS	59	60,2	NS
средно	155	52,7	109	70,3	NS	73	67,0	NS
висше	41	14,0	22	<b>53,7*</b>	<b>P=0,001</b>	13	<b>31,7*</b>	<b>P=0,007</b>
Образование на бащата								
основно или по-ниско	96	32,6	82	<b>85,4*</b>	<b>P=0,001</b>	57	59,3	NS
средно	154	52,4	106	68,8	NS	77	72,4	NS
висше	44	15,0	25	56,8	NS	11	<b>25,0*</b>	<b>P=0,001</b>
Вид професия <sup>1</sup> (n=283)								
физическа работа	184	65,0	136	73,9	NS	97	52,7	NS
умствена работа	99	35,0	69	69,7	NS	41	41,4	NS
Настоящо местожителство								
София	173	58,8	117	67,6	NS	80	46,2	NS
провинция	121	41,2	96	<b>79,3*</b>	<b>P=0,027</b>	65	53,7	NS
Местоживеене през детството								
София	131	44,6	85	64,9	NS	61	46,6	NS
провинция	163	53,4	128	<b>78,5*</b>	<b>P=0,009</b>	84	51,5	NS

<sup>1</sup>Броят е по-нисък от общия брой изследвани индивиди, поради липсваща информация в попълваните анкети;

\* - статистически значима разлика (P<0,05), NS-несигнификантна разлика

Настоящата дисертационна работа откри високо серопревалиране на антитела срещу *H. pylori* и CagA при безсимптомни възрастни българи. Общата честота на HpIgG беше 72,4%, което е сходно с честотите (64,0-78,5%), откривани в някои други проучвания в Източна Европа (Албания, Естония, Полша и Хърватия), (Boyanova, 2011b). Данните от развитите западноевропейски страни показват много по-ниско серопревалиране на *H. pylori*, напр., 11% в Швеция и 36% в Исландия (Boyanova, 2011b). По света също така серопревалирането е било много по-ниско в развитите държави, напр. 15,4% в Австралия и 23,1% в Канада, отколкото в развиващите се, където серопревалирането на *H. pylori* остава много високо, напр. 71-74,6% във Виетнам, Нигерия и ЮАР (Boyanova, 2011b).

Много проучвания са показали, че честотата на инфекцията с *H. pylori* и серопревалирането постепенно намаляват (Boyanova, 2011b). Изглежда, че подобряването на социално-икономическите условия е с по-голямо значение за това, отколкото лечението за ерадикация на *H. pylori* (Boyanova, 2011b). В някои азиатски проучвания серопревалирането на *H. pylori* е намалявало с темп >1% годишно, напр. с 1,04% годишно в Южна Корея (от 66,9% през 1998 г. до 59,6% през 2005 г.) и с 1,55% на година (от 62,5% през 1993 г. до 47,0% през 2003 г.) в Китай (Tan & Goh, 2008). В Турция намалението е било с 1,22% на година между 1990 г. (78,5%) и 2000 г. (66,3%), (Ozden *et al.*, 2004). В Гърция серопревалирането е намаляло с 1,03% годишно от 1987 г. (59,5%) до 1997 г. (49,2%), (Apostolopoulos *et al.*, 2002).

Резултатите от настоящия дисертационен труд показаха, че серопревалирането на *H. pylori* в България е намаляло от 82,6% през 1993 г. (Boyanova *et al.*, 1994) до 72,4% през 2011 г. ( $P=0,002$ ), което представлява спад с 10,2% за период от 18 години. Въпреки това, темпът на намалението беше разочаровашо нисък (само 0,57% на година) в сравнение с наблюдаваното в други държави (виж по-горе). Този резултат съответства и на много лекия спад на смъртността от стомашен карцином в България, който се наблюдава от 1980 г. насам. Според Levi *et al.*, (2004) и според Българския Национален Статистически Институт смъртността от стомашен карцином при мъжете е била 23,07 случая на 100 000 през 1980 г., 14,91 на 100 000 през 1999 г., и 21,2 на 100 000 през 2010 г., докато при жените съответните стойности са били 13,11 на 100 000 през 1980 г., 7,49 през 1999 г. и 12,9 през 2010 г. (Levi *et al.*, 2004). Следователно, **въпреки подобряването на социално-**

**икономическите условия в България инфекцията с *H. pylori* все още е широко разпространена у нас и намалява с доста бавно темпо.**

Откриването на рисковите фактори за инфекцията с *H. pylori* е от решаващо значение за епидемиологичния контрол. Инфектирането обикновено става по време на детството и честотата и нараства с възрастта (Boyanova, 2011b). Серопревалирането на *H. pylori* в България също нараства с възрастта. При изследваните индивиди на възраст 18-30 години то беше по-ниско (53,3%), отколкото при останалите възрастови групи (>77%;  $P < 0,001$ ). Проучване през 1993 г. е открило 80% серопревалиране на *H. pylori* при помладите индивиди на възраст 18-30 години (Boyanova *et al.*, 1994), докато в настоящата работа при тази възрастова група честотата на HpIgG е доста по ниска (53,3%). За разлика от проучването на Boyanova *et al.* (1994) в настоящата работа не беше доказано по-ниско серопревалиране на *H. pylori* в групата на най-възрастните индивиди (>50-годишни) (69% през 1993 г. спрямо 81,2% в настоящата работа). И някои други проучвания са открили подобни находки, т.е. положителна корелация между серопревалирането на *H. pylori* и възрастта на индивидите (Fujisawa *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 1998). Този резултат може да бъде обяснен с „феномена кохортите“, т.е. зависимо от възрастта увеличаване на серопревалирането, което се дължи най-вече на намаления темп на заразяване по време на детството (Nagy *et al.*, 2016).

Данните за пола на индивида като рисков фактор за инфекция с *H. pylori* са противоречиви. Повечето проучвания не са откривали значима разлика в серопревалирането на *H. pylori* в зависимост от пола (Boyanova *et al.*, 2011b). В настоящата работа серопревалирането на *H. pylori* при жените беше по-високо (82,9%), отколкото при мъжете (68,8%), което е сходно с резултати от проучвания в Албания и Саудитска Арабия (Boyanova *et al.*, 2011b; Marie, 2008); но, от друга страна, проучвания в Чили и Южна Корея са открили точно обратното – че честотата на HpIgG е по-висока при мъже (Boyanova *et al.*, 2011b). В настоящата дисертационна работа беше открита положителна връзка между женския пол и HpIgG. За потвърждаване на тази връзка са необходими по-задълбочени бъдещи проучвания.

Броят на братята и сестрите също е съобщаван като рисков фактор за инфекцията (Boyanova *et al.*, 2011b). В настоящото проучване липсата на братя и сестри показва

отрицателна връзка със серопревалирането на *H. pylori*, като статистически значима беше разликата в серопревалирането между индивиди без братя и/или сестри спрямо такива, които имат по повече от един брат/сестра.

За разлика от други проучвания (Torres *et al.*, 1998) в настоящата работа не се откри връзка между нивото на образование на изследваните и серопревалирането на *H. pylori*. Честотата на HpIgG, обаче, показва обратна връзка с нивото на образование на майката. Може да се предположи, че тези резултати се дължат на по-доброто социално-икономическо положение на хората с по-добро образование.

Местоживеенето е съобщавано като рисков фактор за инфекция с *H. pylori*. Инфекцията е била по-разпространена в селски те райони отколкото в по-развитите урбанизирани ррегиони (Boyanova *et al.*, 1994). В настоящото проучване се установи, че хората, които живеят понастоящем или по време на детството си са живели в София имат по-ниско серопревалиране на *H. pylori*, отколкото живеещите (или живели през детството си) в провинцията, но логистичната регресия не потвърти значимостта на местоживеенето като независим фактор, влияещ на честотата на *H. pylori* инфекцията.

Почти половината от изследваните безсимптомни индивиди (49,3%) бяха серопозитивни за CagA IgG. От общо 213 *H. pylori*-серопозитивни при 142 (66,7%) беше доказан и CagA IgG. Някои проучвания, напр. В Аржентина, Бразилия, Естония, Иран и Швеция съобщават за подобна или по-висока честота на CagA IgG (>60% до >80%), (Boyanova *et al.*, 2011b; Cartágenes *et al.*, 2009; Jafarzadeh *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2003). В други държави, обаче, съобщаваното серопревалиране на *H. pylori* е било много по-ниско, напр. 36% във Финландия и 11% в Тунис (Boyanova *et al.*, 2011b). Резултатите от настоящия дисертационен труд показват, че населението в България има както високи честоти на превалиране на инекцията с *H. pylori*, както и относително висока честота на вирулентни щамове *H. pylori*, което представлява по-висок риск от развитие на пептични язви и стомашен карцином.

Трима изследвани в настоящото проучване бяха CagA IgG-положителни, но отрицателни за *H. pylori* IgG. Това би могло да се дължи на спонтанна ерадикация на инфекцията след антибиотично лечение по друг повод, тъй като има данни, че CagA-

антителата могат да персистират в серума и повече от десет години след успешна ерадикация; въпреки това те са по-точни, отколкото *H. pylori* IgG за откриване на инфекцията при някои групи от пациенти (Veijola *et al.*, 2008). С важно значение е фактът, че Sasazuki *et al.* (2006) са открили трикратно по-висок риск от развитие на стомашен карцином при *H. pylori* IgG-отрицателни, но CagA IgG-положителни индивиди. Пациентите със стомашен карцином често имат атрофия на стомашната лигавица, което спомага за спонтанния клирънс на инфекцията с *H. pylori* (Sasazuki *et al.*, 2006). За това е важно тези пациенти, които са CagA-серопозитивни/*H. pylori*-серонегативни да бъдат изследвани и чрез други диагностични методи и да бъдат проследявани.

Никой от изследваните социо-демографски фактори не показва връзка със серопревалирането на CagA освен възрастта и нивото на образование на бащата. Доколкото ни е известно, такава връзка не е съобщавана досега. Вероятна причина за това би могло да е фактът, че мъжете по-често са пушачи, а тютюнопушенето се свързва с по-ниско ниво на образованието, напр. в Германия (Rohrman *et al.*, 2003) и с наличието на CagAIgG (напр. в Ирландия, макар там да не е било свързано с нивото на образование), (Murray *et al.*, 2000).

Серопревалирането на *H. pylori* IgG и CagA IgG при 294 безсимптомни кръводарители в зависимост от приема на някои диетични фактори е представено на Таблица 21.

Унивариантните анализи показаха, че честата консумация (>5 дни седмично) на **пчелен мед** беше свързана със значимо по-ниско серопревалиране на *H. pylori* IgG (60,8% спрямо 76,4% при останалите случаи,  $p=0.01$ ) и CagA IgG (35,1% спрямо 54,1%,  $p=0.005$ ) в сравнение с останалите случаи. Освен това индивидите, които често (>5 дни седмично) консумират кисело мляко имаха значимо по-ниско серопревалиране на CagA IgG (40,4%) в сравнение с останалите случаи (54,6%,  $p=0.016$ ) – Табл. 21.

**Таблица 21.** Серопревалиране на *H. pylori* IgG и CagA IgG при 294 безсимптомни кръводарители в зависимост от приема на някои диетични фактори.

Диетичен фактор	изследвани	<i>H. pylori</i> IgG-положителни		CagA IgG-положителни	
	Брой	брой	%	брой	%
Тютюнопушене					
Не	116	84	72.4	56	48.3
≤20 цигари/ден	160	115	71.4	77	47.8
>20 цигари/ден	17	14	82.4	12	70.6
Алкохол					
Не	85	62	72.4	44	51.8
≤3 дни/седмично	163	120	73.2	81	67.5
>3 дни/седмично	46	31	67.4	20	43.5
Кафе					
Не	35	21	60.0	13	37.1
≤5 дни/седмично	30	23	76.7	16	53.3
>5 дни/седмично	229	169	73.8	116	50.7
Сурови плодове					
Не	13	10	76.9	9	69.2
≤5 дни/седмично	70	51	72.9	39	55.7
>5 дни/седмично	211	152	72.0	97	46.0
Сурови зеленчуци					
Не	7	4	57.1	5	71.4
≤5 дни/седмично	90	68	75.6	50	55.6
>5 дни/седмично	197	141	71.6	90	45.7
Зелен чай					
Не	221	162	73.3	112	50.7
≤5 дни/седмично	55	40	72.7	26	47.3
>5 дни/седмично	18	11	61.1	7	38.9
Пчелен мед					
Не	95	69	72.6	52	54.7
≤5 дни/седмично	125	99	79.2	67	53.6
>5 дни/седмично	74	45	<b>60.8*</b>	26	<b>35.1*</b>
Зехтин					
Не	171	126	73.7	87	50.8
≤5 дни/седмично	70	54	77.1	37	52.9
>5 дни/седмично	53	33	62.3	21	39.6
Суров чесън					
Не	63	46	73.0	37	58.7
≤5 дни/седмично	165	120	72.7	77	46.7
>5 дни/седмично	66	47	71.2	31	47.0
Суров лук					
Не	65	44	67.7	33	50.8
≤5 дни/седмично	153	116	75.8	75	49.0
>5 дни/седмично	76	53	69.8	37	48.7

<b>Червено вино</b>					
Не	132	95	72.0	69	52.3
≤5 дни/седмично	109	83	76.1	52	47.7
>5 дни/седмично	53	35	66.0	24	43.4
<b>Кисело мляко</b>					
Не	21	14	66.7	10	47.6
≤5 дни/седмично	164	124	75.6	91	55.5
>5 дни/седмично	109	75	68.8	44	<b>40.4*</b>
<b>Общо</b>	<b>294</b>	<b>213</b>	<b>72.4</b>	<b>145</b>	<b>49.3</b>

\* Статистически значима разлика (P<0,05)

Логистичният регресионен анализ показва по-нисък риск от инфекция с вирулентни CagA-положителни *H. pylori* при индивиди които често консумират пчелен мед (≥5 дни седмично), (OR, 0,65; 95% доверителен интервал [CI], 0,486-0,859) и кисело мляко (OR, 0,56; 95% CI, 0,341-0,921) в сравнение с останалите индивиди (Табл. 22). Съответната ROC крива показва че площта под кривата (AUC) за CagA IgG беше 0,654 (SEM 0,032, p <0,001, 95% CI 0,592–0,717) когато се отчитат възрастта и консумацията на пчелен мед и кисело мляко (Фиг. 18).

**Таблица 22.** Рискови фактори за наличие на CagA IgG при 294 здрави български кръводарители, потвърдени от логистичен регресионен анализ

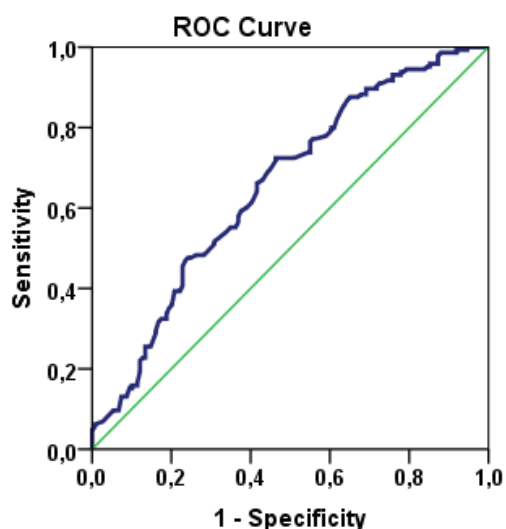
Исходна променлива:	експозиционна (независима) променлива	B <sup>1</sup>	SEM <sup>2</sup>	p	OR	95% CI за OR <sup>3</sup>
Наличие на CagA IgG	Възраст	0,035	0,011	0,001	1,036	1,014-1,057
Наличие на CagA IgG	Кисело мляко (честа консумация >5 дни/седмично спрямо останалите индивиди)	-0,580	0,254	0,022	0,560	0,341-0,921
Наличие на CagA IgG	Пчелен мед (честа консумация >5 дни/седмично спрямо останалите индивиди)	-0,437	0,146	0,003	0,646	0,486-0,859

<sup>1</sup>B, регресионен коефициент на логистичната регресия.

<sup>2</sup>SEM, стандартна грешка на средната на регресионните коефициенти.

<sup>3</sup>95% CI (доверителен интервал) за OR (odds ratios) [Exp(B)]

**Фиг. 18.** ROC крива за логистично-регресионен модел за рискови фактори (възраст, консумация на кисело мляко и консумация на пчелен мед) за честота на CagA IgG.



Логистичният регресионен анализ показва по-нисък риск от инфекция с *H. pylori* при индивиди които често консумират пчелен мед ( $\geq 5$  дни седмично), (OR, 0,68; 95% CI, 0,473-0,967) в сравнение с останалите индивиди (Таблица 23). Съответната ROC крива показва че AUC за *H. pylori* IgG беше 0,662 (SEM 0,038,  $p < 0,001$ , 95% CI 0,588–0,736) когато се отчитат възрастта и консумацията на пчелен мед (Фиг. 19).

**Таблица 23.** Рискови фактори за наличие на *H. pylori* IgG при 294 здрави български кръводарители, потвърдени от логистичен регресионен анализ

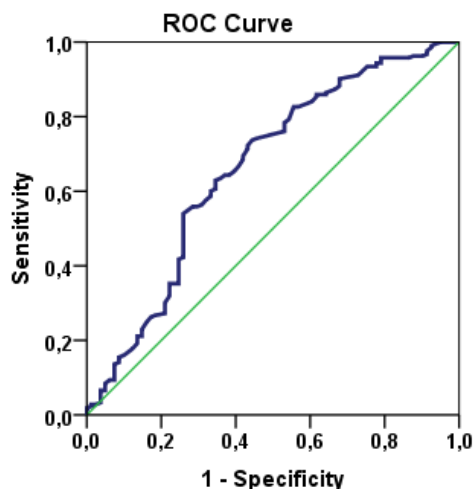
Исходна променлива:	експозиционна (независима) променлива	B <sup>1</sup>	SEM <sup>2</sup>	p	OR	95% C.I.for OR <sup>3</sup>
наличие на <i>H.pylori</i> IgG	Възраст	0,048	0,012	<0,001	1,049	1,024-1,075
наличие на <i>H.pylori</i> IgG	пчелен мед (честа консумация >5 дни/седмично спрямо останалите индивиди)	-0,508	0,182	0,032	0,676	0,473-0,967

<sup>1</sup>B, регресионен коефициент на логистичната регресия.

<sup>2</sup>SEM, стандартна грешка на средната на регресионните коефициенти.

<sup>3</sup>95% CI (доверителен интервал) за OR (odds ratios) [Exp(B)]

**Фиг. 19.** ROC крива за логистично-регресионен модел за рискови фактори (възраст и консумация на пчелен мед) за честотата на *H.pylori* IgG.



Тютюнопушенето и консумацията на останалите диетични фактори не показаха значими разлики в честотата на *H. pylori* IgG и CagA IgG при различните групи.

Резултатите от настоящата дисертационна работа показаха, че честотата на анти-*H. pylori* IgG беше значимо по-ниска при хора, които редовно (>5 дни/седмично) консумират пчелен мед.

Активност на меда срещу *H. pylori* е съобщавана и по-рано в литературата. Ефектът на меда се дължи на неговото рН, на водородния пероксид, на осмотичния ефект, и други, вещества, които се съдържат в меда (Manyi-Loh *et al.*, 2010). Ndip *et al.*, (2007) са направили оценка на активността на планински мед от Камерун, на видовете мед Capillano и Manuka от Нова Зеландия, мед от Южна Африка и еко-мед от Кения. От изследваните с най-изразени анти-*H. pylori* свойства са се оказали планинския мед и медът Manuka (Ndip *et al.*, 2007). Ефектът на меда Manuka се свързва с уникален манука фактор (UMF), който е показал активност, отговаряща на 20% w/v фенол (Tonks *et al.*, 2007). Keenan *et al.*, (2012) демонстрират противовъзпалителните качества на меда manuka, който намалява секрецията на интерлекин-8 (IL-8) от стомашните епителни клетки при заразени с *H. pylori* (Keenan *et al.*, 2012). Въпреки това в едно проучване се съобщава за 5.8-kDa фактор в меда manuka, който взаимодейства с Toll-like рецептор 4 (TLR4) и активира продукцията на проинфламаторен

медиатор – тумор-некротичен фактор - алфа (TNF- $\alpha$ ) (Tonks *et al.*, 2007). Ето защо активностите на този вид мед не бива да се приемат еднозначно.

От друга страна едно проучване в Оман демонстрира антибактериалните свойства на различни марки мед спрямо щамове *H. pylori*, обаче резултатите не са показали наличие на синергизъм между пчелния мед и използваните за лечение amoxicillin или clarithromycin в случаи на гастрити и дуоденални язви (Nzeako *et al.*, 2006).

При изследване за активни молекули срещу *H. pylori* Manyi-Loh *et al.*, (2012) са провели тънкослойна хроматография и са открили 16 летливи съединения с доказани антимикробни и антиоксидантни свойства, като алкохол, кетони, алифатни киселини, бензенови съединения, фуранови и пиранови производни и най-добро антибактериално действие е показала фракцията GCF3 (5 mg/ml), (Manyi-Loh *et al.*, 2012).

В България е проучвана *in vitro* активността спрямо *H. pylori* на други пчелни продукти, като прополис (Boyanova *et al.*, 2005). Растежът на всички щамове *H. pylori* е бил потиснат от 90  $\mu$ l 30% етанолов екстракт от български прополис при метод с дифузия от ямки в агар. При използване на метод с разреждания в агар 100 и 300  $\mu$ g/ml прополис са инхибирали съответно 57,1% и 76,2% от щамовете (Boyanova *et al.*, 2005). Българският прополис е показал дозо-зависима активност срещу повечето изследвани щамове *H. pylori* strains tested (Boyanova *et al.*, 2005). От друга страна, обаче, Coelho *et al.* (2007) са открили, че използването на бразилски прополис са период от една седмица води само до транзиторно потискане на *H. pylori* в някои пациенти (Coelho *et al.*, 2007). Независимо от това, известно е, че дори и монотерапията с антибиотик води до ерадикация на *H. pylori* в едва 10-50% от случаите (Boyanova, 2011c). Неантибиотичните средства имат по-добър ефект, ако се приемат за продължителен период (от няколко месеца) за да се прояви тяхната максимална активност. В скорошно проучване 50,6% от българските гастроентерологични пациенти, които консумират мед  $\geq 1$  ден/седмично са били позитивни за *H. pylori* (при изследване с  $^{13}\text{C}$  уреен дихателен тест), спрямо 70,8% от индивидите, които не консумират пчелен мед (Boyanova *et al.*, 2015). Настоящата дисертационна работа подкрепя тази находка, като подчертава, че честият и продължителен прием на пчелен мед (в  $>5$  дни всяка седмица и, предполагаемо, за дълъг период от време) беше свързан с по-ниско серопревалиране на *H. pylori* IgG. Интересно е също така, че настоящата работа показва силна връзка между по-ниската честота на CagA IgG (35,1%; P=0,005) и честия прием на

пчелен мед (>5 дни седмично). Интересен факт е, че трима души бяха HpIgG-отрицателни, но CagAIgG-положителни. Им съобщения за единични случаи на клирънс на инфекцията с *H. pylori* в резултат на редовен прием на антибиотици за лечение на други инфекции (Leung et al., 2002). От друга страна, според японски автори, индивидите с аличие на CagA антитела (независимо дали са били HpIgG-положителни, или не) са били с висок риск за развитие на стомашен карцином (Sasazuki et al., 2006).

**Този резултат показва, че хората, които често и редовно консумират пчелен мед, освен че са по-нисък риск от инфектиране, имат и по-добра защита от заразяване със силно вирулентни цитотоксин-продуциращи щамове *H. pylori*. Доколкото ни е известно, досега не е съобщавана подобна обратна връзка между консумацията на пчелен мед и серопревалирането на CagA IgG, поради което са необходими бъдещи проучвания за изясняване на точните механизми.**

Тъй като наличието на CagA антитела се свързва с развитие на пептични язви и стомашен карцином (Camorlinga-Ponce et al., 2008), диета, включваща мед може да се окаже един лесен начин за намаляване на честотата на инфекцията с *H. pylori* сред популацията, както и начин да се намали заболяемостта от тежки гастродуоденални заболявания. Въпреки това значимостта на консумацията на пчелен мед за терапия на вече заразени с *H. pylori* пациенти (самостоятелно или като добавка към антибиотични режими) се нуждае от бъдещи по-задълбочени проучвания.

Има множество съобщения за анти-*H. pylori* действие на лактобацилите. *Lactobacillus* spp. оцеляват в стомаха по-дълго от повечето бактерии поради своята киселиннорезистентност. Техните анти-*H. pylori* ефекти включват: потискане на уреазната активност на *H. pylori* и адхезията към епителните клетки, секретирани на късоверижни мастни киселини, напр. пропионова, оцетна, мравчена и, особено важно – млечна киселина; както и автолизини, бактериоцини и други вещества, като водороден пероксид, протеинази, екзополisahариди и компоненти на клетъчната стена; потискане на индуцираната от *H. pylori* секреция на IL-8 и др. (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007, Zhou et al., 2008).

Лактобацилите могат да проявят бактерицидно анти-*H. pylori* действие и да блокират колонизацията и реинфекцията, както и да потиснат адхезията на *H. pylori* към стомашните клетки. Ето защо лактобацилите често са включвани в терапевтичните режими за ерадикация на *H. pylori* (Lesbros-Pantoflickova et al., 2007). Трябва да се има

предвид, обаче, че *in vitro* и *in vivo* активностите на пробиотиците могат да се различават и че действието на лактобацилите е силно специфично за съответния щам (Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007). Boyanova *et al.*, (2009) съобщават, че всички изследвани щамове *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* оказват потискащо действие върху голям брой щамове *H. pylori*, включително и такива резистентни на антибиотици, но въпреки това действието на лактобацилите е била силно щамово-специфично (Boyanova *et al.*, 2009).

Понеже лактобацилите са основен компонент в киселото мляко, настоящата работа изследваше връзката между консумацията на кисело мляко и серопревалирането на *H. pylori* IgG. Изненадващ резултат е, че, за разлика от Ornelas *et al.* (2007), настоящият дисертационен труд не откри по ниско серопревалиране на *H. pylori* при хора, които често консумират кисело мляко (Ornelas *et al.* 2007).

Ornelas *et al.* (2007) са открили протективен ефект при консумация на кисело мляко повече от веднъж седмично сред мексиканската популация (Ornelas *et al.* 2007). Следва да се отбележи, обаче, че в настоящия труд само 19 от изследваните индивиди (6,5%) са посочили в анкетите, че не консумират кисело мляко. Също така в България има голямо разнообразие на марки кисело мляко (около 80), които могат съществено да се различават, що се отнася до концентрацията и качествата на използваните лактобацили. Поради това е необходимо бъдещо по-задълбочено проучване, с цел да се поанализира повече информация по тази тема.

Все пак, важна находка в настоящия дисертационен труд е откриването **на връзка между честата (>5 дни седмично) консумация на кисело мляко и по-ниското серопревалиране на CagA IgG**. Този факт показва, че дори и честият прием на кисело мляко да не намалява честотата на инфекцията с *H. pylori*, все пак има протективен ефект спрямо заразяване със силно вирулентни CagA-положителни щамове *H. pylori*. От значение е, че пробиотиците могат да намалят продукцията на фактори на вирулентността на, *H. pylori* (Prasanthi *et al.*, 2011). Например, има съобщения, че щамове *L. paraplantarum* намаляват адхезията на *cagA*<sup>+</sup> щамове към клетъчни линии от стомашен епител (Ki *et al.*, 2010).

Не бяха открити статистически значими разлики в честотите на *H. pylori* IgG и/или CagA IgG според консумацията на останалите изследвани диетични фактори, а именно тютюнопушене, консумация на алкохол, зелен чай, кафе, суров чесън и лук, пресни плодове

и зеленчуци, червено вино и зехтин. Подобни резултати са съобщавани от, Zhu *et al.* (2014), които не откриват връзка между честотата на *H. pylori* и консумацията на плодове и зеленчуци, чесън, лук, червено вино и тютюнопушенето (Zhu *et al.*, 2014). От друга страна, Łaszewicz *et al.* (2014) са открили, че тютюнопушенето и пиенето на алкохолни напитки са свързани с по-високо серопревалиране на *H. pylori*, докато Ansari *et al.* (2016) са открили, че пиенето на зелен чай е фактор, който може да намали честотата на инфекцията с *H. pylori* (Ansari *et al.*, 2016; Łaszewicz *et al.* 2014).

**В обобщение, честотата на *H. pylori* инфекцията у нас беше висока - 72%, като вирулентни щамове (IgGCagA+) бяха 67%. Въпреки подобрената социално-икономическа среда у нас, честотата на инфекцията с *H. pylori* намалява по-бавно, отколкото в други държави. Честотата на IgG срещу *H. pylori* е по-ниска при младите хора, което е благоприятна тенденция. Статистическият анализ доказва, че серопревалирането на *H. pylori* зависи от характеристики на пациента като възраст, пол, образование на майката, брой братя и сестри. Проблемът с *H. pylori*-инфекцията в България все още не е окончателно разрешен. Това налага нуждата от по-добра профилактика на инфекцията, вкл. повишаване на информираността на населението и по-стриктното прилагане на санитарно-хигиенни мерки.**

**В настоящия дисертационен труд за първи път се доказва, че честата консумация на пчелен мед е свързана с по-ниска честота на анти-*H. pylori* IgG. Също така, за първи път в настоящата работа се съобщава, че честият прием на пчелен мед или кисело мляко е свързан с по-ниско серопревалиране на CagA IgG. Следователно, диета, включваща редовен прием на мед и кисело мляко може да осигури по-добра защита срещу инфектиране със силно вирулентни CagA<sup>+</sup> щамове *H. pylori*, и по този начин да намали заболяемостта от пептични язви и стомашен карцином.**

## 5. Антимикробна чувствителност и механизми на резистентност при изолатите *H. pylori*

### 5.1 Определяне на чувствителността на изолатите *H. pylori* към clarithromycin и metronidazole

Сред изолатите от инфекция с единичен щам *H. pylori* 183 (40,6%) бяха резистентни на metronidazole.

Като цяло, в много държави процентът на резистентност към metronidazole расте.(Boyanova *et al.*, 2014; Okamura *et al.*, 2014; Tsay *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). В България, честотата на резистентността на *H. pylori* към metronidazole (20% при нелекувани деца и 33,5% при нелекувани възрастни) през 2010-2015 г. беше сред средните стойности, съобщавани в Европа, където тя варира между 15% и 40% (Boyanova *et al.*, 2016; Thung *et al.*, 2016). Общият процент на резистентност към metronidazole в Европа е бил 33,1%, като няма съществени разлики между северните и южните европейски страни (Thung *et al.*, 2016). В развиващите се страни се докладва по-висока честота (50%–80%), например в Мексико (76,3%), а в Япония (9–12%), Канада (18-22%) и САЩ (21,5%) резистентност към metronidazole се открива по-рядко; възможно обяснение за това би могло да са разликите в общата употреба на metronidazole в различните държави (Thung *et al.*, 2016).

Резистентни на clarithromycin бяха 117 изолата (25,9%), а 72,3% (326 изолата) бяха чувствителни. Междинна чувствителност (I) към clarithromycin беше открита при 8 (1,8%) изолата. У нас честотата на *H. pylori* към clarithromycin е 30,0% при нелекувани деца и 25,3% при нелекувани възрастни (Boyanova *et al.*, 2016), което подчертава нуждата от по-често тестване на щамовата чувствителност преди включването на този агент в ерадикационните режими за инфекцията.

Резистентността към clarithromycin при *H. pylori* обичайно се дължи на точкови мутации в ген на 23S рРНК, сред които най-често се открива A2143G (69,8%), следвана от A2142G (11,7%) и A2142C (2,6%) (Mégraud *et al.*, 2004). Тези мутации пречат на свързването на макролидите към мишената им (Mégraud *et al.*, 2004). Резистентността към clarithromycin нараства сравнително бързо, като честота ѝ достига приблизително 30% в Япония и Италия, 40% в Турция и 50% в Китай. От друга страна тя се среща доста по-рядко в държави като Тайван и Швеция (<15%), (Liou *et al.*, 2015; Thung *et al.*, 2016).

Интерес представляват данните за употребата на макролиди в обществото. Данни от европейския надзор на антибиотичната употреба за 2012г показват междинно ниво на консумация на макролиди за България – 2,4 DDD/1000/ден, като 18,5 DDD/1000/ден е била общата употреба на антимикробни средства, тоест макролидната консумация е 13,5% от общата. Това ниво е сходно с нивата на консумация в много други европейски държави (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-consumption-europe-esac-net-2012.pdf>).

### **Връзка между резистентност, заболяване и генотип**

Изолатите *H. pylori* от пациенти с пептични язви бяха малко по-често чувствителни на metronidazole (66,1%; 76 от 115 изолата), отколкото изолатите от пациенти с неязвени заболявания, инфектирани от единичен щам (57,1%; 192 от 336 случая), но тази разлика не беше статистически значима ( $P=0,091$ ).

Не се откриха и съществени разлики в чувствителността към clarithromycin сред *H. pylori*, изолирани от пациенти с пептични язви (23,5% резистентни щамове (27 случая), 0,9% интермедиерни (1 случай) и 75,5% чувствителни (87 случая)) и такива с неязвени заболявания (23,8% резистентни щамове (80 случая), 2,1% интермедиерни (7 случая) и 74,1% чувствителни (249 случая)).

По настоящем много стандартни режими, например тройни комбинации, включващи clarithromycin, не успяват да постигнат >80% успех при ерадикацията на инфекцията с *H. pylori*, поради което се препоръчват секвенциална терапия; терапия с 4 препарата, вкл. 3 антибиотика и без бисмутови съединения „съпътстваща“ терапия; и четворен режим с бисмутово съединение (Thung *et al.*, 2016; Zullo *et al.*, 2013). Актуализираните режими би трябвало да се ползват по-често, особено за лечение на инфекции с вирулентни щамове, които носят доживотен риск за развитие на сериозни заболявания.

В настоящото проучване *cagA*<sup>+</sup> щамовете бяха с малко по-висока честота (83%, 271 от 325) при изолатите, чувствителни на clarithromycin, отколкото при резистентните на това антимикробно средство (77%, 97 of 126), но тази разлика не беше статистически значима ( $p\geq 0.192$ ). Щамовете чувствителни на metronidazole също проявяват сходни честоти към *cagA*, както при резистентните щамове 83% (219 от 268) срещу 81% (149 от 183) ( $p\geq 0.209$ ).

Има съобщения, че генът *cagA* е свързан с успеха на ерадикационната терапия. В някои проучвания щамове с ниска вирулентност (*cagA*-отрицателни), които са чести при пациенти без язви, са свързани с по-високи нива на антибиотична резистентност и по-висок риск от неуспех на ерадикацията, отколкото при вирулентните (*cagA*<sup>+</sup>) щамове, които са чести при пациентите с язви (Boyanova, 2011d). В настоящото проучване честотата на *cagA* не беше свързана с чувствителността на щамове към clarithromycin или metronidazole.

По подобен начин не открихме връзка между резистентност към metronidazole и /или clarithromycin и наличие на вирулентните алели *vacA s1a*, *m1*, *i1*.

Понастоящем се препоръчва да се раздели емпиричната терапия на първа линия за две групи: за популации с ниска и за популации с висока резистентност към clarithromycin, като границата на резистентността към този антибиотик се поставя на 15% до 20% (Maltferheiner *et al.*, 2012). Според резултатите от настоящия дисертационен труд България попада към популациите с висока резистентност към clarithromycin. Това ни подтикна да проучим по-детайлно механизмите на резистентност към това антимикробно лекарство при *H. pylori*.

## **5.2 Определяне на механизмите на резистентност към макролиди - алел специфична полимеразно-верижна реакция за определяне на точкови мутации**

Макролидите са част от ерадикационната терапия на *H. pylori*. Един от важните механизми на резистентност е резистентността към макролиди. Тя се дължи на три основни вида мутации - A2143G, A2142G и A2142C. Бяха изследвани 84 щамове - 82 clarithromycin-резистентни и два интермедиерни. Щамове бяха изолирани от 9 деца и 75 възрастни. Според ендоскопската диагноза 11 пациенти имаха пептични язви и 73 бяха с неязвени заболявания (44 случая на хроничен гастрит, 2 на остър гастрит, един на хроничен гастрит и гастроэзофагеален рефлукс, 25 случая на гастроэзофагеален рефлукс и един на панкреасна киста).

Сред изследваните резистентни/интермедиерни на clarithromycin щамове, честотите на *cagA*<sup>+</sup>, *cagE*<sup>+</sup>, *vacA s1a*, *m1*, *i1* и *i2* щамове бяха съответно 76,2% (64/84 щамове), 58,0%

(47/81), 82,1% (69/84), 35,7% (30/84), 50,0% (39/78) и 50,0% (39/78). Много (57,1%, 48/84) от щамовете бяха резистентни към metronidazole.

Точкови мутации A2143G, A2142G и A2142C бяха открити във всичките 84 (100%) щама, резистентни/междинно чувствителни към clarithromycin. Таблица 24 и Таблица 25 показват връзката на откритите мутации водещи до резистентност към clarithromycin с характеристики на пациентите и щамовете.

**Таблица 24.** Мутации, водещи до резистентност към clarithromycin, и връзката им с характеристики на пациентите.

Характеристики на пациентите	Групи пациенти	Брой щамове	Брой (%) на щамове с мутации			
			A2143G	A2142G	A2142C	A2143G и A2142G
Възраст	Деца	9	5 (55.6)	3 (33.3)	0 (0)	1 (11.1)
	Възрастни	75	49 (65.3)	17 (22.7)	1 (1.3)	8 (10.7)
Пол	Мъже	41	25 (61.0)	10 (24.4)	0 (0)	6 (14.6)
	Жени	43	29 (67.4)	10 (23.3)	1 (2.3)	3 (7.0)
Заболяване	Язви	11	8 (72.7)	3 (27.3)	0 (0)	0 (0)
	Неязвени	73	46 (63.0)	17 (23.3)	1 (1.4)	9 (12.3)
Лечение	Нелекувани	69	42 (60.9)	17 (24.6)	1 (1.4)	9 (13.0)
	Лекувани	14	11 (78.6)	3 (21.4)	0 (0)	0 (0)
Местоживеене	Столица	48	30 (62.5)	11 (22.9)	1 (2.1)	6 (12.5)
	Провинция	18	11 (61.1)	5 (27.8)	0 (0)	2 (11.1)
Общо		84	54 (64.3)	20 (23.8)	1 (1.2)	9 (10.7)

Общите честоти на A2143G (вкл. при щамовете с междинна чувствителност към clarithromycin, МПК, 0.5 mg/l), A2142G, A2142C и A2143G +A2142G мутации бяха съответно 64,3% (54/84 щама), 23,8% (20/84), 1,2% (1/84) и 10,7% (9/84).

Точковата мутация A2142G беше по-честа (38,9%, 14/36 щама) сред щамове чувствителни към metronidazole в сравнение с тази при резистентни към metronidazole щамове (12.5%, 6/48, p=0,009) – Табл. 25.

Самостоятелна мутация A2143G бе открита в 79.5% (31/39) от щамовете с генотип *vacA* i2 спрямо 46,2% (18/39, p=0,002) при *vacA* i1 позитивните щамове. Честотата на

самостоятелната A2143G и на двойната мутация A2143G+A2142G беше съответно 87,2% (34/39) при *vacA* i2 щамове спрямо 59,0% (23/39, p=0,01) сред *vacA* i1 щамове – Табл. 25.

**Таблица 25.** Мутации, водещи до резистентност към clarithromycin, и връзката им с характеристики на щамове

Характеристики на пациентите	Групи пациенти	Брой щамове	Брой (%) на щамове с мутации			
			A2143G	A2142G	A2142C	Смесени <sup>a</sup>
metronidazole	Чувствителни	36	19 (52.8)	14 <sup>b</sup> ( <b>38.9</b> )	0 (0)	3 (8.3)
	Резистентни	48	35 (72.9)	6 <sup>b</sup> (12.5)	1 (2.1)	6 (12.5)
<i>cagA</i>	Положителни	64	39 (60.9)	18 (28.1)	0 (0)	7 (10.9)
	Отрицателни	20	15 (75.0)	2 (10.0)	1 (5.0)	2 (10.0)
<i>cagE</i>	Положителни	47	26 (55.3)	15 (31.9)	1 (2.1)	5 (10.6)
	Отрицателни	34	25 (73.5)	5 (14.7)	0 (0)	4 (11.8)
<i>vacA</i> s алели	<i>vacA</i> s1a	69 <sup>d</sup>	43 (62.3)	17 (24.6)	1 (1.4)	8 (11.6)
	<i>vacA</i> s1b	1	1 (NA <sup>c</sup> )	0 (NA)	0 (NA)	0 (NA)
	<i>vacA</i> s2	17 <sup>d</sup>	13 (76.5)	3 (17.6)	0 (0)	1 (5.9)
<i>vacA</i> m алели	<i>vacA</i> m1	30 <sup>d</sup>	18 (60.0)	8 (26.7)	0 (0)	4 (13.3)
	<i>vacA</i> m2	57 <sup>d</sup>	38 (66.7)	13 (22.8)	1 (1.8)	5 (8.8)
<i>vacA</i> i алели	<i>vacA</i> i1	39	18 <sup>b</sup> (46.2)	15 <sup>b</sup> ( <b>38.5</b> )	1 (2.6)	5 (12.8)
	<i>vacA</i> i2	39	31 <sup>b</sup> ( <b>79.5</b> )	5 <sup>b</sup> (12.8)	0 (0)	3 (7.7)
clarithromycin MIC (mg/L)	0.5-12	20	<b>18<sup>b</sup> (90.0)</b>	2 <sup>b</sup> (10.0)	0 (0)	0 (0)
	16- >256	26	12 <sup>b</sup> (46.2)	11 <sup>b</sup> ( <b>42.3</b> )	0 (0)	3 (11.5)
Общо		84	54 (64.3)	20 (23.8)	1 (1.2)	9 (10.7)

<sup>a</sup>смесени - A2143G и A2142G мутации; <sup>b</sup>статистически значима разлика (p <0,05); <sup>c</sup>NA-неприложимо;

<sup>d</sup>два изолата имаха и *vacA* s1a/s2 и m1/m2 алели, един изолат беше с *vacA* s1a/s2 алели и един - с m1/m2 алели.

Щамове с генотип *vacA* i1 притежаваха по-често само точковата мутация A2142G (38,5%, 15/39) в сравнение с *vacA* i2 щамове (12,8%, 5/39, p=0,018), както и по-често A2142G и смесени A2143G + A2142G мутации (51,3%, 20/39) в сравнение с *vacA* i2 щамове (20,5%, 8/39, p=0,005).

Щамовете с по-ниска (0,5-12 mg/l) МПК на clarithromycin по-често имаха точковата мутация A2143G (90,0%, 18/20) в сравнение с тези с високи МПК 16->256 mg/l (46,2%, 12/26, p=0,002). МПК<sub>50</sub> на clarithromycin беше 12 mg/L при щамовете, като имаха само A2143G точкова мутация и 64 mg/L при щамовете само с точковата мутация A2142G (Таблица 25).

Типът на мутациите, водещи до резистентност към clarithromycin, е от огромно значение за успеха на базираните на clarithromycin тройни режими за ерадикация на *H. pylori*. Мутацията A2143G е свързана с по-слаб успех на ерадикацията (50%) в сравнение с останалите мутации (89%) при италиански деца (Francavilla *et al.*, 2010). Други автори съобщават подобни резултати в Корея (Hwang *et al.* 2010).

Освен точковите мутации A2143G, A2142G и A2142C някои автори са откривали и други мутации в clarithromycin резистентни щамове, напр. A2115G, A2223G, G2141A, T2182C, T2245C и C2131T (Klesiewicz *et al.*, 2014). В настоящото проучване, обаче, всички щамове резистентни или интермедиерни на clarithromycin притежаваха по една точкова мутация измежду A2143G, A2142G и A2142C, или комбинации от тях. Подобни резултати има и в Турция, въпреки че там сред 36 резистентни на clarithromycin щамове не е открита точковата мутация A2142C (Caliskan *et al.*, 2015).

Мутацията A2143G в комбинация с други мутации за резистентност към clarithromycin е срещана сравнително рядко (2,1-21,1%) във Франция, Япония и Бразилия, но доста често в Тайван (44,4%), (Boyanova, 2011b; Cambau *et al.*, 2009; Furuta *et al.*, 2007). Делът на щамовете със смесени мутации за резистентност към clarithromycin (10,7%) в нашето проучване беше сходна на тази (8,8-11,4%) за клиничните резистентни към clarithromycin щамове във Франция и Испания (Agudo *et al.*, 2011; Cambau *et al.*, 2009).

Мутацията A2143G (самостоятелно или в комбинация) се срещаше по-рядко (75,0%) в сравнение с проучване в Испания (85,3%) (Agudo *et al.*, 2011) и сред китайски деца (84,6%), (Liu *et al.* 2011), но беше по-честа, отколкото в Полша (62,5%) и със сходна честота, като във Франция (Cambau *et al.*, 2009).

Някои проучвания съобщават, че точковата мутация A2142G е свързана с 1-8 пъти (често 2-8 пъти) по-висока МПК на clarithromycin в сравнение с мутацията A2143G

(Boyanova, 2011b; Furuta *et al.*, 2007; Klesiewicz *et al.*, 2014), но други проучвания не са открили такава разлика (Agudo *et al.*, 2011).

В настоящото проучване щамовете с мутация 2142G имаха 5.3 пъти по-висока минимална потискаща концентрация- МПК<sub>50</sub> на clarithromycin в сравнение с тези, които притежават мутацията 2143G. Освен това и двата щам с междинна чувствителност към clarithromycin имаха МПК на clarithromycin 0,5 mg/L и бяха с мутация A2143G.

По отношение на *vacA* алелите установихме връзка между мутацията A2143G и генотип *vacA* i2. Щамовете с генотип *vacA* i1 притежаваха по-често само точковата мутация A2142G. Доколкото ни е известно, това е първо съобщение относно връзката ( $p=0,002$ ) между единичната мутация A2143G и щамове с генотип *vacA* i2.

Има съобщения, че по-слабо вирулентните (*cagA* отрицателни) щамове са свързани с двукратно по-висок риск за неуспех на терапията с тройна комбинация, базирана на clarithromycin в сравнение с по-вирулентните (*cagA* положителни) щамове. (Broutet *et al.*, 2001). В настоящото проучване по-слабо вирулентните (*vacA* i2) щамове показаха връзка с мутациите A2143G, които са добър прогностичен маркер за неуспешна ерадикация на *H. pylori* (Francavilla *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2010). Тъй като мутациите A2143G са свързани с по-нисък ерадикационен успех в сравнение с останалите мутации за резистентност към clarithromycin, тези резултати от настоящото проучване могат да допринесат за разбирането относно по-доброто ерадиране при инфекции, причинени от по-вирулентни щамове *H. pylori* в сравнение с по-слабо вирулентните. По-силното възпаление на стомашната лигавица може да увеличи шанса за успешна ерадикация (Broutet *et al.*, 2001).

Връзката между мутацията A2142G и чувствителните към metronidazole щамове е интересна и следва да бъде изследвана по-детайлно в бъдещи проучвания.

Не бяха открити различия между мутациите, водещи до резистентност към clarithromycin и различните групи пациенти според тяхната възраст, пол, заболяване, предшестващо лечение, местоживееене и статуса на *cagA*, *cagE*, и *vacA* s и m. Тези резултати могат да бъдат обяснени, макар и частично, с относително ниския брой на децата, на пациентите с язви и на вече лекуваните пациенти, както и с много високото превалиране (83,3%) на щамовете с генотип *vacA* s1.

В заключение може да се каже, че при clarithromycin резистентните/интермедиерните щамове резистентността към metronidazole е много по-висока. Мутациите, отговорни за резистентността към clarithromycin при *H. pylori*, са свързани с алела *vacA i* и с чувствителност към metronidazole. Точковата мутация A2143G е честа в по-слабо вирулентните *vacA i2* щамове, докато точковата мутация A2142G се среща при по-вирулентните *vacA i1* щамове. Тъй като мутацията 2143G най-често предвещава неуспех при ерадикация с тройни режими с clarithromycin, настоящото проучване показва връзка с описваната по-добра ерадикация при по-вирулентните щамове *H. pylori* в сравнение с тези, които показват по-слаба вирулентност.

## VI. ИЗВОДИ

1. Честотата на *H. pylori* инфекцията у нас беше висока - 72%. Логистичният регресионен анализ доказва, че серопревалирането на *H. pylori* зависи от възрастта, пола и социално-икономическия статус на пациента. По-възрастните пациенти, жените, по-ниското образование на родителите и наличието на братя и сестри се свързват с по-голяма честота на *H. pylori* инфекция.
2. Всички 479 щамове *H. pylori*, изолирани и идентифицирани с класически методи, бяха потвърдени като такива молекулярно-генетично чрез PCR за видовоспецифичния ген за уреаза *ureA*, което е показател за надеждността на използваните методи.
3. Установихме висока честота на вирулентните алели на *vacA* (s1a – 82% и i1 - 63%) на *H. pylori* поотделно или в комбинация, като и в двата случая те се свързваха с пептични язви. Важно да се прави генотипиране и на *vacA* i алелите, те са по-добър предиктор за наличие на вирулентни щамове *H. pylori*, за които се изисква по-агресивна терапия за ерадикация на инфекцията.
4. Беше установена висока честота на *cagA* гена (81,6 %), като той се асоциираше във висока степен с язвени заболявания. Значимо по-ниска беше честотата на *cagA*<sup>+</sup> *H. pylori*, изолирани от деца в сравнение с възрастни. Висока беше и честотата на *cagE* (62,5%) при *H. pylori*, който се откриваше по-често пациенти с пептични язви. Комбинацията на *cagE* и *cagA* е по-добър предиктор за развитие на пептична язва от наличието на *cagA* самостоятелно. За пръв път се съобщава зависимост между *cagA/cagE* генотиповете и възрастта на пациента - при децата *cagE* се откриваше 2 пъти по-рядко, докато генотипът *cagA*<sup>+</sup>/*cagE*<sup>-</sup> беше по-чест.
5. За първи път у нас беше установена честотата на разпространение на много гени от острова на патогенност *cagPAI* на *H. pylori*, както и честотата на интактен *cagPAI* в България. Връзката с типа на заболяването е сигнификантна - при 96% от изолатите от язвено болни беше открит интактен *cagPAI*, докато всички изолати с липсващ *cagPAI* бяха от пациенти с неязвени заболявания.
6. Резултатите показаха сравнително висока честота на *iceA1* – 69.3% и *babA2* - 48,8% , но не се установи връзка между *iceA1* и *babA2* алелите и тежестта на гастро-дуоденалната патология. Единствено комбинацията *babA2/iceA1* преваляра

значимо при язвено болни. За България не се препоръчва изследването на *dupA*, *homA* и *homB*, и на гена за гликозилтрансферазата като маркери за вирулентността на *H. pylori* – не беше открита зависимост между наличието на тези гени и типа на заболяването.

7. Високата честота на гена *oipA* с включен функционален статус (81%) беше свързана значимо с наличието на пептични язви, както и с генотиповете *cagA*<sup>+</sup>, *vacA s1*, *m1* и, особено важно - с *vacA i1*, което е индикатор за силен синергизъм между тези фактори на вирулентност в патогенезата на *H. pylori* инфекцията.
8. За пръв път в глобален план беше доказано, че честата консумация на български пчелен мед е свързана с по-ниска честота на анти-*H. pylori* IgG и че честият прием на пчелен мед или кисело мляко е свързан с по-ниско превалиране на CagA IgG. Диета, включваща редовен прием на мед и кисело мляко, би могла да осигури по-добра защита срещу вирулентни щамове.
9. За пръв път в света беше открит орален щам *H. pylori* с едновременно висока вирулентност и двойна антибиотична резистентност.
10. Общата резистентност на проучените изолати *H. pylori* към clarithromycin беше 26%. При 84 изолата с намалена чувствителност към clarithromycin бяха установени три точкови мутации - A2143G, A2142G и A2142C мутации. Честотата им беше съответно 64,3%, 23,8%, 1.2%. Точковата мутация A2143G е по-честа в по-слабо вирулентните *vacA i2* щамове, докато точковата мутация A2142G се среща по-често при по-вирулентните *vacA i1* щамове. Това може да обясни по-трудната ерадикация на по-слабо вирулентните щамове.

## VII. ПРИНОСИ

### Научни приноси с оригинален характер:

1. Направено беше комплексно охарактеризиране на вирулентността на щамовете *H. pylori* с изследването на **27 алела на гени** на този микроорганизъм.
2. За пръв път в България бяха доказани **A2143G, A2142G и A2142C точковите мутации** при clarithromycin нечувствителни *H. pylori*. Честотата им беше съответно 64,3%, 23,8% и 1,2%.
3. Открита е за първи път в света асоциация между **мутацията A2143G** (свързана с по-чест неуспех на терапията) и по-слабо вирулентните *vacA i2* щамове, както и между **мутацията A2142G и по-вирулентните vacA i1** щамове.
4. За пръв път в света е открит и охарактеризиран **орален щам H. pylori** с висока вирулентност и двойна антибиотична резистентност.

### Научни приноси с потвърдителен характер:

1. Беше установена висока честота на ***H. pylori* инфекцията** у нас - 72%. Серопревалирането беше в зависимост от пола и социално-икономическия статус на изследваните—по-често при жените, по-възрастните пациенти, при по-ниско образование на родителите, наличие на братя и сестри и местоживееене в провинцията.
2. Беше доказана висока честота на ***cagA* гена** (81,6 %) при *H. pylori* изолатите и връзката ѝ с язвените заболявания. Честотата на *cagA*<sup>+</sup> при изолатите от деца беше по-ниска спрямо възрастните. Висока беше и честотата на *cagE* (62,5%), който беше по-чест при пептични язви. Комбинацията на *cagE* и *cagA* е по-добър предиктор за развитие на пептична язва от наличието на *cagA* самостоятелно.
3. Беше определена честотата на разпространение на много гени от **острова на патогенност *cagPAI*** на *H. pylori*, както и честотата на интактен *cagPAI* в България. Връзката с типа заболяване беше сигнификантна - при 96% от изолатите от язвено болни имаше интактен *cagPAI*, а всички изолати с липсващ *cagPAI* бяха от неязвено болни.

4. Беше намерена висока честота на **вирулентните *vacA* алели** (s1a – 82% и i1 - 63%) на *H. pylori* поотделно и в комбинация, като и в двата случая те се асоциираха с пептични язви. *vacA* i беше особено важен предиктор на изхода на заболяването.
5. Беше установено, че високата честота на ***oipA* гена** с включен функционален статус (81%) е свързана с пептични язви, както и с генотиповете *cagA*<sup>+</sup>, *vacA* s1, m1 и, особено важно с *vacA* i1, което показва силен синергизъм между тези фактори на вирулентност в патогенезата на инфекцията.
6. Резултатите показаха сравнително висока честота на *iceA1* – 69.3% и *babA2* алелите - 48,8%, но без връзка с тежестта на заболяването. Единствено **комбинацията *babA2/iceA1*** преваляваше значимо при язвено болни.

#### **Приноси с научно-приложен характер**

1. За първи път в света е намерена връзка между редовната консумация на **български пчелен мед** и по-ниската честота на анти-*H. pylori* IgG, както и между честият прием на **пчелен мед или кисело мляко** и по-ниското серопревалиране на CagA IgG, които са свързани с по-висока вирулентност.
2. Беше създадена методика за охарактеризиране на множество фактори на вирулентност при изолати *H. pylori* и беше въведена методика за подобряване детекцията на *cagA* гена с две двойки допълнителни праймери.
3. Беше въведена методика за установяване на функционалния статус “on” или “off” на *oipA* гена.
4. Беше въведена алел-специфичен PCR за доказване на точкови мутации, обуславящи резистентност към clarithromycin.
5. Беше въведен метод за комплексно охарактеризиране на орални *H. pylori* изолати.
6. В резултат на направените проучвания не се препоръчва изследването на *dupA*, *homA* и *homB* и гена за гликозилтрансферазата като маркери за вирулентността на *H. pylori* у нас.

## VIII. ЛИТЕРАТУРА

1. Кръстев З, Чернев К. Гастрозофагеална рефлуксна болест. Гастроентерология 1997, Б:262-274.
2. Мечков Гр, Таков Д. Какво знаем и какво не знаем за язвената болест. Върт бол.. 1991; XXX (2): 1-6.
3. Митов И, Цветкова Е, Томов А, Петров П, Коцев В, Петров Д. Моноклонални антитела за типизиране на *Helicobacter pylori*. Инфектология. 1998; XXXV (№ 1): 32-34.
4. Младенова И. Епидемиологични проучвания върху инфекцията с *H. pylori*. Дисертация. Ст. Загора, Тракийски университет. 2000, 176 стр.
5. Петров П. Хеликобактер пилори. Инфектология. 2000; XXXVII, (№ 1): 3-7.
6. Томов А, Мечков Гр, Таков Д, Цветкова Е, Петров П, Савов Е, Иванова К. Изолиране и микробиологична характеристика на първите щамове *Campylobacter pylori* в България. Епидемиолог. микробиолог. и инфекц. бол. 1990, XXVII (1): 14-18.
7. Abadi AT, Perez-Perez G. Role of *dupA* in virulence of *Helicobacter pylori*. World Journal of Gastroenterology. 2016;22:10118.
8. Adler I, Muiño A, Aguas S, Harada L, Diaz M, Lence A, Labbrozzi, M, Muiño JM, Elsner B, Avagnina A, Denninghoff V. *Helicobacter pylori* and oral pathology: relationship with the gastric infection. *World J Gastroenterol* 2014
9. Aghdam SM, Sardari Z, Safaralizadeh R, Bonyadi M, Abdolmohammadi R, Moghadam MS, Khalilnezhad A. Investigation of association between *oipA* and *iceA1/iceA2* genotypes of *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:8295-9.
10. Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T, López-Brea M. Rapid detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* strains in Spanish patients by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Revista espanola de quimioterapia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia.* 2011;24:32.
11. Ahmad K, Fatemeh F, Mehri N, Maryam S. Probiotics for the treatment of pediatric *Helicobacter pylori* infection: a randomized double blind clinical trial. *Iran J Pediatr* 2013; 23: 79-84
12. Akhondi-Meybodi M, Ghane M, Akhondi-Meybodi S, Dashti G. Five-year survival rate for gastric cancer in Yazd Province, Central Iran, from 2001 to 2008. *Middle East J Dig Dis.* 2017;9:39-48.
13. Alarcón T, Domingo D, Prieto N, López-Brea M. PCR using 3'-mismatched primers to detect A2142C mutation in 23S rRNA conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of clinical microbiology.* 2000;38:923-5.
14. Alam J, Ghosh P, Ganguly M, Sarkar A, De R, Mukhopadhyay AK. Association of Intact *dupA* (*dupA1*) rather than *dupA1* cluster with duodenal ulcer in Indian population. *Gut Pathog.* 2015;7:9.

15. Almeida N, Donato MM, Romãozinho JM, Luxo C, Cardoso O, Cipriano MA, Marinho C, Fernandes A, Sofia C. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. *Digestive diseases and sciences*. 2015;60:74-85.
16. Al Sayed A, Anand PS, Kamath KP, Patil S, Preethanath RS, Anil S. Oral Cavity as an Extragastric Reservoir of *Helicobacter pylori*. *ISRN Gastroenterol* 2014; 2014: 261369
17. Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 12767-12780
18. An B, Moon BS, Kim H, et al. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains and its effect on H. pylori eradication rates in a single center in Korea. *Ann Lab Med* 2013; 33: 415.
19. Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore medical journal*. 2014;55:621.
20. Ansari S, Gautam R, Nepal HP, et al. *Helicobacter pylori* colonization in Nepal; assessment of prevalence and potential risk factors in a hospital-based patient cohort. *BMC research notes* 2016;9:1
21. Apostolopoulos P, Vafiadis-Zouboulis I, Tzivras M, Kourteas D, Katsilambros N, Archimandritis A. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in Greece: the changing prevalence during a ten-year period and its antigenic profile. *BMC Gastroenterol* 2002;2:11.
22. Arachchi HS, Kalra V, Lal B, Bhatia V, Baba CS, Chakravarthy S, Rohatgi S, Sarma PM, Mishra V, Das B, et al. Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (*dupA*) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. *Helicobacter*. 2007;12:591–597.
23. Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *Journal of medical microbiology*. 2008;57:145-50.
24. Assumpção MB, Martins LC, Melo Barbosa HP, Barile KA, de Almeida SS, Assumpção PP, Corvelo TC. *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. *World J Gastroenterol*. 2010;16:3033-9.
25. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *Clin. Invest*. 2009;119:2475-2487.
26. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *Journal of advanced research*. 2015;6:539-47.
27. Backert S, Tegtmeyer N. The versatility of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin VacA in signal transduction and molecular crosstalk. *Toxins*. 2010;2:69-92.
28. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach, M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter*. 2010;15:163-176.
29. Backert S, Tegtmeyer N, Fischer W. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiol*. 2015;10(6):955-65.
30. Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Shirzad M, Zamanzad B, Rahimian G, Taghikhani A, Rafieian-Kopaei M, Shirzad H. Mucosal interleukin-21 mRNA expression level is high in

patients with *Helicobacter pylori* and is associated with the severity of gastritis. *Cent Eur J Immunol.* 2015;40:61-67.

31. Bang CS, Baik GH. Attempts to enhance the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 5252–62.
32. Barkun, AN, Bardou M, Kuipers EJ, Sung J, Hunt RH, Martel M, Sinclair P, and International Consensus Upper Gastrointestinal Bleeding Conference Group. International consensus recommendations on the management of patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann. Intern. Med.* 2010;152:101-113.
33. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, Schiavon S, Guariso G, Ceroti M, Nitti D, Rugge M. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 2008;135:91-9.
34. Belogolova E, Bauer B, Pompaiah M, Asakura H, Brinkman V, Ertl C, Bartfeld S, Nechitaylo TY, Haas R, Machuy N, Salama N. *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cellular microbiology.* 2013;15:1896-912.
35. Blaser MJ, Chen Y, Reibman J. Does *Helicobacter pylori* protect against asthma and allergy? *Gut* 2008;57:561-567.
36. Boyanova L, Andreev N, Bouchard S, Mégraud F. *Helicobacter pylori* seroprevalence in Bulgaria. *Med Microbiol Lett.* 1994;3:107-117.
37. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, et al. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol* 2005;54:481-83.
38. Boyanova, L. (2007). Detection of *Helicobacter pylori* in symptomatic Bulgarian adults. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007;13:908-914.
39. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Davidkov L, Kamburov V, JeleV C, Mitov I. Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60: 409-415
40. Boyanova L, Stephanova-Kondratenko M, & Mitov I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report. *Lett Appl Microbiol* 2009;48:579-84.
41. Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8:59-70.
42. Boyanova L. *H. pylori* virulence factors. In *Helicobacter pylori*. **Boyanova L.** (ed.) Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2011a: 71-117.
43. Boyanova L. Epidemiology of *H. pylori* infection. In *Helicobacter pylori*. Boyanova L. (ed.) Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2011b: 135-159.
44. Boyanova L. Non-antibiotic agents in the treatment of *H. pylori* infection. In *Helicobacter pylori*. Boyanova L. (ed.) Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2011c: 253-275.
45. Boyanova L. *H. pylori* resistance to antibiotics. In *Helicobacter pylori*. Boyanova L. (ed.) Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2011d: 201-235.

46. Boyanova L, Davidkov L, Gergova G, et al. *Helicobacter pylori* susceptibility to fosfomycin, rifampin, and 5 usual antibiotics for *H. pylori* eradication. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 79: 358–61.
47. Boyanova L, Ilieva J, Gergova G, et al. Honey and green/black tea consumption may reduce the risk of *Helicobacter pylori* infection. *Diagnostic Microbiol Infect Dis* 2015;82:85-6.
48. Boyanova L, Gergova G, Evstatiev I, Spassova Z, Kandilarov N, Yaneva P, Markovska R, Mitov I. *Helicobacter pylori* resistance to six antibiotics by two breakpoint systems and resistance evolution in Bulgaria. *Infect Dis (Lond)*. 2016;48:56-62.
49. Bridge DR, Merrell DS. Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA toxins and disease. *Gut microbes*. 2013;4:101-17.
50. Broussard CS, Goodman KJ, Phillips CV, Smith MA, Fischbach LA, Day RS, Aragaki CC. Antibiotics taken for other illnesses and spontaneous clearance of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf*. 2009;18:722-729.
51. Broutet N, Marais A, Lamouliatte H, de Mascarel A, Samoyeau R, Salamon R, Mégraud F. *cagA* status and eradication treatment outcome of anti-*Helicobacter pylori* triple therapies in patients with nonulcer dyspepsia. *J Clin Microbiol* 2001;39:1319-1322.
52. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Disease models & mechanisms*. 2017;10:89-104.
53. Buzas GM. Gastric tubes as vectors of *Helicobacter pylori* transmission. *Med. Hypotheses*. 2010;75:47-49.
54. Caliskan R, Tokman HB, Erzin Y, et al. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* strains to five antibiotics, including levofloxacin, in Northwestern Turkey. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015; 48: 278–84.
55. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier JC, Megraud F. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47:3600-7.
56. Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, Lazcano-Ponce E, Herrero R, Bernal-Sahagun F, Abdo-Francis JM, Aguirre-García J, Munoz N, Torres J. Age and severity of mucosal lesions influence the performance of serologic markers in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal pathologies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2008;17:2498-504.
57. Caner V, Yilmaz M, Yonetcı N, Zencir S, Karagenc N, Kaleli I, Bagci H. *H pylori* iceA alleles are disease-specific virulence factors. *World Journal of Gastroenterology*. 2007;13:2581.
58. Cartagenes VD, Martins LC, Carneiro LM, Barile KA, Corvelo TC. *Helicobacter pylori* in children and association with CagA strains in mother-child transmission in the Brazilian Amazon region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009;42:298-302.
59. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Traini T, Giulio MD, Lannutti SN, and Lattanzio R. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Scand. J. Gastroenterol*. 2008;43:178-185.

60. Chen MY, He CY, Meng X, Yuan Y. Association of *Helicobacter pylori babA2* with peptic ulcer disease and gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2013;19:4242-51.
61. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol*. 2007;102:1-18.
62. Chiarini A, Calà C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, D'Arpa F, Giammanco A. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28:437-46
63. Chiurillo MA, Moran Y, Cañas M, Valderrama E, Alvarez A, Armanie E. Combination of *Helicobacter pylori-iceA2* and proinflammatory interleukin-1 polymorphisms is associated with the severity of histological changes in Venezuelan chronic gastritis patients. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010;59:170-6.
64. Chmiela M, Karwowska Z, Gonciarz W, Allushi B, Stączek P. Host pathogen interactions in *Helicobacter pylori* related gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2017;23:1521-40.
65. Choi YJ, Kim N, Lim J, Jo SY, Shin CM, Lee HS, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Jung HC. Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *Helicobacter* 2012; 17: 77-85
66. Chomvarin, C, Namwat, W, Chaicumpar, K., Mairiang, P., Sangchan, A., Sripa, B., Tor-Udom, S., and Vilaichone, R.K. (2008). Prevalence of *Helicobacter pylori vacAj cagA, cagE, iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int. J. Infect. Dis*. **12**,30-36.
67. Chung C, Olivares A, Torres E, Yilmaz O, Cohen H, Perez-Perez G. Diversity of *VacA* intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48:690-6.
68. Chung KT, Shelat VG. Perforated peptic ulcer-an update. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2017;9:1.
69. Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol*. 2004;186:3124-3132.
70. Coelho LG, Bastos FM, Resende CC, et al. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection, a pilot clinical study. *Helicobacter* 2007;12:572-4.
71. Coelho LG, Coelho MG. Clinical management of *Helicobacter pylori*: the Latin American perspective. *Digestive Diseases*. 2014;32:302-9.
72. Con SA, Takeuchi H, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Yasuda N, Con-Wong R. Role of bacterial and genetic factors in gastric cancer in Costa Rica. *World J. Gastroenterol*. 2009;15:211-218
73. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *J Dig Dis* 2012; 13: 2-9
74. Cosgun Y, Yildirim A, Yucel M, Karakoc AE, Koca G, Gonultas A, GURSOY G, USTUN H, KORKMAZ M. Evaluation of Invasive and Noninvasive Methods for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2016;17:6165.
75. Dabiri H, Jafari F, Baghaei K, Shokrzadeh L, Abdi S, Pourhoseingholi MA, Mohammadzadeh A. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, oipA, iceA,*

- babA2* and *babB* genotypes in Iranian dyspeptic patients. *Microbial Pathogenesis*. 2017;105:226-30.
76. da Costa DM, dos Santos Pereira E, Rabenhorst SH. What exists beyond *cagA* and *vacA*? *Helicobacter pylori* genes in gastric diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2015;21:10563.
  77. Dai YN, Yu WL, Zhu HT, Ding JX, Yu CH, Li YM. Is *Helicobacter pylori* infection associated with glycemic control in diabetics?. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2015;21:5407.
  78. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 1988;7:555–558.
  79. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012; 13: 607-615
  80. Demiray-Gürbüz E, Yılmaz Ö, Olivares AZ, Gönen C, Sarıoğlu S, Soytürk M, Tümer S, Altungöz O, Şimşek İ, Perez Perez GI. Rapid identification of *Helicobacter pylori* and assessment of clarithromycin susceptibility from clinical specimens using FISH. *The Journal of Pathology: Clinical Research*. 2016 Nov 1.
  81. de Reuse HD, Heimesaat MM, Bereswill S, Sutton P, Mitchell H. Helicobacteromics--genomics of a highly variable, well-adapted and persistent pathogen. *Helicobacter pylori in the 21st Century*. 2010:269-91.
  82. de Vries AC, Kuipers EJ. *Helicobacter pylori* infection and nonmalignant diseases. *Helicobacter* 2010;15 (Suppl 1):29-33.
  83. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181
  84. Dixon BR, Radin JN, Piazuolo MB, Contreras DC, Algood HM. IL-17a and IL-22 induce expression of antimicrobials in gastrointestinal epithelial cells and may contribute to epithelial cell defense against *Helicobacter pylori*. *PloS one*. 2016;11:e0148514.
  85. Djekic A, Müller A. The Immunomodulator VacA Promotes Immune Tolerance and Persistent *Helicobacter pylori* Infection through Its Activities on T-Cells and Antigen-Presenting Cells. *Toxins*. 2016;8:187.
  86. Dong QJ, Wang Qy Xin YN, Li N, Xuan SY. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol*. 2009;15:3984-3991.
  87. Dorer MS, Fero J, Salama NR. DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog*. 2010;6:e1001026.
  88. Dossumbekova A, Prinz C, Gerhard M, Brenner L, Backert S, Kusters JG, Schmid RM, Rad R. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. *Gut*. 2006;55:1360-1.
  89. Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, Abdirad A, Mohagheghi MA, Hosseini ME, Zeraati H, Ghasemi A, Esmaili M, Mohajerani N. *dupA* as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. *Journal of medical microbiology*. 2008;57:554-62.

90. Douraghi M, Talebkhan Y, Zeraati H, Ebrahimzadeh F, Nahvijoo A, Morakabati A, Ghafarpour M, Esmaili M, Bababeik M, Oghalaie A, Rakhshani N. Multiple gene status in *Helicobacter pylori* strains and risk of gastric cancer development. *Digestion*. 2009;80:200-7.
91. Duckworth MJ, Okoli AS, Mendz GL. Novel *Helicobacter pylori* therapeutic targets: the unusual suspects. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2009;7:835-867.
92. Duncan SS, Valk PL, McClain MS, Shaffer CL, Metcalf JA, Bordenstein SR, Cover TL. Comparative genomic analysis of East Asian and non-Asian *Helicobacter pylori* strains identifies rapidly evolving genes. *PloS one*. 2013;8:e55120.
93. Duš 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
94. Ek C, Whary MT, Ihrig M, Bravo LE, Correa P, Fox JG. Serologic evidence that ascaris and toxoplasma infections impact inflammatory responses to *Helicobacter pylori* in Colombians. *Helicobacter* 2012; 17: 107-115
95. El Khadir M, Boukhris SA, Benajah DA, El Rhazi K, Ibrahim SA, El Abkari M, Harmouch T, Nejari C, Mahmoud M, Benlemlih M, Bennani B. *VacA* and *CagA* Status as Biomarker of Two Opposite End Outcomes of *Helicobacter pylori* Infection (Gastric Cancer and Duodenal Ulcer) in a Moroccan Population. *PloS one*. 2017;12:e0170616.
96. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Asian M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006;11:574-580.
97. Eshraghian A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection among the healthy population in Iran and countries of the Eastern Mediterranean Region: a systematic review of prevalence and risk factors. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17618-25.
98. Etukudo OM, Ikpeme EE, Ekanem EE. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection among children seen in a tertiary hospital in Uyo, southern Nigeria. *Pan African Medical Journal*. 2012;12.
99. Fang YJ, Liou JM, Chen CC, Lee JY, Hsu YC, Chen MJ, Tseng PH, Chen CC, Chang CY, Yang TH, Chang WH. Distinct aetiopathogenesis in subgroups of functional dyspepsia according to the Rome III criteria. *Gut*. 2014;gutjnl-2014.
100. Fasciana T, Calà C, Bonura C, Di Carlo E, Matranga D, Scarpulla G, Manganaro M, Camilleri S, Giammanco A. Resistance to clarithromycin and genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated in Sicily. *Journal of medical microbiology*. 2015;64:1408-14.
101. Fazeli Z, Alebouyeh M, Tavirani MR, Azimirad M, Yadegar A. *Helicobacter pylori* CagA induced interleukin-8 secretion in gastric epithelial cells. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench*. 2016.
102. Feinstein LB, Holman RC, Yorita Christensen KL, Steiner CA, & Swerdlow DL. Trends in hospitalizations for peptic ulcer disease, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Dis*, 2010;16:1410-1418.
103. Feliciano O, Gutierrez O, Valdés L, Fragoso T, Calderin AM, Valdes AE, Llanes R. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, and iceA* genotypes in Cuban patients with upper gastrointestinal diseases. *BioMed research international*. 2015;2015.

104. Fernandez-Gonzalez E, Backert S. DNA transfer in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Journal of gastroenterology*. 2014;49:594-604.
105. Fischbach W, Malfertheiner P, Hoffmann JC, Bolten W, Kist M, Koletzko S. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal ulcer disease. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009;106, 801-808.
106. Fischbach W. Gastric MALT lymphoma—Update on diagnosis and treatment. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2014;28:1069-77.
107. Fischer W, Breithaupt U, Kern B, Smith SI, Spicher C, Haas R. A comprehensive analysis of *Helicobacter pylori* plasticity zones reveals that they are integrating conjugative elements with intermediate integration specificity. *BMC genomics*. 2014;15:310.
108. Flahou B, Rimbara E, Mori S, Haesebrouck F, Shibayama K. The other helicobacters. *Helicobacter*. 2015;20(S1):62-7.
109. Fock KM, Graham DY, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* research: historical insights and future directions. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2013;10:495-500.
110. Foegeding NJ, Caston RR, McClain MS, Ohi MD, Cover TL. An overview of *Helicobacter pylori* VacA toxin biology. *Toxins*. 2016;8:173.
111. Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta S, Margiotta M, Piscitelli D, Lorenzo L, Cavallo L, Ierardi E. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. *The Journal of pediatrics*. 2010;157:228-32.
112. Frick-Cheng AE, Pyburn TM, Voss BJ, McDonald WH, Ohi MD, Cover TL. Molecular and structural analysis of the *Helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system core complex. *MBio*. 2016;7:e02001-15.
113. Fujisawa T, Kumagai T, Akamatsu T, Kiyosawa K, Matsunaga Y. Changes in seroepidemiological pattern of *Helicobacter pylori* and hepatitis A virus over the last 20 years in Japan. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2094-2099.
114. Furuta T, Soya Y, Sugimoto M, Shirai N, Nakamura A, Kodaira C, Nishino M, Okuda M, Okimoto T, Murakami K, Fujioka T. Modified allele-specific primer–polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to clarithromycin. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22:1810-5.
115. Furuta T, Delchier JCh. *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter* 2009;14 (Suppl 1):29-35.
116. Furuta Y. Diversity in genome and epigenome of *Helicobacter pylori*. *Nihon saikingaku zasshi*. Japanese journal of bacteriology. 2014;70:383-9.
117. Gaddy JA, Radin JN, Loh JT, Zhang F, Washington MK, Peek RM, Algood HM, Cover TL. High dietary salt intake exacerbates *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. *Infection and immunity*. 2013;81:2258-67.
118. García A, Salas-Jara MJ, Herrera C, González C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: from environment to human host. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 5632-5638
119. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol*. 2014;20:1438-49.

120. Ge RG, Wang DX, Hao MC, Sun XS. Nickel trafficking system responsible for urease maturation in *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2013;19:8211-8.
121. GholizadeTobnagh S, Bakhti SZ, LatifiNavid S, Zahri S, Bakhti FS. Role of Plasticity Region Genes and *cagE* gene of *cagPAI* of *Helicobacter pylori* in Development of Gastrointestinal (GI) Diseases. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2017;18:43.
122. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AM, Soares TF, Oliveira CA, Bittencourt PF, Queiroz DM. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008;298:223-30.
123. González-Vázquez R, Córdova-Espinoza MG, Escamilla-Gutiérrez A, Morales-Méndez I, Ochoa-Pérez SA, Armendáriz-Toledano F, Fonseca-Nájera J, Giono-Cerezo S. Frequency of virulence genes in mixed infections with *Helicobacter pylori* strains from a Mexican population. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*. 2016;81:11-20.
124. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Colins MD, Sly L, McConnell W, and Harper WE. Transfer of *Campylobacter pylori* *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb, nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol. S*. 1989; 39:397-405.
125. Gorrell R, Kwok T. The *Helicobacter pylori* Methylome: Roles in Gene Regulation and Virulence. In *Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by Helicobacter pylori 2017* (pp. 105-127). Springer International Publishing.
126. Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 2004;53:1235-1243.
127. Graham DY, Shiotani A. Which therapy for *Helicobacter pylori* infection? *Gastroenterology* 2012; 143:10–2.
128. Graham DY, Lee YC, Wu MS. Rational *Helicobacter pylori* therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:177–86.e3; Discussion e12–3.
129. Graham DY. *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology* 2015; 148: 719–31.e3.
130. Haddadi MH, Bazargani A, Khashei R, Fattahi MR, Bagheri Lankarani K, Moini M, Rokni Hosseini SM. Different distribution of *Helicobacter pylori* EPIYA- *cagA* motifs and *dupA* genes in the upper gastrointestinal diseases and correlation with clinical outcomes in Iranian patients. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2015;8:S37–S46.
131. Hage N, Howard T, Phillips C, Brassington C, Overman R, Debreczeni J, Gellert P, Stolnik S, Winkler GS, Falcone FH. Structural basis of Lewis<sup>b</sup> antigen binding by the *Helicobacter pylori* adhesin BabA. *Science advances*. 2015;1:e1500315.
132. Hagymási K, Tulassay Z. Peptic ulcer: facts and questions–2010. *Orvosi hetilap*. 2010;151:1054-61.
133. Hagymási K, Tulassay Z. *Helicobacter pylori* infection: new pathogenetic and clinical aspects. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20:6386.

134. Hamed ME, Hussein HM, El Sadany HF, Elgobashy AA, Atta AH. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection among family members of infected and non-infected symptomatic children. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2013;43:755-66.
135. Hammond CE, Beeson C, Suarez G, Peek RM, Backert S, Smolka AJ. *Helicobacter pylori* virulence factors affecting gastric proton pump expression and acid secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015;309:G193-201.
136. Hirata Y, Ohmae T, Yanai A, Sakitani K, Hayakawa Y, Yoshida S, Sugimoto T, Mitsuno Y, Akanuma M, Yamaji Y, Ogura K. Sitafloxacin resistance in *Helicobacter pylori* isolates and sitafloxacin-based triple therapy as a third-line regimen in Japan. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;39:352-5.
137. Homan M, Luzar B, Kocjan BJ, Mocilnik T, Shrestha M, Kveder M, Poljak M. Prevalence and clinical relevance of *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Slovenian children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2009;49:289-96.
138. Honar N, Minazadeh A, Shakibazad N, Haghighat M, Saki F, Javaherizadeh H. Diagnostic accuracy of urea breath test for *Helicobacter pylori* infection in children with dyspepsia in comparison to histopathology. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2016 ;53:108-12.
139. Hong SJ, Kim SW. *Helicobacter pylori* infection in gastroesophageal reflux disease in the Asian countries. *Gastroenterology research and practice*. 2015;2015.
140. Huang X, Deng Z, Zhang Q, Li W, Wang B, Li M. Relationship between the *iceA* gene of *Helicobacter pylori* and clinical outcomes. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2016;12:1085.
141. Hussein NR, Argent RH, Marx CK, Patel SR, Robinson K, Atherton JC. *Helicobacter pylori dupA* is polymorphic, and its active form induces pro-inflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. *J. Infect. Dis*. 2010;202:261-269
142. Hussein NR. A study of *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins (*hom*) A and B in Iraq and Turkey. *J Infect Public Health* 2011;4:135-139.
143. Hussein NR, Tuncel IE. *Helicobacter pylori dupA* and smoking are associated with increased levels of interleukin-8 in gastric mucosa in Iraq. *Hum Pathol*. 2015;46:929-930.
144. Hwang TJ, Kim N, Kim HB, Lee BH, Nam RH, Park JH, Lee MK, Park YS, Lee DH, Jung HC, Song IS. Change in antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea. *Journal of clinical gastroenterology*. 2010;44:536-43.
145. Isomoto H, Moss J, Hirayama T. Pleiotropic actions of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. *TohokuJ. Exp. Med*. 2010;220:3-14.
146. Israel DA, Peek RM Jr. Surreptitious manipulation of the human host by *Helicobacter pylori*. *Gut Microbes* 2010;1:19-127.
147. Jafarzadeh A, Rezayati MT, Nemati M. Specific serum immunoglobulin G to *H. pylori* and CagA in healthy children and adults (south-east of Iran). *World J. Gastroenterol*. 2007;13:3117-3121.

148. Jimenez F, Demaria JL, Ahumada C, Nagel A, Baroni MR, Giugni MC, Méndez E. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* anti-CagA antibodies and its relationship with epidemiologic factors in Santa Fe. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*. 2003;34:16-20.
149. Johnson EM, Gaddy JA, Voss BJ, Hennig EE, Cover TL. Genes required for assembly of pili associated with the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Infection and immunity*. 2014;82:3457-70.
150. Jung SW, Sugimoto M, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y. The intact *dupA* cluster is a more reliable *Helicobacter pylori* virulence marker than *dupA* alone. *Infect Immun*. 2012;80:381–387.
151. Kamburov V, Boyanova L, Manova S, Tadjer S, Krastev Z. Diagnostic tests for evaluation of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer bleeding. *Bulgarian Hepatogastroenterol*. 2007;IX, 7-12.
152. Kang J, Jones KR, Jang S, Olsen CH, Yoo YJ, Merrell DS, Cha JH. The geographic origin of *Helicobacter pylori* influences the association of the *homb* gene with gastric cancer. *J Clin Microbiol* 2012;50:1082-1085.
153. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical journal*. 2016;39:14-23.
154. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Srinivas S, Devi SM, Majeed AA, Rao KR, Khan AA, Sechi LA, Ahmed N. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005a;5:32.
155. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Ahmad N, Habeeb A, Khan AA, Ahmed N. Comparing genomes of *Helicobacter pylori* strains from the high-altitude desert of Ladakh, India. *J Clin Microbiol* 2005b;43:1538-1545.
156. Kawai M, Furuta Y, Yahara K, et al. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC microbiology*. 2011; 11:104.
157. Keenan JI, Salm N, Wallace AJ et al. Using food to reduce *H. pylori*-associated inflammation. *Phytotherapy Research* 2012;26:1620-5.
158. Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen?. *Gut pathogens*. 2010;2:1.
159. Ki MR, Ghim SY, Hong IH, Park JK, Hong KS, Ji AR, Jeong KS. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and of adherence of cagA-positive strains to gastric epithelial cells by *Lactobacillus paraplantarum* KNUC25 isolated from kimchi. *Journal of medicinal food*. 2010;13:629-34.
160. Kim SY, Choi DJ, Chung JW. Antibiotic treatment for *Helicobacter pylori*: Is the end coming?. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2015;6:183.
161. Kim JY, Kim N, Nam RH, Suh JH, Chang H, Lee JW, Kim YS, Kim JM, Choi JW, Park JG et al. Association of polymorphisms in virulence factor of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases in South Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:984–991.

162. Klesiewicz K, Nowak P, Karczewska E, et al. PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains. *Acta Biochim Pol* 2014;61: 311–5.
163. Koehler CL, Mues MB, Dienes HP, Kriegsmann J, Schirmacher P, Odenthal M. (2003). *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol. Pathol.* 2003;56:36-42.
164. Kolesnikova I, Pavlova EK, Grigor'eva I. "High" and "low" gastric ulcers in posthelicobacterial era--is this division vital?. *Ekspierimental'naia i klinicheskaia gastroenterologija*= *Experimental & clinical gastroenterology.* 2012;58-61.
165. Konturek JW. DISCOVERY BY JAWORSKI OF *HELICOBACTER PYLORI*. *Journal of physiology and pharmacology.* 2003;54(S3):23-41.
166. Krashias G, Bashiardes S, Potamitou A, Potamitis GS, Christodoulou C. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genes in Cypriot patients. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 2013;7:642-50.
167. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Health Sciences; 2014.
168. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews.* 2006;19:449-90.
169. Lai CH, Huang JC, Chiang-Ni C, Li JP, Wu LT, Wu HS, Sun YC, Lin ML, Lee JF, Lin HJ. Mixed Infections of *Helicobacter pylori* Isolated from Patients with Gastrointestinal Diseases in Taiwan. *Gastroenterology Research and Practice.* 2016;2016.
170. Lamb A, Chen LF. Role of the *Helicobacter pylori*-Induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *Journal of cellular biochemistry.* 2013;114:491-7.
171. Lan HC, Chen TS, Li AF, Chang FY, Lin HC. Additional corpus biopsy enhances the detection of *Helicobacter pylori* infection in a background of gastritis with atrophy. *BMC Gastroenterol* 2012;12:182
172. Łaszewicz W, Iwańczak F & Iwańczak B. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults depending on socioeconomic status and living conditions. *Advances in Medical Sciences* 2014;59:147-50
173. Leal YA, Cedillo-Rivera R, Simón JA, Velázquez JR, Flores LL, Torres J. Utility of stool sample-based tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52: 718-728
174. Leclerc H. Epidemiological aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Bull. Acad. Natl. Med.* 2006;190:949-962.
175. Leduc D, Gallaud J, Stingl K, de Reuse H. Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization. *Infection and immunity.* 2010;78:2782-92.
176. Lee JW, Kim N, Kim JM, Nam RH, Chang H, Kim JY, Shin CM, Park YS, Lee DH, Jung HC. Prevalence of primary and secondary antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. *Helicobacter* 2013; 18: 206-214

177. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK, Choi SY, Jung YD: *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2013, 19: 8192-8202.
178. Lesbros-Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I & Blum AL. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J Nutr* 2007;137(Suppl2):812S-8S.
179. Levi F, Lucchini F, Gonzalez JR, Fernandez E, Negri E, La Vecchia C. Monitoring falls in gastric cancer mortality in Europe. *Ann Oncol*. 2004; 15:338-345.
180. Leung W, Hung L, Kwok C, Leong R, Ng D, Sung J. Follow up of serial urea breath test results in patients' after consumption of antibiotics for non-gastric infections. *World J Gastroenterol*. Vol 8, no 4, pp 703-6, 2002.
181. Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson HO, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M. Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2016.
182. Lima VP, Silva-Fernandes IJ, Alves MK, Rabenhorst SH. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiol* 2011; 35: e32-e37
183. Linden SK, Arnqvist A, Teneberg S, Moran AP. *Helicobacter pylori* adhesion to the gastric surface. In *Helicobacter pylori* in the 21st Century, Sutton P, Mitchell H, eds. (Cab International: Wallingford, UK), 2010; pp. 248-268.
184. Linpisarn S, Suwan W, Lertprasertsuk N, Koosirirat C, Steger HF, Prommuangyong K, Phornphutkul K (2007) *Helicobacter pylori cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes in northern Thai patients with gastric disease. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38:356-362.
185. Ling F, Wang X, Dai D, Yu M, Chen C, Qian J, Liu C, Zhang Y, Ding J, Guan XW, Shao S. The *Helicobacter pylori* protein CagM is located in the transmembrane channel that is required for CagA translocation. *Curr Microbiol* 2013; 67: 531-536.
186. Ling SS, Khoo LH, Hwang LA, Yeoh KG, Ho B. Instrumental Role of *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase in VacA-Dependent Vacuolation in Gastric Epithelial Cells. *PloS one*. 2015;10:e0131460.
187. Linz B, Windsor HM, Gajewski JP, Hake CM, Drautz DI, Schuster SC, Marshall BJ. *Helicobacter pylori* genomic microevolution during naturally occurring transmission between adults. *PLoS One*. 2013;8:e82187.
188. Liou JM, Chang CY, Chen MJ, Chen CC, Fang YJ, Lee JY, Wu JY, Luo JC, Liou TC, Chang WH, Tseng CH. The primary resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan after the national policy to restrict antibiotic consumption and Its relation to virulence factors—A nationwide study. *PLoS One*. 2015;10:e0124199.
189. Liu G, Xu X, He L, Ding Z, Gu Y, Zhang J, Zhou L. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Beijing children. *Helicobacter*. 2011;16:356-62.
190. Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y. Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. *BMC infectious diseases*. 2013;13:555.
191. Liu X, He B, Cho WC, Pan Y, Chen J, Ying H, Wang F, Lin K, Peng H, Wang S. A systematic review on the association between the *Helicobacter pylori vacA* i genotype and gastric disease. *FEBS Open Bio*. 2016;6:409-17.

192. Loh JT, Friedman DB, Piazuolo MB, Bravo LE, Wilson KT, Peek RM Jr, Correa P, Cover TL. Analysis of *Helicobacter pylori* cagA promoter elements required for salt-induced upregulation of CagA expression. *Infect Immun*. 2012;80:3094-106.
193. Loyd RA, McClellan DA. Update on the evaluation and management of functional dyspepsia. *Am Fam Physician* 2011; 83: 547-552
194. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2005;128:833-48.
195. Ma JL, Zhang L, Brown LM, Li JY, Shen L, Pan KF, Liu WD, Hu Y, Han ZX, Crystal-Mansour S, Pee D, Blot WJ, Fraumeni JF, You WC, Gail MH. Fifteen-year effects of *Helicobacter pylori*, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 488-492
196. Mahboubi M, Falsafi T, Sadeghizadeh M, Mahjoub F. The role of outer inflammatory protein A (OipA) in vaccination of the C57BL/6 mouse model infected by *Helicobacter pylori*. *Turk J Med Sci*. 2017;47:326-333.
197. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, ElOmar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
198. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. *Gut* 2012; 61: 646–64.
199. Manyi-Loh CE, Clarke AM, Mkwetshana NF et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infections: Mitigating factors and prospective natural remedies. *Afr J Biotechnol* 2010;9:2032-42.
200. Manyi-Loh CE, Clarke AM & Ndip RN. Detection of phytoconstituents in column fractions of n-hexane extract of goldcrest honey exhibiting Anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archives of Medical Research* 2012;43:197-204.
201. Marie MA. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Large Series of Patients in an Urban Area of Saudi Arabia. *Korean J Gastroenterol*. 2008;52:226-229.
202. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*. 1984;323:1311-5.
203. Marshall, BJ, Armstrong, JA, McGeachie, DB, and Glancy, RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aus*. 1985;142:436-439.
204. Mateva L, Tankova T, Petrova J, Aleksiev A, Spassova Z, Stoinova V. Characteristic of dyspepsia in diabetic patients. Comparison with dyspeptic patients without diabetes. *Gut* 2001;49 (Suppl III): A1689.
205. Matos JJ, de Sousa HA, Marcos-Pinto R, Dinis-Ribeiro M. *Helicobacter pylori* CagA and VacA genotypes and gastric phenotype: a meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013; 25: 1431-1441.
206. Matsuda M, Shiota S, Matsunari O, Watada M, Murakami K, Fujioka T, Yamaoka Y. Prevalence of two homologous genes encoding glycosyltransferases of *Helicobacter pylori* in the United States and Japan. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 2011;26:1451-1456.

207. Mattar R, Monteiro MS, Marques SB, Zilberstein B, Hashimoto CL, Carrilho FJ. Association of *LEC* and *trip A Helicobacter pylori* genes with gastric cancer in a Brazilian population *Infect. Agent Cancer* 2010;5:1.
208. Matteo MJ, Armitano RI, Granados G, Wonaga AD, Sanches C, Olmos M, Catalano M. *Helicobacter pylori oipA, vacA* and *dupA* genetic diversity in individual hosts. *J. Med. Microbiol.* 2010;59:89-95.
209. Mazaheri Assadi M, Chamanrokh P, Whitehouse CA, Huq A. Methods for detecting the environmental coccoid form of *Helicobacter pylori*. *Frontiers in public health.* 2015;3:147.
210. Medina ML, Medina MG, Martin GT, Picon SO, Bancalari A, Merino LA. Molecular detection of *Helicobacter pylori* in oral samples from patients suffering digestive pathologies. *Med. Oral Patol. Oral. Cir. Bucal.* 2010;15: e38-e42.
211. Megraud, F. 1995. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **9**:85–91.
212. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004;53: 1374–84.
213. Megraud E, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20:280-322.
214. Megraud F. *Helicobacter pylori*: bacteriological aspects, diagnostic methods, and susceptibility to antibiotics. *Presse Med.* 2008;37:507-512.
215. Mégraud F. Current recommendations for *Helicobacter pylori* therapies in a world of evolving resistance. *Gut Microbes.* 2013a;4:541-8.
216. Mégraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* 2013b; 62: 34-42
217. Memon AA, Hussein NR, Deyi VY, Burette A, Atherton JC. Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study. *Journal of clinical microbiology.* 2014;52:2984-9.
218. Michaud DS. Role of bacterial infections in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2013; 34: 2193-2197
219. Miciuleviciene J, Calkauskas H, Jonaitis L, Kiudelis G, Tamosiūnas V, Praskevicius A, Kupcinskis L, Berg D. *Helicobacter pylori* genotypes in Lithuanian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer. *Medicina (Kaunas)* 2008;44:449–454.
220. Miftahussurur M, Syam AF, Makmun D, Nusi IA, Zein LH, Akil F, Uswan WB, Simanjuntak D, Uchida T, Adi P, Utari AP. *Helicobacter pylori* virulence genes in the five largest islands of Indonesia. *Gut pathogens.* 2015;7:26.
221. Miftahussurur M, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* virulence genes and host genetic polymorphisms as risk factors for peptic ulcer disease. *Expert review of gastroenterology & hepatology.* 2015;9:1535-47.
222. Mirzaei N, Poursina F, Moghim S, Rahimi E, Safaei HG. The mutation of the *rdxA* gene in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 90.

223. Mishra S. Is *Helicobacter pylori* good or bad? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 301-304
224. Mitchell HM;Rocha GA;Kaakoush NO;O'Rourke JL;Queiroz DM M, 2014, 'The family *Helicobacteraceae*', in *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*, pp. 337-392, [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9\\_275](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9_275)
225. Mitov I, Tsvetkova E, Tomov A, Petrov P, Kotsev V, Petrov D. Monoclonal antibodies for typing of *Helicobacter pylori*. *Infectology*. 1998;XXXV:32-4.
226. Momtaz H, Dabiri H, Souod N, Gholami M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in cows, sheep, goats and human beings. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 61
227. Moon SW, Kim TH, Kim HS, Ju JH, Ahn YJ, Jang HJ, Shim SG, Kim HJ, Jung WT, Lee OJ. United Rapid Urease Test Is Superior than Separate Test in Detecting *Helicobacter pylori* at the Gastric Antrum and Body Specimens. *Clin Endosc* 2012; 45: 392-396
228. Mottaghi B, Safaralizadeh R, Bonyadi M, Latifi-Navid S and Somi MH. *Helicobacter pylori vacA* i region polymorphism but not *babA2* status associated to gastric cancer risk in northwestern Iran. *Clin Exp Med* 2014;16:57
229. Murray L, Bamford K, Kee F, McMaster D, Cambien F, Dallongeville J, Evans A. Infection with virulent strains of *Helicobacter pylori* is not associated with ischaemic heart disease: evidence from a population-based case-control study of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2000;149:379-385.
230. Nagini S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. *World J Gastrointest Oncol* 2012; 4: 156-169
231. Nagy P, Johansson S, Molloy-Bland M. Systematic review of time trends in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in China and the USA. *Gut pathogens*. 2016;8:8.
232. Ndip RN, Malange Takan AE, Enchakachi CM, et al. In vitro antimicrobial activity of selected honeys on clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Afr Health Sci* 2007;7:228-31.
233. Nguyen LT, Uchida T, Murakami K, Fujioka T, Moriyama, M. *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J. Med. Microbiol*. 2008;57:1445-1453.
234. Nguyen LT, Uchida T, Tsukamoto Y, Trinh TD, Ta L, Mai HB, Le HS, Ho DQ, Hoang HH, Matsuhisa T, Okimoto T. Clinical relevance of *cagPAI* intactness in *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2010;29:651-60.
235. Nilsson, C, Skoglund, A., Moran, A.P., Annuk, H., Engstrand, L., and Normark, S. (2008). Lipopolysaccharide diversity evolving in *Helicobacter pylori* communities through genetic modifications in fucosyltransferases. *PLoS One*. 2008;3:e3811.
236. Nzeako BC & Al-Namaani F. The antibacterial activity of honey on *Helicobacter pylori*. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2006;6:71-6.
237. Odenbreit S, Swoboda K, Barwig I, Ruhl S, Borén T, Koletzko S, Haas R. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infection and immunity*. 2009;77:3782-90.
238. Ogiwara H, Graham DY, Yamaoka Y. *vacA* i-region subtyping. *Gastroenterology* 2008;134:1267.

239. Okamura T, Suga T, Nagaya T, et al. Antimicrobial resistance and characteristics of eradication therapy of *Helicobacter pylori* in Japan: a multi-generational comparison. *Helicobacter* 2014; 19: 214–20.
240. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, Suerbaum S, Achtman M, Linz B. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *PLoS Genet.* 2010;6: e 1001069.
241. Oleastro M, Monteiro L, Lehours P, Megraud F, Menard A. Identification of markers for *Helicobacter pylori* strains isolated from children with peptic ulcer disease by suppressive subtractive hybridization. *Infect. Immun.* 2006; 74: 4064–4074.
242. Oleastro M, Cordeiro R, Ferrand J, Nunes B, Lehours P, Carvalho-Oliveira I, Mendes AI, Penque D, Monteiro L, Mégraud F, Ménard A. Evaluation of the clinical significance of *homB*, a novel candidate marker of *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer disease. *J Infect Dis* 2008;198:1379-1387.
243. Oleastro M, Cordeiro R, Menard A, Yamaoka Y, Queiroz D, Megraud F, Monteiro L. Allelic diversity and phylogeny of *homB*, a novel co-virulence marker of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* 2009a;9:248.
244. Oleastro M., Cordeiro R., Yamaoka Y., Queiroz D., Mégraud F., Monteiro L., Ménard A. (2009b) Disease association with two *Helicobacter pylori* duplicate outer membrane protein genes, *homB* and *homA*. *Gut Pathog* 22:12.
245. Oleastro M, Santos A, Cordeiro R, Nunes B, Megraud F, Menard A. Clinical relevance and diversity of two homologous genes encoding glycosyltransferases in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2885-2891.
246. Oleastro M, Ménard A. The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. *Biology*, 2013;2:1110-1134.
247. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Volland P, Borén T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Gerhard M. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 2005;44:151-6.
248. Ornelas IJ, Galvan-Potrillo M & Lopez-Carrillo L. Protective effect of yoghurt consumption on *Helicobacter pylori* seropositivity in a Mexican population. *Public Health Nutr* 2007;10:1283-7.
249. Osman HA, Hasan H, Suppian R, Hassan S, Andee DZ, Abdul Majid N, Zilfalil BA. Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA*, *babA2*, and *dupA* genotypes and correlation with clinical outcome in Malaysian patients with dyspepsia. *Turk J Med Sci.* 2015;45:940–946.
250. Ozbey G, Aygun C. Prevalence of genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from patients in eastern Turkey and the association of these genotypes with clinical outcome. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2012;43:1332-9.
251. Ozbey G, Dogan Y, Demiroren K. Prevalence of *Helicobacter pylori* virulence genotypes among children in Eastern Turkey. *World J Gastroenterol.* 2013;19:6585-9.
252. Ozden A, Bozdayi G, Ozkan M, Köse KS. Changes in the seroepidemiological pattern of *Helicobacter pylori* infection over the last 10 years. *Turk J Gastroenterol* 2004;15:156-158.

253. Pachathundikandi SK, Tegtmeyer N, Backert S. Signal transduction of *Helicobacter pylori* during interaction with host cell protein receptors of epithelial and immune cells. *Gut Microbes*. 2013;4:454-74.
254. Pacheco AR, Proenca-Modena JL, Sales AIL, Fukuhara Y, Da Silveira WD, Pimenta-Modena JL, De Oliveira RB, Brocchi M. Involvement of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the development of gastroduodenal diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2008;27:1053-1059.
255. Pajares, JM, and Gisbert, JP. *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Rev. Esp. Enferm. Dig*. 2006;98: 770-785.
256. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:3389.
257. Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, Hatziloukas E, Sgouras DN. Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats. *PloS one*. 2013;8:e56291.
258. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, and Sibley RK. *H. pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med*. 1991;325:1131.
259. Parzecka M, Szaflarska-Popławska A, Gasiorowska J, Gorzkiewicz M, Grzybowski T. [The prevalence of *dupA* (duodenal ulcer-promoting gene) of *Helicobacter pylori* in children and adolescents--own observation] *Pol Merkur Lekarski*. 2013;34:277-280.
260. Payão SL, Rasmussen LT. *Helicobacter pylori* and its reservoirs: A correlation with the gastric infection. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 2016;7:126.
261. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Digestive diseases and sciences*. 2014;59:1698-709.
262. Pereira MI, Medeiros JA. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J Gastroenterol*. 2014;20:684-98.
263. Pereira WN, Ferraz MA, Zabaglia LM, de Labio RW, Orcini WA, Ximenez JP, Neto AC, Payão SL, Rasmussen LT. Association among *H. pylori* virulence markers *dupA*, *cagA* and *vacA* in Brazilian patients. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2014;20:1.
264. Peterson, W.L., Harford, W, and Marshall, B.J. The Dallas experience with acute *Helicobacter pylori* infection. (2002) In *Helicobacter* pioneers: First hand accounts from the scientists who discovered helicobacters, 1892-1982, Marshall, B., ed. (Blackwell Science Asia: Victoria, Australia), pp. 143-150.
265. Pinto-Ribeiro I, Ferreira RM, Batalha S, Hlaing T, Wong SI, Carneiro F, Figueiredo C. *Helicobacter pylori vacA* Genotypes in Chronic Gastritis and Gastric Carcinoma Patients from Macau, China. *Toxins*. 2016;8:142.
266. Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2003;46:83-88.

267. Pohl MA, Kienesberger S, Blaser MJ. Novel functions for glycosyltransferases Jhp0562 and GalT in lewis antigen synthesis and variation in *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. 2012;80:1593-605.
268. Pourakbari B, Mirsalehian A, Maleknejad P, Mamishi S, Azhdarkosh H, Daryani NE, Najafi M, Kazemi B, Paknejad M, Mahmoudi S, Bandehpour M, Ghazi M, Salavati A. Evaluation of a new antigen for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in stool of adult and children. *Helicobacter* 2011; 16: 42-46
269. Prasanthi CH, Prasanthi NL, Manikiran SS, Rao NR. Focus on current trends in the treatment of *Helicobacter pylori* infection: An update. *situations*. 2011;9:009.
270. Qin Z, Lin WT, Zhu S, Franco AT, Liu J. Imaging the motility and chemotaxis machineries in *Helicobacter pylori* by cryo-electron tomography. *Journal of bacteriology*. 2017;199:e00695-16.
271. Qureshi NN, Gallaher B, Schiller NL. Evolution of amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori* in vitro: characterization of resistance mechanisms. *Microb Drug Resist* 2014; 20: 509–16.
272. Ramis IB, de Moraes EP, Fernandes MS, Mendoza-Sassi R, Rodrigues O, Juliano CR, Scaini CJ, da Silva PE. Evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. *Braz J Microbiol* 2012; 43: 903-908
273. Ramis IB, Vianna JS, Silva Junior LV, Von Groll A, Silva PE. *cagE* as a biomarker of the pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;46:185-189
274. Rauws EAJ, Tytgat GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1990;335:1233–1235.
275. Raymond J, Thiberge JM, Dauga C. Diagnosis of *Helicobacter pylori* recurrence: relapse or reinfection? Usefulness of molecular tools. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2016;2;51:672-8.
276. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133:926-936.
277. Rhee KH, Park JS, Cho MJ. *Helicobacter pylori*: bacterial strategy for incipient stage and persistent colonization in human gastric niches. *Yonsei medical journal*. 2014;55:1453-66.
278. Rigas, B., Feretis, C, and Papavassiliou, E.D. John Lykoudis: an unappreciated discoverer of the cause and treatment of peptic ulcer disease. *Lancet* 1999;354:1634-1635.
279. Rimbara E, Sasatsu M, Graham DY. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. *Methods Mol Biol* 2013; 943: 279-287
280. Rohrmann S, Becker N, Kroke A, Boeing H. Trends in cigarette smoking in the German centers of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): the influence of the educational level. *Prev Med*. 2003;36:448-454.
281. Romero-Adrian TB, Leal-Montiel J, Monsalve-Castillo F, Mengual-Moreno E, McGregor EG, Perini L, Antunez A. *Helicobacter pylori*: bacterial factors and the role of cytokines in the immune response. *Curr. Microbiol*. 2010;60:143-155.

282. Ruggiero P. *Helicobacter pylori* infection: what's new. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25: 337-344
283. Salih BA. *Helicobacter pylori* infection in developing countries: The burden for how long? *Saudi J. Gastroenterol.* 2009;15:201-207.
284. Salih BA, Guner A, Karademir A, Uslu M, Ovali MA, Yazici D, Bolek BK, Arikan S. Evaluation of the effect of *cagPAI* genes of *Helicobacter pylori* on AGS epithelial cell morphology and IL-8 secretion. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014;105:179-89.
285. Santibáñez M, Aguirre E, Belda S, Aragones N, Saez J, Rodríguez JC, Galiana A, Sola-Vera J, Ruiz-García M, Paz-Zulueta M, Sarabia-Lavín R, Brotons A, López-Girona E, Pérez E, Sillero C, Royo G. Relationship between tobacco, *cagA* and *vacA* *il* virulence factors and bacterial load in patients infected by *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 2015; 10: e0120444
286. Saracino IM, Zullo A, Holton J, et al. High prevalence of primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Italy. *J Gastrointest Liver Dis* 2012; 21: 363–5.
287. Sarem M, Corti R. Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition).* 2016;39:28-35.
288. Sari YS, Can D, Tunali V, Sahin O, Koc O, Bender O. *H. pylori*, treatment for the patient only or the whole family? *World J. Gastroenterol.* 2008;14:1244-1247.
289. Sasazuki S, Inoue M, Iwasaki M, Otani T, Yamamoto S, Ikeda S, Hanaoka T, Tsugane S. Effect of *Helicobacter pylori* infection combined with *CagA* and pepsinogen status on gastric cancer development among Japanese men and women: a nested case-control study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers.* 2006;15:1341-7.
290. Sasidharan S, Uyub AM. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among asymptomatic healthy blood donors in Northern Peninsular Malaysia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009;103:395-398.
291. Schmidt HM, Andres S, Kaakoush NO, Engstrand L, Eriksson L, Goh KL, Fock KM, Hilmi I, Dhamodaran S, Forman D, Mitchell H. The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (*dupA*) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study. *Gut pathogens.* 2009;1:1.
292. Schmidt HM, Andres S, Nilsson C, Kovach Z, Kaakoush NO, Engstrand L, Goh KL, Fock KM, Forman D, Mitchell H. The *cagPAI* is intact and functional but HP0521 varies significantly in *Helicobacter pylori* isolates from Malaysia and Singapore. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases.* 2010;29:439-51.
293. Schweizer HP. Understanding efflux in Gram-negative bacteria: opportunities for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7: 633-642
294. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Singh S, Feng J, Sachs G. Cytoplasmic histidine kinase (Hp0244)-regulated assembly of urease with Ure1, a channel for urea and its metabolites, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, is necessary for acid survival of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2010;192:94-103
295. Secka O, Antonio M, Tapgun M, Berg DE, Bottomley C, Thomas V, Walton R, Corrah T, Adegbola RA, Thomas JE. PCR-based genotyping of *Helicobacter pylori* of Gambian

- children and adults directly from biopsy specimens and bacterial cultures. *Gut pathogens*. 2011;3:5.
296. Selgrad M, Tammer I, Langner C, et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 16245–51.
  297. Seo JH, Park HK, Park JS, Yeom JS, Lim JY, Park CH, Woo HO, Youn HS, Jun JS, Ko GH, Baik SC. Association between Gastric pH and *Helicobacter pylori* Infection in Children. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*. 2015;18:246-52.
  298. Shao Y, Sun K, Xu W, Li XL, Shen H, Sun WH. Helicobacter pylori infection, gastrin and cyclooxygenase-2 in gastric carcinogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014;20:12860.
  299. Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, Yamaoka Y. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the *Helicobacter pylori dupA* gene and clinical outcomes. *Gut pathogens*. 2010;2:1.
  300. Shiota S, Watada M, Matsunari O, Iwatani S, Suzuki R, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori iceA*, clinical outcomes, and correlation with *cagA*: a meta-analysis. *PLoS one*. 2012;7:e30354.
  301. Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. *Journal of digestive diseases*. 2013;14:341-9.
  302. Shiota S, Reddy R, Alsarraj A, ElSerag HB, Graham DY. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* among male United States Veterans. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 1616–24.
  303. Shirin H, Leja M, Niv Y. *Helicobacter pylori* and non-malignant diseases. *Helicobacter* 2008;13(Suppl 1): 23-27.
  304. Skoglund A, Backhed HK, Nilsson C, Bjorkholm B, Normark S, Engstrand L. A changing gastric environment leads to adaptation of lipopolysaccharide variants in *Helicobacter pylori* populations during colonization. *PLoS One* 2009;4:e5885.
  305. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004;10:1958-1960.
  306. Smith SM. Role of Toll-like receptors in Helicobacter pylori infection and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5:133-46.
  307. Souod N, Sarshar M, Dabiri H, Momtaz H, Kargar M, Mohammadzadeh A, Abdi S. The study of the *oipA* and *dupA* genes in Helicobacter pylori strains and their relationship with different gastroduodenal diseases. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. 2015;8(Suppl1):S47.
  308. Šterbenc A, Homan M, Kocjan BJ, Luzar B, Zidar N, Poljak M. Prevalence and clinical significance of *homA* and *homB*, two novel *Helicobacter pylori* virulence markers, in Slovenian paediatric population. 2012. In *HELICOBACTER*, vol. 17, pp. 67-67. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.

309. Su P, Li Y, Li H, Zhang J, Lin L, Wang Q, Guo F, Ji Z, Mao J, Tang W, Shi Z, Shao W, Mao J, Zhu X, Zhang X, Tong Y, Tu H, Jiang M, Wang Z, Jin F, Yang N, Zhang J. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated in the Southeast Coastal Region of China. *Helicobacter* 2013; 18: 274-279
310. Sugano K. Screening of gastric cancer in Asia. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2015;29:895-905.
311. Suzuki N, Yoneda M, Naito T, Iwamoto T, Masuo Y, Yamada K, Hisama K, Okada I, Hirofuji, T. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *J. Med. Microbiol*. 2008;57:1553-1559.
312. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 203-213
313. Takenaka R, Okada H, Kato J, Makidono C, Hori S, Kawahara Y, Miyoshi M, Yumoto E, Imagawa A, Toyokawa T, *et al.* *Helicobacter pylori* eradication reduced the incidence of gastric cancer, especially of the intestinal type. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007;25:805-812.
314. Talarico S, Gold BD, Fero J, Thompson DX, Guarner J, Czinn S, Salama NR. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:1680-1688.
315. Talebi Bezmin Abadi A., Rafiei A, Ajami A., Hosseini V., Taghvaei T., Jones K. R., Merrell D. S. (2011) *Helicobacter pylori* *hombB*, but not *cagA*, is associated with gastric cancer in Iran. *J Clin Microbiol* 49:3191-3197.
316. Talley NJ. Functional dyspepsia: new insights into pathogenesis and therapy. *The Korean journal of internal medicine*. 2016;31:444.
317. Tan HJ, Goh KL. Changing epidemiology of *Helicobacter pylori* in Asia. *J Dig Dis*. 2008;9:186-189.
318. Tan HJ, Goh KL. Extragastrintestinal manifestations of *Helicobacter pylori* infection: facts or myth? A critical review. *J Dig Dis* 2012; 13: 342-349
319. Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. Role of the *cag*-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Febs Journal*. 2011;278:1190-202.
320. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, Valasek MA. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2016;43:514-33.
321. Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, Tedeschi R, Basaglia G, De Paoli P. Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41:976-80.
322. Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, *et al.* A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *J Leukoc Biol* 2007;82:1147-55.
323. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:87-106
324. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Munoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998;178:1089-1094.

325. Tsay FW, Wu DC, Kao SS, et al. Reverse sequential therapy achieves a similar eradication rate as standard sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized controlled trial. *Helicobacter* 2015; 20: 71–7.
326. Tseng CH, Tseng FH. Diabetes and gastric cancer: the potential links. *World journal of gastroenterology: WJG.* 2014;20:1701.
327. Tsugane S, Sasazuki S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer* 2007; 10: 75-83
328. Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Ohba Y, Takahashi M, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA causes mitotic impairment and induces chromosomal instability. *J. Biol. Chem.* 2009;284:22166-22172.
329. Umit H, Tezel A, Bukavaz S, Unsal G, Otkun M, Soylu AR, Xucer D, Otkun M, Bilgi S. The relationship between virulence factors of *Helicobacter pylori* and severity of gastritis in infected patients. *Dig. Dis. Sci.* 2009;54:103-110.
330. Unge, P. *Helicobacter pylori* treatment in the past and in the 21st century. (2002) In *Helicobacter* pioneers: First hand accounts from the scientists who discovered helicobacters, 1892-1982, Marshall, B., ed. (Blacb Science Asia: Victoria, Australia), pp. 203-213.
331. Vale EE, Vitor JM. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? *Int. J. Food Microbiol.* 2010;138:1-12.
332. van Blankenstein M, van Vuuren AJ, Looman CW, Ouwendijk M, Kuipers EJ. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the Netherlands. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48:794-800.
333. Vega AE, Cortiñas TI, Puig ON, Silva HJ. Molecular characterization and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* strains isolated in western Argentina. *International Journal of Infectious Diseases.* 2010;14:e85-92.
334. Veijola L, Oksanen A, Sipponen P, Rautelin H. Evaluation of a commercial immunoblot, Helicoblot 2.1, for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:1705-1710.
335. Villain P, Gonzalez P, Almonte M, Franceschi S, Dillner J, Anttila A, Park JY, De Vuyst H, Herrero R. European Code against Cancer 4th Edition: infections and Cancer. *Cancer epidemiology.* 2015;39:S120-38.
336. Vladimirov, B., I. Tersiev, M. Marina, K. Ivanova. Omeprazole vs famotidine and antibiotics on *H. pylori* positive duodenal ulcers. *Digestion*, 59, 1998, Suppl 3, 436 (ExhB 3226).
337. Waldum HL, Kleveland PM, Sørdal ØF. *Helicobacter pylori* and gastric acid: an intimate and reciprocal relationship. *Therapeutic Advances in Gastroenterology.* 2016;9:836-44.
338. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, Wu JY, Kuo CH, Huang YK, Wu DC. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 2015;21:11221.
339. Watari J, Chen N, Amenta PS, Fukui H, Oshima T, Tomita T, Miwa H, Lim KJ, Das KM. *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development. *World J Gastroenterol* 2014;20:5461-5473

340. Whitmire JM, Merrell DS. Successful culture techniques for *Helicobacter* species: verification of *Helicobacter* identity using 16S rRNA gene sequence analysis. *Methods Mol Biol* 2012; 921: 37-40
341. Winter JA, Letley DP, Cook KW, Rhead JL, Zaitoun AA, Ingram RJ, Amilon KR, Croxall NJ, Kaye PV, Robinson K, Atherton JC. A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and *Helicobacter pylori*-induced metaplasia in the stomach. *Journal of Infectious Diseases*. 2014;210:954-63.
342. Wroblewski LE, Peek RM. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2013;42:285-98.
343. Wu Q, Yang ZP, Xu P, Gao LC, Fan DM. Association between *Helicobacter pylori* infection and the risk of colorectal neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis* 2013; 15: e352-e364
344. Yadegar A, Alebouyeh M, Zali MR. Analysis of the intactness of *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in Iranian strains by a new PCR-based strategy and its relationship with virulence genotypes and EPIYA motifs. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;35:19-26.
345. Yahiro K, Hirayama T, Moss J, Noda M. New insights into VacA intoxication mediated through its cell surface receptors. *Toxins*. 2016;8(5):152.
346. Yakoob J, Abbas Z, Jafri W, Usman MW, Jafri F, Awan S. Comparison of the virulence markers of *Helicobacter pylori* and their associated diseases in patients from Pakistan and Afghanistan. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2013;19:211.
347. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37:2274-9.
348. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HM, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*. 2006;55:775-81.
349. Yamaoka, Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *J. Med. Microbiol*. 2008a;57:545-553.
350. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008b;14:4265-72.
351. Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. *Gastroenterology research and practice*. 2012;2012.
352. Yamaoka Y, & Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Future Oncology*, 2014;10:1487-1500.
353. Yeomans ND, Naesdal J. Systematic review: ulcer definition in NSAID ulcer prevention trials. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2008;27:465-72.
354. Yin S, Lan C, Pei H, Zhu Z. Expression of interleukin 1 $\beta$  in gastric cancer tissue and its effects on gastric cancer. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:31.

355. Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, Hanawa T, Kamiya S. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. BMC Microbiol. 2009;9:197.
356. Yong X, Tang B, Li BS, Xie R, Hu CJ, Luo G, Qin Y, Dong H, Yang SM. *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. Cell Communication and Signaling. 2015;13:1.
357. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. BMC gastroenterology. 2008;8:1.
358. Zhang YY, Xia HH, Zhuang ZH, Zhong J. Review article: 'true' re-infection of *Helicobacter pylori* after successful eradication -worldwide annual rates, risk factors and clinical implications. Aliment. Pharmacol. Ther. 2009;29:145-160.
359. Zhang YX, Zhou LY, Song ZQ, Zhang JZ, He LH, Ding Y. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: a prospective serial study. World J Gastroenterol 2015; 21: 2786–92.
360. Zhang RG, Duan GC, Fan QT, Chen SY. Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. World journal of gastrointestinal pathophysiology. 2016;7:97.
361. Zhou C, Ma FZ, Deng XJ, et al. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4. World J Gastroenterol 2008;14:5090-5.
362. Zhu Y, Zhou X, Wu J, et al. Risk factors and prevalence of *Helicobacter pylori* infection in persistent high incidence area of gastric carcinoma in Yangzhong city. Gastroenterology research and practice, 2014. 2014
363. Zullo A, Scaccianoce G, De Francesco V, Ruggiero V, D' Ambrosio P, Castorani L, Bonfrate L, Vannella L, Hassan C, Portincasa P. Concomitant, sequential, and hybrid therapy for *H. pylori* eradication: a pilot study. Clin Res Hepatol Gastroenterol 2013; 37: 647-650

## IX. Научни прояви, свързани с дисертационния труд

### Публикации

- 1 С. Боянова Л, Панов В, **Йорданов Д**, Марковска Р, Марина М, Гергова Г, Иванова К, Панайотов Ст., Митов И. , Кантарджиев Т., Кръстев З. 2008. *Helicobacter pylori* в устната кухина – анализ на резултати от литературата и собствени предварителни проучвания. Хепато-гастроентерол. No.1:3-10.
- 2 С. Boyanova L, **Yordanov D**, Gergova G, Markovska R, Mitov I. Benefits of *Helicobacter pylori cagE* genotyping in addition to *cagA* genotyping. A Bulgarian study. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011;100:529-535  
IF<sub>2011</sub> – 2.09
- 3 С. Markovska R, Boyanova L, **Yordanov D**, Gergova G, Mitov I.. *Helicobacter pylori oipA* genetic diversity and its associations with both disease and *cagA*, *vacA* s, m and i alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;71:335-340  
IF<sub>2011</sub>-2,53
- 4 С. **Yordanov D**, Boyanova L, Markovska R, Gergova G, Mitov I. Significance of *Helicobacter pylori vacA* intermediate region genotyping-a Bulgarian study. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;74:253-257  
IF<sub>2012</sub>-2,53

### Участия в конгреси

- 1К. Боянова, Л, Р Марковска, **Д Йорданов**, Г Гергова, З Спасова, Р Николов, Л Давидков, В Камбуров, Хр Желев, Н Кацаров, Е Лазарова, И Митов. Фактори на вирулентност в щамовете *Helicobacter pylori* и тяхната честота при симптоматични пациенти. 7ми Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфектология на Българската асоциация на микробиолозите. Велико Търново, 08-10.05.2009 г.
- 2К. Боянова Л, **Йорданов Д**, Гергова Г, Марковска Р, Митов И. Асоциация на *iceA* и *babA* генотиповете на *Helicobacter pylori* с характеристиките на щамовете и пациентите. 8ми Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. Пловдив, 22-25.04.2010 г. стр. 22
- 3К. **Йорданов Д**, Боянова Л, Марковска Р, Гергова Г, Митов И. Разпространение на основните фактори на вирулентност на щамове *Helicobacter pylori* според характеристиките на пациентите. (доклад) 8<sup>ми</sup> Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. Пловдив, 22-25.04.2010 г.

- 4К. **Йорданов Д**, Боянова Л, Андреев Н, Гергова Г, Митов И. Динамика на *Helicobacter pylori* инфекцията в България – серопревалиране на *H. pylori* и CagA имуноглобулин G. (доклад) 10ти Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. Пловдив, 26-29.IV. 2012.
- 5К. **Йорданов Д**, Боянова Л, Андреев Н, Гергова Г, Митов И. Влияние на диетични фактори върху *Helicobacter pylori* инфекцията в България – серопревалиране на *H. pylori* и CagA имуноглобулин G. 11<sup>ти</sup> Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. София, 9-11.V. 2013. (доклад)
- 6К. **Йорданов Д**, Боянова Л, Марковска Р, Гергова Г, Митов И. Проучване върху честотата и значението на гена *hnmB* на *Helicobacter pylori* в България. 12<sup>ти</sup> Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. София, 24-26.IV. 2014. (постер)