

Д-р Даниел Валентинов Йорданов

Helicobacter pylori
– фактори на вирулентност,
резистентност и серопревалиране

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност ”Микробиология”

Научни ръководители

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, д.м.н.
Доц. д-р Румяна Донкова Марковска-Давидкова, д.м.

Научно жури:

Проф. д-р Людмила Боянова Георгиева, д.м.н.
Проф. д-р Лена Петрова Сечанова, д.м.
Проф. д-р Енчо Запрянов Савов, д.м.н.
Проф. д-р Ива Стефанова Христова, д.м.н.
Доц. д-р Петър Киров Петров, д.м.

София
2017

Дисертационният труд е представен на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по медицинска микробиология към Медицински факултет, Медицински университет – София на 15.06.2017 г. и е насочен за защита пред Научно жури

Дисертацията съдържа 186 страници и е онагледена с 25 таблици и 19 фигури. Книгописът включва 363 литературни източници, от които 357 на латиница и 6 на кирилица.

Експерименталната работа е извършена в Катедрата по медицинска микробиология, Медицински университет – София.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на г. от ч. в Катедрата по медицинска микробиология, Медицински университет – София. Материалите по защитата са публикувани на сайта на МФ, МУ-София.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФаза	Аденозинтрифосфатаза	ELISA	Ензимно-свързан имуносорбентен тест
БУТ	Бърз уреазен тест	EPIYA	Glu-Pro-Phe-Tyr-Ala мотив
ГЕРБ	Гастроезофагеална рефлуксна болест	EUCAST	Европейска комисия по надзор на изследванията за антибиотична чувствителност
ГТФаза	Гуанозинтрифосфатаза	FISH	Флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизация
ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина	FITC	Флуоресцеин-изотиоцианат
ЗП	Зони на пластичност	<i>iceA</i>	ген, индуциран от контакт с епитела
ЛПЗ	Липополизахарид	IgG	Имуноглобулин G
МКА	Моноклонални антитела	IL	Интерлевкин
МПК (MIC)	Минимална потискаща концентрация	MALT	Свързана с мукозата лимфоидна тъкан
НСПВС	Нестероидни противовъзпалителни средства	MAPK	Митоген-активирана протеинкиназа
pРНК	Рибозомна рибонуклеинова киселина	NHP	не- <i>pylori Helicobacter</i> -видове
СЗО	Световна здравна организация	NF-κB	Нуклеарен фактор κB
ФАТ	Фекален антигенен тест	<i>oipA</i>	Ген за външномембранен инфламаторен протеин
AS-PCR	Алел-специфична полимеразно-верижна реакция	OMP	Външномембранен протеин
<i>babA2</i>	ген, кодиращ адхезин, свързващ кръвногрупов антиген	OR	odds ratio/ съотношение на шансовете
BST	Метод на граничните стойности (Breakpoint susceptibility test)	PBS	Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор
<i>cag</i>	цитотоксин-асоцииран ген	PCR	Полимеразно-верижна реакция
Cag	протеин на <i>cag</i>	PG	Простагландин
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> остров на патогенност	PPI	Инхибитори на протонната помпа
СОХ	Циклооксигеназа	ROC	Receiver operating characteristics
dATP	Дезоксиаденозинтрифосфат	RU	Относителна единица
dCTP	Дезоксицитидинтрифосфат	Th	T-хелпери
dGTP	Дезоксигуанозинтрифосфат	TLR	Toll-like receptor
dNTP	Дезоксинуклеозидтрифосфати	TNFα	тумор-некротизиращ фактор – α
dTTP	Дезокситимидинтрифосфат	T4SS	Тип IV секреторна система
<i>dupA</i>	ген, промотиращ дуоденалните язви	UBT	Уреен дихателен тест
EDTA	Етилендиаминтетраоцетна киселина	VacA	Вакуолизиращ цитотоксин A
EIA	Имуноензимен тест	<i>vacA</i>	Ген за VacA

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 фактори на гостоприемника 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^{ва} 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 съавт. (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 съавт. (1998); Владимирова и съавт. (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.

I. 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.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Пациенти и бактериални изолати

1.1. Бактериални изолати /биопсии/

В проучването бяха включени последователно 479 *H. pylori* изолата 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/. 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 кухня/

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 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 **бърз уреазен тест (БУТ)**. Последната част се използваше за посевка.

При изолата от устна кухня беше допълнително проведена имунофлуоресцентната микроскопия с 4 моноклонални антитела (МКА) (121F3, 122E9, 123B11 и 161 F8) произведени в Катедра медицинска микробиология, Медицински университет-София.

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

2.1. Екстракция на ДНК

Беше използвана термоекстракция.

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

2.2.1. Видова идентификация чрез PCR

За доказване на *H. pylori* беше използвана PCR за специфичния за този бактериален вид ген за уреаза - *ureA*.

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).

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) Допълнително статусът на *cagA* беше определен и посредством амплификация по метода описан от Broutet *et al.* (2001)

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

За доказването на *cagE* бяха използвани праймери от литературата (Tomasini *et al.*, 2003) При 150 ДНК-екстракта бяха използвани и праймери, публикувани от Olberman *et al.*, (2010)

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

Използваха се протоколи според Olbermann *et al.* (2010).

Отсъствието на острова на патогенността *cagPAI* (empty site) беше доказвано посредством PCR с използване на праймери от публикувана литература (Olbermann *et al.*, 2010).

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

Генотипирането на *iceA* алелите *iceA1* и *iceA2* беше посредством праймери, описани от Yamaoka *et al.* (1999).

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

Използваха се праймери от публикувана литература (Podzorski *et al.*, 2003).

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

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 *hotA* и *hotB*, кодиращи външномембранни протеини

За детекция на двата *hot* гена, които имат 90% хомоложност, се използваха една и съща двойка праймери, избрани от публикуваната литература (Oleastro *et al.*, 2006).

2.2.10. Детекция чрез PCR на гена за гликозилтрансфераза *jhp0562* Използваха се праймери от публикувана литература (Oleastro *et al.*, 2010).

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

За детекция на гена на вирулентност *oipA* 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 (Kauser et al., 2005b). 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, местоживееене (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. *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).

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).

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).

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

Методът на граничните стойности беше използван за определяне на чувствителността към clarithromycin (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, USA) и metronidazole (SigmaAldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

Категориите на щамовата чувствителност бяха определени с граничните стойности на EUCAST за *H. pylori* и преди използваните гранични стойности (PBP). 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 ≥ 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 детекция на точковата мутация A2142C беше проведена 3'-mismatched PCR с използване на праймери, описани от 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 някой от изследваните гени. 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

Тестът за независимост χ^2 и екзактният тест на Fisher 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.

Беше използвана логистична регресия при 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.

III. 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 *H. pylori*, даващи положителен бърз уреазен тест, 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).

Смесени инфекции бяха доказани при 5,8% (28 изолата). Останалите 451 изолата (94,2%) бяха от инфекции с единичен щам *H. pylori* и те бяха включени в последващите проучвания. Разпределението на *H. pylori* изолирани от пациенти с инфекция от единичен щам според годината на изолиране е както следва: 2005 г. – 7 изолата; 2006 г. - 32 изолата; 2007 г. -12 изолата, 2008 г. -73 изолата; 2009 г. – 115 изолата; 2010 г. – 46 изолата; 2011 г. 34 изолата; 2012 г. – 33 изолата; 2013 г. – 10 изолата; 2014 г. – 61 изолата и 2015 г. – 28 изолата.

Някои от характеристиките на пациентите, от които са изолирани *H. pylori* от инфекции с единичен щам са представени на Таблица 1.

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, ($P<0,0001$).

Таблица 1. Характеристики на пациентите, инфектирани с единичен щам *H. pylori*:

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

* За 81 пациента липсваха данни за местожителството им.

** За 120 пациента липсваха данни за предшестващо лечение

1.2 Бактериални изолати /устна кухня/

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).

2. Определяне на фактори на вирулентност

2.1 Екстракция на ДНК

От всички 479 изолата беше екстрахирана ДНК, като продуктите на екстракциите бяха доказани чрез електрофореза в агарозен гел.

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

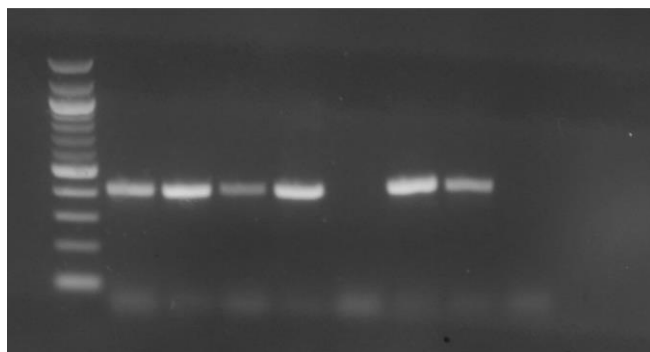
2.2.1. Доказване на ген, кодиращ уреаза (*ureA*)

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 биопсичния 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.

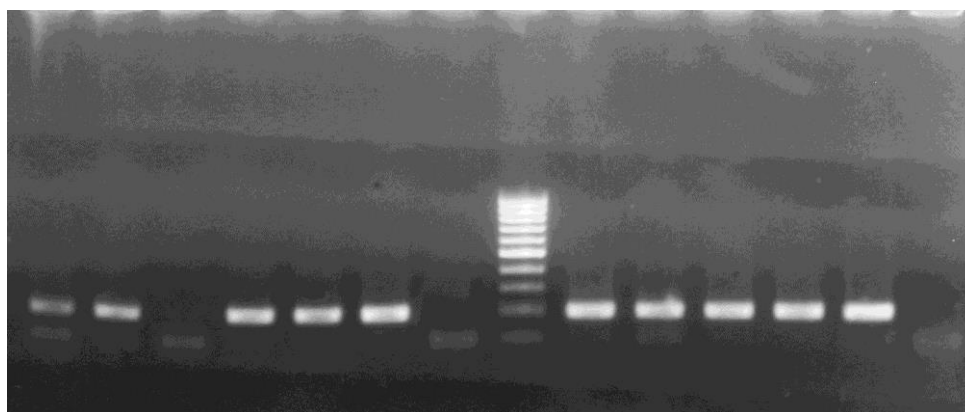


Фиг. 1. Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *ureA* (411 bp)

2.2.2. Детекция на мозаичните алели на гена *vacA*

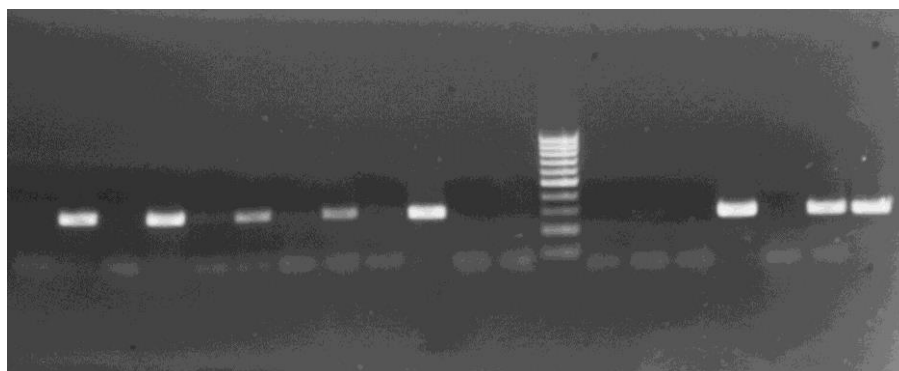
От изследваните 479 изолата 451 (94,2%) бяха от инфекции с единичен щам *H. pylori*, а 28 (5,8%) бяха доказани като смесени инфекции въз основа на едновременно присъствие на алтернативни алели на *vacA*. Честотата на смесените инфекции (5,8%) беше сравнително ниска в сравнение с данните, публикувани в други държави (0–41%, най често 10–18%) (El Khadir *et al.*, 2017; 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: 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. 2. PCR детекцията на алелите на *vacA* е показана на Фиг. 2 – *vacA* s1a и Фиг. 3 – *vacA* m1, Фиг. 4 *vacA* m2 и Фиг. 5 – *vacA* i1.



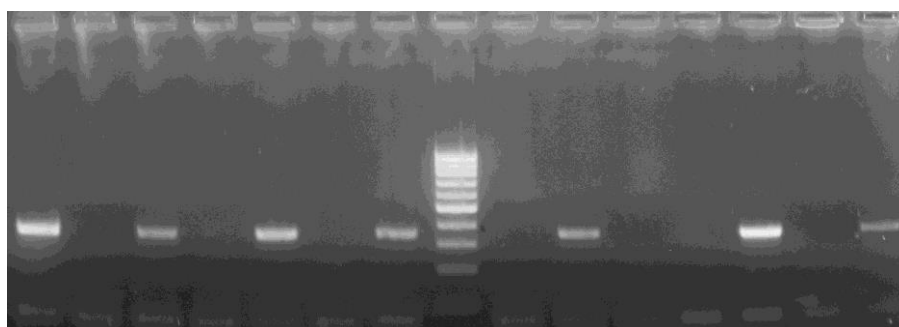
Фиг. 2. Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *vacA* s1a (190 bp)

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

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

Всички изолати 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; Erzini *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).

Пациентите с пептични язви по-често имаха щамове с тип *vacA s1a*, отколкото тези с неязвени заболявания (90,4%, 104 от 115 случая, спрямо 79,2%, 266 от 336; **P=0,007**) – Таблица 2. *vacA s1b*, и *vacA s2* бяха редки генотипове и се откриваха при пациенти с неязвени заболявания.

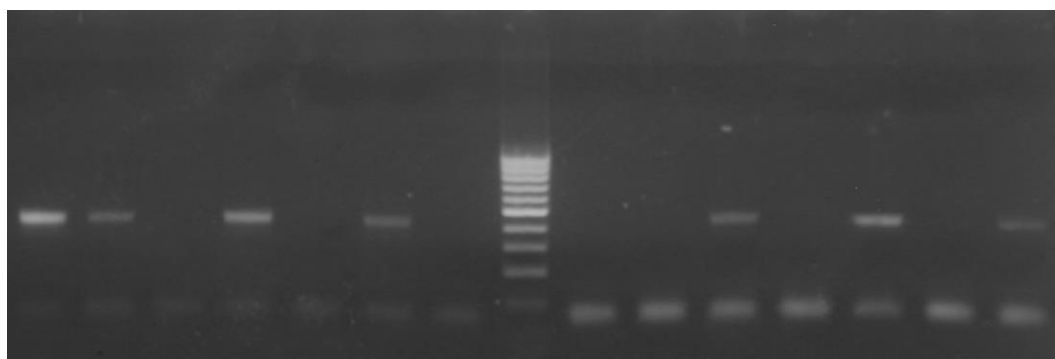
Установихме по-висока честота на *m1* алела при пациентите с язвени заболявания – Таблица 2.

Таблица 2. 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	90,4	266	79,2	P=0,007	370	82,0
<i>vacA s1b</i>	-	-	8	2,4	NS	8	1,8
<i>vacA s2</i>	11	9,6	62	15,8	P=0,026	73	16,2
<i>vacA i1</i>	94	81,7	189	56,3	P<0,0001	283	62,7
<i>vacA i2</i>	21	18,3	145	43,7	P<0,0001	168	37,3
<i>vacA m1</i>	58	50,4	123	36,6	P=0,005	181	40,1
<i>vacA m2</i>	57	49,6	213	63,4	P=0,005	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- не-сигнификантна разлика

vacA i1 беше със сравнително висока честота сред българските щамове *H. pylori*. 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 силно се различават от тези в Турция, въпреки географската близост (Chung *et al.*, 2010).



Фиг. 5. 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). 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.

Честотата на алелните комбинации на *vacA* при 451 изолата *H. pylori* от пациенти с пептични язви и с неязвени заболявания са представени в Табл. 3. 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 3. 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	47,8	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	25,0	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	15,2	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* щама (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, El Khadir *et al.*, (2017) 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 щамовете 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.

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 щамове (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 3). 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 срещат с по-висока честота. От друга страна *vacA* s1/i2/m2 генотипът се срещаше по-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 пола на пациента.

Честотата на **нисковирулентния генотип *vacA* s1a/i2/m2** беше по-висока при изолати от жени (26,5%), отколкото при мъже (17,6%), ($p=0,021$), което може да обясни, поне частично, по-високата честота и по-тежката клиника на гастродуоденални заболявания (напр. язва на дванадесето-

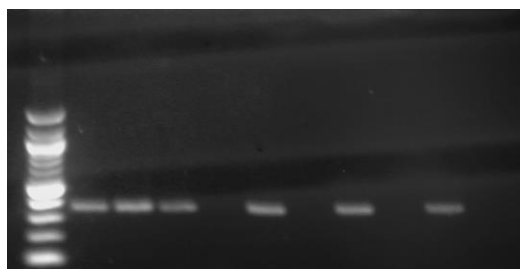
пръстника) при мъжете, отколкото при жените, както се съобщава в някои проучвания (Feinstein *et al.*, 2010).

Не беше устоновена 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 по-добър предиктор за наличието на вирулентни щамове *H. pylori*. Наличието на висок процент на високо вирулентната комбинация *vacA (s1a/m1/i1)* при българските *H. pylori* изолати 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. 6. Всички *cagA*⁻ и 30 *cagA*⁺ 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*⁺ изолата. При последващата амплификация на ДНК-екстракти от останалите 93 изолата *H. pylori* с двойката праймери A3-A4, като *cagA*⁺ статус беше доказан в още определени още 10.8% от тях (10 случая). Така общият брой на *cagA*⁺ изолатите в настоящото проучване беше **368 (81,6%)**.

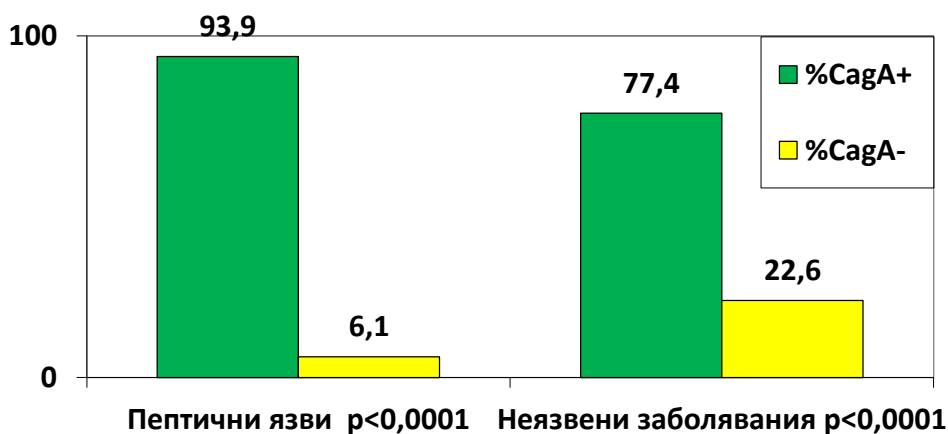


Фиг. 6. Електрофоретично доказване на продукт от PCR за *cagA* (352 bp)

За клиниката е от особена важност да се извършва надеждна детекция на *cagA* статуса на щамовете *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 А1-А2) с 12%, когато се използва и втори чифт праймери (А3-А4). Подобни резултати получихме и в настоящото проучване; използването на праймерите А3-А4 (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 препоръча използването на втори чифт праймери (А3-А4) за гена *cagA*, особено в страни като България, където има висока честота на *cagA*⁺ щамове.

Изолатите от пациенти с пептични язви по-често бяха *cagA*⁺ (93,9%; 108 от 115 случая) спрямо 77,4% при останалите пациенти (260 от 336 случая; P<0,0001) (Фиг. 7). 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. 7. Честота на *cagA*⁺ изолати при пациенти с язвени и неязвени заболявания.

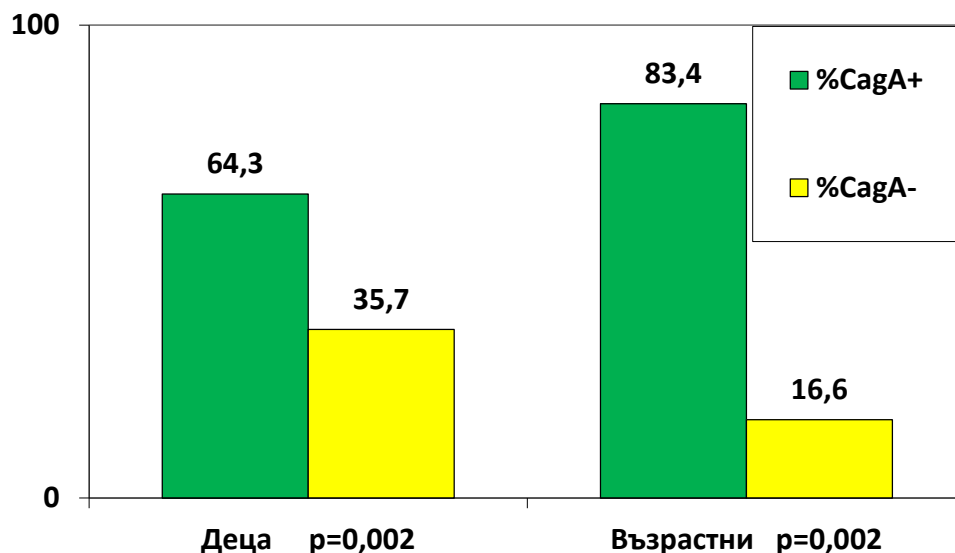
Подобни резултати с висока честота на *cagA*⁺ щамове при тежка гастроинтестинална патология са съобщавани често (Megraud & Lehours, 2007; El Khadir *et al.*, 2017). Други проучвания, обаче, не са откривали разлика в честотата на *cagA* сред пациентите с язвена и с неязвена патология (Dabiri *et al.*,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

cagA-положителните щамове *H. pylori* често са свързвани 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*⁺ 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 и Турция (Apostolopoulos *et al.*, 2002; Ozbey *et al.*, 2013; Krashias *et al.*, 2013; Uchida *et al.*, 2015).

Не се наблюдаваше значима разлика в честотата на *cagA* при двата пола. *cagA*⁺ 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*⁺ *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*⁺ *H. pylori*, изолирани от деца (64,3%; 27 от 42 случая) в сравнение с възрастни (83,4%; 341 от 409 случая) – Фиг. 8.



Фиг. 8. Честота на *cagA*⁺ изолати при деца и възрастни.

Инфекциите с щамове тип I (*CagA*⁺/*VacA*⁺) 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*⁺ щамовете (Chung *et al.*, 2010). Chung *et al.* (2010) са открили подобна връзка - наличие на *cagA*⁺, *vacA* s1 и *vacA* i1 изолати при болни с пептични язви в Китай, Уругвай и САЩ, като единственото изключение са пациентите в 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*⁺ изолатите (336 от 368 случая), спрямо само 34 от 83 *cagA*⁻ изолатата (41,0%; P<0,001). *vacA* i1 също беше доказан по-често при *cagA*⁺ изолати *H. pylori* (272 случая; 73,9%); за сравнение само 11 от 83 *cagA*⁻ изолатата

притежаваха алела *vacA* i1 (13,3%; $P < 0,001$). Също толкова значима е разликата в честотата на *vacA* m1 – 47,0% при *cagA*⁺ изолатите (173 случая) спрямо 9,6% при *cagA*⁻ (8 случая), ($P < 0,001$). **Комбинацията от най-вирулентните алели *vacA* s1a/i1/m1 се срещаше в 42,9% от всички *cagA*⁺ изолати *H. pylori* (158 от 368 случая), и само при 5 от 83 случая с *cagA*⁻ (6,0%; $P < 0,001$).**

Тези много вирулентни изолати *H. pylori* с генотип *cagA*⁺/*vacA* s1a/i1/m1 се срещаха 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, изолатите *H. pylori* с *cagA*⁻ генотип показаха връзка с по-слабо вирулентните алели на *vacA* – s2, i2 и m2, както и с тяхната тройна комбинация. При 83 *cagA*⁻ 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*⁻ изолати *H. pylori* (45 от 83 случая), докато в случаите на *cagA*⁺ 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, изолатите *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*⁺/*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*⁺ *H. pylori*, изолирани от деца (64,3%) в сравнение с възрастни (83,4%).

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

cagE 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), въпреки че резултатите от различни проучвания по света са противоречиви - в Турция само *cagE* е определен като рисков фактор (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 шам, изследвани с PCR, *cagE*-положителните (*cagE*⁺) бяха 282 (62,5%). От тях 279 бяха *cagA*⁺/*cagE*⁺, а само при 3 изолата беше доказан *cagA*⁻/*cagE*⁺ генотип, т.е. между *cagA* и *cagE* беше доказана силна връзка ($P < 0,0001$). *cagE*⁻ бяха 169 изолата (37,5%), от които 89 с генотип *cagA*⁺/*cagE*⁻, а 80 – с *cagA*⁻/*cagE*⁻ (Табл. 4).

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).

Таблица 4. 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	%		брой	%
<i>cagE</i> ⁺	89	77,4	193	57,4	P=0,0001	282	62,5%
<i>cagE</i> ⁻	26	22,6	143	42,6	P<0,0001	169	37,5
<i>cagA</i> ⁺ / <i>cagE</i> ⁺	89	77,4	190	56,5	P<0,0001	279	61,9%
<i>cagA</i> ⁺ / <i>cagE</i> ⁻	19	16,5	70	20,8	NS	89	19,7
<i>cagA</i> ⁻ / <i>cagE</i> ⁻	7	6,1	73	21,7	P=0,0002	80	17,7
<i>cagA</i> ⁻ / <i>cagE</i> ⁺	-	-	3	0,9	NS	3	0,7

NS- несигнификантна разлика

Изолатите 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), докато 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 изолатата. 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 бил 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*⁺/*cagE*⁺), отколкото при възрастните (съответно 65,0%; 268 от 409 случая за *cagE*⁺ и 69,0% - 266 случая за *cagA*⁺/*cagE*⁺), като и в двата случая $P < 0,0001$. Освен това, при изолатите от деца генотипът *cagA*⁺/*cagE*⁻ 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*⁻/*cagE*⁻ - (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 най-възрастните 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 по-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*

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

Разпределението според диагнозата на пациентите беше:

- с неязвени заболявания – 92 пациента (78,6%), а с пептични язви – 25 пациента (21,4%).

Честотата на *cagPAI* гените при язвено и неязвено болни са показани на Таблица 5.

Таблица 5. 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	100,0	73	79,3	0,012
<i>cagE</i>	83	70,9	22	88,0	61	66,3	0,046
<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	100,0	77	83,7	0,038
<i>cagY</i>	90	76,9	21	84,0	69	75,0	>0,05
<i>Caga</i>	99	84,6	25	100,0	74	80,4	0,012
<i>CagY</i>	99	84,6	25	100,0	74	79,8	0,012
<i>Cagδ</i>	99	84,6	24	96,0	75	81,5	>0,05
Empty site¹	15	12,8	0	0,0	15	16,3	0,038

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

Ако гените на острова се разгледат поотделно, значимо по-висока е честотата при язвено болни на *cagY*, *caga*, *cagW*, *cagA* и *cagE*.

Всички пациенти с липсващ остров на патогенност с наличие на empty site, бяха с неязвени заболявания (15 от 92 случая; 16,3%), докато никой от 25-те изолати 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 изолати (53,3%) не се доказа нито един от гените от *cagPAI*. При 6 изолати (40,0%) беше доказано наличие на само един от изследваните гени на *cagPAI*, а при един изолат (6,7%) се доказаха два от изследваните гени от *cagPAI*.

Всичките 9 изследвани гена от *cagPAI* (*cagA*, *cagE*, *cagM*, *cagT*, *cagW*, *cagY*, *caga*, *cagY*, *cagδ*) бяха позитивни при **75 изолати (64,1%)**.

При 15 изолати (12,8%) бяха налице всички изследвани гени от *cagPAI*, освен един, а при 5 изолати (4,3%) липсваха 2 от гените в *cagPAI*. При останалите 7 изолати, 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 интактността на *cagPAI* (Olbermann, 2010). При такива щамове авторите установяват секреция на IL-8 – тоест наличие на възпалителна реакция (Olbermann, 2010).

Изолатите 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 изолати 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. 6).

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 6. 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>CagY</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 щамове от Западните страни, и в почти всички (често >90%) изолати 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 интактноста на острова на патогенност по-скъп и трудоемък метод. По-голяма прецизност би могла да се постигне, ако се изследва влиянието на изолати 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 изолати 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 САТG-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 гастро-езофагеална 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*.

iceA1 при изолати от пациенти с пептични язви се изолираше с честота 77,6% (45 от 58 случая), докато при изолатите от пациенти с неявна 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 7 .

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 неявна 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 неявени заболявания; аналогично комбинацията *iceA1/cagA⁺* беше открита при 72.4% от пациентите с язви спрямо 55.9% ($P=0.035$) при останалите (Табл. 7). Вероятно това се дължи на наличието на вирулентните *vacA s1* и *cagA⁺* алели.

Най-вирулентната комбинация *iceA1/cagA⁺/vacA s1/ml* 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, $P = 0,96$) от изолати от пациенти с неявна диспепсия. Данните от настоящия труд не могат да подкрепят значимостта на *iceA1* алела за по-тежко развитие на заболяването.

Таблица 7. 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
<i>iceA1/cagA</i> ⁺	108	61,4	42	72,4 (P=0,035)	66	55,9
<i>iceA1/vacA s1</i>	115	65,3	44	75,9 (P=0,04)	71	60,2
<i>iceA1/vacA s1a</i>	115	65,3	44	75,9 (P=0,04)	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> ⁺ / <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.

Настоящото проучване откри преваляване 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%) (Noman *et al.*, 2009). 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* превалява 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 изолати 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 ≤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 щамовете 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 попада в границите на статистическата значимост ($P = 0,059$). Честотата (48,8%, 79 от 162 изолата) на *babA2*-положителните изолати 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 са представени в Табл. 8: *babA2* често е бил свързан с *vacA s1* и *cagA* (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 тях бяха и *cagA*⁺, а 72,2% (57 случая) бяха и с *iceA1* генотип.

Таблица 8. 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
<i>babA2/vacA m1</i>	34	21.0	18	33.3 (P = 0,006)	16	14.8
<i>babA2/vacA m2</i>	45	27.8	14	25.9	31	28.7
<i>babA2/iceA1</i>	57	35.2	26	48.1 (P = 0,015)	31	28.7
<i>babA2/iceA2</i>	22	13.6	6	11.1	16	14.8
<i>babA2/cagA⁺/vacA s1/m1</i>	34	21.0	18	33.3 (P = 0,006)	16	14.8

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, $P = 0,015$).

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 s1*, 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⁺* (**P = 0,118**). Въпреки това **генотипът *babA2/cagA⁺/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⁺/vacA s1/m1*.

babA2 не беше свързан нито 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*. Този ген 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. Щамовете 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 щамовете 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)

В настоящия дисертационен труд гените *jhp0917* и *jhp0918* бяха изследвани при 192 изолата *H. pylori* от инфекция с единичен щам. *dupA⁺* 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.

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;).

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. 9.

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). 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 изолати според пола и възрастта на пациентите (Табл. 9).

Таблица 9. Честота на *dupA* според профила на пациентите

Група пациенти	брой изследвани изолати	<i>dupA</i> ⁺	<i>dupA</i> ⁻
<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%)
Общо	192	66 (34,4%)	126 (65,6%)

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 изолати 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*⁺ 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 външномембранни протеини

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

Най-проучваният ген от семейството *Hom* от външномембранни 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%. Сходни честоти на двата *hom* гена са открити в страни от Западна Европа и в Иран (Oleastro *et al.*, 2009b; Talebi Bezmin Abadi *et al.*, 2011). 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* превалява 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 10 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 местоживееенето на пациентите, нито с клиничната проява на инфекцията с *H. pylori*.

Таблица 10. Честота на *homA* и *homB* в зависимост от характеристиките на пациентите.

Пациенти	Брой щамове	<i>homA</i> ⁺ щамове (n=85)		<i>homB</i> ⁺ 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
Общо	169	85	50,3	84	49,7

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 (Hussein, 2011), и Словения (Šterbenc *et al.*, 2012). Подобни находки са съобщавани още от Kang *et al.* (2012) сред корейски изолати, които също така отбелязват, че връзката на *homB* с тежестта на гастродуоденалната патология зависи силно от географския произход на изолатите (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 са ясни и не е известен неговият рецептор в клетките на гостоприемника (Oleastro & Ménard, 2013).

Таблица 11 показва честотата на *sagA* и мозаичните гени *vacA* и техните връзки с *homA* и *homB*. Алелите *vacA s1a* и *i1* бяха значимо по-чести сред *homB*⁺ 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*⁺ щамове). Логично, *vacA s2* и *i2* бяха по-чести при *homA*⁺ (съответно 24,7% за *vacA s2* и 48,2% за *vacA i2*), отколкото при *homB*⁺ 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*⁺ щамове (46,4% спрямо 31,8%), докато *vacA m2* преваляваше при *homA*⁺ щамове (68,2% спрямо 53,6%), но тези разлики не бяха достатъчно статистически значими (P=0,05). Също така честотата на *sagA* беше по-висока сред *homB*⁺ щамове (81,0% спрямо 76,5% при *homB*⁻), но тази разлика не беше статистически значима (p>0,05).

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 Bezman Abadi *et al.*, 2011), което предполага, че *homB* е поне ко-фактор на вирулентност за *H. pylori*.

Таблица 11. Честоти на *cagA* и *vacA* сред *homA*⁺ и *homB*⁺ 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> ⁺ (n=85)	65	76.5	61	71.8	21	24.7	27	31.8	58	68.2	44	51.8	41	48.2
<i>homB</i> ⁺ (n=84)	68	81.0	74	88.1	8	9.5	39	46.4	45	53.6	63	75.0	21	25.0
p		>0.05		0.008		0.009		0.05		0.05		0.002		0.002

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 изолати *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 12 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 β -(1,3)*galT*. Генът *jhp0562* е разположен точно преди β -(1,3)*galT* и е наличен в много, но не всички щамове *H. pylori*. *jhp0562* е хомоложен на β -(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).

Генът *jhp0562* не показва статистически значима разлика в честотата си в зависимост от пола, възрастта и клиниката на пациента. 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*.

Таблица 12. Честота на *jhp0562* според характеристиките на пациентите

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

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 щама *H. pylori* бяха *cagA*-позитивни. Честотата на *jhp0562* сред *cagA*-позитивните щамове беше 56,1% (55 щама), а сред *cagA*-отрицателните щамове тази честота беше 43,5% (10 от 23 *cagA*-отрицателни щама). **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 за 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 външно-мембранен протеин

На случаен принцип бяха избрани и изследвани общо 69 щама, изолирани в периода 2008 г. до 2010 г. 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).

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). 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 изолатите с с интактен *cagPAI* имат 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 (Dossymbekova et al., 2006; Yamaoka, 2012; Odenbreit et al., 2009). Щамовете *H. pylori* показват голямо разнообразие според географския регион. 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 „включен“ статус); което предполага, че тази промяна е част от еволюционен механизъм на бактериите целящ предотвратяване на „изключването“ (Miftahussurur & Yamaoka, 2015).

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 13).

Най-честият статус със запазена рамка на четене и „включено“ състояние беше този с 6 СТ повтор, 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 повтор. В настоящото проучване щамовете бяха с повече от 5 СТ повтор в

5' региона на *oirA*, което е специфично за европейските щамове (Kausser *et al.*, 2005a).

Честотата на *cagA*⁺ щамове беше 84%; тази на *vacA* s1 и s2 беше съответно 81% и 19%; на m1 и m2 беше съответно 42% и 58%, а на i1 и i2 беше съответно 66% и 34%.

Най-силна беше връзката между „включения“ статус на *oirA* със запазена рамка на четене и пептичните язви (P=0.001), като не се установи значима връзка с пола, възрастта и местоживеенето на пациентите (Таблица 14). Установена беше значима асоциация между „включения“ функционален статус на *oirA* и наличието на *cagA* (P<0,001) или алела *vacA* s1 (P<0,001), както и с наличието на генотиповете *vacA* m1 (P=0,005) или *vacA* i1 (P<0,001). Честотите на комбинациите от гени са представени в Таблица 15.

Таблица 13. Честота на моделите на СТ динуклеотидни повтори при *oirA*

Секвенция на сигнално-пептидният кодиращ регион на <i>oirA</i>	Брой СТ повтори	Брой изолати
„включено“ състояние		
ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAA	6	39
M K K A L L L T L S L S F W L H A E		
ATGAAAAAAGCCCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAA	9	6
M K K A L L L T L S L S L S F W L H A E		
ATGAAAAAAGCTCTCTTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAA	5+	2
M K K A L L L S L S L S F W L H A E	2	
ATGAAAAAAGTTCTATTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTTTGGCTCCACGCTGAA	8	5
M K K V L L L S L S L S F W L H A E		
ATGAAAAAAGCTCTTTTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTTTGGCTCCACGCTGAA	8	4
M K K A L L L S L S L S F W L H A E		
„изключено“ състояние		
ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCACGCTGAAAAGGAATGGATTTTATTAG	7	6
M K K A L L L T L S L S R S G S T L K G M D F I *		
ATGAAAAAAGCTCTCTTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTCTGGCTCCATGCTGA	7	3
M K K A L L L S L S L V L A P C *		
ATGAAAAAAGCTCTCTTACTAACTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTTTGGCTCCACGCTGA	8	2
M K K A L L L T L S L S L V L A P R *		
ATGAAAAAAGCTCTCTTACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGTTTTGGCTCCACGCTGAAAAGGAGTGGATTTTATTAG		
M K K T L L L S L S L S R F G S T L K G V D F I *	9	2

Легенда: * - стоп-кодон

Щамовете с най-вирулентни комбинации, т.е. *cagA*⁺ 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 *oirA*. Около две трети от тях бяха изолирани от пациенти с пептични язви. Почти всички (9 от 10) щамове с *cagA*⁻/*vacA* s2/m2/i2 генотип показаха „изключен“ функционален статус на *oirA* и бяха изолирани от пациенти с хроничен гастрит. Интересно е, че един

щам с генотип *cagA*⁻/*vacA* s2/m2/i2 и „изключен” функционален статус на *oipA* беше изолиран от пациент с дуоденална язва. Вторият по честота генотип беше *cagA*⁺/*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.

Таблица 14. 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	Брой изолати	Брой изолати с включен статус на <i>oipA</i> (%)	Брой изолати с изключен статус на <i>oipA</i> (%)	P	Генотип	Брой изолати	Брой изолати с включен статус на <i>oipA</i> (%)	Брой изолати с изключен статус на <i>oipA</i> (%)	P
<i>Заболяване</i>					<i>cagA</i>				
Пептична язва	34	33 (97%)	1 (3%)	0,001	<i>cagA</i> ⁺	58	54 (93%)	4 (7%)	<0,001
Неязвено заболяване	35	23 (66%)	12 (34%)		<i>cagA</i> ⁻	11	2 (18%)	9 (82%)	
<i>Пол</i>					<i>vacA</i>				
Мъжки	46	37 (80%)	9 (20%)	0,83	<i>vacA</i> s1	56	54 (96%)	2 (4%)	<0,001
Женски	23	19 (83%)	4 (17%)		<i>vacA</i> s2	13	2 (15%)	11 (85%)	
<i>Възраст</i>					<i>vacA</i> m1				
8-17 г.	4	2 (50%)	2 (50%)	0,19	<i>vacA</i> m2	29	28 (97%)	1 (3%)	0,005
18-65 г.	46	38 (83%)	9 (17%)	0,24	<i>vacA</i> i1	40	27 (68%)	12 (32%)	0,005
66-81 г.	12	10 (83%)	2 (17%)	1,00	<i>vacA</i> i2	41	38 (93%)	3 (7%)	
<i>Местоживеене</i>									
София	40	32 (80%)	8 (20%)	1,00					
Провинция	29	24 (83%)	5 (17%)						

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

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 изолати 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.

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).

Таблица 15. 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</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1a m1 i1	24	23	1	15 (63)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1a m1 i2	2	2	0	2 (100)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1a m2 i1	16	15	1	11 (69)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1a m2 i2	9	8	1	4 (44)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1a m2	2	2	0	0 (0)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s1a m1	3	3	0	0 (0)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s2 m2 i1	1	0	1	1 (100)
<i>cagA</i> ⁺ / <i>vacA</i> s2 m2 i2	1	0	1	0 (0)
<i>cagA</i> ⁻ / <i>vacA</i> s2 m2 i2	10	1	9	0 (0)
<i>cagA</i> ⁻ / <i>vacA</i> s1a m2 i2	1	1	0	1 (100)

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 (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. 14). Генотиповете *cagA*⁺, *vacA* s1, m1 и i1, и „включеното” функционално състояние на *oipA* всички бяха силно свързани с наличието на пептична язвена болест (Табл. 15). Важна находка е, че повечето щамове с генотип *vacA* i1 (93%) съдържат и „включен” *oipA*, който се среща при само 57% от изолатите 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).

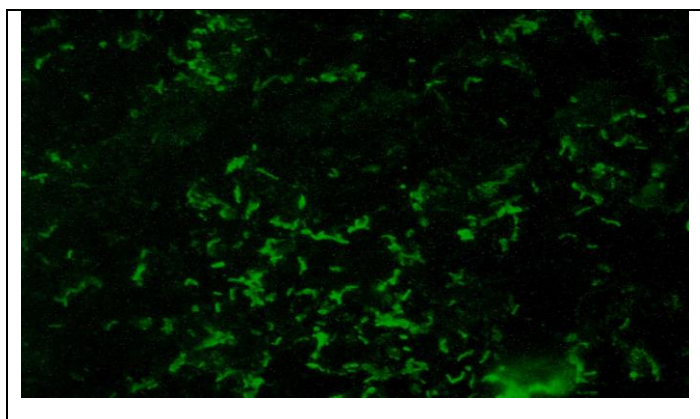
В заключение, високата честота на гена *oipA* с включен функционален статус (81%) беше свързана значимо с наличието на пептични язви, както и с генотиповете *cagA*⁺, *vacA s1, m1* и, особено важно - с *vacA i1*, което е индикатор за силен синергизъм между факторите на вирулентност на *H. pylori* в патогенезата 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 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 бактерия, който не растеше на аеробната контрола, което е типично за *H. pylori*.



Фиг. 9. Имунофлуоресценция на *H. pylori*

Изолатът даде положителен резултат за имунофлуоресценция (Фиг. 9) 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 16). PCR за мозаичните алели на *vacA* показва, че изолатът е с по-вирулентния генотип *vacA* s1.

Таблица 16. 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.

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 cefuroxime.

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). 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

Честотата на *H. pylori* IgG в 294 изследвани серума беше 72,4% (213 случая), а CagA IgG се откриха в 145 случая (49,3%). По-подробно резултатите са представени в Таблица 17.

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 среща 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 среща 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 17. 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	82,9*	P=0,018	44	57,9	NS
Възраст (години)								
18-30	75	25,5	40	53,3*	P<0,001	24	32,0*	P=0,006
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	59,1*	P=0,043	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	53,7*	P=0,001	13	31,7*	P=0,007
Образование на бащата								
основно или по-ниско	96	32,6	82	85,4*	P=0,001	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	25,0*	P=0,001
Вид професия ¹ (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	79,3*	P=0,027	65	53,7	NS
Местоживеене през детството								
София	131	44,6	85	64,9	NS	61	46,6	NS
провинция	163	53,4	128	78,5*	P=0,009	84	51,5	NS

¹Броят 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 показваха, 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%). Само че, 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.

Серопревалирането на *H. pylori* IgG и CagA IgG при 294 безсимптомни кръводарители в зависимост от приема на някои диетични фактори е представено на Таблица 18.

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. 18.

Логистичният регресионен анализ показа 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. 19). 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. 9).

Логистичният регресионен анализ показа по-нисък риск от инфекция с *H. pylori* при индивиди които често консумират пчелен мед (≥ 5 дни седмично), (OR, 0,68; 95% CI, 0,473-0,967) в сравнение с останалите индивиди (Таблица 20). 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. 11).

Таблица 18. Серопревалиране на *H. pylori* IgG и CagA IgG при 294 безсимптомни кръводарители в зависимост от приема на някои диетични фактори.

Диетичен фактор	Общ брой	<i>H. pylori</i> IgG		CagA IgG	
		n	%	n	%
<i>Тютюнопушене</i>					
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
<i>Алкохол</i>					
Не	85	62	72.4	44	51.8
≤3 дни/седм.	163	120	73.2	81	67.5
>3 дни/седм.	46	31	67.4	20	43.5
<i>Кафе</i>					
Не	35	21	60.0	13	37.1
≤5 дни/седм.	30	23	76.7	16	53.3
>5 дни/седм.	229	169	73.8	116	50.7
<i>Сурови плодове</i>					
Не	13	10	76.9	9	69.2
≤5 дни/седм.	70	51	72.9	39	55.7
>5 дни/седм.	211	152	72.0	97	46.0
<i>Сурови зеленчуци</i>					
Не	7	4	57.1	5	71.4
≤5 дни/седм.	90	68	75.6	50	55.6
>5 дни/седм.	197	141	71.6	90	45.7
<i>Зелен чай</i>					
Не	221	162	73.3	112	50.7
≤5 дни/седм.	55	40	72.7	26	47.3
>5 дни/седм.	18	11	61.1	7	38.9
Общо	294	213	72.4	145	49.3

Диетичен фактор	Общ брой	<i>H. pylori</i> IgG		CagA IgG	
		n	%	n	%
<i>Пчелен мед</i>					
Не	95	69	72.6	52	54.7
≤5 дни/седм.	125	99	79.2	67	53.6
>5 дни/седм.	74	45	60.8*	26	35.1*
<i>Зехтин</i>					
Не	171	126	73.7	87	50.8
≤5 дни/седм.	70	54	77.1	37	52.9
>5 дни/седм.	53	33	62.3	21	39.6
<i>Суров чесън</i>					
Не	63	46	73.0	37	58.7
≤5 дни/седм.	165	120	72.7	77	46.7
>5 дни/седм.	66	47	71.2	31	47.0
<i>Суров лук</i>					
Не	65	44	67.7	33	50.8
≤5 дни/седм.	153	116	75.8	75	49.0
>5 дни/седм.	76	53	69.8	37	48.7
<i>Червено вино</i>					
Не	132	95	72.0	69	52.3
≤5 дни/седм.	109	83	76.1	52	47.7
>5 дни/седм.	53	35	66.0	24	43.4
<i>Кисело мляко</i>					
Не	21	14	66.7	10	47.6
≤5 дни/седм.	164	124	75.6	91	55.5
>5 дни/седм.	109	75	68.8	44	40.4*

*Статистически значима разлика (P<0,05)

Таблица 19. Рискови фактори за наличие на CagA IgG при 294 здрави български кръводарители, потвърдени от логистичен регресионен анализ

Исходна променлива:	експозиционна (независима) променлива	B ¹	SEM ²	p	OR	95% CI за OR ³
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

¹B, регресионен коефициент на логистичната регресия.

²SEM, стандартна грешка на средната на регресионните коефициенти.

³95% CI (доверителен интервал) за OR (odds ratios) [Exp(B)]

Фиг. 10. ROC крива за логистично-регресионен модел за рискови фактори (възраст, консумация на кисело мляко и консумация на пчелен мед) за честота на CagA IgG.

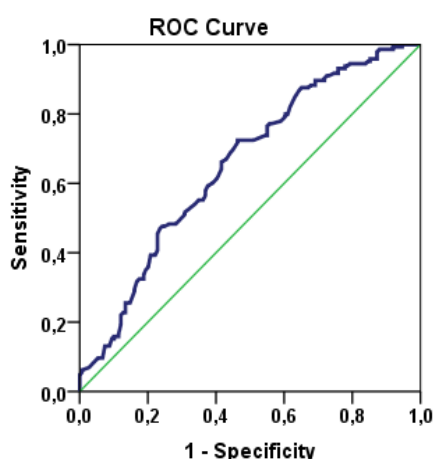


Таблица 20. Рискови фактори за наличие на *H. pylori* IgG при 294 здрави български кръводарители, потвърдени от логистичен регресионен анализ

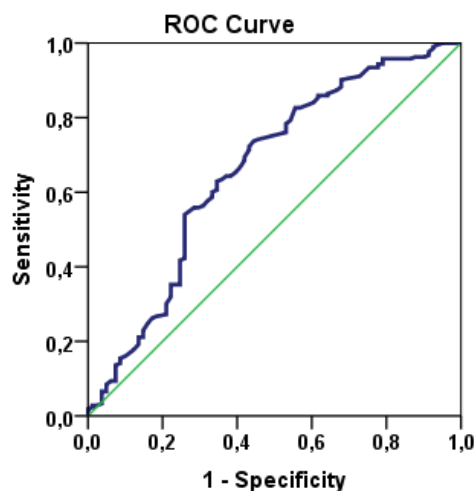
Исходна променлива:	експозиционна (независима) променлива	B ¹	SEM ²	p	OR	95% C.I.for OR ³
наличие на <i>H.pylori</i> IgG	Възраст	0,048	0,012	<0,001	1,049	1,024-1,075
наличие на <i>H.pylori</i> IgG	пчелен мед (честа консумация >5 дни/седмично спрямо останалите индивиди)	-0,508	0,182	0,032	0,676	0,473-0,967

¹B, регресионен коефициент на логистичната регресия.

²SEM, стандартна грешка на средната на регресионните коефициенти.

³95% CI (доверителен интервал) за OR (odds ratios) [Exp(B)]

Фиг. 11. 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 интерлевкин-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- α) (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 изолати *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 µl 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 µg/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 ≥ 1 ден/седмично са били позитивни за *H. pylori* (при изследване с ^{13}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 (>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 CagA IgG-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 антитета (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 антитета 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, секретиране 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 по-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, чо 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).

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, съобщавано е, че тютюнопушенето и пиенето на алкохолни напитки са свързани с по-високо серопревалиране на *H. pylori*, както и, 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.

Настоящият дисертационен труд за първи път съобщава, 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⁺ щамове *H. pylori*, и по този начин да намали заболяемостта от пептични язви и стомашен карцином.

5. Антимикробна чувствителност и механизми 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 А2143G (69,8%), следвана от А2142G (11,7%) и А2142С (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 антимикуробни 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 на изолата

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% ре-

зистентни 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*⁺ щамове 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 ($p \geq 0.192$). Щамове 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*⁺) 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*⁺, *cagE*⁺, *vacA* s1a, m1, i1 и i2 щамове бяха съответно 76,2% (64/84 щам), 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 щамове бяха резистентни към metronidazole.

Точкови мутации A2143G, A2142G и A2142C бяха открити във всичките 84 (100%) щам, резистентни/междинно чувствителни към clarithromycin. Таблица 21 и Таблица 22 показват връзката на откритите мутации водещи до резистентност към clarithromycin с характеристики на пациентите и щамове.

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

Точковата мутация A2142G беше по-честа (38,9%, 14/36 щам) сред щамове чувствителни към metronidazole в сравнение с тази при резистентни към metronidazole щамове (12.5%, 6/48, p=0,009) – Табл. 22.

Таблица 21. 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)

Таблица 22. Мутации, водещи до резистентност към clarithromycin, и връзката им с характеристики на щамовете

Характеристики на пациентите	Групи Пациенти	Брой щамове	Брой (%) на щамове с мутации			
			A2143G	A2142G	A2142C	Смесени ^a
metronidazole	Чувствителни	36	19 (52.8)	14 ^b (38.9)	0 (0)	3 (8.3)
	Резистентни	48	35 (72.9)	6 ^b (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 ^d	43 (62.3)	17 (24.6)	1 (1.4)	8 (11.6)
	<i>vacA</i> s1b	1	1 (NA ^c)	0 (NA)	0 (NA)	0 (NA)
	<i>vacA</i> s2	17 ^d	13 (76.5)	3 (17.6)	0 (0)	1 (5.9)
<i>vacA</i> m алели	<i>vacA</i> m1	30 ^d	18 (60.0)	8 (26.7)	0 (0)	4 (13.3)
	<i>vacA</i> m2	57 ^d	38 (66.7)	13 (22.8)	1 (1.8)	5 (8.8)
<i>vacA</i> i алели	<i>vacA</i> i1	39	18 ^b (46.2)	15 ^b (38.5)	1 (2.6)	5 (12.8)
	<i>vacA</i> i2	39	31 ^b (79.5)	5 ^b (12.8)	0 (0)	3 (7.7)
clarithromycin MIC (mg/L)	0.5-12	20	18 ^b (90.0)	2 ^b (10.0)	0 (0)	0 (0)
	16- >256	26	12 ^b (46.2)	11 ^b (42.3)	0 (0)	3 (11.5)
Общо		84	54 (64.3)	20 (23.8)	1 (1.2)	9 (10.7)

^aсмесени - A2143G и A2142G мутации; ^bстатистически значима разлика ($p < 0,05$); ^cNA-неприложимо; ^dдва изолата имаха и *vacA* s1a/s2 и m1/m2 алели, един изолат беше с *vacA* s1a/s2 алели и един - с m1/m2 алели.

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 щамове. Честотата на A2143G и на двойната мутация A2143G+A2142G беше 87,2% (34/39) при *vacA* i2 щамове спрямо 59,0% (23/39, $p=0,01$) сред *vacA* i1 щамовете – Табл. 22.

Щамовете с генотип *vacA* i1 притежаваха по-често само точковата мутация A2142G (38,5%, 15/39) в сравнение с *vacA* i2 щамовете (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 щамовете (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, $p=0,002$). МПК₅₀ 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 22).

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 изолати, напр. A2115G, A2223G, G2141A, T2182C, T2245C и C2131T (Klesiewicz *et al.*, 2014). В настоящото проучване, обаче, всички щамове, резистентни или интермедиерни към clarithromycin, притежаваха по една точкова мутация измежду A2143G, A2142G и A2142C, или комбинации от тях. Подобни резултати има и в Турция, но 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%) в Япония и Бразилия, но доста често в Тайван (44,4%), (Boyanova, 2011b; Furuta *et al.*, 2007). Делът на щамове 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; Klesiewicz *et al.*, 2014), но други проучвания не са открили такава разлика (Agudo *et al.*, 2011).

В настоящото проучване щамове с мутация 2142G имаха 5.3 пъти по-висока минимална потискаща концентрация- МПК₅₀ на clarithromycin в сравнение с тези, които притежават мутацията 2143G. Освен това и двата щамове 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 *vacA* i2. Щамове с генотип *vacA* i1 имаха по-често само 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 *cagA*⁻ щамове са свързани с по-висок риск за неуспех на терапията с тройна комбинация, базирана на clarithromycin в сравнение с по-вирулентните (*cagA*⁺) 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 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, местоживеене и статуса на *cagA*, *cagE*, и *vacA s* и *m*. Тези резултати могат да бъдат обяснени донякъде 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: 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.

IV. ИЗВОДИ

1. Честотата на *H. pylori* инфекцията у нас беше висока - 72%. Логистичният регресионен анализ доказа, 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* 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*⁺ *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*⁺/*cagE*⁻ 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* превалира значимо при язвено болни. За България не се препоръчва изследването на *dupA*, *hmtA* и *hmtB*, 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*⁺, *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 преваляване 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.

V. 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 местоживеене 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*⁺ 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*⁺, *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.

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 IF₂₀₁₁ – 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 IF₂₀₁₁ - 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 IF₂₀₁₂ - 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^{ми} 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^{ти} 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 *homB* на *Helicobacter pylori* в България. 12^{ти} Нац. Конгрес по клинична микробиология и инфекции на Българската асоциация на микробиолозите. София, 24-26.IV. 2014. (постер)