

**Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Wydział Farmaceutyczny**

Izabela Wojtas-Bonior

**Charakterystyka i udział
bakterii *Helicobacter pylori* oraz grzybów *Candida*
w zakażeniach towarzyszących
wybranym
chorobom górnego odcinka przewodu pokarmowego**

Praca doktorska

Promotor : Prof. dr hab. Alicja Budak

**Praca wykonana
w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej**

**Kierownik Zakładu :
Prof. dr hab. Alicja Budak**

Kraków 2010

*Pani Prof. dr hab. Alicji Budak
promotorowi mojej pracy doktorskiej
składam serdeczne podziękowania
za życzliwość, poświęcony czas
oraz cenne wskazówki i uwagi.*

*Pani Dr Elżbiecie Karczewskiej bardzo dziękuję
za serdeczność, poświęcony czas
oraz cenne rady w trakcie wykonywania pracy.*

*Panu Dr Edwardowi Sito bardzo dziękuję
za udostępnienie materiału klinicznego
oraz miłą atmosferę współpracy.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję także do wszystkich pracowników
Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej
za życzliwość i pomoc w realizacji badań.*

Spis treści

1. WSTĘP	7
1.1. Epidemiologia zakażenia <i>H. pylori</i>	8
1.2. Charakterystyka <i>H. pylori</i>	9
1.3. Genom <i>H. pylori</i>	10
1.4. Czynniki wirulencji <i>H. pylori</i>	11
1.4.1. Ureaza	11
1.4.2. Rzęski	13
1.4.3. Cytotoksyna wakuolizująca VacA	13
1.4.4. Wyspa patogenności <i>cag</i> PAI	17
1.5. Chorobotwórczość <i>H. pylori</i>	20
1.5.1. Choroba wrzodowa	21
1.5.2. Wydzielanie żołądkowe w zakażeniu <i>H. pylori</i>	22
1.5.3. Udział <i>H. pylori</i> w patogenezie wrzodów żołądka i dwunastnicy	23
1.5.4. <i>H. pylori</i> , a rak żołądka	24
1.5.5. Rola <i>H. pylori</i> w dyspepsji czynnościowej.....	25
1.6. Diagnostyka zakażenia <i>H. pylori</i>	26
1.6.1. Łańcuchowa reakcja polimerazowa – PCR.....	28
1.7. Leczenie zakażenia <i>H. pylori</i>	29
1.8. Charakterystyka grzybów drożdżopodobnych z rodzaju <i>Candida</i>	33
1.9. Patomechanizm zakażeń grzybami <i>Candida</i>	34
1.9.1. Dymorfizm.....	35
1.9.2. Adhezja.....	35
1.9.3. Koadhezja	37
1.9.4. Enzymy	37
1.9.5. Toksyne	38
1.9.6. Zakażenie <i>C. albicans</i> , a układ immunologiczny	38
1.10. Grzyby z rodzaju <i>Candida</i> , a choroba wrzodowa	39
1.11. Antybiotykoterapia grzybic głębokich	41
2. CEL PRACY.....	45
3. MATERIAŁY I METODY	46
3.1. Chorzy, materiał kliniczny.....	46

3.2. <i>H. pylori</i> – badanie mikrobiologiczne	47
3.2.1. Hodowla <i>H. pylori</i>	48
3.2.2. Oznaczanie lekowrażliwości <i>H. pylori</i>	49
3.3. <i>H. pylori</i> – badanie genetyczne	53
3.3.1. Izolacja bakteryjnego DNA.....	54
3.3.2. Reakcja PCR	56
3.3.2.1. Wykrywanie genów <i>ureB</i> , <i>cagA</i> oraz alleli <i>s1</i> , <i>s2</i> , <i>m1</i> , <i>m2</i> genu <i>vacA</i> <i>H. pylori</i> metodą PCR.....	57
3.3.2.2. Analiza produktów PCR	58
3.4. Oznaczanie poziomu przeciwciał klasy IgG anty- <i>H. pylori</i> metodą immunoenzymatyczną ELISA.....	58
3.4.1. Wykonanie testu	59
3.5. <i>Candida spp.</i> – badanie mikologiczne	61
3.5.1. Hodowla <i>Candida spp.</i>	61
3.5.2. Identyfikacja szczepów <i>Candida spp.</i>	62
3.5.2.1. Podłoże chromogenne <i>Candida</i> ID 2.....	62
3.5.2.2. Test ID 32 C	63
3.5.3. Badanie lekowrażliwości szczepów <i>Candida spp.</i>	64
3.5.4. Badanie aktywności enzymatycznej szczepów <i>Candida spp.</i>	65
3.6. Analiza statystyczna	66
4. WYNIKI	68
4.1. Badanie genetyczne szczepów <i>H. pylori</i>	68
4.2. Analiza związku różnych genotypów <i>H. pylori</i> z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy	76
4.3. Zależność pomiędzy metaplastą jelitową, potwierdzoną badaniem histopatologicznym, a genotypem <i>H. pylori</i>	79
4.4. Ocena lekowrażliwości <i>H. pylori</i>	81
4.5. Analiza częstości występowania przeciwciał klasy IgG anty- <i>H. pylori</i>	85
4.6. Badanie mikologiczne grzybów z rodzaju <i>Candida</i>	87
4.6.1. Ocena ilościowa występowania grzybów <i>Candida spp.</i> w biopsjach pobranych z żołądka.....	87
4.6.2. Identyfikacja oraz ocena lekowrażliwości grzybów z rodzaju <i>Candida</i>	89

4.6.3. Ocena aktywności enzymatycznej szczepów <i>Candida spp.</i>	92
4.7. Udział <i>H. pylori</i> oraz grzybów <i>Candida</i> w wybranych chorobach górnego odcinka przewodu pokarmowego	97
5. DYSKUSJA	100
6. PODSUMOWANIE	118
7. WNIOSKI	120
8. STRESZCZENIE	121
9. SUMMARY	125
10. PIŚMIENNICTWO	129
11. SPIS RYCIN	153
12. SPIS TABEL	155

1. WSTĘP

W 2005 roku nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny przyznano dwóm australijskim naukowcom ze szpitala w Perth, J. Robinowi Warrenowi i Barry'emu J. Marshallowi, odkrywcom bakterii *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), którzy potwierdzili jej rolę w patogenezie zapalenia żołądka oraz choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy [1, 2, 3, 4, 5].

W latach 80-tych XX wieku, za główną przyczynę choroby wrzodowej uważano stres oraz niehigieniczny tryb życia, a w leczeniu stosowano głównie leki hamujące wydzielanie kwasu solnego. Takie postępowanie często prowadziło do nawrotów choroby. Dopiero udowodnienie związku pomiędzy zakażeniem *H. pylori*, a chorobą wrzodową spowodowało wprowadzenie do terapii leków przeciwbakteryjnych oraz zastąpienie leczenia zachowawczego terapią przyczynową [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Po raz pierwszy obecność bakterii spiralnych w popłuczynach treści żołądkowych, pobranych od pacjentów z chorobami żołądka opisał w 1886 roku profesor medycyny Uniwersytetu Jagiellońskiego – Walery Jaworski w swojej książce dla lekarzy: „Podręcznik chorób żołądka”. Ze względu na zakrzywiony kształt nazwał je *Vibrio rugula*. Sugerował ich rolę w patogenezie chorób żołądka [8].

W kolejnych latach, pojawiało się wiele doniesień na temat obecności spiralnych mikroorganizmów w żołądkach ssaków [5].

Laureaci nagrody Nobla swoje prace nad *H. pylori* rozpoczęli pod koniec lat 70-tych XX wieku. Robin Warren badając próbki biopsatów pobrane ze śluzówki żołądka od pacjentów zgłaszających się na badanie endoskopowe, zauważył wyraźną korelację pomiędzy obserwowanymi zmianami histopatologicznymi, a występowaniem drobnoustrojów spiralnych [9].

Rok 1982 otworzył nowy rozdział w gastroenterologii, kiedy Warrenowi i Marshallowi, jako pierwszym na świecie, udało się wyhodować czyste kolonie bakterii *H. pylori*, przypadkowo wydłużając, ze względu na okres Świąt Wielkanocnych, czas inkubacji. Początkowo nazwano je podobne do *Campylobacter* (*Campylobacter* – like organism). Ponieważ bakterie te izolowano głównie z części przedodźwiernikowej żołądka, nadano

im nazwę *Campylobacter pyloridis*, którą ze względów gramatycznych poprawiono na *Campylobacter pylori*. Następnie, aby dowieść chorobotwórczości bakterii i spełnić, tzw. trzeci postulat Kocha, Barry Marshall wypił zawiesinę bakterii, co wywołało u niego ostre zapalenie żołądka, z licznymi potwierdzonymi endoskopowo i histopatologicznie nadżerkami oraz wybroczynami. Objawy chorobowe ustąpiły po podaniu odpowiednich leków przeciwbakteryjnych. Eksperyment ten potwierdził rolę *Campylobacter pylori* jako czynnika etiologicznego nieżytu żołądka [1, 3, 4, 5, 9, 10, 11].

Odkrycie różnic morfologicznych, biochemicznych oraz genetycznych pomiędzy *Campylobacter pylori*, a innymi bakteriami z tego rodzaju, spowodowało utworzenie w 1989 roku nowego rodzaju – *Helicobacter*, a bakterię izolowaną od ludzi nazwano *Helicobacter pylori* [11].

Udowodnienie przez australijskich noblistów bezpośredniego wpływu zakażenia *H. pylori* w patogenezie zapalenia żołądka oraz choroby wrzodowej zachęca do kontynuacji prowadzenia badań nad rolą innych drobnoustrojów w etiologii przewlekłych chorób o charakterze zapalnym [5].

1.1. Epidemiologia zakażenia *H. pylori*

Zakażenie *H. pylori* jest jednym z najczęściej występujących w świecie i dotyczy około 50% populacji ludzkiej. Jednak odsetek infekcji w krajach rozwijających się (Ameryki Południowej, Azji, Afryki), jest znacznie wyższy (70-90%), niż w krajach rozwiniętych (Ameryki Północnej, Europy Zachodniej) (20-40%) [12, 13, 14]. Wynika to przede wszystkim z czynników ryzyka nabycia zakażenia *H. pylori*, do których zalicza się, m.in.: niski status socjoekonomiczny, złe warunki sanitarne oraz wiek dziecięcy [12, 13, 14, 15]. W Polsce szacuje się, że odsetek zakażonych wynosi około 85% ludzi dorosłych [16].

Głównym rezerwuarem bakterii jest zakażony człowiek, a zakażenie szerzy się przez kontakty międzyludzkie. Przypuszcza się, że do zakażenia dochodzi na drodze: oralno-oralnej, gastro-oralnej oraz fekalno-oralnej [12, 15, 17, 18].

Ostatnie badania przeprowadzone w wielu krajach na całym świecie, donoszą o spadku częstości występowania zakażenia *H. pylori* zarówno w krajach o wysokim jak i o niskim poziomie socjoekonomicznym, co wynika przede wszystkim z polepszenia standardu życia oraz warunków sanitarnych [15].

1.2. Charakterystyka *H. pylori*

Rodzaj *Helicobacter*, zaliczany do klasy ϵ -*Proteobacteria*, obejmuje ponad 20 gatunków, spośród których najważniejsze znaczenie kliniczne posiada *H. pylori*. Jest ona mikroaerofilną, Gram-ujemną, spiralną lub esowato wygiętą pałeczką, o rozmiarach od 0.5-1 μm szerokości i 2.5-5 μm długości. Dzięki obecności rzęsek (4-6) ułożonych biegunowo, wykazuje zdolność do ruchu (rycina 1).



Rycina 1. *Helicobacter pylori* [19].

W budowie komórki, bakteria ta podobna jest do innych pałeczek Gram-ujemnych. Pod względem biochemicznym, nie redukuje azotanów, nie hydrolizuje hipuranu sodu. Jest natomiast katalazo- i oksydazo-dodatnia, wytwarza dwa typy ureazy oraz wiele innych enzymów, takich jak: fosfataza alkaliczna i kwaśna, esterazy, dysmutaza nadtlenkowa, fosfoamidaza, transpeptydaza glutamylowa [20, 21]. W niesprzyjających warunkach (stres wywołany reaktywnymi formami tlenu, leki przeciwbakteryjne) może przyjmować postać zarodnikową [22, 23, 24].

1.3. Genom *H. pylori*

Bakteria *H. pylori*, przystosowana do życia w ściśle określonym środowisku, posiada mały genom, który stanowi w przybliżeniu 1/3 wielkości genomu *Escherichia coli*. Ma postać kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA o stosunkowo niewielkiej zawartości guaniny i cytozyny (G+C), 39%. Zawiera minimalny zestaw genów, niezbędnych do przeżycia w warunkach panujących w żołądku [25, 26].

Sekwencję całego genomu *H. pylori* poznano w 1997 roku w trakcie badań prowadzonych w The Institute for Genomic Research w USA. Badany szczep oznaczony symbolem 26695, wyizolowano od pacjenta z nieżytem żołądka [27]. Przed wykonaniem sekwencjonowania, szczep był wielokrotnie pasażowany. Ze względu na dużą zmienność genetyczną *H. pylori*, która mogła ujawnić się w trakcie pasażu, zespół naukowców z USA postanowił ustalić sekwencję genomowego DNA innego szczepu *H. pylori*, pochodzącego od pacjenta z chorobą wrzodową dwunastnicy, który nie był poddany pasażowaniu przed sekwencjonowaniem. Oznaczono go symbolem J99 [28]. Obydwa typowane szczepy posiadały geny *cagA* i *vacA* (*s1/m1*), warunkujące zjadliwość *H. pylori* [28].

Porównanie sekwencji i organizacji genomu u szczepów *H. pylori* 26695 oraz J99 wykazało, że obydwa szczepy posiadały zbliżoną jego organizację oraz podobny zestaw białek kodowanych na chromosomie [25, 26, 28]. Nie znaleziono jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jaki jest związek pomiędzy zmiennością na poziomie DNA, a chorobotwórczością [25].

Cechy genomu *H. pylori*:

- obecność dużej ilości genów odpowiedzialnych za restrikcję i modyfikację,
- charakterystyczny układ genów odpowiedzialnych za syntezę lipopolisacharydu (LPS – lipopolisacharyd),
- duża ilość genów kodujących lipoproteiny oraz białka błony zewnętrznej (OMP – outer membrane proteins),
- obecność wyspy patogenności 40 kbp,
- mała ilość genów kodujących białka regulacyjne,

- rozbudowany genetyczny system zdobywania żelaza [11, 25].

1.4. Czynniki wirulencji *H. pylori*

Do głównych czynników wirulencji *H. pylori*, umożliwiających kolonizację oraz uszkodzenie błony śluzowej żołądka zalicza się, m.in.: ureazę, rzęski, adhezyny, LPS, katalazę, lipazy, fosfolipazy, proteazy, cytotoksynę wakuolizującą VacA (Vacuolating cytotoxin A) oraz produkty genów zlokalizowane w obrębie wyspy patogenności *cag* PAI (cytotoxin-associated gene A pathogenicity island), w tym białko CagA (cytotoxin-associated gene A antigen) [2, 5, 7].

W niniejszej pracy opisano ureazę, rzęski oraz cytotoksyny VacA i CagA.

1.4.1. Ureaza

H. pylori, nie będąc bakterią acidofilną, kolonizuje błonę śluzową żołądka człowieka. Ureaza, produkowana przez nią w dużej ilości (6-10% wytwarzanych białek), jest czynnikiem umożliwiającym jej przetrwanie w kwaśnym środowisku soku żołądkowego oraz dotarcie do komórek nabłonka. Enzym katalizuje reakcję hydrolizy mocznika, w wyniku której powstaje dwutlenek węgla oraz amoniak [5, 26].

Amoniak, alkalizując środowisko w otoczeniu bakterii, powoduje neutralizację soku żołądkowego, co pozwala komórkom *H. pylori* przebić się przez warstwę śluzu i dotrzeć do nabłonka. Ponadto, indukuje bezpośrednio i pośrednio powstawanie uszkodzeń w błonie śluzowej żołądka. Jony wodorotlenowe, powstające w skutek dysocjacji amoniaku w środowisku wodnym działają cytotoksycznie w stosunku do komórek nabłonkowych żołądka [29]. Natomiast sam amoniak, poprzez wychwyt jonów wodorowych podnosi pH, co prowadzi do zwiększonego uwalniania gastryny oraz pobudzenia komórek okładzinowych do produkcji kwasu solnego. Dlatego też, amoniakowi przypisuje się udział w powstawaniu mikronadżerek błony śluzowej, czemu z kolei towarzyszy uwalnianie wielu składników odżywczych dla drobnoustroju [5, 11, 26, 30].

W wyniku zakażenia *H. pylori*, dochodzi do kontaktu komórek bakteryjnych z neutrofilami oraz uruchomienia tlenowych mechanizmów zabijania drobnoustrojów. Wytwarzany w tym procesie kwas podchlorawy może reagować z amoniakiem tworząc silnie toksyczną monochloraminę, która powoduje lizę komórek, co w konsekwencji prowadzi do powstania ubytków w błonie śluzowej żołądka [31]. Monochloramina wywiera także efekt mutageny na DNA komórek eukariotycznych, dlatego może być istotnym czynnikiem doprowadzającym do powstawania nowotworów u osób z przewlekłą infekcją *H. pylori* [5].

Aktywność samej ureazy może być również przyczyną uszkodzeń nabłonka śluzówki żołądka, ze względu na aktywację monocytów oraz uruchamianie odpowiedzi przeciwzapalnej przez ten enzym [32].

Pod względem budowy, ureaza jest multimerycznym białkiem, składającym się z dwóch podjednostek UreA i UreB, występujących w molekularnym stosunku 1:1. Do pełnej aktywności enzymu wymagana jest obecność jonów niklu, które łącząc się z miejscami aktywnymi cząsteczki przekształcają apoenzym w postać aktywną [11, 26].

Za biosyntezę ureazy jest odpowiedzialny kompleks 9 genów *ure*, z których *ureA* i *ureB* kodują podjednostki enzymu, natomiast *ureCDIEFGH* są odpowiedzialne za włączenie jonów niklu do centrum aktywnego enzymu [11]. Ponadto, gen *ureI* koduje białko pełniące funkcję kanału błony wewnętrznej, transportującego mocznik do komórki. Jego aktywność zależy od pH środowiska zewnętrznego [33].

Ureaza występuje w dwóch formach. W skład powierzchni zewnętrznej błony komórkowej wchodzi izoforma enzymu, która bierze udział w hydrolizie mocznika do amoniaku i dwutlenku węgla w celu neutralizacji kwasu solnego. Postać cytoplazmatyczna enzymu o takiej samej specyfice substratowej, określa kierunek chemotaksji i również pośrednio odpowiada za motorykę bakterii [24, 26].

Mechanizm transportu ureazy na powierzchnię komórki nie został do końca poznany. Jedną z hipotez zakłada, tzw. model „altruistycznej autolizy”, gdzie skutek śmierci komórki bakteryjnej dochodzi do uwolnienia enzymu, który następnie jest absorbowany na powierzchni żyjących bakterii.

Inne przypuszczenie, to istnienie nie odkrytego do tej pory specyficznego systemu transportu [24, 26].

Ureaza stanowi jeden z najważniejszych czynników *H. pylori* w kolonizacji żołądka oraz decyduje o zjadliwości szczepu. Potwierdzono badaniami, że wszystkie kliniczne szczepy *H. pylori* produkują ureazę, natomiast ureazo-ujemne mutanty *H. pylori* nie były zdolne do kolonizacji błony śluzowej żołądka zwierząt zakażonych w celach doświadczalnych [34].

Ureaza była pierwszym czynnikiem wirulencji *H. pylori* wykorzystanym w diagnostyce chorób żołądka [35].

1.4.2. Rzęski

Obok spiralnego kształtu, kluczową rolę w poruszaniu się bakterii, w gęstym śluzie żołądka, odgrywają rzęski. Każda z nich pokryta jest osłonką, będącą przedłużeniem błony zewnętrznej bakterii, która chroni witkę przed kwaśnym środowiskiem żołądka [11].

Pojedyncza rzęska zbudowana jest z dwóch rodzajów białek (flagellin) – FlaA (53 kDa) i FlaB (54 kDa). Geny kodujące obydwie białka, które są niezależnymi jednostkami transkrypcyjnymi, zostały już sklonowane oraz zsekwencjonowane [36]. Wykazano, że obecność obydwu flagellin jest konieczna do pełnej aktywności ruchowej bakterii. Mutacje w genie kodującym jedną z podjednostek flagelliny powodują osłabienie ruchu, natomiast w obu genach – utratę ruchliwości [37].

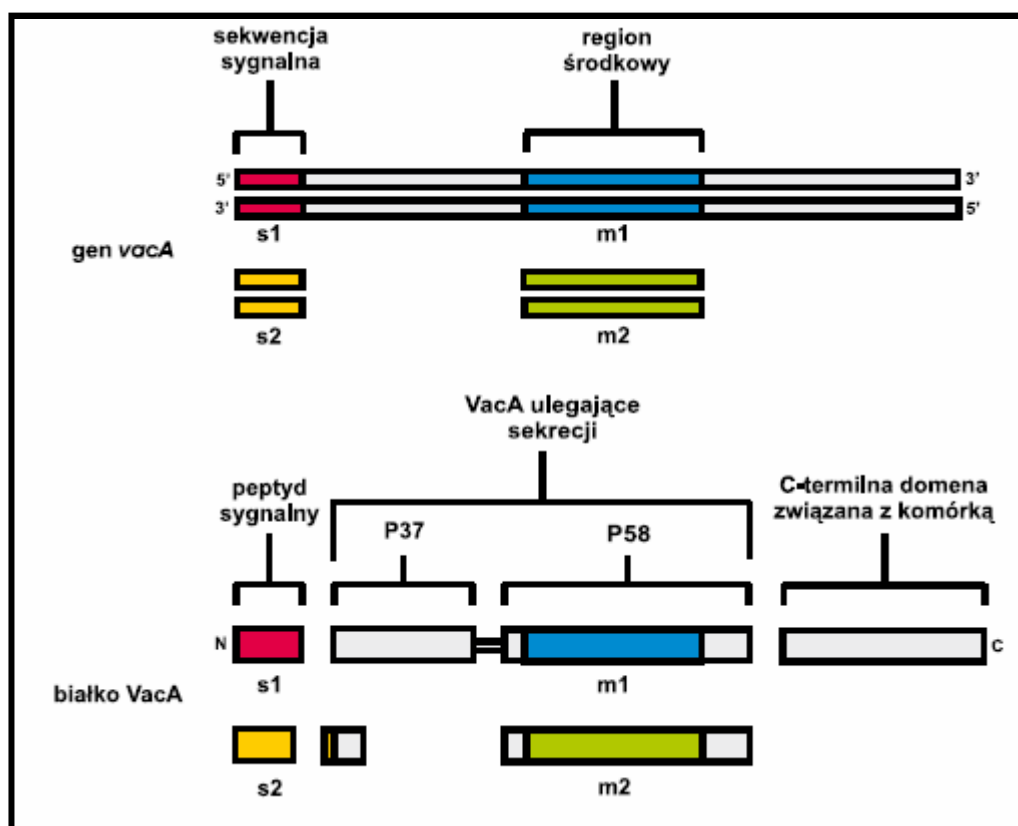
1.4.3. Cytotoksyna wakuolizująca VacA

Jednym z głównych czynników wirulencji *H. pylori* jest cytotoksyna wakuolizująca VacA. W 1988 roku Leunk i wsp. wykazali, że 55% supernatantów uzyskanych po odwirowaniu hodowli *H. pylori*, indukowało powstawanie wakuoli w komórkach linii HeLa [38].

Badania *in vitro* wykazały, że toksyna VacA jest odpowiedzialna za wakuolizację komórek eukariotycznych. Podana w warunkach *in vivo* bezpośrednio do żołądka myszy doprowadziła do zniszczenia komórek nabłonkowych oraz do powstania wrzodów [39, 40, 41].

Ze względu na zdolność do wakuolizacji komórek eukariotycznych *in vitro*, szczepy *H. pylori* podzielono na Tox+ oraz Tox-. Stwierdzono, że w szczepach Tox-, które nie wykazują właściwości cytotoksycznych, transkrypcja genu *vacA* zachodzi na dużo niższym poziomie, niż w szczepach Tox+ [42].

Natywna proteina VacA jest wielkocząsteczkowym oligomerem, zbudowanym z sześciu lub siedmiu podjednostek, każda o masie około 90 kDa, przypominającym kształtem kwiat. Białko prekursorowe VacA o masie 140 kDa, składa się z trzech domen: C-terminalnej domeny związanej z powierzchnią komórki (47 kDa), uwalnianej toksyny (90 kDa) oraz 33-aminokwasowej sekwencji sygnałowej. Prekursor właściwej cytotoksyny ulega specyficznemu procesowaniu (cięciu proteolitycznemu), na obu końcach, co prowadzi do uwolnienia dojrzałej toksyny złożonej z dwóch podjednostek (37 kDa N-terminalny fragment-P37 oraz 58 kDa C-terminalny fragment-P58) połączonych pętlą, o względnej masie cząsteczkowej około 90 kDa (rycina 2) [43].



Rycina 2. Polimorfizm genu *vacA* oraz budowa białka VacA [5].

Toksyna tylko w postaci kompleksu, wykazuje aktywność wakuolizującą. Badania *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanych białek P37 lub P58 wykazały brak efektu wakuolizacji w komórkach eukariotycznych, kiedy działały niezależnie od siebie [44].

Toksyna VacA, ze względu na strukturalną organizację oraz sposób procesowania białka jest zaliczana do rodziny toksyn typu AB, wytwarzanych przez wiele gatunków bakterii [45]. Podjednostka A (P37) – aktywna, odpowiedzialna jest za aktywność enzymatyczną, a B (P58) – tzw. wiążąca, rozpoznaje odpowiednie receptory na powierzchni komórek docelowych (140 kDa białko p140 zidentyfikowane jako RPTP – receptor-like protein tyrosine phosphatase oraz 250 kDa białko p250 RPTP; w zależności od rodzaju komórek) [46, 47].

Wiadomo, że aktywność toksyny VacA znacznie wzrasta w kwaśnym pH, a sama toksyna jest odporna na działanie pepsyny i kwasu solnego, co czyni ją dobrze przystosowaną do warunków, jakie panują w żołądku [48]. Przypuszcza się, że w kwaśnym środowisku żołądka dochodzi do dysocjacji oligomeru VacA i powstania monomerów. Podjednostka P58 wiąże się z receptorem na powierzchni komórki nabłonka i wraz z jednostką P37 wbudowuje się w błonę tej komórki, tworząc kanał selektywnie przepuszczający aniony. W kolejnym etapie toksyna na drodze endocytozy dostaje się do endosomu, co powoduje wzrost przepuszczalności jego ścian oraz akumulację jonów. Skutkiem tego, jest napływ wody do endosomu oraz powstanie wakuoli [43].

Gen *vacA*, kodujący cytotoksynę wakuolizującą VacA, obecny jest we wszystkich klinicznych szczepach *H. pylori*, jednak tylko 40-50% z nich wykazuje aktywność cytotoksyczną. Posiada mozaikową budowę, gdzie sekwencje konserwowane występują na zmianę z sekwencjami zmiennymi. Fragmentem silnie konserwowanym we wszystkich szczepach *H. pylori* jest odcinek kodujący C-terminalną domenę protoksyny i segment położony w pobliżu N-końca. Natomiast zmienność wykazuje sekwencja sygnałowa, kodująca fragment peptydu sygnałowego i N-terminalny koniec dojrzałej toksyny (tzw. region *s*, signal sequence) oraz fragment odpowiedzialny za wiązanie z komórką docelową (tzw. region *m*, middle-region) (rycina 2) [5, 49].

Atherton i wsp. scharakteryzowali gen *vacA* u 59 szczepów *H. pylori*, wskazując na istnienie trzech typów sekwencji sygnałnej (*s1a*, *s1b*, *s2*) oraz dwóch rodzajów alleli regionu środkowego (*m1*, *m2*) [49]. Obecnie, znane są nowe podtypy regionu *s* (*s1c*) oraz *m* (*m1a*, *m1b*, *m1c*, *m2b*) [50, 51, 52, 53].

Toksyczność danego szczepu *H. pylori* jest uwarunkowana obecnością określonych typów alleli, które występując w różnych kombinacjach (poza *s2/m1*, która jest praktycznie niespotykana w Europie oraz Stanach Zjednoczonych), odpowiadają za zwiększoną aktywność cytotoksyny lub jej brak, co rzutuje na zdolność do tworzenia kwaśnych wodniczek w komórkach nabłonka błony śluzowej żołądka [49].

Polimorfizm regionu środkowego determinuje różnice w powinowactwie domeny P58 do receptorów komórkowych, które jest większe w przypadku allelu *m1*, niż *m2* [54, 55]. Spośród alleli typu *s*, to *s1* warunkuje powstanie hydrofobowego N-końca toksyny, co umożliwia tworzenie porów w błonie komórkowej oraz powstanie wakuoli. Natomiast allel *s2*, kodując białko procesowane w innym miejscu niż białko kodowane przez allel *s1*, powoduje hydrofilowe wydłużenie N-końca dojrzałej toksyny, które blokuje aktywność wakuolizacyjną [54, 56]. Z tego względu, szczepy *s1/m1* produkują toksynę VacA o większej aktywności cytotoksycznej w porównaniu do szczepów o układzie alleli *s1/m2*. Obecność genotypu *s2/m2* warunkuje ekspresję cytotoksyny VacA, która nie wykazuje aktywności cytotoksycznej [49].

Wykazano, że szczepy *H. pylori vacA s1* są znamienne częściej izolowane od pacjentów z chorobą wrzodową żołądka i/lub dwunastnicy oraz z rakiem żołądka, w porównaniu do szczepów *vacA s2* [49, 57, 58, 59, 60].

W 2007 roku Rhead i wsp. opisali nowy polimorficzny region w genie *vacA*, występujący pomiędzy sekwencją *s* i *m*, który nazwali „intermediate” (*i*) region. Wyróżniono dwa allele regionu *i*: *i1* oraz *i2*. Wykazano, że allel *i1* jest lepszym predyktorem potencjału kancerogennego *H. pylori*, niż obecnie przyjmowane typowanie alleli *s* i *m* [54].

Poza wakuolizacją, toksyna VacA pełni także inne funkcje, które wpływają na ustanowienie chronicznej infekcji *H. pylori*: blokuje proces dojrzewania fagosomów w makrofagach, hamuje prezentację antygenów oraz proliferację limfocytów T, a także obniża poziom odpowiedzi immunologicznej

Th1. Ponadto, wpływa na rozluźnienie ścisłych połączeń pomiędzy komórkami nabłonka, a indukując uwalnianie cytochromu c z mitochondriów, prowadzi do apoptozy, która jest istotnym czynnikiem w patogenezie raka żołądka [56].

Cytotoksyna VacA wzbudza również produkcję swoistych przeciwciał anty-VacA, których obecność może być wykrywana testem neutralizacji, Western-blot (immunoblot) lub immunoenzymatycznym ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) [61, 62].

1.4.4. Wyspa patogenności *cag* PAI

Wyspy patogenności, to regiony chromosomu bakteryjnego, które występują powszechnie u bakterii chorobotwórczych, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, natomiast jest ich brak lub pojawiają się sporadycznie u gatunków niepatogennych. Są nośnikami genów wirulencji, które kodują toksyny, adhezyny, inwazyjność, systemy sekrecji białek oraz pozyskiwania żelaza [63].

W przypadku *H. pylori*, wyspa patogenności *cag* PAI znajduje się w chromosomie bakteryjnym pomiędzy genem *glr*, kodującym racemazę glutaminianową, a genem o nieznanym znaczeniu. Jest to fragment DNA o długości ~40 kbp, na końcach którego występują proste powtórzenia 31 nukleotydowe (tzw. „direct repeat”). Region ten charakteryzuje się niższą od średniej zawartością par G+C (35%) i prawdopodobnie został nabyty drogą transferu horyzontalnego z innych genomów bakteryjnych, plazmidów lub fagów [25, 64].

Wyspa patogenności *cag* PAI może występować jako obszar ciągły lub może być podzielona na dwa regiony (*cagI* i *cagII*), przez sekwencje insercyjne (IS): IS605 lub IS606, które kodują dwa białka – TnpA i TnpB, prawdopodobnie transpozazy. Czasami sekwencje IS mogą doprowadzić do całkowitej delecji *cagI*, *cagII* lub obu fragmentów jednocześnie, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia wirulencji szczepu [25, 64].

Wyspa patogenności *H. pylori* składa się z około 27 genów odpowiedzialnych za zjadliwość bakterii [65]. Gen *cagA* (cytotoxin-associated gene A), umiejscowiony na końcu 3' PAI, koduje silnie

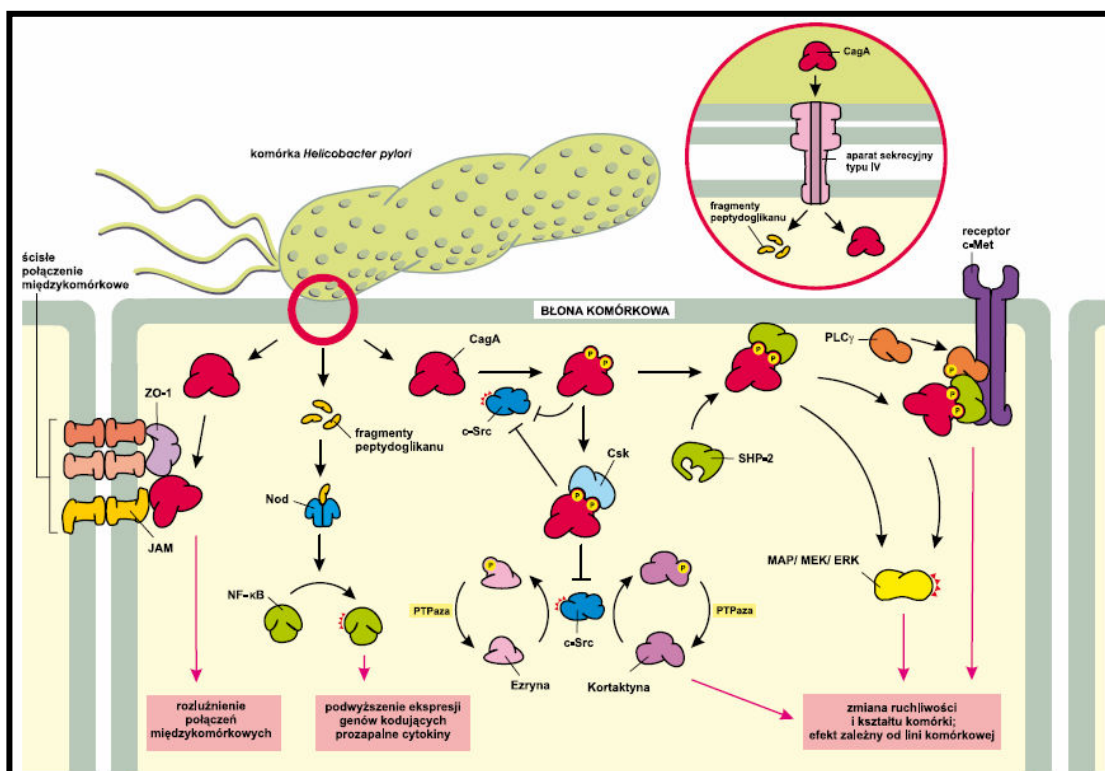
immunogenne białko CagA o masie 120-140 kDa [25, 63]. Indukuje ono powstawanie przeciwciał anti-CagA w organizmie człowieka. Ich obecność, wykrywana za pomocą testu ELISA lub Western-blot świadczy o infekcji cytotoksycznymi szczepami CagA+, co stanowi ważną informację kliniczną [66, 67, 68]. Szacuje się, że średnio 60% szczepów *H. pylori* zawiera gen *cagA* [68, 69, 70].

Oprócz *cagA*, w skład PAI wchodzi geny, których produkty budują, tzw. system wydzielniczy typu IV – TFSS (type four secretion system), odpowiedzialny za bezpośredni transfer toksyny CagA do cytoplazmy komórek nabłonka błony śluzowej żołądka. Do translokacji CagA niezbędna jest aktywność 17 genów, przy czym 14 z nich, bierze udział w indukcji transkrypcji genu kodującego interleukinę 8 (IL-8) [65]. Wykazano, że w wyniku mutacji w genach *cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM* dochodzi do znacznie zmniejszonej sekrecji IL-8 [64].

CagA, jako białko wielofunkcyjne, moduluje wiele ścieżek sygnalizacyjnych. W wyniku „wstrzyknięcia” do komórek nabłonkowych błony śluzowej żołądka dochodzi do jego fosforylacji na resztach tyrozyny motywów EPIYA (sekwencja pięciu aminokwasów: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala; EPIYA), przez komórkowe kinazy Src. Ufosforylowana proteina CagA oddziałuje z wieloma białkami. Jednym z dokładniej poznanych szlaków, jest ścieżka zapoczątkowana wiązaniem z domeną SH2 (src homology domain 2), fosfatazy tyrozynowej SHP-2 (PTP – protein tyrosine phosphatase), co prowadzi do zmiany jej konformacji. Wpływa to na stymulację i rozregulowanie w komórce szlaku przekazywania sygnału MAP/MEK/ERK (MAP kinase/MAP kinase kinase/extracellular signal regulated protein kinase), wskutek czego dochodzi do nieprawidłowej proliferacji komórek, zmian w ich kształcie (wydłużenie, tzw. fenotyp kolibra, hummingbird phenotype), ruchliwości (tzw. fenotyp rozproszony, scattered) oraz cytoszkieletu. Dodatkowe cykle replikacji DNA, zachodzące w wyniku wzmożonych podziałów komórkowych mogą zwiększyć szansę mutacji genetycznych [5, 71].

Przy pomocy TFSS, do wnętrza komórek nabłonkowych jest wydzielany peptydoglikan, który prowadzi do aktywacji czynnika

transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), indukującego wytwarzanie IL-8 (rycina 3) [72, 73].



Rycina 3. Główne szlaki przemian indukowane przez białko CagA [5].

IL-8 jest silnym czynnikiem chemotaktycznym i aktywującym neutrofile, co prowadzi do rozwoju procesu zapalnego, w efekcie którego, komórki nabłonkowe błony śluzowej żołądka ulegają uszkodzeniu i zniszczeniu [74].

Obecnie wiadomo, że zakażenie szczepami *cagA*⁺ zwiększa ryzyko rozwoju choroby wrzodowej jak również raka żołądka [56, 58, 59, 60, 75, 76, 77].

Gen *cagA*, podobnie jak *vacA*, cechuje się silnym polimorfizmem, dotyczącym liczby i sekwencji flankujących motywy fosforylacji EPIYA, zlokalizowanych w domenie karboksylowej CagA, co wpływa na patogenność bakterii [71, 78].

Wyróżnia się szczepy *H. pylori* typu: zachodniego 'Western type', izolowane od pacjentów z Ameryki Północnej, Australii i Europy; oraz wschodnio-azjatyckiego 'East-Asian type', zakażające mieszkańców Japonii,

Chin i Korei. Wykazano, że szczepy typu zachodniego indukują niższy poziom stanu zapalnego, niż typu wschodnio-azjatyckiego. Stąd, stopień atrofii żołądka, a przez to ryzyko rozwoju raka żołądka, jest większe u pacjentów zaliczanych do typu wschodnio-azjatyckiego, w porównaniu z typem zachodnim oraz pacjentami *cagA* ujemnymi [71, 79].

Pod względem klinicznym izolaty *H. pylori* zostały podzielone na dwie rodziny, tzw. typ I oraz typ II. Do typu I zalicza się szczepy z ekspresją genów *cagA* i *vacA* (fenotypowo CagA+, VacA+), o wysokiej zjadliwości, mogące znacząco wpływać na rozwój choroby wrzodowej żołądka, dwunastnicy oraz raka żołądka. Natomiast do typu II kwalifikuje się izolaty bez obecności genu *cagA*, z ekspresją genu *vacA*, ale powstająca toksyna jest nieaktywna. Szczepy *H. pylori* należące do tego typu wywołują najczęściej bezobjawowe zakażenia lub infekcje o znacznie łagodniejszym przebiegu (zapalenie błony śluzowej żołądka). Dodatkowo wyodrębniono także typ pośredni, do którego zalicza się szczepy, u których produkcja CagA i VacA jest niezależna [80, 81]. Nie wiadomo jednak, jakie jest powiązanie między ekspresją obydwu genów, zwłaszcza, że gen *vacA* występuje w odległości ponad 300 kbp od regionu *cag* PAI, a inaktywacja genu *cagA* nie wpływa na syntezę cytotoksyny wakuolizującej [82, 83]. Wykazano jednak, że obecność genu *cagA* silnie koreluje z allelem *vacA* s1 [49, 57, 58].

1.5. Chorobotwórczość *H. pylori*

H. pylori odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego. Jest czynnikiem etiologicznym zapalenia błony śluzowej żołądka typu B oraz jednym z istotnych czynników ryzyka choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, chłoniaka żołądka typu MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) oraz raka żołądka [2, 6, 7, 9, 10, 17, 84, 85].

W 1994 roku Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (IARC – International Agency for Research on Cancer) przy WHO (World Health Organization – Światowa Organizacja Zdrowia) uznała bakterię *H. pylori* za karcynogen I klasy tzn. o udowodnionym działaniu rakotwórczym [86].

U większości zakażonych, poza stanem zapalnym w części przedodźwiernikowej żołądka, nie obserwuje się zmian w jego czynności, a przetrwała kolonizacja nie daje żadnych objawów. Problem kliniczny dotyczy 10-15% zakażonych *H. pylori*, u których powstaje wrzód trawienny, a u 2% może dojść do rozwoju raka żołądka [1, 2, 3, 6, 7].

Rola *H. pylori* w karcynogenezie żołądka została udowodniona na modelu zwierzęcym (gerbille mongolskie) [87, 88].

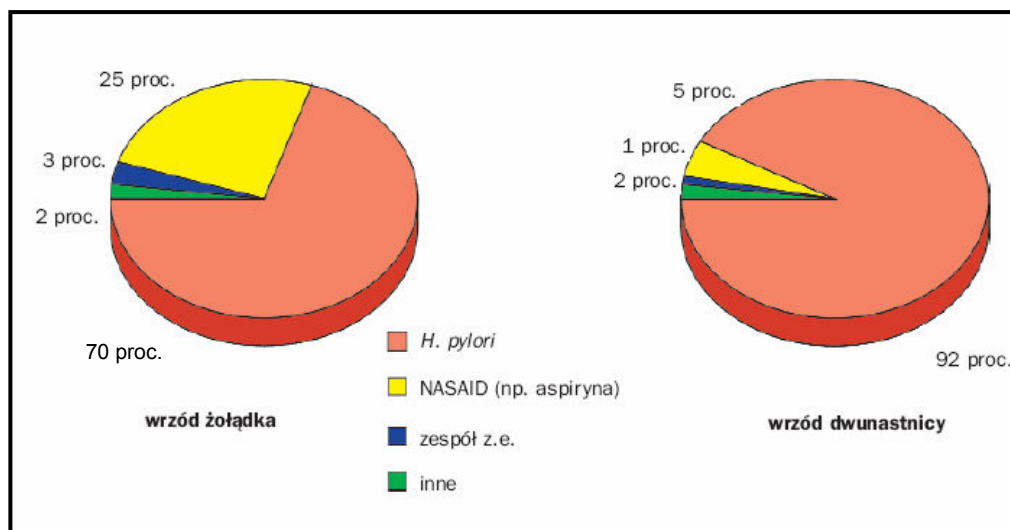
Poza stopniem toksyczności szczepu *H. pylori*, na występowanie zmian patologicznych w żołądku i dwunastnicy wpływają także cechy gospodarza (predyspozycje genetyczne, intensywność odpowiedzi immunologicznej na zakażenie) oraz czynniki środowiskowe [75, 89, 90].

1.5.1. Choroba wrzodowa

Wrzód trawienny powstaje w wyniku zaburzenia równowagi pomiędzy mechanizmami ochronnymi błony śluzowej, a czynnikami agresji w postaci kwasu solnego (HCl) oraz pepsyny, co prowadzi do wytrawienia błony śluzowej i powstania ubytku, który sięga głębszych warstw ściany żołądka lub dwunastnicy [7].

Choroba wrzodowa cechuje się zdolnością do samoistnego gojenia, nawrotowością oraz typową dobową rytmiką dolegliwości bólowych [6]. Czasami może dojść do powikłania wrzodu w postaci krwawienia, perforacji, czy zwężenia odźwiernika oraz, bardzo rzadko, raka żołądka [7].

Zakażenie *H. pylori* stwierdza się u około 90% chorych z wrzodem dwunastnicy oraz u około 70% z wrzodem żołądka [6, 7]. Inne czynniki, które mogą spowodować powstanie wrzodów trawiennych to niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), zespół Zollingera-Ellisona, czy refluks żółciowy (rycina 4) [6, 7].



Rycina 4. Czynniki etiologiczne wrzodów żołądka i dwunastnicy [6].

Wrzód dwunastnicy występuje głównie w jej opuszcze i powstaje w wyniku zarzucania nadmiernej ilości kwasu żołądkowego, którego produkcję wzmacnia zakażenie *H. pylori*. W konsekwencji, dochodzi do metaplasji żołądkowej (przeobrażenia nabłonka śluzówki dwunastnicy w nabłonek żołądkowy), rozwoju nadżerek, a następnie wrzodu [2, 6, 7].

Wrzód żołądka występuje zazwyczaj na granicy błony śluzowej obszaru gruczołów trawieńcowych i odźwiernikowych. W wyniku infekcji trzonu przez *H. pylori* oraz działania produkowanych toksyn (ureaza, amoniak, cytotoksyny, proteazy, fosfolipaza A_2) dochodzi do załamania bariery żołądkowej, co przy upośledzonym przepływie krwi, nawet pomimo obniżonej sekrecji kwasu solnego, może prowadzić do powstania wrzodu [2, 6, 7].

1.5.2. Wydzielanie żołądkowe w zakażeniu *H. pylori*

W żołądku zakażonym *H. pylori*, dochodzi do głębokiego zaburzenia mechanizmu wydzielania żołądkowego, w którym uczestniczy gastryna, histamina i somatostatyna [1, 2, 6, 7, 91].

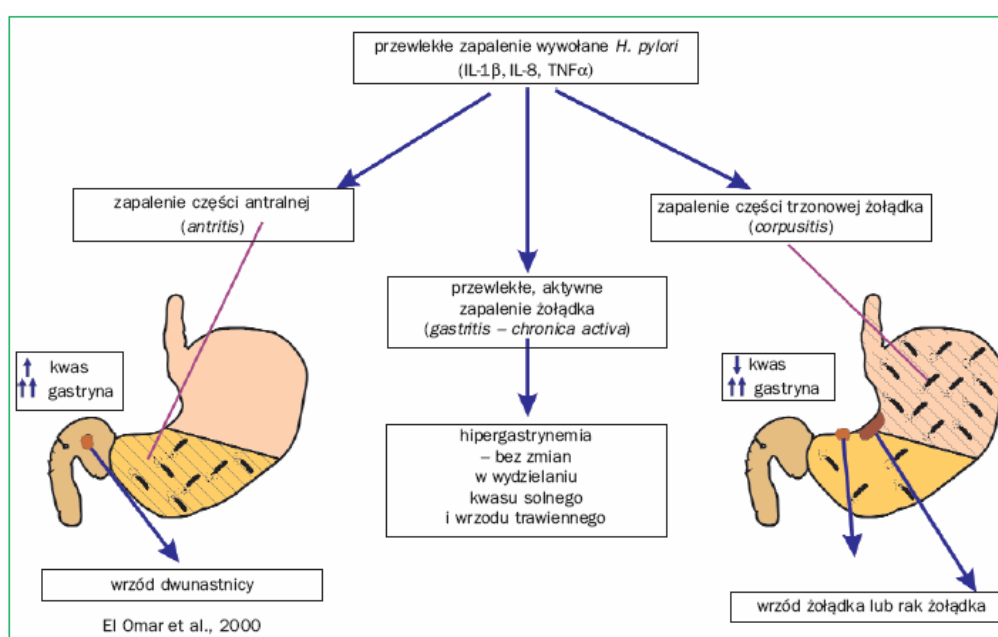
Bakterie kolonizując część przedodźwiernikową żołądka i wywołując stan zapalny, wpływają na spadek aktywności oraz liczby komórek D. Prowadzi to do zmniejszonego uwalniania somatostatyny oraz jej słabszego działania hamującego na komórki G, co skutkuje nadmiernym uwalnianiem gastryny. Ponadto, w obecności *H. pylori* produkowany jest dodatkowy

czynnik silnie pobudzający uwalnianie gastryny z komórek G – N- α -metylohistamina. Gastryna oraz histamina uwalniana z komórek ECL (enterchromaffin-like cells) wzmagają aktywność wydzielniczą komórek okładzinowych, co prowadzi do zwiększonej sekrecji kwasu solnego (hyperchlorhydrii) [1, 2, 7, 91].

W przypadku kolonizacji przez *H. pylori* trzonu żołądka, może dojść do zmniejszenia sekrecji kwasu solnego (hypochlorhydrii), m.in. w wyniku bezpośredniego hamowania aktywności komórek okładzinowych, w których bakteria upośledza ekspresję podjednostek pomp protonowych [2, 7, 91].

1.5.3. Udział *H. pylori* w patogenezie wrzodów żołądka i dwunastnicy

Zgodnie z koncepcją McColl'a i wsp., lokalizacja zakażenia *H. pylori* ma wpływ na rozwój określonego typu wrzodu. Jeśli dotyczy błony śluzowej dystalnej części żołądka, prowadzi do antritis i sprzyja rozwojowi wrzodu dwunastnicy. Natomiast, gdy infekcja obejmuje również trzon żołądka, prowadzi do zmian zanikowych, hypochlorhydrii oraz hypergastrynemii, co wiąże się z możliwością rozwoju wrzodu, a nawet raka żołądka (rycina 5) [92].



Rycina 5. Schemat rozwoju wrzodu dwunastnicy oraz wrzodu lub raka żołądka w zakażeniu *H. pylori* [6].

Lee, Dixon i wsp. zasugerowali, że głównym czynnikiem determinującym stopień oraz miejsce kolonizacji *H. pylori* w żołądku jest lokalna produkcja kwasu solnego. To ona decyduje o topografii zapalenia w żołądku [93, 94].

Zgodnie z ich hipotezą, zapalenie żołądka ograniczone do części przedodźwiernikowej występuje u osób z nadmierną produkcją kwasu solnego, wynikającą z dużej ilości komórek okładzinowych (uwarunkowanej genetycznie), bądź wysokiej ich wrażliwości na różne bodźce. U takich osób, w wyniku infekcji *H. pylori* stwierdza się zapalenie żołądka typu B. Pacjenci ci są w grupie ryzyka rozwoju wrzodu dwunastnicy, natomiast są „odporni” na rozwój zapalenia w obrębie trzonu żołądka.

Natomiast u osób z hyposekrecją kwasu solnego, infekcja *H. pylori* obejmuje bardziej proksymalną część żołądka. W tym wypadku, zapalenie dotyczy zarówno części przedodźwiernikowej jak i trzonu. Rozwijające się z czasem zanikowe zapalenie trzonu, doprowadza do dalszej hypochlorhydrii i stanowi czynnik ryzyka rozwoju wrzodu oraz raka żołądka [93, 94].

Przesunięcie bakterii w kierunku trzonu może wynikać także z farmakologicznego zahamowania sekrecji HCl, np. po zastosowaniu inhibitorów pompy protonowej [6].

Jak już wcześniej wspomniano, zakażenie szczepami *cagA*⁺ zwiększa ryzyko zarówno choroby wrzodowej, jak również raka żołądka, chociaż pacjenci z wrzodem dwunastnicy są w grupie zmniejszonego ryzyka rozwoju nowotworu żołądka. Dlatego, ogólnie można powiedzieć, że infekcja szczepami *H. pylori cagA*⁺ zwiększa prawdopodobieństwo choroby, natomiast jej rodzaj może zależeć od innych czynników (m.in. lokalnej produkcji HCl, ale także wieku nabycia zakażenia oraz przyjmowanej diety) [90].

1.5.4. *H. pylori*, a rak żołądka

Polska od wielu lat jest zaliczana do krajów podwyższonego ryzyka zachorowań na raka żołądka [95]. Dane epidemiologiczne wskazują, że około 80% wszystkich raków żołądka spowodowane jest zakażeniem *H. pylori* [88]. Wiadomo jednak, że oprócz *H. pylori* (zwłaszcza szczepów

CagA+, VacA+), dużą rolę w procesie karcynogenezy odgrywają także inne czynniki, takie jak:

- środowiskowe – narażenie zawodowe na azotyny, azotany i związki nitrozowe,
- dietetyczne – dieta obfitująca w sól, uboga w warzywa i owoce,
- genetyczne – polimorfizm genów kodujących cytokiny np. IL-1 β [96, 97].

Rozwój raka żołądka w przebiegu infekcji *H. pylori* związany jest z szeregiem zmian histologicznych w błonie śluzowej, określanych jako „kaskada Correi”. Bezpośrednio po zakażeniu *H. pylori*, dochodzi do rozwoju ostrego stanu zapalnego, który z czasem przechodzi w postać przewlekłą. Następnie, u około 50% zakażonych obserwuje się zanikowe zapalenie żołądka, a także zmiany o typie ogniskowej metaplazji jelitowej. U około 8% chorych pojawiają się zmiany dysplastyczne, a u 2% dochodzi do rozwoju raka żołądka [88, 98].

1.5.5. Rola *H. pylori* w dyspepsji czynnościowej

Według najnowszych kryteriów rzymskich III, dyspepsja czynnościowa jest definiowana jako ból lub dyskomfort w nadbrzuszu, któremu mogą towarzyszyć takie objawy jak: wrażenie szybkiego nasycenia po niewielkim posiłku, uczucie ciężaru w nadbrzuszu, odbijanie, wzdęcia, czy zaburzenia w oddawaniu stolca. Objawów tych nie można wytłumaczyć przyczyną organiczną, metaboliczną ani układową [99].

Szacuje się, że w krajach Europy Zachodniej z powodu dyspepsji czynnościowej cierpi około 25% populacji ludzi dorosłych [100].

Do patomechanizmów powstawania objawów dyspepsji czynnościowej zalicza się:

- zaburzenia w opróżnianiu żołądka,
- zaburzenia wydzielania kwasu żołądkowego,
- upośledzenie przystosowania żołądka do przyjęcia pokarmu,
- nadwrażliwość trzewna [101].

Rola *H. pylori* w dyspepsji czynnościowej nie jest do końca wyjaśniona. Wiadomo, że infekcja powoduje proces zapalny w błonie śluzowej żołądka, który może zaburzać czucie trzewne [101].

Wykazano, że eradykacja *H. pylori* przynosi umiarkowane, ale istotne korzyści chorym z dyspepsją niewrzodową [102]. Po jednorazowym leczeniu uzyskuje się długoterminowe zniesienie dolegliwości, a ponadto zmniejszenie ryzyka rozwoju wrzodu trawiennego, zanikowego zapalenia błony śluzowej żołądka oraz raka żołądka [103].

U chorych < 45 roku życia, z utrzymującą się dyspepsją, bez objawów alarmujących (krwawienia z przewodu pokarmowego, uporczywe wymioty, gwałtowny spadek masy ciała, anemia, brak apetytu), właściwym postępowaniem jest strategia „wykonaj test i lecz” („test and treat” strategy). Do potwierdzenia zakażenia *H. pylori* zaleca się testy nieinwazyjne, takie jak: test oddechowy z użyciem mocznika znakowanego izotopem węgla C¹³ (UBT – urea breath test), lub badanie antygenu *H. pylori* w kale. Natomiast w przypadku występowania objawów dyspeptycznych u osób > 45 roku życia lub sygnałów alarmowych niezależnie od wieku, zaleca się endoskopię górnego odcinka przewodu pokarmowego [101, 103, 104].

W Polsce, ze względu na częstość infekcji sięgającą w populacji osób dorosłych 85% oraz stosunkowo wysoką zapadalność na raka żołądka, należy w diagnostyce uwzględnić badanie endoskopowe, także u pacjentów w młodym wieku [16, 101].

1.6. Diagnostyka zakażenia *H. pylori*

Do diagnostycznych metod rozpoznawania aktualnego lub przebytego zakażenia *H. pylori* zalicza się:

Metody nieinwazyjne (niewymagające endoskopii górnego odcinka przewodu pokarmowego):

- test oddechowy z użyciem mocznika znakowanego izotopem węgla C¹³ (UBT),
- oznaczanie antygenów *H. pylori* w kale (z użyciem przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych),

- badanie serologiczne (testy wykrywające swoiste przeciwciała w surowicy, krwi pełnej, ślinie i moczu),
- określenie obecności *H. pylori* w ślinie lub w stolcu metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR – polymerase chain reaction) [103, 105, 106].

Metody inwazyjne (wymagające pobrania bioptatów błony śluzowej żołądka podczas gastroskopii):

- badanie histopatologiczne,
- szybki test ureazowy (tzw. CLO-test, *Campylobacter*-like organism test),
- hodowla bakteryjna,
- metoda PCR [103, 105, 106].

UBT oraz test wykrywający antygeny *H. pylori* w stolcu charakteryzują się wysoką czułością oraz swoistością, ale pierwszy z nich jest trudno dostępny w Polsce [107].

Jakościowe testy serologiczne, wykonywane z pełnej krwi, śliny lub moczu, nie mają obecnie znaczenia w praktyce klinicznej, ze względu na niską czułość [103].

Niektóre sytuacje kliniczne, jak: krwawienie z wrzodu trawiennego, zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka, chłoniak MALT oraz przyjmowanie antybiotyków i inhibitorów pompy protonowej (IPP), mogą być przyczyną fałszywie ujemnych wyników testów inwazyjnych oraz nieinwazyjnych. Nie dotyczy to jednak ilościowych badań serologicznych charakteryzujących się dużą dokładnością (>90%), wskazanych do wykonania w powyższych przypadkach [103].

Zaleca się przeprowadzenie u chorych kontroli skuteczności eradykacji *H. pylori* za pomocą testów nieinwazyjnych (UBT, oznaczanie antygenów *H. pylori* w kale). Wyjątek stanowią pacjenci, u których wskazana jest endoscopia (np. chorzy z wrzodem żołądka). Badanie potwierdzające eradykację *H. pylori* powinno być wykonane co najmniej 4 tygodnie od zakończenia leczenia [103].

Obecnie coraz większe zastosowanie w diagnostyce zdobywają metody molekularne, oparte na wykrywaniu w próbkach klinicznych

swoistych sekwencji DNA badanych drobnoustrojów. Są wysoce swoiste i czułe, a w porównaniu z metodami stosowanymi w rutynowej diagnostyce, znacznie szybsze [108].

Metody molekularne stosowane w diagnostyce zakażenia *H. pylori* (PCR oraz jej różne odmiany) są wykorzystywane do:

- wykrywania *H. pylori* w próbkach klinicznych i środowiskowych,
- wykrywania czynników wirulencji (np. obecności genu *cagA* oraz alleli genu *vacA*) w szczepach izolowanych od pacjentów,
- wykrywania mutacji warunkujących oporność *H. pylori* na stosowane w leczeniu antybiotyki i chemioterapeutyki,
- badań epidemiologicznych (różnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów) [108].

1.6.1. Łańcuchowa reakcja polimerazowa – PCR

Klasyczna łańcuchowa reakcja polimerazowa polega na amplifikacji (powieleniu) konkretnego fragmentu genu. Składniki niezbędne do przebiegu reakcji to: matrycowe DNA, swoiste startery (primery – jednoniciowe fragmenty DNA zazwyczaj 10-30 nukleotydowe) komplementarne do końców wybranej sekwencji DNA, cztery rodzaje trójfosforanów deoksynukleotydów (dNTP), termostabilna polimeraza DNA oraz jony Mg^{2+} .

Cykl reakcji obejmuje trzy etapy:

- denaturację dwuniciowego DNA w temperaturze 94-96°C,
- hybrydyzację starterów (w odpowiednio obliczonej temperaturze) do komplementarnych sekwencji na matrycy DNA,
- wydłużanie starterów przez przyłączanie kolejnych deoksynukleotydów przy udziale termostabilnej polimerazy DNA w temperaturze 72°C [109].

W wyniku powtarzania cykli następuje powielenie określonej sekwencji DNA w postępie geometrycznym.

Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością, dzięki czemu może wykryć w badanej próbce nawet bardzo małe ilości DNA drobnoustroju [109].

Do najczęściej wykrywanych genów *H. pylori* przy użyciu techniki PCR należą:

- geny cytotoksyczności *cagA* i *vacA* (allele *s1*, *s1a*, *s1b*, *s2*, *m1*, *m2*),
- geny kodujące ureazę (podjednostki A, B, C),
- gen kodujący podjednostkę 16S rRNA [108].

Łańcuchowa reakcja polimerazowa jest szczególnie wykorzystywana do określania częstości występowania genu *cagA* oraz typów alleli w obszarze sygnałowym i środkowym genu *vacA*, co jest ważne dla ustalenia toksyczności szczepu [49, 108].

1.7. Leczenie zakażenia *H. pylori*

W 2005 roku zaktualizowano wytyczne Europejskiej Grupy zajmującej się zakażeniem *H. pylori* (EHSg – European Helicobacter Study Group), które opublikowano jako „Raport Uzgodnieniowy Maastricht III” [103].

W odniesieniu do nowych wytycznych europejskich, w 2008 roku uaktualniono zalecenia Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG-E), dotyczące diagnostyki oraz zasad leczenia zakażenia *H. pylori* [105].

Zgodnie z najnowszymi europejskimi (Raport Maastricht III 2005) oraz polskimi (PTG-E 2008) wytycznymi, wskazaniem do eradykacji *H. pylori* jest:

- wrzód żołądka lub dwunastnicy (czynny lub nie, w tym powikłana choroba wrzodowa),
- chłoniak MALT,
- zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka,
- stan po resekcji żołądka z powodu raka,
- krewni I stopnia chorych na raka żołądka (w Polsce zaleca się eradykację zakażenia *H. pylori* już w drugim stopniu pokrewieństwa),
- dyspepsja czynnościowa,
- niedokrwistość z niedoboru żelaza o niewyjaśnionej przyczynie,
- samoistna plamica małopłytkowa,
- życzenie pacjenta po konsultacji z lekarzem [103, 105].

Obecnie za najbardziej skuteczne postępowanie terapeutyczne, które daje najwyższy odsetek eradykacji *H. pylori*, uważa się terapię obejmującą lek zmniejszający wydzielanie żołądkowe (IPP) w połączeniu z dwoma antybiotykami (amoksycylina, klarytromycyna, rzadziej tetracyklina) lub antybiotykiem i jednym z chemioterapeutyków (metronidazol) bądź solami bizmutu [103].

Inhibitory pompy protonowej (IPP) – omeprazol, pantoprazol, lanzoprazol, rabeprazol, esomeprazol, to leki, które hamując wydzielanie kwasu solnego, przez blokowanie pompy wodorowo-potasowej w komórkach okładzinowych żołądka, podwyższają pH w żołądku, co zwiększa skuteczność działania antybiotyków oraz wpływa korzystnie na proces gojenia się wrzodów [110].

Sole bizmutu, to leki działające cytoprotekcyjnie w stosunku do błony śluzowej żołądka, wpływające jednocześnie na gojenie się niszy wrzodowej oraz wykazujące działanie aktywne wobec *H. pylori* [3, 110].

Amoksycylina jest półsyntetyczną penicyliną, działającą bakteriobójczo wobec wielu gatunków bakterii. Blokuje ostatni etap biosyntezy ściany komórkowej bakterii, poprzez wiązanie się z karboksypeptydazami i transpeptydazami (PBPs – penicillin binding proteins; białka wiążące penicyliny). Jest stosowana w eradykacji *H. pylori* w skojarzeniu z klarytromycyną lub metronidazolem [111].

Klarytromycyna to antybiotyk z grupy makrolidów – bakteriostatycznych inhibitorów syntezy białek bakteryjnych. Miejscem docelowym działania klarytromycyny jest podjednostka 23S rRNA 50S rybosomu komórki bakteryjnej. Antybiotyk ten jest najczęściej stosowany w eradykacji *H. pylori* w połączeniu z amoksycyliną lub metronidazolem [111].

Tetracyklina jest antybiotykiem o działaniu bakteriostatycznym, charakteryzującym się szerokim spektrum działania, obejmującym także *H. pylori*. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego polega na wiązaniu się leku z podjednostką 16S rRNA rybosomu, co uniemożliwia wiązanie aminoacylo-tRNA do miejsca A na rybosomie. Prowadzi to do zahamowania syntezy białek i wzrostu bakterii. Jest stosowana w terapii zakażeń szczepami *H. pylori* opornymi na inne leki, takie jak klarytromycyna, czy

metronidazol. Stanowi także alternatywę w leczeniu osób uczulonych na penicyliny [111].

Metronidazol to chemioterapeutyk wykazujący działanie bójcze w stosunku do bakterii beztlenowych, mikroaerofilnych oraz pierwotniaków. Po wnikięciu do wnętrza komórki bakteryjnej ulega redukcji przy niskim potencjale oksydoredukcyjnym, a jego zredukowana forma powoduje rozerwanie nici DNA, prowadząc do śmierci komórki. Metronidazol wykazuje synergizm z antybiotykami beta-laktamowymi (amoksycylina). Stanowi jeden z najbardziej aktywnych preparatów w leczeniu zakażeń bakteriami beztlenowymi [111].

Jednym z nowych leków wprowadzonych do leczenia zakażenia *H. pylori* jest lewofloksacyna z grupy fluorochinolonów, charakteryzująca się szerokim spektrum aktywności wobec bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych (w tym *H. pylori*) [103, 112].

Mechanizm działania przeciwbakteryjnego lewofloksacyny polega na blokowaniu replikacji DNA bakterii przez zahamowanie aktywności topoisomerazy II i IV [111].

Analizując czynniki wpływające na niepowodzenie eradykacji zakażenia *H. pylori* wykazano, że główną przyczyną nieskutecznej terapii jest oporność *H. pylori* na stosowane w leczeniu antybiotyki i chemioterapeutyki, która wynika przede wszystkim z mutacji punktowych [113].

Aktualnie, w Polsce, zgodnie z wytycznymi PTG-E, obowiązuje następujący schemat leczenia zakażenia *H. pylori*:

10-14 dniowa terapia pierwszego rzutu:

- IPP + amoksycylina + metronidazol
- lub
- IPP + klarytromycyna + metronidazol
- lub
- IPP + amoksycylina + klarytromycyna.

W przypadku braku efektów terapeutycznych po zastosowaniu terapii pierwszego rzutu zalecany jest:

14-dniowy trójskładnikowy schemat leczenia drugiego rzutu:

- IPP + 2 antybiotyki,

lub czteroskładnikowy:

- IPP + amoksycylina + metronidazol + tetracyklina

lub

- IPP + amoksycylina + metronidazol + sole bizmutu (jeśli są dostępne).

Leczenie trzeciego wyboru:

Według zaleceń PTG oraz Raportu Maastricht III 2005, po dwukrotnym niepowodzeniu terapii oraz przy bezwzględnych wskazaniach do eradykacji *H. pylori*, chorego należy skierować do specjalistycznego ośrodka, wykonać badanie mikrobiologiczne oraz antybiogram dla wyizolowanego szczepu *H. pylori*, a następnie leczyć zgodnie z wynikiem lekowrażliwości [103, 105].

Ponadto, PTG rekomenduje w trzecim rzucie leczenia także inne możliwości, jak:

- rozważenie wprowadzenia lewofloksacyny z amoksycyliną,
- dodanie probiotyku (jeśli wcześniej nie był stosowany),
- przedłużenie leczenia do 14 dni (jeśli poprzednie kuracje trwały krócej) [105].

Według najnowszych wskazań, zawartych w Raporcie Maastricht III 2005, 14-dniowa standardowa terapia 3-lekowa pierwszego rzutu (IPP + amoksycylina + klarytromycyna lub metronidazol) jest skuteczniejsza niż terapia 7-dniowa. Pozostaje ona nadal leczeniem pierwszego wyboru w populacjach, w których częstość oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę jest mniejsza niż 15-20%.

Terapia 7-dniowa jest dopuszczalna na obszarach, gdzie potwierdzono jej skuteczność.

W przypadku, gdy odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol w danej populacji sięga poniżej 40%, akceptuje się terapię złożoną z IPP, klarytromycyny i metronidazolu.

Czteroskładnikowe leczenie z preparatem bizmutu stanowi akceptowaną terapię pierwszego rzutu i nadal pozostaje najlepszym rozwiązaniem leczenia drugiego rzutu. W przypadku braku dostępności soli

bizmutu, Raport Maastricht III 2005 rekomenduje terapię złożoną z IPP, amoksycyliny lub tetracykliny i metronidazolu.

Zaleca się ciągle monitorowanie częstości występowania oporności wśród szczepów *H. pylori* na stosowane w leczeniu antybiotyki i chemioterapeutyki w różnych rejonach geograficznych, celem oceny ryzyka niepowodzenia terapii z powodu lekooporności [103].

1.8. Charakterystyka grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*

Przewód pokarmowy człowieka jest siedliskiem dla wielu rodzajów bakterii, jak *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* oraz *Clostridium*. U zdrowych osób współwystępują w równowadze z grzybami, które współzawodniczą o miejsca wiązania na błonach śluzowych [114, 115].

Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* wchodzi w skład flory saprofitycznej, bytującej w przewodzie pokarmowym, układzie moczowo-płciowym, na skórze oraz błonach śluzowych dróg oddechowych. Należą do drobnoustrojów oportunistycznych, które w określonych warunkach mogą wywołać zakażenie zwane kandydozą [116, 117, 118].

Wyróżnia się kilka postaci klinicznych kandydozy: powierzchniową (skóry, paznokci, błon śluzowych), układową (narządową), rozsianą oraz uczuleniową [119].

Do czynników predysponujących do rozwoju zakażenia grzybiczego należą:

- stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum przeciwbakteryjnym,
- leki immunosupresyjne (cytostatyki, kortykosteroidy),
- stosowanie IPP lub H₂ – blokerów,
- urazy, oparzenia,
- żywienie parenteralne,
- obecność linii naczyniowych oraz cewników,
- inwazyjne zabiegi diagnostyczne,
- pierwotne i wtórne niedobory immunologiczne (AIDS, cukrzyca, endokrynopatie, procesy nowotworowe) [117, 118, 120].

Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* występują w postaci komórek wegetatywnych kulistych, cylindrycznych lub jajowatych. Rozmnażają się przez pączkowanie, tworząc blastosporę i pseudostrzępkę. Większość z nich ma zdolność do fermentacji wybranych węglowodanów oraz asymilacji węgla i azotu z różnych związków organicznych [116].

1.9. Patomechanizm zakażeń grzybami *Candida*

Organizm człowieka, poza układem immunologicznym, posiada wiele mechanizmów, które chronią go przed infekcjami, takich jak: odpowiednie pH skóry i błon śluzowych, ciągłość nabłonka, jego złuszczenie i odnowa, wydzielanie śluzu, endogenna flora bakteryjna. Ponadto, wytwarza liczne substancje stanowiące nieswoistą linię obrony jak: lizozym obecny w ślinie, laktoferyna wiążąca żelazo, laktoperoksydaza, glikoproteiny oraz sekrecyjna immunoglobulina IgA [115, 121]. Grzyby z rodzaju *Candida* są przystosowane do pokonywania tych przeszkód [115, 122].

Ze względu na rolę wielu determinant patogenności drożdżaków *Candida*, w rozwoju zakażenia wyróżnia się następujące etapy:

- obecność na błonach śluzowych gospodarza małej liczby blastosporów komensalnych szczepów *Candida*,
- proliferacja blastosporów oraz początek pączkowania, prowadzący do zwiększenia ich liczby,
- adherencja do powierzchni nabłonka,
- aktywacja proteaz i fosfolipaz, powodujących drażnienie powierzchni tkanek,
- uszkodzenie tkanek, penetracja wypustek nitkowatych, tworzenie nici grzybni,
- aktywna inwazja nabłonka i tkanek pozanabłonkowych,
- ekspozycja grzybów *Candida* na układ odpornościowy gospodarza [115].

Spośród grzybów z rodzaju *Candida*, najlepiej poznanym gatunkiem, a zarazem najczęstszym u ludzi czynnikiem etiologicznym kandydozy narządowej i uogólnionej jest *Candida albicans* (*C. albicans*) [116].

Charakteryzuje się następującymi czynnikami chorobotwórczości:

- zmiennością morfologiczną i antygenową (dymorfizm),
- adhezją do nabłonków i śródbłonków,
- produkcją zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i fosfolipaz,
- produkcją toksyn (gliotoksyna),
- aktywnością hemolityczną [115, 122].

1.9.1. Dymorfizm

Ważnym czynnikiem wirulencji *C. albicans* jest zdolność do wzrostu zarówno w formie jednokomórkowych owalnych blastosporów jak i pseudogrzybni, którą stanowią łańcuchy wydłużonych komórek [115, 122, 123].

Podczas przemiany blastospor w formy mycelialne, dochodzi w komórce grzyba do reorganizacji cytoszkieletu, zmiany składu ściany komórkowej oraz syntezy fazowospecyficznych białek strukturalnych i enzymatycznych [124].

Wytwarzanie form nitkowatych zależy od warunków środowiska, w tym: odpowiedniego pH, temperatury, dostępności i rodzaju substancji odżywczych [122].

W procesie kolonizacji tkanek gospodarza, najpierw występuje forma drożdżowa (blastospory) oporna na bójcze działanie fagocytów. Następnie dochodzi do wykształcenia formy wydłużonej tzw. germ-tubes, czyli kiełkującej blastospory, stanowiącej pierwszą fazę mycelialną (strzępkową) formy wzrostu, która łatwiej penetruje w głąb tkanki [115, 125].

Wykazano, że brak zdolności do występowania grzybów w tych dwóch formach pozbawia je właściwości chorobotwórczych [126].

1.9.2. Adhezja

Przyleganie komórek grzybów do powierzchni komórek gospodarza jest wstępnym, niezbędnym etapem, poprzedzającym kolonizację tkanek, który uruchamia dalsze drogi transdukcji sygnałów i może prowadzić do rozprzestrzeniania się zakażenia [127]. Brak zdolności adhezji uniemożliwia

utrzymanie się grzyba w organizmie żywiciela i prowadzi do jego usunięcia wskutek ciągłego omywania błon śluzowych płynami ustrojowymi [123].

Wykazano, że najsilniejsze właściwości adhezyjne posiada gatunek *C. albicans*, które wspólnie ze zdolnością do dymorfizmu czynią go najbardziej patogennym [115].

Warunki panujące we wrotach zakażenia, takie jak: pH, temperatura, stężenie cukrów, koncentracja komórek grzyba, wywierają duży wpływ na adhezję *C. albicans* [122].

Proces przylegania zachodzi na zasadzie interakcji ligand-receptor. *C. albicans* posiada zdolność adhezji do różnych typów komórek nabłonkowych, komórek śródbłonna, płytek krwi, erytrocytów, a także do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen, laminina, fibronektyna, witronektyna czy elastyna), białek śliny oraz surowicy (albumina, fibrynogen, transferyna, niektóre białka dopełniacza). Adheruje także do sztucznych polimerów, z których zbudowane są cewniki, endoprotezy, tworząc biofilm na ich powierzchni [122, 123].

Przypuszcza się, że wszystkie adhezyny pod względem biochemicznym są mannoproteinami, które stanowią 30-40% masy ściany komórkowej *C. albicans* [123, 127].

Obecnie znana jest funkcja następujących adhezyn:

- Als1p (agglutinin-like sequence protein) – wiąże receptory komórek nabłonka policzka i śródbłonna naczyń,
- Ala1p (Als5p) - wiąże fibronektynę,
- Hwp1p (mannoproteina specyficzna dla formy mycelialnej) – wiąże receptory komórek nabłonka policzka,
- Int1p (integrin-like protein) – wiąże białka macierzy zewnątrzkomórkowej,
- Mnt1p, Pmt1p (mannozylotransferazy) – oddziałując z białkami ściany komórkowej grzyba wpływają na adherencję [122, 123].

Wykazano, że szczepy *C. albicans* izolowane od chorych mają silniejsze właściwości adhezyjne, w porównaniu do szczepów pochodzących od osób zdrowych [128]. Ponadto, potwierdzono badaniami, że szczepy

o słabszych właściwościach adhezyjnych są mniej wirulentne dla zwierząt laboratoryjnych [124].

1.9.3. Koadhezja

Zjawisko to polega na tworzeniu autoagregatów, w wyniku przyłączenia się komórek grzybów do blastosporów będących już w kontakcie z komórką nabłonka. Zwiększona liczba blastosporów warunkuje wysokie stężenie enzymów litycznych, które uszkodzają struktury na powierzchni komórek gospodarza i ułatwiają inwazję grzyba [121].

Gatunek *C. albicans* posiada zdolność do koadhezji zarówno z komórkami grzybów przylegających już do komórek gospodarza, jak również z innymi drobnoustrojami zasiedlającymi organizm człowieka [122].

1.9.4. Enzymy

Proteazy oraz fosfolipazy są enzymami odgrywającymi kluczową rolę w patogenezie zakażeń wywoływanych przez grzyby *Candida*. Szczepy nie produkujące tych enzymów charakteryzują się mniejszą patogennością [115].

Za najważniejszą proteazę uznaje się kwaśną proteazę aspartylową (Sap), wyizolowaną w 1981 roku przez Rùchela ze szczepu *C. albicans* [129]. Występuje ona w postaci 10 izoenzymów (Sap) kodowanych przez rodzinę genów *SAP1-10* [130]. Ekspresja poszczególnych genów jest bardzo zróżnicowana i zależy od czynników środowiskowych (pH, temperatura, obecność białka) oraz fazy morfologicznej grzyba [122].

Proteazy Sap, modyfikując powierzchnię grzybów i komórek nabłonkowych, zwiększają przyleganie grzybów do błony śluzowej, co ułatwia ich kolonizację oraz penetrację do tkanek żywiciela [131]. Ponadto, charakteryzują się szeroką specyfiką substratową rozkładając: keratynę, albuminę, kolagen, hemoglobinę, także degradują łańcuchy ciężkie immunoglobuliny IgA oraz składnik C3 komplementu [124]. Wykazano również ich wpływ na zmianę przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz aktywację czynników krzepnięcia [132].

Rola poszczególnych enzymów Sap w patogenezie zakażenia zależy od etapu oraz rodzaju infekcji. Ostatnio trwają poszukiwania inhibitorów

proteaz Sap, które mogłyby mieć zastosowanie w terapii przeciwgrzybiczej [133].

Istotną rolę w rozprzestrzenianiu się grzybów w organizmie gospodarza odgrywają fosfolipazy. *C. albicans* produkuje fosfolipazę B (PLB), C (PLC) oraz D (PLD), jednak główną rolę w zakażeniu odgrywa fosfolipaza B, posiadająca aktywność fosfolipazy, lizofosfolipazy, a także transacetylazy [134]. Wykazano, że szczepy *C. albicans* izolowane z krwi produkują więcej fosfolipazy, w porównaniu do izolatów z moczu, czy jamy ustnej [122].

Fosfolipaza B jest kodowana przez geny *caPLB1* i *caPLB2*. Wykazano, że mutanty pozbawione genu *caPLB1* wykazują znacznie ograniczoną zdolność penetracji w głąb tkanek gospodarza [122].

1.9.5. Toksyny

Shah i wsp. potwierdzili badaniami, że *C. albicans* wytwarza toksynę analogiczną do gliotoksyny (epipolitiiodioksypiperazyna), produkowanej przez inny gatunek grzybów (*Aspergillus fumigatus*). Poza właściwościami toksycznymi, wywiera efekt immunosupresyjny oraz antyfagocytarny [135]. Ponadto, *C. albicans* produkuje jeszcze kilka toksyn, które podzielono ze względu na ciężar cząsteczkowy [136]. Do toksyn o wysokim ciężarze cząsteczkowym należy m.in. kandydotoksyna, która wykazuje aktywność cytotoksyczną oraz immunologiczną. Toksyny o niskim ciężarze cząsteczkowym były letalne dla zwierząt doświadczalnych [115].

Grzyby *C. albicans* produkują mannoproteinę – czynnik wywołujący hemolizę erytrocytów. Działanie hemolityczne niezbędne jest do pozyskiwania żelaza, koniecznego do procesów wzrostu oraz rozmnażania [122].

1.9.6. Zakażenie *C. albicans*, a układ immunologiczny

Zakażenie *C. albicans* indukuje odpowiedź zarówno humoralną jak i komórkową. Głównymi substancjami immunogennymi *C. albicans* są: mannoproteiny, glikan, mannoglikoproteiny, chityna, białka metaboliczne

Sap, białka szoku cieplnego (Hsp – heat shock proteins) – Hsp 90 i Hsp 70 oraz enolaza [137].

Mannany indukują powstawanie limfocytów supresorowych oraz hamują wydzielanie mieloperoksydazy i modyfikują funkcje neutrofilów [122].

C. albicans może unikać reakcji ze strony układu immunologicznego gospodarza dzięki zmienności morfologicznej oraz antygenowej (obecność różnych antygenów na strzępkach oraz blastosporach) [122]. Ponadto, na swojej powierzchni posiada receptor, analogiczny do receptora CR3, który występuje m.in. na neutrofilach i makrofagach. Komórkom żernym umożliwia on rozpoznanie i fagocytozę cząstek opłaszczonych składnikiem C3b dopełniacza. Ta swoista mimikra molekularna skutecznie chroni grzyba przed fagocytozą [115].

Przyjmuje się, że za wirulencję grzybów *Candida* odpowiadają wytwarzane enzymy oraz zdolność do adhezji, a mimikra antygenowa i zmienność fenotypowa umożliwiają uniknięcie reakcji ze strony układu immunologicznego gospodarza [115].

1.10. Grzyby z rodzaju *Candida*, a choroba wrzodowa

Jak już wspomniano, grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*, stanowiąc naturalną florę fizjologiczną przewodu pokarmowego, bytują u większości zdrowych osób w obrębie jamy ustnej, gardła i jelita grubego. Przełyk, żołądek oraz jelito cienkie stanowią dla nich jedynie drogę pasażu. Oznacza to, że stała kolonizacja grzybicza w tych obszarach przewodu pokarmowego może prowadzić do rozwoju zakażeń, które nieleczone, mogą być źródłem infekcji dla innych układów [118].

Do grzybiczego zakażenia przewodu pokarmowego dochodzi głównie na drodze endogennej. Możliwe jest także zakażenie egzogenne (środowisko, chorzy, personel szpitalny) [118, 120].

W ostatnich latach coraz częściej notuje się infekcje grzybicze wywołane przez grzyby drożdżopodobne [120]. Jedną z przyczyn tego zjawiska jest szeroko stosowana antybiotykoterapia, która zaburzając równowagę biologiczną w naturalnej mikroflorze przewodu pokarmowego,

sprzyja zajęciu przez grzyby wolnych miejsc receptorowych na komórkach nabłonka, kolonizacji, a nawet rozsiewowi grzybiczemu [117].

Głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń grzybiczych przewodu pokarmowego jest *C. albicans*. Pozostałe, najczęściej izolowane gatunki chorobotwórcze to: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* oraz *C. lusitaniae* [118].

Obecnie duże zainteresowanie wywołuje ocena roli grzybów z rodzaju *Candida* w chorobie wrzodowej żołądka. Wykazano, że kolonizacja grzybicza wrzodów żołądka występuje u około 50% populacji chorych z wrzodem żołądka oraz wydłuża proces gojenia się wrzodów i wpływa na utrzymywanie się objawów klinicznych [138, 139, 140]. Stwierdzono również, że szczepy grzybów izolowane z wrzodów żołądka cechują się silniejszą aktywnością proteolityczną, w porównaniu do szczepów izolowanych od pacjentów z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej żołądka, co może mieć wpływ na przebieg gojenia się niszy wrzodowej [141].

W badaniach *in vitro* wykazano zdolność do wzrostu gatunków: *C. albicans* i *C. tropicalis* w pH = 2, a *C. lusitaniae* w pH = 3 [142, 143].

Obecnie zdania są podzielone, czy zakażenie grzybicze jest bezpośrednio odpowiedzialne za załamanie bariery śluzówkowej żołądka, czy w niepoznany bliżej sposób, wpływa na kluczowe mechanizmy gojącego się już owrzodzenia, w tym na proces ukrwienia w obrębie wrzodu, angiogenezę oraz syntezę czynników wzrostowych [120]. Brak związku pomiędzy liczbą komórek grzybów w żołądku, poziomem przeciwciał przeciwgrzybiczych w surowicy oraz obecnością antygenu grzybiczego we krwi sugeruje, że zazwyczaj grzybicza kolonizacja wrzodów jest zjawiskiem wtórnym, towarzyszącym lokalnej patologii w żołądku [142, 143].

Standardy leczenia zakażeń grzybiczych wrzodów nie zostały jeszcze ustalone [141].

1.11. Antybiotykoterapia grzybic głębokich

W terapii grzybic systemowych dostępne są leki przeciwgrzybicze należące do 4 odrębnych klas strukturalnych (rycina 6) [111].



Rycina 6. Klasyfikacja leków przeciwgrzybiczych stosowanych w terapii grzybic układowych [111].

Antybiotyki polienowe, których przedstawicielem jest amfoterycyna B, stanowią najstarszą grupę leków przeciwgrzybiczych. Charakteryzują się szerokim spektrum przeciwgrzybiczym, które obejmuje obok grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* i *Cryptococcus*, także grzyby pleśniowe.

Mechanizm działania polienów polega na wiązaniu się leku z ergosterolem błony protoplazmatycznej grzyba, co prowadzi do uszkodzenia integralności błony i ucieczki składników komórkowych na zewnątrz. W konsekwencji dochodzi do lizy i śmierci komórki. Niestety wiązanie ze sterolami grzyba nie jest ograniczone tylko do drobnoustrojów, ponieważ antybiotyki polienowe wchodzą także w interakcje ze sterolami (cholesterolem) komórek ssaków. Skutkiem tego zjawiska jest działanie

nefrotoksyczne, które może być osłabione przez umieszczenie amfoterycyny B na lipidowych nośnikach.

Najczęstszym wskazaniem klinicznym do stosowania amfoterycyny B jest: zapalenie otrzewnej o etiologii *Candida*, grzybice oczne, grzybice u pacjentów z białaczką szpikową, chłoniakiem, inwazyjna kandydoza zagrażająca życiu, aspergiloza płuc/rozszkana, mukormykozy.

Kolejną grupą leków przeciwgrzybiczych, wprowadzoną do terapii w latach 80-tych XX wieku, są imidazole. Dzieli się na dwuazole, których przedstawicielem jest ketokonazol oraz trójazole, do których zalicza się: flukonazol, itraconazol, worykonazol, posakonazol oraz rawukonazol. Trzy ostatnie leki należą do tzw. II generacji azoli.

Mechanizm działania azoli polega na zaburzeniu syntezy ergosterolu w błonie komórkowej grzyba, poprzez hamowanie 14 α -demetylasy katalizowanej przez cytochrom P₄₅₀. W wyniku tego procesu powstała błona komórkowa posiada zaburzoną strukturę oraz funkcję. Worykonazol dodatkowo hamuje syntezę chityny w ścianie komórkowej grzyba.

Flukonazol w swoim spektrum przeciwgrzybiczym obejmuje drożdżaki z rodzaju *Candida* oraz *Cryptococcus*. Wyjątek stanowią gatunki: *C. krusei* posiadający naturalną oporność na ten lek oraz *C. glabrata* o zmniejszonej wrażliwości.

Obecnie jest stosowany zarówno w profilaktyce jak i w leczeniu różnych postaci klinicznych inwazyjnej lub rozszkanej kandydozy, a także u pacjentów HIV(+). Jest lekiem o dużym marginesie bezpieczeństwa, dobrze tolerowanym przez pacjentów. Warto jednak wspomnieć, że niekontrolowane stosowanie flukonazolu w szpitalu prowadzi do selekcji szczepów naturalnie opornych na ten lek, jak *C. krusei* lub o obniżonej wrażliwości, jak *C. glabrata*, które odgrywają coraz większą rolę w zakażeniach układowych oraz inwazyjnych.

Itraconazol charakteryzuje się szerokim spektrum przeciwgrzybiczym, obejmującym obok rodzaju *Candida* także grzyby dimorficzne. W odróżnieniu od flukonazolu, jest aktywny wobec grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus*. Pomimo szerokiej aktywności biologicznej itraconazol wykazuje działanie nefrotoksyczne oraz wchodzi w interakcję z wieloma lekami.

Nowe pochodne triazoli (worykonazol, posakonazol, rawukonazol) są aktywne nie tylko w stosunku do grzybów z rodzaju *Candida* (w tym opornych lub o obniżonej wrażliwości na flukonazol, odpowiednio *C. krusei* oraz *C. glabrata*), ale także do grzybów pleśniowych. W Polsce, dotychczas zarejestrowano do leczenia worykonazol oraz posakonazol.

Wprowadzenie worykonazolu na polski rynek poszerzyło bardzo wąski zakres leków przeciwgrzybiczych dostępnych w leczeniu grzybic układowych.

Poza aktywnością wobec wyżej wymienionych rodzajów grzybów, worykonazol w swoim spektrum obejmuje także grzyby dimorficzne oraz dermatofity. Wieloośrodkowe badania kliniczne wykazały, że worykonazol jest skutecznym lekiem przeciwgrzybiczym w leczeniu inwazyjnej aspergilozy oraz innych trudnych w terapii grzybic układowych. Jest także lepiej tolerowany przez pacjentów, niż amfoterycyna B.

Posakonazol charakteryzuje się szerokim zakresem działania przeciwgrzybiczego, zbliżonym do amfoterycyny B i szerszym od pozostałych azoli. Wchodzi w interakcje z wieloma lekami.

Najnowszą grupę leków przeciwgrzybiczych stanowią echinokandyny. W Polsce zarejestrowano kaspofunginę, anidulafunginę oraz niedawno mikafunginę.

Antymikotyki te charakteryzują się unikalnym mechanizmem działania, który polega na blokowaniu syntazy 1-3 β -glukanowej, biorącej udział w syntezie glukanu, który jest składnikiem ściany komórkowej, nadającym kształt komórce grzyba oraz zapewniającym jej integralność. Pozbawiona glukanu ściana komórkowa przestaje być sztywna, wykazuje wrażliwość na ciśnienie osmotyczne, co w konsekwencji prowadzi do lizy komórki. Efekt ten jest szczególnie zaznaczony w przypadku grzybów *Candida* (w tym gatunków naturalnie opornych na azole). Grzyby z rodzaju *Cryptococcus* oraz *Mucor* ze względu na niską zawartość glukanu nie mieszczą się w spektrum echinokandyn.

Leki te charakteryzują się dużym marginesem bezpieczeństwa, ponieważ miejscem uchwytu jest ściana komórkowa grzyba, a komórki ssaków nie posiadają podobnej struktury.

Spektrum przeciwgrzybicze kaspofunginy obejmuje poza rodzajem *Candida*, grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus* oraz grzyby dimorficzne.

Kaspofungina jest lekiem z wyboru w leczeniu kandydoz (jamy ustnej, przełyku, postaci inwazyjnej). W przypadku aspergilozy stosowana jest w przypadkach nieodpowiadających na wcześniejsze leczenie przeciwgrzybicze.

Anidulafungina jest antymikotykiem skutecznym zarówno w leczeniu kandydozy u pacjentów z wydolnym układem odporności jak i z niedoborami immunologicznymi. Największą aktywność wykazuje w stosunku do *C. albicans* i *C. glabrata*, a najmniejszą do *C. parapsilosis*. W spektrum przeciwgrzybiczym anidulafunginy mieszczą się także grzyby pleśniowe *Aspergillus*.

Ostatnią omawianą grupą leków przeciwgrzybiczych, stosowanych w grzybicach układowych są antymetabolity, reprezentowane tylko przez jeden lek: flucytozynę (5-fluorocytozynę).

Mechanizm działania flucytozyny może obejmować kilka szlaków metabolicznych, które prowadzą bądź do zahamowania syntezy białka w komórce grzyba, wskutek wbudowania zmodyfikowanego leku w kwas RNA, lub nieprawidłowego podziału komórek, w wyniku zaburzeń syntezy DNA.

Flucytozyna wykazuje aktywność wobec grzybów z rodzaju: *Candida*, *Cryptococcus*, *Cladosporium* oraz *Phialophora*. Zwykle jest stosowana w połączeniu z amfoterycyną B w leczeniu kryptokokozy ośrodkowego układu nerwowego, a w monoterapii w zakażeniach układu moczowego [111].

W przypadku każdej postaci kandydozy konieczne jest oznaczenie wrażliwości grzyba na leki przeciwgrzybicze [144].

2. CEL PRACY

Cele podjętych badań:

1. Ocena patogenności szczepów *H. pylori*, na podstawie potwierdzenia metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej PCR obecności genu *cagA* i alleli *s1*, *s2*, *m1*, *m2* genu *vacA* oraz analiza związku tych genów z wybranymi chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego.
2. Analiza pierwotnej oporności szczepów *H. pylori* na leki stosowane w empirycznej terapii tego zakażenia.
3. Charakterystyka szczepów *Candida spp.*, izolowanych od pacjentów z wybranymi chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego, na podstawie:
 - a) profilu enzymatycznego,
 - b) wrażliwości na leki przeciwgrzybicze.
4. Analiza współwystępowania wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego z zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida spp.*

3. MATERIAŁY I METODY

Protokół badania klinicznego oraz mikrobiologicznego uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (Opinia nr KBET/149/B/2006).

3.1. Chorzy, materiał kliniczny

Badaniami objęto grupę 267 osób – 149 (56%) kobiet oraz 118 (44%) mężczyzn, w wieku od 16 do 80 lat (średni wiek 43 lata), zgłaszających się do prywatnego gabinetu lekarskiego oraz poradni gastrologicznej Centrum Medycznego „Falck” w Krakowie, w okresie od grudnia 2006 roku do lutego 2009 roku. Osoby te nigdy wcześniej nie były leczone w kierunku zakażenia *H. pylori*.

Powodem zgłoszenia się wszystkich pacjentów do lekarza gastroenterologa były dolegliwości dyspeptyczne, takie jak: ból w nadbrzuszu, odbijania, wzdęcia, gazy, nudności, wymioty, zgaga, zaburzenia w oddawaniu stolca, spadek masy ciała, brak apetytu.

W celu zdiagnozowania przyczyny dolegliwości, każdego chorego poddano badaniu endoskopowemu górnego odcinka przewodu pokarmowego. Podczas gastroskopii, w każdym przypadku pobierano biopłaty błony śluzowej żołądka z okolicy antrum oraz trzonu, w celu wykonania szybkiego testu ureazowego (PRO-MED, Góra Kalwaria, Polska), badania histopatologicznego oraz mikrobiologicznego w kierunku zakażenia *H. pylori* oraz *Candida*.

Materiał badany na obecność *H. pylori* (2 biopłaty – po jednym z antrum oraz z trzonu), przesyłano w podłożu transportowym Portagerm pylori (PORT-PYL, bioMérieux, Polska Sp. z o.o.), natomiast biopłaty przeznaczone do badań w kierunku izolacji grzybów *Candida* (po jednym z antrum oraz z trzonu), transportowano w 1 ml 0.85% NaCl.

Pobrany materiał opracowywano w dniu jego pobrania w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Dane dotyczące rozpoznania klinicznego u badanych pacjentów (dyspepsja niewrzodowa, choroba wrzodowa żołądka, choroba wrzodowa

dwunastnicy), wyniki szybkiego testu ureazowego oraz wyniki badania histopatologicznego, otrzymywano od lekarza gastroenterologa przeprowadzającego badanie kliniczne.

Rozpoznanie dyspepsji niewrzodowej obejmowało pacjentów bez żadnych zmian w badaniu endoskopowym oraz pacjentów z nadżerkowymi lub nienadżerkowymi schorzeniami jak: zapalenie przełyku, zapalenie żołądka oraz zapalenie dwunastnicy.

Losowo wybranym 61 pacjentom z zakażeniem *H. pylori*, oznaczono w surowicy poziom przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko *H. pylori*.

3.2. *H. pylori* – badanie mikrobiologiczne

Aparatura

- Inkubator CO₂ wraz z reduktorem (CO-150, New Brunswick Scientific, USA)
- Ultrazamrażarka -86°C, NBS Premium U410 (New Brunswick Scientific, USA)
- Mikroskop laboratoryjny odwrócony Nikon Eclipse E200 F (Equimed, Polska)
- Densytometr TYPE ATB 1550 (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Chłodziarko-zamrażarka (Polar, Polska)
- Zestaw pipet automatycznych (Eppendorf, Niemcy)
- Wytrząsarka Vortex z regulacją (Kartell)

Odczynniki i podłoża

- Podłoże transportowe Portagerm pylori, PORT-PYL (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Podłoże Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Podłoże Schaedler Agar (Oxoid, Argenta, Polska Sp. z o.o.)
- Bulion: Schaedler Anaerobe Broth (Oxoid, Argenta, Polska Sp. z o.o.)
- Suplement Dent (Oxoid, Argenta, Polska Sp. z o.o.)
- Krew barania
- Urea Indole Medium (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Woda utleniona 3%
- Krążki na obecność oksydazy (Becton Dickinson, USA)
- Barwienie metodą Grama: fiolet krystaliczny, płyn Lugola, 90% etanol z dodatkiem acetonu, fuksyna
- 10% glicerol
- 10% surowica płodowa bydlęca FBS (Sigma-Aldrich, USA)

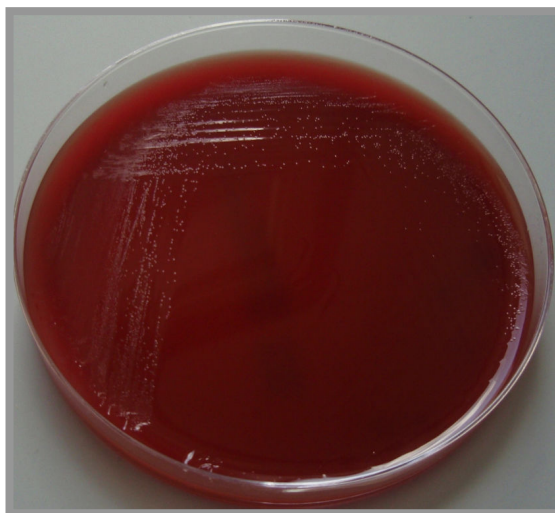
- Etesty: amoksycylina, metronidazol, klarytromycyna, lewofloksacyna (AB Biodisk, Szwecja)
- API NaCl 0.85% Medium 2ml (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)

3.2.1. Hodowla *H. pylori*

Materiał przeznaczony do badań mikrobiologicznych w kierunku izolacji *H. pylori*, stanowiły dwa wycinki błony śluzowej żołądka (po jednym z antrum oraz z trzonu), pobrane od każdego pacjenta podczas gastroskopii do podłoża transportowego Portagerm pylori, które w tym samym dniu były opracowywane w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM.

Otrzymany materiał umieszczano na jałowym szkiełku podstawowym, homogenizowano przy użyciu drugiego szkiełka, a następnie zebrany za pomocą wymazówki homogenat wysiewano na całą powierzchnię podłoża Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej, z suplementem Dent oraz bez suplementu. Hodowlę prowadzono w cieplarni, w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37°C, przez okres od 3 do 7 dni. Po okresie 3-4 dni, makroskopowo oceniano wygląd wyrosłych kolonii na podłożach: Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej z suplementem Dent oraz bez suplementu. Kolonie sugerujące *H. pylori* przesiewano na podłoże Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej, inkubowano w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37°C, przez 72 godziny. W przypadku braku charakterystycznych kolonii, hodowlę prowadzono do 7 dni, oceniając co 24-48 godzin wyrosłe kolonie.

Wyhodowane szczepy identyfikowano na podstawie makroskopowego wyglądu kolonii oraz dodatnich wyników testów na obecność ureazy, katalazy oraz oksydazy (rycina 7).



Rycina 7. Wzrost szczepu klinicznego *H. pylori* nr 413 na podłożu Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej.

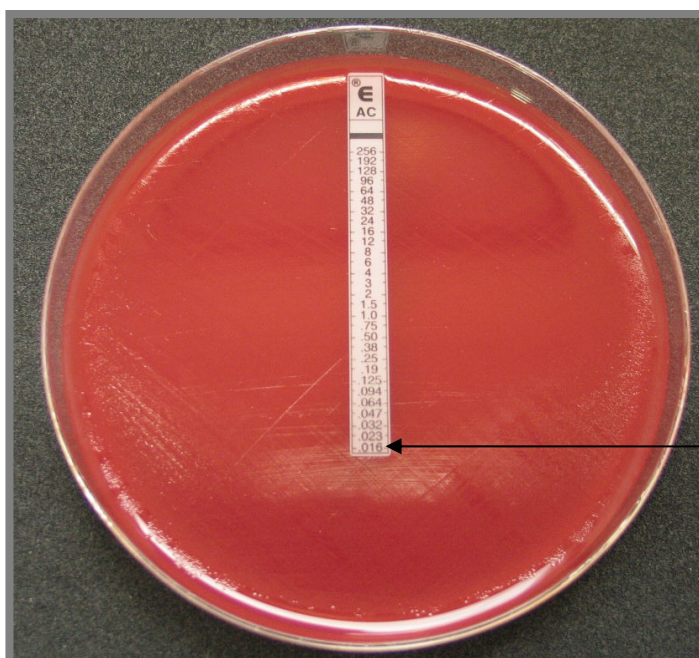
Ponadto, z hodowli wykonywano preparat, barwiony metodą Grama, w którym sprawdzano obecność Gram-ujemnych spiralnych bakterii.

Zidentyfikowane kolonie *H. pylori* przesiewano na całą powierzchnię podłoża Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej, inkubowano w cieplarni, w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37°C, przez 72 godziny, a następnie bankowano. W tym celu, zbierano z powierzchni agaru jałową wymazówką masę bakteryjną, którą zawieszano w podłożu płynnym (bulion Schaedler Anaerobe Broth – 1ml, 10% glicerol – 4 krople, 10% surowica płodowa bydłęca – 4 krople). Tak przygotowane szczepy przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania badań genetycznych.

3.2.2. Oznaczanie lekowrażliwości *H. pylori*

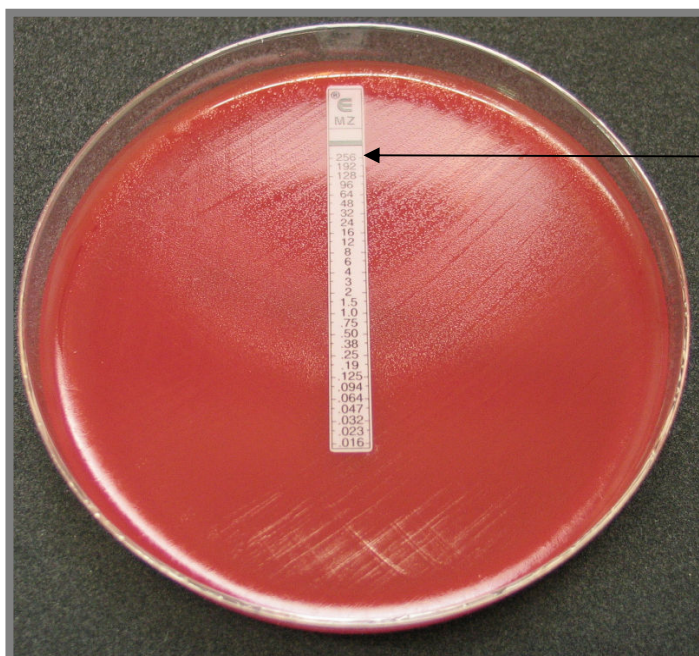
Wrażliwość 97 szczepów *H. pylori* na amoksycylinę, metronidazol, klarytromycynę oraz 79 szczepów na lewofloksacynę oznaczono metodą ilościową z zastosowaniem Etestów – plastikowych pasków nasasyconych antybiotykiem w gradiencie stężeń, celem wyznaczenia najmniejszego stężenia leku (MIC – Minimal Inhibitory Concentration) w mg/l, hamującego wzrost bakterii, zgodnie z zaleceniami producenta.

W tym celu, czyste kolonie szczepu *H. pylori* wyizolowanego z pobranych biopsatów błony śluzowej żołądka, wysiewano na całej powierzchni podłoża Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz inkubowano w cieplarni, w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Z uzyskanej hodowli przygotowywano zawiesinę bakterii, poprzez zebranie z powierzchni agaru jałową wymazówką masy bakteryjnej, którą zawieszano w 2 ml API NaCl 0.85% Medium. Próbkę delikatnie mieszano, a następnie w densytometrze mierzono gęstość zawiesiny, odpowiadającą wartości 3.0 w skali McFarland'a. W przypadku uzyskania zawiesiny o niewłaściwej gęstości, inokulum rozcieńczano, poprzez dodanie roztworu 0.85% NaCl lub zagęszczano, uzupełniając masą bakteryjną. Po otrzymaniu zawiesiny o prawidłowej gęstości 3.0 w skali McFarland'a, automatyczną pipetą przenoszono 150 µl na podłoże Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej oraz przy użyciu jałowej wymazówki, równomiernie rozprowadzano materiał w trzech kierunkach po całej powierzchni agaru. Posiane podłoże pozostawiano do wyschnięcia na 15 minut. Po upewnieniu się, że powierzchnia agaru była całkowicie sucha, przy pomocy sterylnej pęsety, nakładano pasek Etestu z odpowiednim lekiem (amoksycylina, metronidazol, klarytromycyna lub lewofloksacyna). Płytki inkubowano w cieplarni, w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych, przez 72 godziny. Po upływie tego czasu odczytywano dla danego antybiotyku/chemioterapeutyku wartość MIC (mg/l), w miejscu przecięcia się eliptycznej strefy zahamowania wzrostu z paskiem, biorąc pod uwagę wzrost mgławicowy oraz pojedyncze kolonie (ryciny: 8, 9, 10, 11).



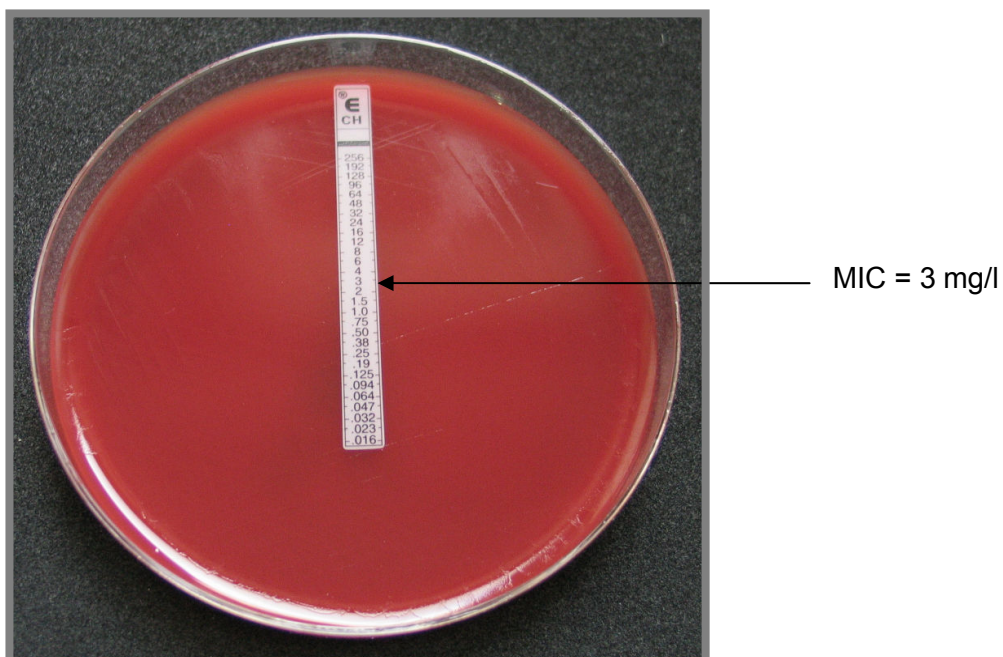
MIC < 0.016 mg/l

Rycina 8. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego *H. pylori* nr 413 na **amoksyycynę**, MIC < 0.016 mg/l.

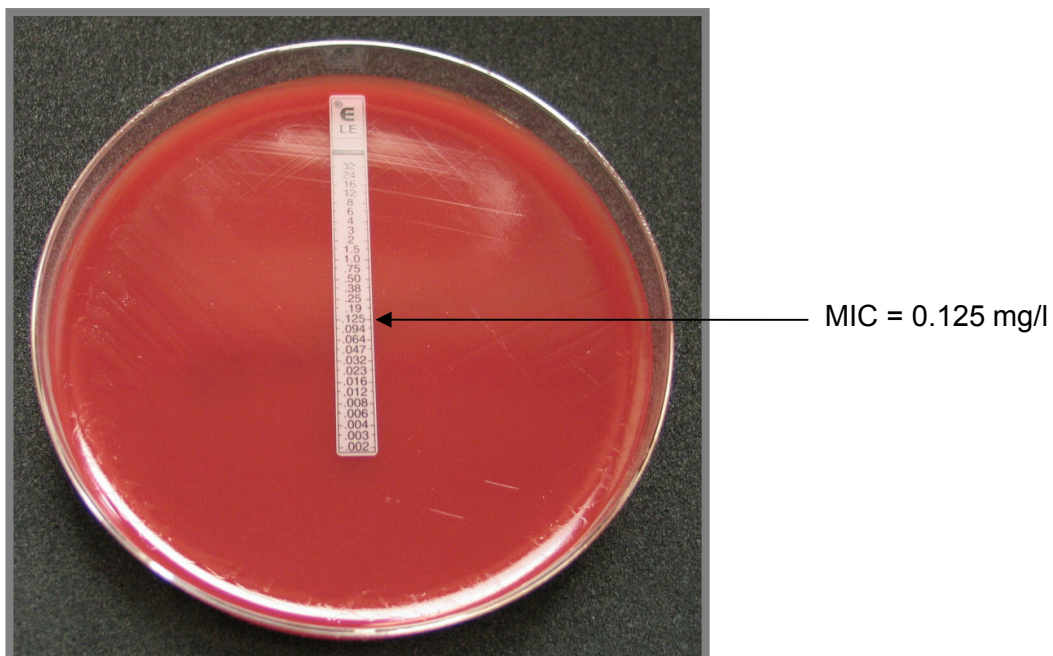


MIC > 256 mg/l

Rycina 9. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego *H. pylori* nr 413 na **metronidazol**, MIC > 256 mg/l.



Rycina 10. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego *H. pylori* nr 284 na **klarytromycynę**, MIC = 3 mg/l.



Rycina 11. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego *H. pylori* nr 413 na **lewofloksacynę**, MIC = 0.125 mg/l.

W kategoryzacji szczepów wrażliwy/ średniowrażliwy/ oporny przyjęto wartości graniczne MIC:

- dla klarytromycyny, zgodnie z wytycznymi CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [145],
- dla metronidazolu oraz amoksycyliny, zgodnie z wytycznymi BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) [146],
- dla lewofloksacyny, zgodnie z danymi literaturowymi [147] (tabela 1).

Tabela 1. Stężenia graniczne antybiotyków/chemioterapeutyków dla *H. pylori*.

Antybiotyk/ chemioterapeutyk	Wrażliwy MIC (mg/l)	Średniowrażliwy MIC (mg/l)	Oporny MIC (mg/l)
Amoksycylina	≤ 1	-	> 1
Metronidazol	≤ 4	-	> 4
Klarytromycyna	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Lewofloksacyna	≤ 1	-	> 1

3.3. *H. pylori* – badanie genetyczne

Aparatura

- Wirówka z chłodzeniem SIGMA 2-16 K (Sigma, Niemcy)
- Ciepłarka laboratoryjna typ CL 135 AF (Poll LTD Warszawa, Polska)
- Blok termiczny TB1 thermoblock (Biometra, Niemcy)
- Wytrząsarka Vortex z regulacją (Kartell)
- Aparat do elektroforezy poziomej w żelu agarozowym Agagel (Biometra, Niemcy)
- Zasilacz: Consort E 143
- Aparat cyfrowy: Canon Power Shot G5
- Transluminator ECX 20M (Vilber Lourmat, Francja)
- System dokumentacji i analizy obrazu żeli POLYDOC (Polygen, Polska)
- Termocykler T Personal (Biometra, Niemcy)
- Chłodziarka (Polar, Polska)
- Zestaw pipet automatycznych (Eppendorf, Niemcy)
- Waga laboratoryjna typ WPS 600 (Radwag, Polska)

Odczynniki

Izolacja DNA z komórek bakteryjnych (Genomic Mini, A&A Biotechnology, Polska)

- 10mM bufor TRIS HCl pH 8.5 do zawieszania bakterii
- Bufor lizujący LT
- Proteinaza K
- Roztwór płuczący A1

Reakcja PCR

- Woda (Nuclease-Free Water, Hyclone, Thermo Scientific, USA)
- Bufor reakcyjny (5 x colorless Go Taq Flexi Buffer) (Promega, USA)
- $MgCl_2$ (25 mM) (Promega, USA)
- dNTP (PCR Nucleotide Mix): dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Promega, USA)
- Polimeraza DNA (GoTaq Flexi DNA Polymerase, 100u; 5u/ μ l) (Promega, USA)
- Primery (HPU 50, HPU 25; VA3-F, VA3-R; VA4-F, VA4-R; VA1-Fc, VA1-Rc; D008, R008) (Sigma Genosys, USA)

Detekcja produktów reakcji PCR

- Agaroza (Sigma-Aldrich, USA)
- 1 x stężony bufor TBE (Tris Ultra Pure p.A., kwas borowy, 0.5M EDTA, woda destylowana)
- Bromek etydy (Sigma-Aldrich, USA)
- Bufor obciążający (6 x Orange Loading Dye) (Fermentas Life Science, Kanada).
- Marker wielkości (O' Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder) (Fermentas Life Science, Kanada).

3.3.1. Izolacja bakteryjnego DNA

Zawiesiny 109 szczepów *H. pylori*, przechowywane w temperaturze -80°C rozmrożono, następnie wysiewano na podłoże Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i inkubowano w cieplarni, w temperaturze 37°C przez 72 godziny, w warunkach mikroaerofilnych. Wyrosłe kolonie pasażowano na kolejne dwa podłoża Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej, które inkubowano w cieplarni, w temperaturze 37°C , w warunkach mikroaerofilnych. Uzyskaną masę bakteryjną zbierano z powierzchni dwóch płytek za pomocą jałowej wymazówki, zawieszano w 1ml 0.85% NaCl oraz odwirowywano (9000 obr/min., 10 min., temperatura 4°C). Supernatant po odwirowaniu zlewano. Z uzyskanych peletek izolowano genomowe DNA przy użyciu zestawu „Genomic Mini”, zgodnie z zaleceniami producenta.

Protokół izolacji DNA

1. Zawieszenie w 100 μ l buforu Tris odwirowanych komórek *H. pylori*.
2. Dodanie 200 μ l uniwersalnego buforu lizującego LT.
3. Dodanie 20 μ l roztworu Proteinazy K.
4. Wymieszanie i inkubowanie próbki 20 min. w temperaturze 37°C.
5. Przeniesienie próbki do 75°C i inkubowanie 5 min.
6. Intensywne mieszanie próbki przez 20 sekund.
7. Wirowanie 3 min. przy 12500 RPM.
8. Pobranie supernatantu oraz naniesienie na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA.
9. Wirowanie 1 min. przy 12500 RPM.
10. Wyjęcie minikolumny wraz z probówką i dodanie do kolumny 500 μ l roztworu płuczącego A1.
11. Wirowanie 1 min. przy 12500 RPM.
12. Przeniesienie minikolumny do nowej probówki o objętości 2 ml i dodanie do kolumny 400 μ l roztworu płuczącego A1.
13. Wirowanie 2 min. przy 12500 RPM.
14. Umieszczenie osuszonej minikolumny w nowej probówce o objętości 1.5 ml i dodanie do próbki znajdującej się na dnie kolumny 100 μ l buforu Tris, ogrzanego do temperatury 75°C.
15. Inkubowanie próbki przez 5 min. w temperaturze pokojowej.
16. Wirowanie 1 min. przy 12500 RPM.
17. Usunięcie minikolumny.
18. Przetrzymanie oczyszczonego DNA znajdującego się w probówce, w lodówce do czasu dalszych analiz.

W celu potwierdzenia obecności bakteryjnego DNA, uzyskane podczas izolacji roztwory rozdzielano przeprowadzając elektroforezę w 2% żelu agarozowym, sporządzonym poprzez rozpuszczenie na gorąco 3 g agarozy w 150 ml 1x stężonego buforu TBE. Po schłodzeniu roztworu do temperatury 60°C, dodawano 7.5 μ l bromku etydyny. Żel mieszano i wylewano do wanienki, w której znajdował się grzebień, umożliwiającą uzyskanie studzienek. Po stężeniu oraz usieciowaniu żelu, wanienkę umieszczano w komorze do elektroforezy, wypełnionej 1x stężonym buforem TBE i usuwano grzebień.

Z próbek zawierających wyizolowane DNA pobierano objętość 7.5 µl i mieszano z 2.5 µl buforu obciążającego. Uzyskane mieszaniny badanych próbek, nakrapiano do studzienek w żelu. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przy napięciu 85 V przez 30 min.

Efekty rozdziału elektroforetycznego uwidaczniano w transluminatorze w świetle UV. Zdjęcia żelu wykonywano aparatem CANON G5.

3.3.2. Reakcja PCR

Analizie genetycznej poddano 109 szczepów *H. pylori*, w których przy użyciu metody PCR zbadano obecność genów: *ureB*, *cagA* oraz alleli genu *vacA* (*s1*, *s2*, *m1*, *m2*). Sekwencje primerów zastosowanych w reakcji PCR przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Primery zastosowane w reakcji PCR dla amplifikacji genów: *ureB*, *cagA* oraz alleli genu *vacA* (*s1*, *s2*, *m1*, *m2*).

Gen	Primer	Sekwencja primera (5'-3')	Produkt PCR (bp)	Literatura
<i>ureB</i>	HPU 50	GAACATGACTACACCAT	933	[148]
	HPU 25	TGGTTTGAGGGCGAATC		
<i>vacA</i>				
<i>m1</i>	VA3-F	GGTCAAATGCGGTCATGG	290	[148]
	VA3-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC		
<i>m2</i>	VA4-F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352	
	VA4-R	CATAACTAGCGCCTTGACAC		
<i>s1/s2</i>	VA1-Fc	ATGGAAATACAACAAACACAC	259/286	
	VA1-Rc	CTGCTTGAATGCGCCAAAC		
<i>cagA</i>	D008	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCG	298	[149]
	R008	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCA		

Do każdej serii badań wykonano kontrolę negatywną, zawierającą wodę (Nuclease-Free Water) zamiast matrycowego DNA oraz kontrolę pozytywną, zawierającą DNA szczepu wzorcowego *H. pylori* 326: *ureB*+, *cagA*+, *vacA s1+/m1*+

3.3.2.1. Wykrywanie genów *ureB*, *cagA* oraz alleli *s1*, *s2*, *m1*, *m2* genu *vacA* *H. pylori* metodą PCR

Do 2 µl roztworu zawierającego oczyszczone DNA dodawano 23 µl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej (tabela 3).

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

MASTERMIX	Objętość (µl)
Bufor reakcyjny (5 x colorless Go Taq Flexi Buffer)	5
25 mM MgCl ₂	1.5
Mieszanina nukleotydów (PCR Nucleotide Mix)	0.5
Primer S	1
Primer A	1
Polimeraza DNA (GoTaq Flexi DNA Polymerase)	0.125
Woda (Nuclease-Free Water)	13.875
Matrycowe DNA	2
Łącznie	25

Uzyskaną mieszaninę wkładano do termocyklera, a następnie przeprowadzano reakcję PCR.

Zastosowano następujące profile termiczne reakcji PCR:

Amplifikacja genu *ureB*:

wstępna denaturacja – 94°C/4min, następnie 35 cykli: 94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/1min, końcowa synteza 72°C/5min.

Amplifikacja alleli genu *vacA* (*s1*, *s2*, *m1*, *m2*):

wstępna denaturacja – 94°C/4min, następnie 35 cykli: 94°C/1min, 57°C/1min, 72°C/1min, końcowa synteza 72°C/5min.

Amplifikacja genu *cagA*:

wstępna denaturacja – 94°C/5min, następnie 33 cykle: 94°C/1min, 60°C/1min, 62.5°C/1min, 72°C/1min, końcowa synteza 72°C/5min.

3.3.2.2. Analiza produktów PCR

Produkty amplifikacji rozdzielano przeprowadzając elektroforezę w 2% żelu agarozowym, sporządzonym poprzez rozpuszczenie na gorąco 3 g agarozy w 150 ml 1x stężonego buforu TBE. Po schłodzeniu roztworu do temperatury 60°C, dodawano 7.5 µl bromku etydyny. Żel mieszano i wylewano do wanienki, w której znajdował się grzebień, umożliwiając uzyskanie studzienek. Po stężeniu oraz usieciowaniu żelu, wanienkę umieszczano w komorze do elektroforezy wypełnionej 1x stężonym buforem TBE oraz usuwano grzebień.

Z próbek zawierających produkty amplifikacji pobierano objętość 7.5 µl, którą mieszano z 2.5 µl buforu obciążającego. Uzyskane mieszaniny badanych próbek oraz 5 µl markera wielkości (100bp) nakrapiano do studzienek w żelu. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono przy napięciu 85 V przez 90 min.

Efekty rozdziału uwidaczniano w transluminatorze w świetle UV. Zdjęcia żelu wykonywano aparatem CANON G5. Wielkość produktów reakcji PCR porównywano z markerem wielkości 100bp DNA Ladder.

3.4. Oznaczanie poziomu przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* metodą immunoenzymatyczną ELISA

Aparatura

- Aparat Microplate Reader RT2100C (Rayto, Stamar, Polska)
- Wirówka laboratoryjna CN 180 (Nüve, Medlab Products Sp. z o.o., Polska)
- Wyrząsarka Vortex z regulacją (Kartell)
- Chłodziarko-zamrażarka (Polar, Polska)
- Mieszadło wirowe DOS-20S (ELMI, Łotwa)
- Papier wchłaniający
- Zestaw pipet automatycznych (Eppendorf, Niemcy)

Odczynniki

Ilościowy test immunoenzymatyczny IgG *H. pylori* EIA-3057 (DRG MedTek Sp. z o.o.)

- Płytki mikrostudzienkowe pokryte oczyszczonym antygenem *H. pylori* (96 studzienek)
- Rozcieńczalnik próbek
- Roztwór hamujący reakcję (1 N HCl)

- Bufor przemycia (20x)
- Odczynnik konjugatu enzymatycznego
- Odczynnik TMB (jednoczasowy)
- Kontrola negatywna *H. pylori*, < 6.25 U/ml
- Kontrola pozytywna *H. pylori*, > 100 U/ml
- Normy *H. pylori*: 0; 6.25; 12.5; 25; 50; 100 U/ml
- Woda destylowana

Próbki krwi pełnej, w objętości 2-3 ml, pobierano z żyły obwodowej na skrzep, podczas wizyty pacjenta u lekarza gastroenterologa. W tym samym dniu były one przesyłane do Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM.

Uzyskany materiał wirowano przez 5 minut przy 2500 obr/min. Następnie, surowicę odciągano przy użyciu plastikowej pipetki do czystej probówki i zamrażano w temperaturze -20°C, do czasu wykonania testu serologicznego.

Poziom przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* w surowicy oznaczano ilościowym testem immunoenzymatycznym IgG *H. pylori* EIA-3057, zgodnie z zaleceniami producenta, przy użyciu czytnika płytek mikrotitracyjnych ELISA – Microplate Reader RT – 2100C.

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzano do temperatury pokojowej (18 – 25°C).

Bufor przemycia (20x) w objętości 1 jednostki, rozcieńczano w 19 jednostkach objętości wody destylowanej: do 50 ml buforu przemycia (20x) dodawano 950 ml wody destylowanej w celu otrzymania 1000 ml buforu przemycia (1x).

3.4.1. Wykonanie testu

Sześćdziesiąt jeden surowic rozmrożono w temperaturze pokojowej. Następnie, dla próbek testowych przygotowywano roztwory 1:40, z wszystkich sześciu norm *H. pylori*, kontroli pozytywnej oraz negatywnej, przez dodanie 5 µl próbki do 200 µl rozcieńczalnika próbek. Tak przygotowane próbki dokładnie mieszano. Następnie, w odpowiednich studzienkach wprowadzano po 100 µl rozcieńczonych surowic, sześć norm *H. pylori* oraz kontrole. W celu uzyskania próby zerowej odczynnika,

100 µl rozcieńczalnika próbek umieszczano w pozycji studzienki A1. Płytkę, przez 10 sekund dokładnie mieszano przy użyciu mieszadła wirowego, a następnie inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej.

Po inkubacji usuwano płyn ze wszystkich studzienek. Mikropłytkę wypłukiwano czterokrotnie rozcieńczonym buforem przemycia (1x) oraz 1x wodą destylowaną, za każdym razem strzepując płytkę na ligninę. Następnie, do wszystkich studzienek wprowadzano po 100 µl konjugatu enzymatycznego. Po delikatnym wymieszaniu przez 10 sekund, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po inkubacji strzepując płytkę na ligninę z wszystkich studzienek usuwano konjugat enzymatyczny. Następnie, mikropłytkę wypłukiwano czterokrotnie rozcieńczonym buforem przemycia (1x) oraz 1x wodą destylowaną, za każdym razem strzepując płytkę na ligninę. W kolejnym etapie do wszystkich studzienek wprowadzano po 100 µl odczynnika TMB, delikatnie mieszano przez 10 sekund oraz inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Po inkubacji, do wszystkich studzienek wprowadzano po 100 µl roztworu hamującego reakcję i delikatnie mieszano przez 30 sekund. Po zmianie koloru próbek (z niebieskiego na żółty) odczytywano wartość miana przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* w jednostkach U/ml na podstawie pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 450 nm w ciągu 15 minut w czytniku płytek mikrotitracyjnych ELISA.

Według producenta testu, poziom graniczny dla próbek o prawidłowym mianie przeciwciał anty-*H. pylori* (ujemnych) został ustalony na 20 U/ml. Wartości poniżej 20 U/ml były interpretowane jako ujemne – prawidłowe, natomiast wyższe od 20 U/ml jako pozytywne.

3.5. *Candida spp.* – badanie mikologiczne

Aparatura

- Aparat ATB Expression (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Oprogramowanie identyfikacyjne ATB Expression (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Densytometr Type ATB 1550 (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Inkubator mikrobiologiczny typ EB 53 F (Jouan)
- Wytrząsarka Vortex z regulacją (Kartell)
- Zestaw pipet automatycznych (Eppendorf, Niemcy)
- Pipeta elektroniczna ATB (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Chłodziarka (Polar, Polska)

Odczynniki

- Podłoże *Candida* ID 2 (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Podłoże Sabouraud (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Test ID 32 C (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Test API ZYM (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Odczynnik Zym A (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Odczynnik Zym B (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- Test ATB FUNGUS 3 (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- API Suspension Medium 2 ml (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)
- API NaCl 0.85% Medium 2ml (bioMérieux, Polska Sp. z o.o.)

Zakres badań mikologicznych obejmował izolację grzybów z bioptatów pobranych z błony śluzowej żołądka, identyfikację wyhodowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych, badanie aktywności enzymatycznej oraz określenie lekowrażliwości.

3.5.1. Hodowla *Candida spp.*

Biopłaty pobrane z błony śluzowej żołądka (po jednym z antrum oraz z trzonu) od każdego pacjenta podczas gastroskopii, transportowano w 1 ml roztworu 0.85% NaCl w dniu pobrania do Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM.

Badanie ilościowe pobranych bioptatów, określające liczbę komórek grzybów z rodzaju *Candida* (CFU – colony forming unit; jednostka tworząca kolonię) w objętości 1 ml badanego materiału, jak również interpretację

wyników wykonywano według zmodyfikowanej metody Müllera [143, 150]: wycinki pobrane z błony śluzowej antrum oraz z trzonu żołądka umieszczano na jałowym szkiełku podstawowym, homogenizowano przy użyciu drugiego szkiełka, a następnie homogenat zebrany za pomocą jałowej wymazówki zawieszano w 1 ml 0.85% NaCl. Następnie, 100 µl zhomogenizowanego materiału pobierano pipetą automatyczną i wysiewano na całą powierzchnię podłoża Sabouraud. Płytki inkubowano w cieplarni przez 48 godzin, w temperaturze 37°C. Ilość wyrosłych kolonii mnożono x 10, a otrzymany wynik posiewu ilościowego grzybów wyrażony w CFU/ml, interpretowano w tabeli 4.

Tabela 4. Interpretacja wyniku badania ilościowego grzybów z rodzaju *Candida* w biopsjach błony śluzowej żołądka.

Badany materiał	Wynik patologicznie nieznamienny	Wynik wątpliwy (wskazane badanie kontrolne)	Wynik dodatni (patologicznie znamienny)
Biopsje błony śluzowej żołądka	$\leq 10^3$ CFU/ml	$10^4 - 10^5$ CFU/ml	$\geq 10^5$ CFU/ml

Wyizolowane pojedyncze kolonie grzybów *Candida* przesiewano na skosy Sabouraud i przechowywano w lodówce do czasu wykonania dalszych badań.

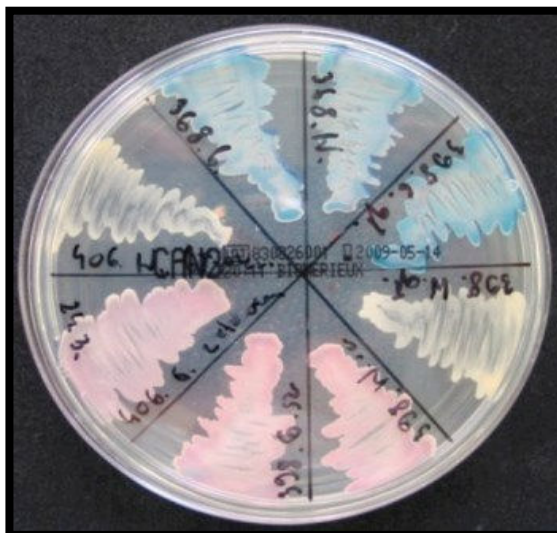
3.5.2. Identyfikacja szczepów *Candida* spp.

Do identyfikacji 32 szczepów grzybów *Candida* spp. wyizolowanych z biopsji błony śluzowej żołądka, zastosowano podłoże chromogenne Candida ID 2 oraz test ID 32 C, zgodnie z zaleceniami producenta.

3.5.2.1. Podłoże chromogenne *Candida* ID 2

Każdy badany szczep przesiewano ze skosu podłoża Sabouraud, na podłoże Sabouraud w płytce Petriego (posiew redukcyjny) i inkubowano w cieplarni (37°C) przez 24 godziny. Następnie, wyrosłe pojedyncze kolonie przesiewano na podłoże chromogenne Candida ID 2. Po inkubacji przeprowadzonej w cieplarni, w temperaturze 37°C przez 48 godzin,

odczytywano wynik. Niebieski kolor kolonii, uzyskany w wyniku specyficznej hydrolizy chromogennego substratu przez heksozaminidazę, identyfikował gatunek *C. albicans* (rycina 12). Zabarwienie różowe lub kremowe wskazywało na obecność innych gatunków *Candida* (*nie-albicans*), które identyfikowano przy użyciu aparatu ATB Expression, za pomocą testu ID 32 C, zawierającego 32 substraty asymilacyjne.



Rycina 12. Wzrost szczepów klinicznych grzybów: *C. albicans* nr 368 W; *Candida nie-albicans* nr 398 W, 406 W; na podłożu chromogennym Candida ID 2.

3.5.2.2. Test ID 32 C

Szczep *nie-albicans* przesiewano ze skosu podłoża Sabouraud, na podłoże Sabouraud w płytce Petriego (posiew redukcijny) i inkubowano w cieplarni (37°C) przez 24 godziny. Następnie, jałową wymazówką pobierano kilka makroskopowo identycznych kolonii, które zawieszano w 2 ml roztworu API Suspension Medium do gęstości 2.0 w skali McFarland'a zmierzonej w densytometrze. Kolejno, przenoszono 250 µl pierwotnej zawiesiny pipetą automatyczną do ampułki API C Medium. Po zmieszaniu zawiesiny w ampułce API C Medium, przy użyciu pipety elektronicznej ATB, napełniano pasek, rozlewając po 135 µl zawiesiny do każdej studzienki. Paski inkubowano w cieplarni, w 27°C przez 24-48 godzin.

Wynik odczytywano przy użyciu czytnika aparatu ATB, który transmitował dane do komputera. Do interpretacji wyników zastosowano oprogramowanie identyfikacyjne ATB Expression.

3.5.3. Badanie lekowrażliwości szczepów *Candida spp.*

W ocenie wrażliwości na leki przeciwgrzybicze obejmujące: amfoterycynę B, flucytozynę, itraconazol, flukonazol, worykonazol, zastosowano test ATB FUNGUS 3, zgodnie z zaleceniami producenta. Zbadano 32 szczepy grzybów, należących do gatunków: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* oraz *C. lusitaniae*.

Każdy szczep przesiewano ze skosu z podłożem Sabouraud, na podłoże Sabouraud w płytce Petriego (posiew redukcyjny) i inkubowano w cieplarni (37°C) przez 24 godziny. Następnie, jałową wymazówką pobierano kilka kolonii, zawieszano w 2 ml roztworu API NaCl 0.85% Medium do gęstości 2.0 w skali McFarland'a mierzonej w densytometrze. Za pomocą pipety automatycznej, z przygotowanej zawiesiny przenoszono 20 µl do ampułki ATB F2 Medium. Po dokładnym zmieszaniu, używając pipety elektronicznej ATB, napełniano pasek, wprowadzając do każdej studzienki po 135 µl zawiesiny ATB F2 Medium. Paski inkubowano w cieplarni, w 37°C przez 24-48 godzin. Wynik odczytywano przy użyciu aparatu ATB oraz wizualnie, według instrukcji dołączonej do testu (rycina 13).



Rycina 13. Oznaczenie lekowrażliwości szczepu klinicznego *C. albicans* nr 413 przy użyciu testu ATB FUNGUS 3.

Wartości graniczne MIC leków przeciwgrzybiczych, przyjęte w kategoryzacji szczepów wrażliwy/ średniowrażliwy/ oporny, zalecane przez CLSI/NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards) przedstawiono w tabeli 5, według instrukcji dołączonej do testu.

Tabela 5. Stężenia graniczne leków przeciwgrzybiczych dla *Candida spp.*

Lek	Wrażliwy MIC (mg/l)	Średniowrażliwy MIC (mg/l)	Oporny MIC (mg/l)
Flucytozyna	≤ 4	8-16	≥ 32
Amfoterycyna B*	-	-	-
Flukonazol	≤ 8	16-32	≥ 64
Itrakonazol	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1
Worykonazol	≤ 1	2	≥ 4
*brak formalnego zdefiniowania przez CLSI/NCCLS, MIC ≥2 mg/l sugeruje oporność.			

3.5.4. Badanie aktywności enzymatycznej szczepów *Candida spp.*

Aktywność enzymatyczną 32 szczepów grzybów oceniono za pomocą testu API ZYM, zawierającego substraty dla 19 enzymów hydrolitycznych, zgodnie z zaleceniami producenta.

Badany szczep grzyba z rodzaju *Candida* przesiewano ze skosu z podłożem Sabouraud, na podłoże Sabouraud w płytce Petriego (posiew redukcyjny) i inkubowano w cieplarni (37°C) przez 24 godziny. Po okresie inkubacji, jałową wymazówką pobierano kilka kolonii, które zawieszano w 2 ml roztworu API Suspension Medium do gęstości 5.5 w skali McFarland'a zmierzonej w densytometrze. Następnie, za pomocą pipety automatycznej, do każdej studzienki nanoszono po 65 µl zawiesiny. Paski inkubowano w cieplarni, przy braku światła przez 4 godziny i 15 minut, w temperaturze 37°C. Po inkubacji, do każdej studzienki dodawano po jednej kropli odczynników Zym A oraz Zym B. Paski wystawiano na działanie światła, w celu wywołania zabarwienia. Po 15 minutach, odczytywano wynik

wizualnie, oceniając intensywność zabarwienia w 5-stopniowej skali. Wartość „0” odpowiadała reakcji ujemnej, „5” reakcji o maksymalnej intensywności, a wartości 1, 2, 3 lub 4 były pośrednie i zależały od poziomu intensywności (wartości 3, 4 lub 5 uważane były za reakcje o wyniku dodatnim) (rycina 14).



Rycina 14. Oznaczenie profilu enzymatycznego dla szczepu klinicznego *C. albicans* nr 474 za pomocą testu API ZYM.

Identyfikację grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz ocenę ich lekowrażliwości przeprowadzono w Pracowni Mikrobiologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. L. Rydygiera w Krakowie.

3.6. Analiza statystyczna

W analizie statystycznej wyników zastosowano:

- 1) test niezależności χ^2 Pearsona, pozwalający na ocenę występowania zależności pomiędzy badanymi zmiennymi,
- 2) iloraz szans (odds ratio), w celu oszacowania ryzyka zachorowania na daną chorobę, na podstawie ilorazu wskaźników w grupie eksponowanej oraz nieeksponowanej na działanie czynnika ryzyka.

Powyższe testy wykorzystano do analizy:

- wyników badania genetycznego *H. pylori* (test χ^2),
- zależności pomiędzy częstością występowania genu *cagA* oraz alleli *s/m* genu *vacA*, a rozpoznaniem klinicznym (test χ^2),
- ryzyka zachorowania na chorobę wrzodową żołądka lub dwunastnicy, w zależności od genotypu *cagA* oraz *vacA* *H. pylori* (iloraz szans),
- zależności pomiędzy częstością występowania metaplazji jelitowej w żołądku, a statusem zakażenia *H. pylori* (test χ^2),

- zależności pomiędzy częstością występowania metaplazji jelitowej w żołądku, a zakażeniem *H. pylori* o określonym genotypie *cagA* oraz *vacA* (test χ^2),
- zależności pomiędzy częstością występowania oporności *H. pylori* na metronidazol, a płcią (test χ^2),
- zależności pomiędzy zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida spp.*, a rozpoznaniem klinicznym (test χ^2).

Za statystycznie znamienne przyjmowano te wyniki testów, dla których poziom istotności był mniejszy lub równy 0.05 (**$p \leq 0.05$**).

W analizie statystycznej posługiwano się oprogramowaniem statystycznym StatsDirect, wersja 2.7.2.

4. WYNIKI

W grupie 267 pacjentów, którzy zgłosili się do lekarza gastroenterologa rozpoznano: 221 (83%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 16 (6%) choroby wrzodowej żołądka oraz 30 (11%) przypadków choroby wrzodowej dwunastnicy.

Dodatni wynik szybkiego testu ureazowego odnotowano u 176 (66%) osób. W badaniu histopatologicznym biopsatów, obecność *H. pylori* potwierdzono u 165 (62%) chorych.

Bakterie *H. pylori* w badaniu mikrobiologicznym potwierdzono u 109 (41%) pacjentów, u których w 80 (36%) przypadkach zdiagnozowano dyspepsję niewrzodową, w 7 (44%) wrzód żołądka oraz w 22 (73%) wrzód dwunastnicy. W badaniu histopatologicznym wycinków błony śluzowej żołądka tej grupy pacjentów, obecność *H. pylori* potwierdzono u 104 (95%) osób, a w teście ureazowym u 108 (99%) osób.

4.1. Badanie genetyczne szczepów *H. pylori*

Analizę genetyczną, pod kątem wykazania obecności genów: *ureB*, *cagA* oraz alleli genu *vacA* (*s1*, *s2*, *m1*, *m2*), przeprowadzono u 109 szczepów *H. pylori*. W tabelach 6-12 przedstawiono potwierdzone genotypy wszystkich badanych szczepów *H. pylori*.

Tabela 6. Szczepy kliniczne *H. pylori* o genotypach *ureB*+, *cagA*+, *vacA* s1/m1.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	2	+	+	1	1
2	28	+	+	1	1
3	29	+	+	1	1
4	31	+	+	1	1
5	51	+	+	1	1
6	54	+	+	1	1
7	66	+	+	1	1
8	72	+	+	1	1
9	88	+	+	1	1
10	107	+	+	1	1
11	112	+	+	1	1
12	136	+	+	1	1
13	145	+	+	1	1
14	187	+	+	1	1
15	228	+	+	1	1
16	236	+	+	1	1
17	313	+	+	1	1
18	330	+	+	1	1
19	340	+	+	1	1
20	345	+	+	1	1
21	353	+	+	1	1
22	354	+	+	1	1
23	373	+	+	1	1
24	399	+	+	1	1
25	400	+	+	1	1
26	413	+	+	1	1
27	447	+	+	1	1
28	455	+	+	1	1
29	460	+	+	1	1
30	470	+	+	1	1
31	477	+	+	1	1
32	539	+	+	1	1
Łącznie 32 genotypy <i>H. pylori</i> <i>ureB</i>+, <i>cagA</i>+, <i>vacA</i> s1/m1					

Tabela 7. Szczepy kliniczne *H. pylori* o genotypach *ureB*+, *cagA*-, *vacA* s1/m1.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	99	+	-	1	1
2	178	+	-	1	1
3	466	+	-	1	1
Łącznie 3 genotypy <i>H. pylori</i> <i>ureB</i>+, <i>cagA</i>-, <i>vacA</i> s1/m1					

Tabela 8. Szczepy kliniczne *H. pylori* o genotypach *ureB*+, *cagA*+, *vacA* s1/m2.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	9	+	+	1	2
2	27	+	+	1	2
3	39	+	+	1	2
4	56	+	+	1	2
5	63	+	+	1	2
6	124	+	+	1	2
7	137	+	+	1	2
8	207	+	+	1	2
9	250	+	+	1	2
10	302	+	+	1	2
11	309	+	+	1	2
12	337	+	+	1	2
13	342	+	+	1	2
14	346	+	+	1	2
15	360	+	+	1	2
16	367	+	+	1	2
17	374	+	+	1	2
18	395	+	+	1	2
19	416	+	+	1	2
20	418	+	+	1	2
21	446	+	+	1	2
22	463	+	+	1	2
23	515	+	+	1	2
24	517	+	+	1	2
25	531	+	+	1	2
Łącznie 25 genotypów <i>H. pylori</i> <i>ureB</i>+, <i>cagA</i>+, <i>vacA</i> s1/m2					

Tabela 9. Szczepy kliniczne *H. pylori* o genotypach *ureB*+, *cagA*-, *vacA* s1/m2.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	188	+	-	1	2
2	226	+	-	1	2
3	251	+	-	1	2
4	380	+	-	1	2
5	382	+	-	1	2
6	444	+	-	1	2
7	489	+	-	1	2
Łącznie 7 genotypów <i>H. pylori</i> <i>ureB</i>+, <i>cagA</i>-, <i>vacA</i> s1/m2					

Tabela 10. Szczepy kliniczne *H. pylori* o genotypach *ureB*+, *cagA*+, *vacA* s2/m2.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	79	+	+	2	2
2	173	+	+	2	2
3	289	+	+	2	2
Łącznie 3 genotypy <i>H. pylori</i> <i>ureB</i>+, <i>cagA</i>+, <i>vacA</i> s2/m2					

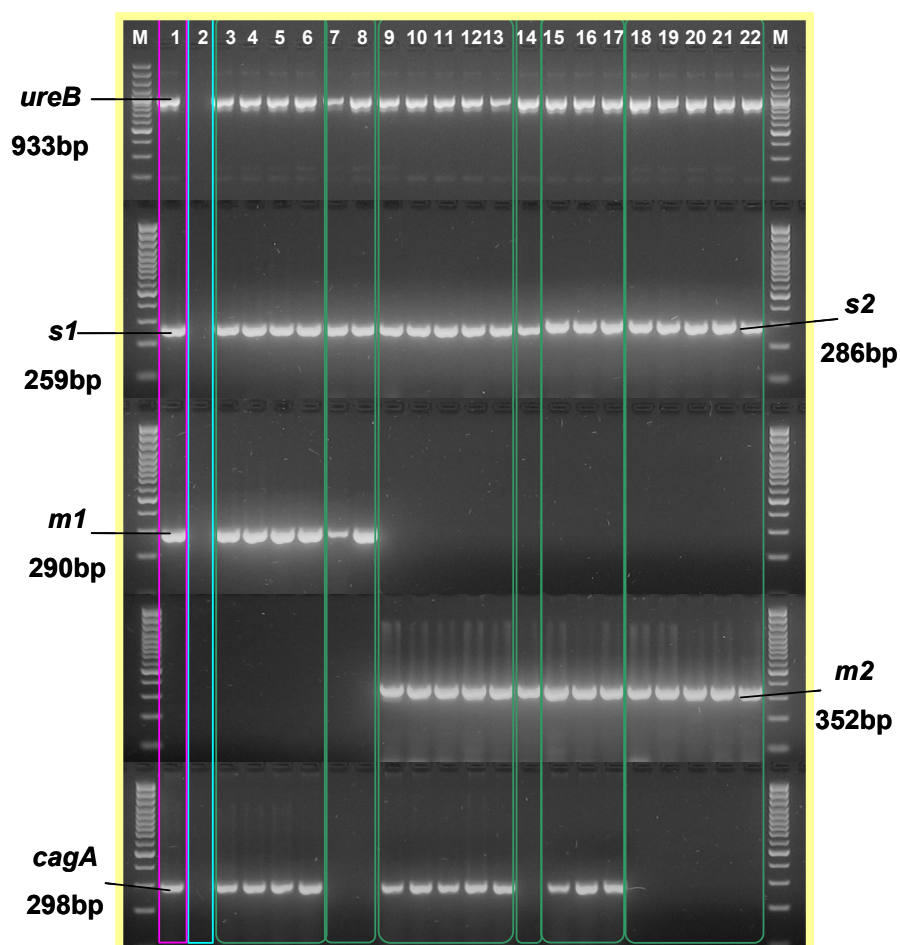
Tabela 11. Szczepy kliniczne *H. pylori* o genotypach *ureB*+, *cagA*-, *vacA* s2/m2.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	18	+	-	2	2
2	34	+	-	2	2
3	49	+	-	2	2
4	62	+	-	2	2
5	69	+	-	2	2
6	80	+	-	2	2
7	131	+	-	2	2
8	153	+	-	2	2
9	160	+	-	2	2
10	180	+	-	2	2
11	195	+	-	2	2
12	225	+	-	2	2
13	227	+	-	2	2
14	258	+	-	2	2
15	263	+	-	2	2
16	279	+	-	2	2
17	284	+	-	2	2
18	297	+	-	2	2
19	303	+	-	2	2
20	321	+	-	2	2
21	336	+	-	2	2
22	341	+	-	2	2
23	361	+	-	2	2
24	372	+	-	2	2
25	383	+	-	2	2
26	390	+	-	2	2
27	392	+	-	2	2
28	430	+	-	2	2
29	435	+	-	2	2
30	464	+	-	2	2
31	481	+	-	2	2
32	488	+	-	2	2
33	508	+	-	2	2
34	533	+	-	2	2
Łącznie 34 genotypy <i>H. pylori</i> <i>ureB</i>+, <i>cagA</i>-, <i>vacA</i> s2/m2					

Tabela 12. Szczepy kliniczne *H. pylori* *ureB*⁺, *cagA*⁺, o mieszanych lub niepełnych genotypach *vacA*.

L.p.	Nr szczepu	Genotyp			
		<i>ureB</i>	<i>cagA</i>	<i>s</i>	<i>m</i>
1	13	+	+	1	1, 2
2	22	+	+	1	1, 2
3	45	+	+	1	?
4	276	+	+	?	1
5	434	+	+	1	?

Na rycinie 15 przedstawiono genotypy 20 wybranych szczepów klinicznych *H. pylori* oraz szczepu wzorcowego.



Rycina 15. Elektroforeza w 2% żelu agarozowym produktów reakcji PCR dla genów: *ureB*, *cagA* oraz alleli *s1*, *s2*, *m1*, *m2* genu *vacA* u wybranych 20 szczepów klinicznych *H. pylori* oraz szczepu wzorcowego.

M – marker wielkości DNA 100 bp;

Numery szczepów klinicznych *H. pylori* (ścieżka 3-22): 107, 112, 145, 187, 99, 178, 27, 56, 63, 124, 137, 188, 79, 173, 289, 131, 153, 160, 180, 195.

kontrola pozytywna (szczep wzorcowy *H. pylori* 326) – ścieżka 1;

kontrola negatywna – ścieżka 2;

ureB – ścieżka 3-22;

s1 – ścieżka 3-14;

s2 – ścieżka 15-22;

m1 – ścieżka 3-8;

m2 – ścieżka 9-22;

cagA – ścieżka 3-6, 9-13, 15-17.

Wykazano, że wszystkie badane szczepy posiadały gen *ureB*, co potwierdziło ich przynależność do gatunku *H. pylori*.

Pięć (5%) szczepów *H. pylori* prezentowało niepełny, bądź mieszany genotyp *vacA*, dlatego dalszej analizie poddano 104 szczepy (tabela 12).

Obecność genu *cagA* stwierdzono u 60 (58%), spośród 104 badanych szczepów, natomiast gen *vacA* potwierdzono u wszystkich izolatów. Najczęściej występującymi allelami genu *vacA* były: *s1* (67 szczepów – 65%) oraz *m2* (69 szczepów – 66%). Allel *s2* oraz *m1* posiadało odpowiednio 37 (35%) i 35 szczepów (34%) (tabela 13).

W badanych izolatach odnotowano obecność trzech, spośród czterech, możliwych kombinacji alleli genu *vacA*, a mianowicie: *s1/m1*, *s1/m2* oraz *s2/m2*. Nie stwierdzono szczepów o genotypie *s2/m1* (tabela 13).

Genotypy *cagA*+, *vacA s1/m1* oraz *cagA*+, *vacA s1/m2*, odpowiadające za zwiększoną wirulencję, posiadało 57 (55%) szczepów *H. pylori* (tabela 13).

Tabela 13. Rozkład genotypów *vacA* oraz genu *cagA* w badanych szczepach *H. pylori*.

Genotyp <i>vacA</i>	Status <i>cagA</i>		Łącznie
	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -	
<i>s1/m1</i>	32 (31%)	3 (3%)	35 (34%)
<i>s1/m2</i>	25 (24%)	7 (7%)	32 (31%)
<i>s2/m2</i>	3 (3%)	34 (32%)	37 (35%)
Łącznie	60 (58%)	44 (42%)	104 (100%)

Gen *cagA* występował znacząco częściej z allelem *s1*, natomiast jego brak był silnie skorelowany z allelem *s2* oraz *m2* ($p < 0.001$) (tabela 14).

Tabela 14. Zależność pomiędzy allelami *s* oraz *m* genu *vacA*, a statusem genu *cagA* w badanych szczepach *H. pylori*.

Typy alleli genu <i>vacA</i>	<i>cagA</i> ⁺ n=60 (%)	<i>cagA</i> ⁻ n=44 (%)	p [*]
<i>s1</i> n=67	57 (95)	10 (23)	<0.001
<i>s2</i> n=37	3 (5)	34 (77)	
<i>m1</i> n=35	32 (53)	3 (7)	<0.001
<i>m2</i> n=69	28 (47)	41 (93)	

* Test Chi².

Wykazano zależność pomiędzy statusem genu *cagA*, a genotypem *s/m vacA* ($p < 0.001$), gdzie gen *cagA* występował częściej z układem alleli *s1/m1* oraz *s1/m2*, natomiast brak tego genu dominował w szczepach o genotypie *s2/m2* (tabela 15).

Tabela 15. Zależność pomiędzy genotypem *s/m vacA*, a statusem genu *cagA* w badanych szczepach *H. pylori*.

Genotyp <i>vacA</i>	<i>cagA</i> ⁺ n=60 (%)	<i>cagA</i> ⁻ n=44 (%)	p [*]
<i>s1/m1</i> n=35	32 (53)	3 (7)	<0.001
<i>s1/m2</i> n=32	25 (42)	7 (16)	
<i>s2/m2</i> n=37	3 (5)	34 (77)	

* Test Chi².

4.2. Analiza związku różnych genotypów *H. pylori* z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy

W grupie 104 pacjentów, od których wyizolowano szczepy *H. pylori*, scharakteryzowane pod kątem posiadania genów determinujących patogenność, rozpoznano: 78 przypadków dyspepsji niewrzodowej, 5 wrzodów żołądka oraz 21 wrzodów dwunastnicy.

Pomimo, że pacjenci z wrzodem żołądka, w odróżnieniu od chorych z wrzodem dwunastnicy, zaliczani są do grupy ryzyka rozwoju zmian nowotworowych, to w przeprowadzonych badaniach, ze względu na niewielką liczbę wrzodów żołądka oraz brak przypadków raka tego narządu wrzody żołądka wraz z wrzodami dwunastnicy zakwalifikowano do jednej grupy wrzodów trawiennych (PUD – peptic ulcer disease).

Na podstawie analizy statystycznej, nie wykazano znamienych różnic w częstości występowania genu *cagA* i alleli *s/m* genu *vacA* w grupach chorych z wrzodem trawiennym oraz z dyspepsją niewrzodową (tabela 16).

Na uwagę zasługuje fakt, że wśród 26 pacjentów z wrzodem trawiennym, zakażenie szczepami *H. pylori cagA*-, *vacA s2* potwierdzono u 6 (23%) chorych.

Tabela 16. Rozkład genu *cagA* oraz alleli *s/m* genu *vacA* w zależności od rozpoznania klinicznego.

Genotyp	PUD (%) n=26	NUD (%) n=78	p [*]
<i>s1</i> n=67	19 (73)	48 (62)	0.288 NS
<i>s2</i> n=37	7 (27)	30 (38)	
<i>m1</i> n=35	9 (35)	26 (33)	0.905 NS
<i>m2</i> n=69	17 (65)	52 (67)	
<i>s1/m1</i> n=35	9 (35)	26 (33)	0.496 NS
<i>s1/m2</i> n=32	10 (38)	22 (28)	
<i>s2/m2</i> n=37	7 (27)	30 (39)	
<i>cagA+</i> n=60	18 (69)	42 (54)	0.170 NS
<i>cagA-</i> n=44	8 (31)	36 (46)	

PUD - peptic ulcer disease, NUD - non ulcer dyspepsia, * Test Chi², NS - not significant.

Natomiast, badając ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową żołądka lub dwunastnicy u osób zakażonych *H. pylori* o określonym genotypie *cagA* oraz *vacA*, na podstawie ilorazu szans (odds ratio) wykazano, że:

1. zakażenie szczepami *H. pylori* posiadającymi allel *s1*, zwiększało o 1.7 razy (OR=1.70) ryzyko wystąpienia wrzodów trawiennych, w porównaniu do szczepów *H. pylori vacA s2* (tabela 17 a)
2. allel *m1* nie wpływał na częstość występowania PUD, w stosunku do allelu *m2* (OR=1.06) (tabela 17 b)
3. u osób zakażonych szczepami *H. pylori cagA+*, ryzyko rozwoju PUD wzrastało prawie dwukrotnie (OR=1.93), w porównaniu do osób zakażonych szczepami *H. pylori cagA-* (tabela 17 c).

Tabela 17. Ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową żołądka lub dwunastnicy w grupie ekspozowanej na czynniki ryzyka: allel *s1* (a), *m1* (b), gen *cagA* (c); w stosunku do grupy nieekspozowanej.

a)

	Czynnik ryzyka	Brak czynnika ryzyka	Iloraz szans (95% CI*)
	<i>s1</i> n=67	<i>s2</i> n=37	
Grupa chorych PUD n=26	19	7	1.70 (0.59, 5.34)
Grupa kontrolna NUD n=78	48	30	

PUD - peptic ulcer disease, NUD - non ulcer dyspepsia, *95% CI - 95% przedział ufności.

b)

	Czynnik ryzyka	Brak czynnika ryzyka	Iloraz szans (95% CI*)
	<i>m1</i> n=35	<i>m2</i> n=69	
Grupa chorych PUD n=26	9	17	1.06 (0.36, 2.93)
Grupa kontrolna NUD n=78	26	52	

PUD - peptic ulcer disease, NUD - non ulcer dyspepsia, *95% CI - 95% przedział ufności.

c)

	Czynnik ryzyka	Brak czynnika ryzyka	Iloraz szans (95% CI*)
	<i>cagA+</i> n=60	<i>cagA-</i> n=44	
Grupa chorych PUD n=26	18	8	1.93 (0.69, 5.73)
Grupa kontrolna NUD n=78	42	36	

PUD - peptic ulcer disease, NUD - non ulcer dyspepsia, *95% CI - 95% przedział ufności.

4.3. Zależność pomiędzy metapłazją jelitową, potwierdzoną badaniem histopatologicznym, a genotypem *H. pylori*

Metapłazję jelitową w żołądku, na podstawie badania histopatologicznego, rozpoznano u 39 (15%), spośród 267 badanych pacjentów (u 31 była dokonana, u 8 niedokonana). Obecność *H. pylori* potwierdzono w badaniu histopatologicznym i/lub mikrobiologicznym u 170 (64%) chorych. Współwystępowanie w żołądku metapłazji jelitowej oraz *H. pylori* wykazano u 29 (11%) osób (u 21 była dokonana, u 8 niedokonana). Nie stwierdzono znamienych różnic w częstości występowania metapłazji jelitowej, w grupie z zakażeniem *H. pylori*, w porównaniu do grupy bez zakażenia ($p=0.134$) (tabela 18).

Tabela 18. Częstość występowania metapłazji jelitowej w żołądku pacjentów z zakażeniem *H. pylori* oraz bez zakażenia.

	Grupa z zakażeniem <i>H. pylori</i> n=170 (%)	Grupa bez zakażenia <i>H. pylori</i> n=97 (%)	p [*]
Brak metapłazji jelitowej n=228	141 (83)	87 (90)	0.134 NS
Metapłazja jelitowa n=39	29 (17)	10 (10)	

* Test Chi², NS - not significant.

Spośród 104 pacjentów, od których wyizolowano szczepy *H. pylori* oraz zbadano pod kątem występowania genotypów *cagA* oraz *vacA*, u 14 (13%) stwierdzono metapłazję jelitową w żołądku (u 11 była dokonana, u 3 niedokonana). Izolowane szczepy reprezentowały następujące genotypy: *cagA*+, *vacA* s1/m1; *cagA*+, *vacA* s1/m2 oraz *cagA*-, *vacA* s1/m1 (tabela 19).

Tabela 19. Genotypy *H. pylori* u pacjentów z metapłazją jelitową w żołądku.

Genotyp <i>H. pylori</i>	Metapłazja jelitowa	
	Dokonana	Niedokonana
<i>cagA</i> +, <i>vacA</i> s1/m1	8	2
<i>cagA</i> +, <i>vacA</i> s1/m2	3	0
<i>cagA</i> -, <i>vacA</i> s1/m1	0	1
Łącznie	11	3

Porównując częstość występowania metapłazji jelitowej w żołądku, w grupie z zakażeniem *H. pylori* *cagA*+ oraz *cagA*-, wykazano, że była ona znamienne wyższa w grupie *cagA*+, aniżeli *cagA*- ($p=0.004$, tabela 20).

Tabela 20. Zależność pomiędzy częstością występowania w żołądku metapłazji jelitowej, a obecnością genu *cagA*.

	<i>cagA</i> + n=60 (%)	<i>cagA</i> - n=44 (%)	p [*]
Brak metapłazji jelitowej n=90	47 (78)	43 (98)	0.004
Metapłazja jelitowa n=14	13 (22)	1 (2)	

* Test Chi².

W grupie chorych, zakażonych szczepami *H. pylori* *vacA* s1 oraz m1, wykazano również znamienne wyższy odsetek występowania metapłazji jelitowej w żołądku (odpowiednio $p=0.003$ oraz $p<0.001$, tabele: 21, 22).

Tabela 21. Zależność pomiędzy częstością występowania w żołądku metaplazji jelitowej, a obecnością *H. pylori* z allelem *s1* lub *s2* genu *vacA*.

	<i>s1</i> n=67 (%)	<i>s2</i> n=37 (%)	p [*]
Brak metaplazji jelitowej n=90	53 (79)	37 (100)	0.003
Metaplazja jelitowa n=14	14 (21)	0 (0)	

* Test Chi².

Tabela 22. Zależność pomiędzy częstością występowania w żołądku metaplazji jelitowej, a obecnością *H. pylori* z allelem *m1* lub *m2* genu *vacA*.

	<i>m1</i> n=35 (%)	<i>m2</i> n=69 (%)	p [*]
Brak metaplazji jelitowej n=90	24 (69)	66 (96)	<0.001
Metaplazja jelitowa n=14	11 (31)	3 (4)	

* Test Chi².

4.4. Ocena lekowrażliwości *H. pylori*

Oznaczenie lekowrażliwości na amoksycylinę, metronidazol oraz klarytromycynę wykonano u 97 szczepów *H. pylori*. Natomiast ocenie wrażliwości na lewofloksacynę poddano 79 szczepów.

Wyniki lekowrażliwości badanych szczepów *H. pylori* na amoksycylinę, metronidazol, klarytromycynę oraz lewofloksacynę przedstawiono w tabeli 23.

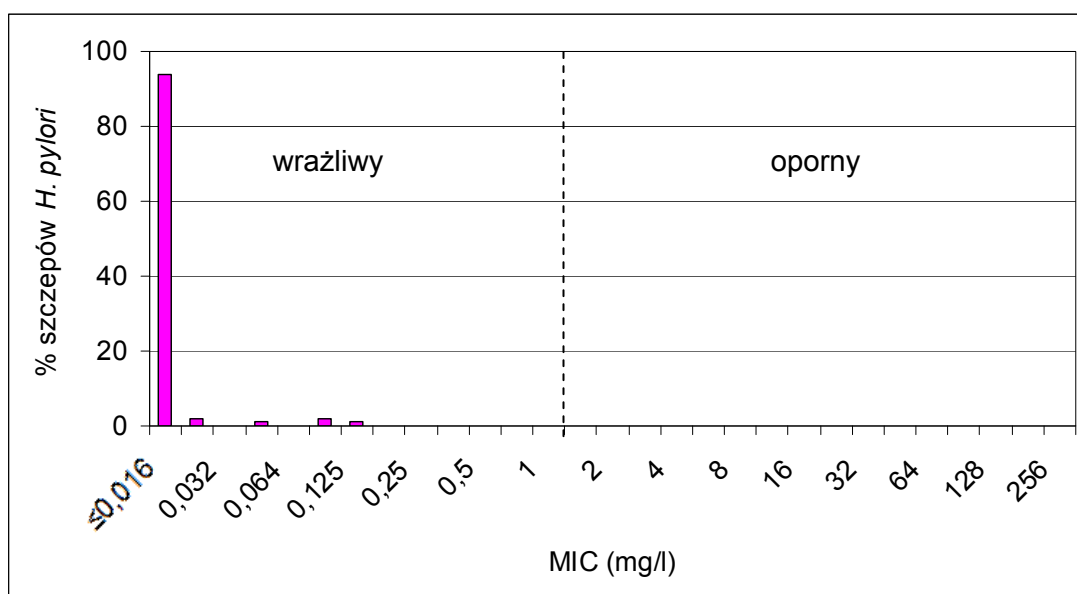
Tabela 23. Lekowrażliwość badanych szczepów *H. pylori*.

Lek	Szczepy wrażliwe liczba (%)	Szczepy średnio- wrażliwe liczba (%)	Szczepy odporne liczba (%)	Łącznie liczba (%)
AMX	97 (100)	-	0 (0)	97 (100)
MTZ	58 (60)	-	39 (40)	97 (100)
CL	73 (75)	2 (2)	22 (23)	97 (100)
LE	75 (95)	-	4 (5)	79 (100)

AMX – amoksycylina, MTZ – metronidazol, CL – klarytromycyna, LE – lewofloksacyna.

Rozkład wartości MIC amoksycyliny, metronidazolu, klarytromycyny oraz lewofloksacyny dla badanych szczepów *H. pylori*, przedstawiono na rycinach: 16, 17, 18, 19.

Wszystkie badane szczepy były wrażliwe na amoksycylinę. Dla 91 (94%) szczepów, MIC amoksycyliny wynosił ≤ 0.016 mg/l, natomiast dla pozostałych 6 izolatów, wartości MIC były wyższe, w zakresie od 0.023 do 0.125 mg/l (rycina 16).



Rycina 16. Aktywność **amoksycyliny** wobec szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).

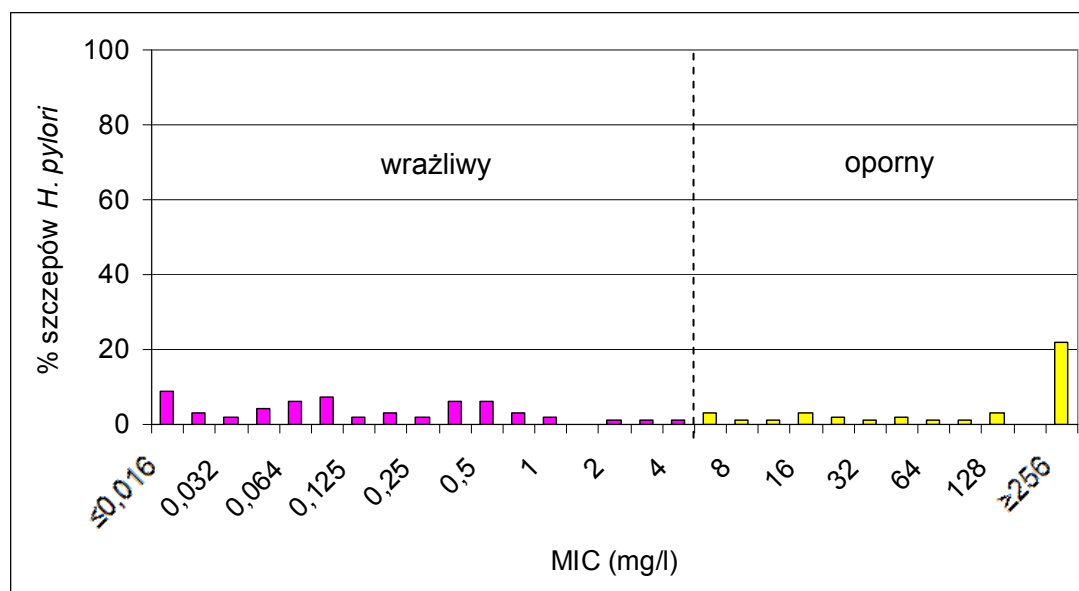
Odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol stanowił 40% i był znacznie wyższy wśród izolatów pochodzących od kobiet, niż od mężczyzn (odpowiednio 59% i 20%, $p < 0.001$, tabela 24).

Tabela 24. Zależność pomiędzy częstością występowania oporności *H. pylori* na metronidazol, a płcią.

	Grupa kobiet n=51 (%)	Grupa mężczyzn n=46 (%)	p [*]
Brak oporności <i>H. pylori</i> na MTZ n=58	21 (41)	37 (80)	<0.001
Oporność <i>H. pylori</i> na MTZ n=39	30 (59)	9 (20)	

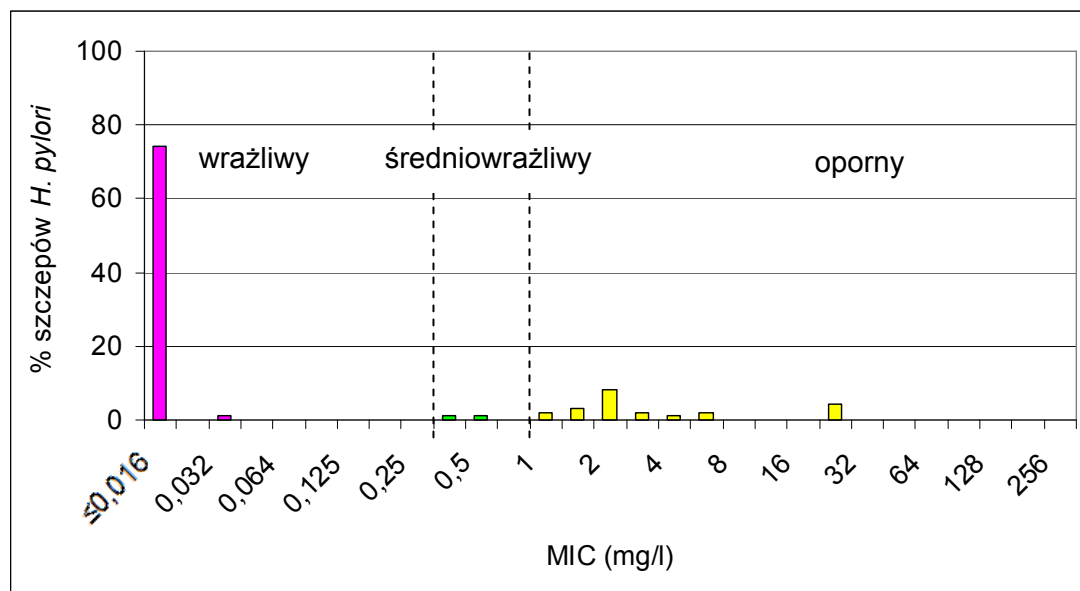
MTZ – metronidazol, * Test Chi².

Bardzo wysoki stopień oporności na metronidazol ($MIC \geq 256$ mg/l) stwierdzono u 21 (22%) szczepów (rycina 17).



Rycina 17. Aktywność metronidazolu wobec szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 4 mg/l dla szczepów opornych).

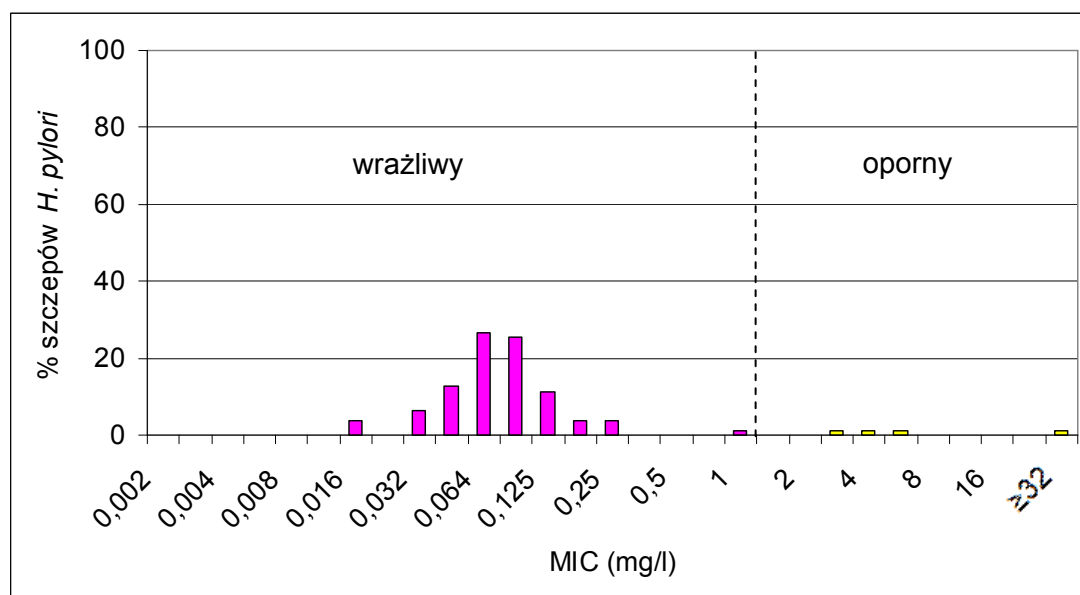
Odsetek szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę wyniósł 23%. Wszystkie szczepy wrażliwe (z wyjątkiem jednego) charakteryzowała wartość MIC ≤ 0.016 mg/l (rycina 18).



Rycina 18. Aktywność **klarytromycyny** wobec szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC ≥ 1 mg/l dla szczepów opornych).

Oporność, zarówno na metronidazol jak i klarytromycynę, wykazano u 12% szczepów.

Brak wrażliwości na lewofloksacynę wykryto u 5% izolatów *H. pylori*. Wartości MIC lewofloksacyny dla 4 szczepów opornych, wyniosły odpowiednio: 3; 4; 6 oraz > 32 mg/l. W przypadku szczepów wrażliwych, wartości MIC znajdowały się najczęściej w zakresie: 0.064 oraz 0.094 mg/l (rycina 19).



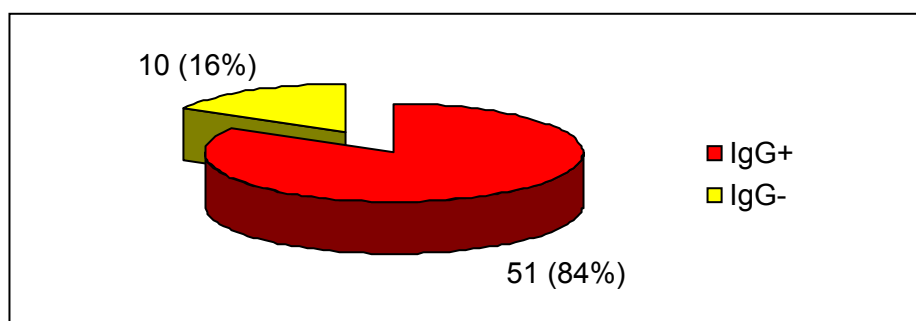
Rycina 19. Aktywność **lewofloksacyny** wobec szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).

Dwa szczepy (2.5%) charakteryzowały się potrójną opornością – na metronidazol, klarytromycynę oraz lewofloksacynę.

4.5. Analiza częstości występowania przeciwciał klasy IgG anti-*H. pylori*

Przebadano surowice pobrane od 61 losowo wybranych pacjentów, z zakażeniem *H. pylori*, potwierdzonym w badaniu histopatologicznym biopsatów oraz w szybkim teście ureazowym. Natomiast izolację *H. pylori* w badaniu mikrobiologicznym uzyskano od 37 osób.

W badanej grupie, znamieny poziom przeciwciał klasy IgG anti-*H. pylori* wykazano u 51 (84%) osób, w tym u wszystkich z izolacją *H. pylori*. U 10 (16%) pacjentów, pomimo potwierdzenia zakażenia *H. pylori* w badaniu histopatologicznym oraz w szybkim teście ureazowym, wynik testu ELISA był ujemny (miano < 20 U/ml) (rycina 20).



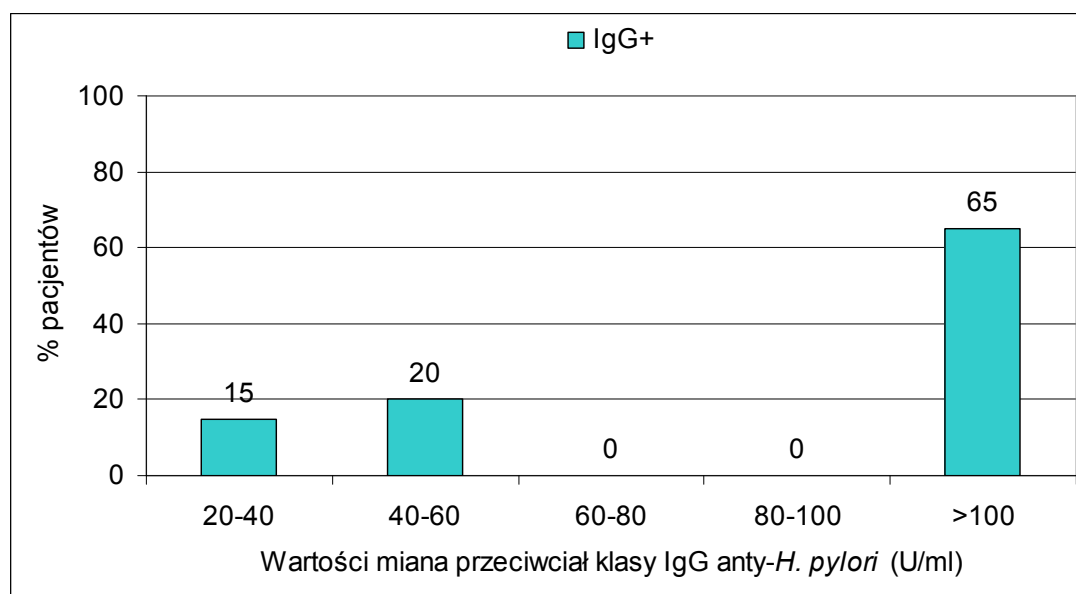
Rycina 20. Występowanie przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* w surowicy badanych pacjentów.

U badanych pacjentów, w 43 przypadkach rozpoznano dyspepsję niewrzodową, w 4 wrzód żołądka oraz w 14 wrzód dwunastnicy (łącznie 18 wrzodów trawiennych).

W grupie 43 pacjentów z dyspepsją niewrzodową, znamieny poziom przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* wykazano u 35 (81%) osób, natomiast u 8 (19%) chorych wynik był ujemny.

Spośród 18 pacjentów z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy, dodatni wynik testu ELISA stwierdzono u 16 (89%) osób.

Na uwagę zasługuje fakt, że w grupie 51 pacjentów ze znamienym poziomem przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori*, u 33 (65%) chorych miano przeciwciał wynosiło > 100 U/ml (rycina 21).



Rycina 21. Rozkład wartości dodatniego miana przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* w surowicy badanych pacjentów.

4.6. Badanie mikologiczne grzybów z rodzaju *Candida*

Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* wyizolowano od 51 (19%) spośród 267 badanych osób. Rozpoznanie kliniczne obejmowało 40 (18%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 8 (50%) wrzodów żołądka oraz 3 (10%) wrzody dwunastnicy.

Wyhodowano 53 szczepy. U dwóch pacjentów zidentyfikowano w badanych materiałach 2 różne gatunki grzybów.

Współwystępowanie w żołądku grzybów *Candida spp.* z *H. pylori* (grupa *H. pylori+*, *Candida+*) potwierdzono u 35 (13%) pacjentów. Obecność tylko grzybów *Candida spp.* (grupa *H. pylori-*, *Candida+*) odnotowano u 16 (6%) osób (tabela 25).

Tabela 25. Współwystępowanie w żołądku badanych osób grzybów z rodzaju *Candida* oraz *H. pylori*.

	Grupa		Łącznie
	<i>H. pylori+</i> , <i>Candida+</i>	<i>H. pylori-</i> , <i>Candida+</i>	
Pacjenci	35	16	51
Izolowane szczepy grzybów	36	17	53

4.6.1. Ocena ilościowa występowania grzybów *Candida spp.* w biopsatach pobranych z żołądka

Analizując wyniki posiewu ilościowego, wykonanego z biopsatów pobranych z żołądka, celem określenia ilości występujących grzybów *Candida spp.* wykazano, że wszyscy pacjenci posiadali patologicznie nieznamienną liczbę komórek grzybów, wyrażoną w ilości $< 10^3$ CFU/ml (tabela 26).

Tabela 26. Wyniki posiewu ilościowego bioptatów z żołądka u badanych chorych, w celu określenia ilości występujących grzybów *Candida spp.*

L.p.	Nr pacjenta	CFU/ml	L.p.	Nr pacjenta	CFU/ml
1	51	30	27	361	10
2	64	10	28	367	10
3	74	30	29	368	170
4	84	160	30	381	10
5	87	10	31	390	10
6	92	10	32	391	20
7	99	10	33	392	10
8	110	10	34	398	50
9	112	40	35	406	800
10	131	60	36	409	30
11	140	10	37	413	30
12	148	10	38	416	20
13	179	20	39	418	10
14	220	400	40	430	600
15	228	200	41	438	10
16	257	20	42	445	10
17	260	700	43	452	10
18	263	20	44	463	10
19	270	20	45	474	20
20	280	10	46	480	20
21	287	30	47	499	20
22	289	30	48	503	10
23	304	10	49	508	140
24	313	10	50	515	110
25	330	700	51	534	20
26	354	10			

Identyfikację do gatunku, określenie profilu enzymatycznego oraz ocenę wrażliwości na leki przeciwgrzybicze, wykonano u 32 szczepów grzybów (pozostałych 21 nie udało się przepasażować w celu wykonania dalszych badań) (tabela 27).

Tabela 27. Charakterystyka szczepów *Candida spp.* poddanych badaniom mikologicznym z uwzględnieniem ich współwystępowania z *H. pylori*.

	Grupa		Łącznie
	<i>H. pylori</i> +, <i>Candida</i> +	<i>H. pylori</i> -, <i>Candida</i> +	
Pacjenci	24	6	30
Izolowane szczepy grzybów	25	7	32

4.6.2. Identyfikacja oraz ocena lekowrażliwości grzybów z rodzaju *Candida*

Łącznie zidentyfikowano 25 (78%) szczepów z gatunku *C. albicans*, po 3 (9.5%) szczepy *C. glabrata* i *C. tropicalis* oraz 1 (3%) *C. lusitaniae*.

W grupie pacjentów *H. pylori*+, *Candida*+, wyhodowano 21 szczepów z gatunku *C. albicans*, 2 – *C. tropicalis*, 1 – *C. lusitaniae* oraz 1 – *C. glabrata*.

Natomiast w grupie chorych *H. pylori*-, *Candida*+, wyizolowano 4 szczepy z gatunku *C. albicans*, 1 – *C. tropicalis* oraz 2 – *C. glabrata*.

Wszystkie szczepy *C. albicans* oraz *C. tropicalis* były wrażliwe na uwzględnione w mikogramie leki przeciwgrzybicze. Dla szczepów *C. glabrata*, wrażliwych na flukonazol oraz itrakonazol, podaje się interpretację jako średniowrażliwy, biorąc pod uwagę naturalną obniżoną wrażliwość tego gatunku na te leki. Szczep *C. lusitaniae* był średniowrażliwy tylko na flucytozynę, natomiast wrażliwy na pozostałe leki (tabele: 28, 29).

Tabela 28. Analiza lekowrażliwości grzybów *Candida spp.* izolowanych od pacjentów z zakażeniem *H. pylori*.

L.p.	Nr pacjenta	Gatunek	5FC MIC (mg/l)	AMB MIC (mg/l)	FCA MIC (mg/l)	ITR MIC (mg/l)	VRC MIC (mg/l)
1	131	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
2	140	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
3	263	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
4	289	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
5	313	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
6	330	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
7	354	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
8	361	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
9	367	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
10	390	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
11	413	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
12	416	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
13	418	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
14	430	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
15	445	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
16	463	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
17	474	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
18	480	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
19	499	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
20	508	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
21	515	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
22	392	<i>C. lusitaniae</i>	I	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
23	381	<i>C. tropicalis</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, 0.125
24	398	<i>C. tropicalis</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, 2.0	S, <0.125	S, 0.125
25	398	<i>C. glabrata</i>	S, <4.0	S, <0.5	I, 2.0	I, 0.5	S, 0.25

5FC – 5-fluorocytozyna, AMB – amfoterycyna B, FCA – flukonazol, ITR – itrakonazol, VRC – worykonazol; S – wrażliwy, I – średniowrażliwy, R – oporny.

Tabela 29. Analiza lekowrażliwości grzybów *Candida spp.* izolowanych od pacjentów bez zakażenia *H. pylori*.

L.p.	Nr pacjenta	Gatunek	5FC MIC (mg/l)	AMB MIC (mg/l)	FCA MIC (mg/l)	ITR MIC (mg/l)	VRC MIC (mg/l)
1	257	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
2	270	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
3	280	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, 1.0	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
4	368	<i>C. albicans</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063
5	260	<i>C. glabrata</i>	S, <4.0	S, <0.5	I, 4.0	I, 0.5	S, 0.25
6	406	<i>C. glabrata</i>	S, <4.0	S, <0.5	I, <1.0	I, <0.125	S, <0.063
7	406	<i>C. tropicalis</i>	S, <4.0	S, <0.5	S, <1.0	S, <0.125	S, <0.063

5FC – 5-fluorocytozyna, AMB – amfoterycyna B, FCA – flukonazol, ITR – itrakonazol, VRC – worykonazol; S – wrażliwy, I – średniowrażliwy, R – oporny.

4.6.3. Ocena aktywności enzymatycznej szczepów *Candida spp.*

Zestawienie badanych enzymów hydrolitycznych i ich substratów przedstawiono w tabeli 30.

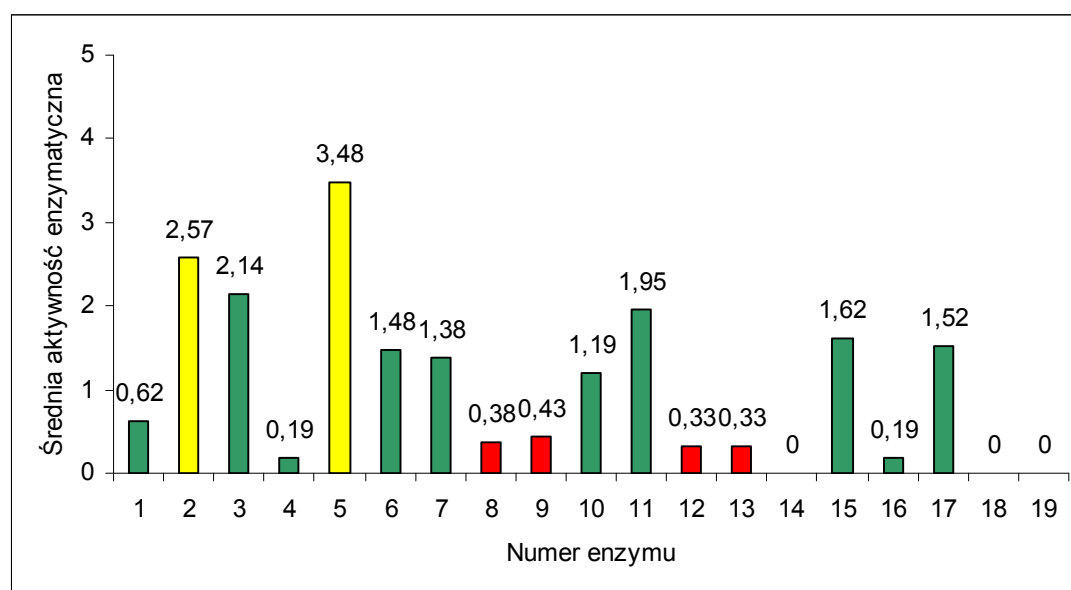
Tabela 30. Badane testem API ZYM enzymy hydrolityczne oraz ich substraty.

L.p.	BADANY ENZYM	SUBSTRAT
1	Fosfataza alkaliczna	2-naftylo-fosforan
2	Esteraza (C 4)	2-naftylo-maślan
3	Esteraza Lipaza (C 8)	2-naftylo-kaprylan
4	Lipaza (C 14)	2-naftylo-mirystynian
5	Arylamidaza leucyny	L-leucylo-2-naftylamid
6	Arylamidaza waliny	L-walilo-2-naftylamid
7	Arylamidaza cystyny	L-cystylo-2-naftylamid
8	Trypsyna	N-benzoilo-DL-arginino-2-naftylamid
9	α -chymotrypsyna	N-glutarylo-feniloalanino-2-naftylamid
10	Kwaśna fosfataza	2-naftylo-fosforan
11	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan
12	α -galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-galaktopiranosyd
13	β -galaktozydaza	2-naftylo- β D-galaktopiranosyd
14	β -glukuronidaza	Naftylo-AS-BI- β D-glukuronid
15	α -glukozydaza	2-naftylo- α D-glukopiranozyd
16	β -glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β D-glukopiranozyd
17	N-acetylo- β -glukozaminidaza	1-naftylo-N-acetyl- β D-glukozaminid
18	α -mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-mannopiranozyd
19	α -fukozydaza	2-naftylo- α L-fukopiranozyd

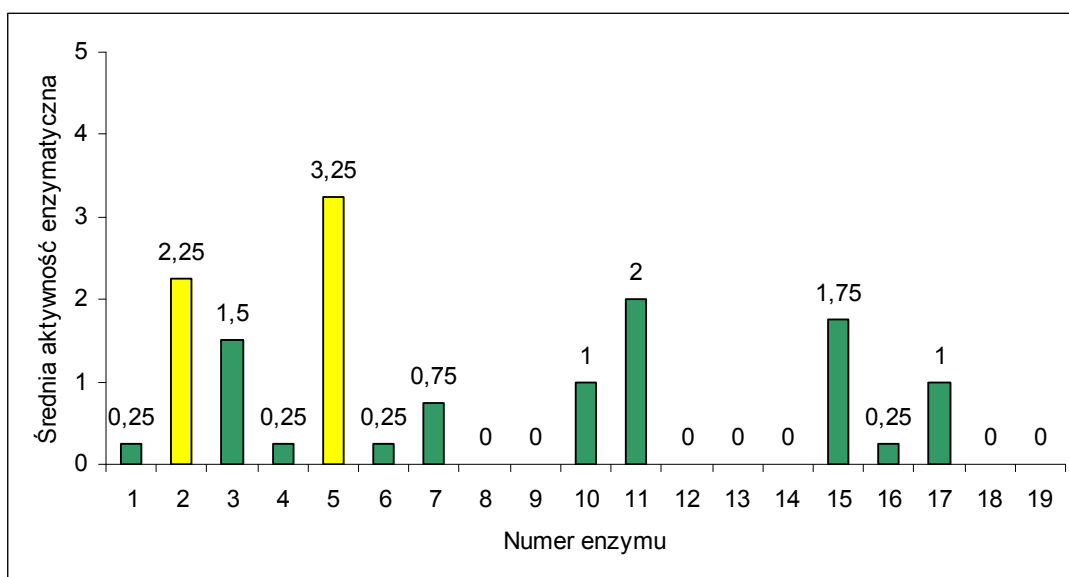
W grupie pacjentów *H. pylori*+, *Candida*+, szczepy *C. albicans* wykazały aktywność większej liczby enzymów (n=16), w porównaniu, do izolatów wyhodowanych od osób *H. pylori*-, *Candida*+ (n=12). Różnica dotyczyła 4 hydrolaz: trypsyny, α -chymotrypsyny, α -galaktozydazy oraz β -galaktozydazy, które wykazały aktywność tylko u osób, u których współwystępowały badane drobnoustroje, jednak na bardzo niskim poziomie, < 0.5, w skali 0-5. W obydwu grupach, enzymami o największej aktywności były: arylamidaza leucyny oraz esteraza (C4) (ryciny: 22, 23).

Legenda:

	Enzymy o najwyższej aktywności w danej grupie szczepów grzybów <i>Candida</i>
	Enzymy aktywne tylko w grupie szczepów grzybów izolowanych od pacjentów z zakażeniem <i>H. pylori</i>
	Pozostałe enzymy

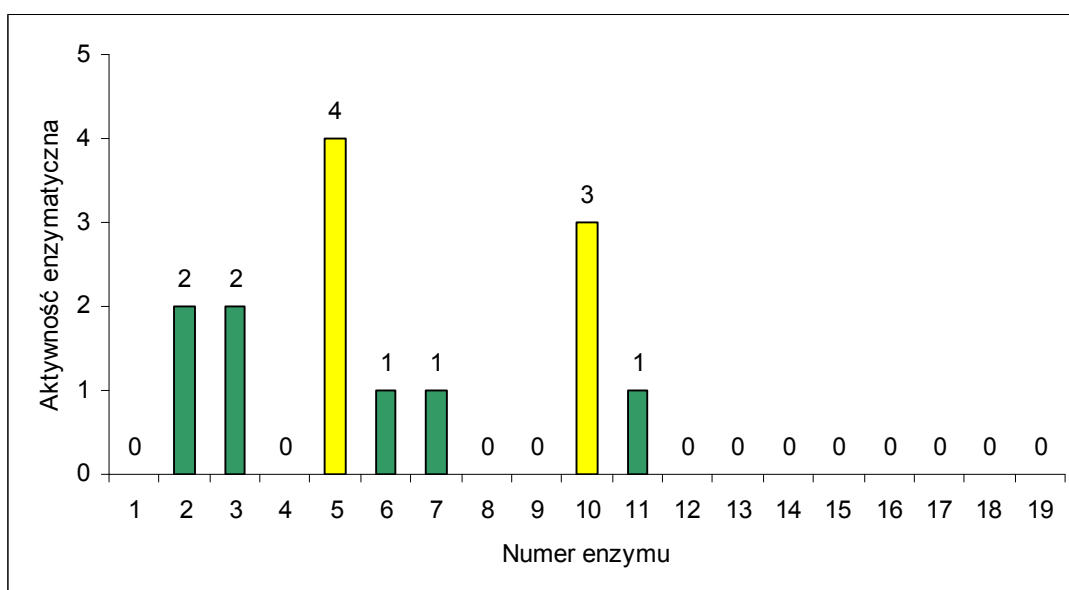


Rycina 22. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów *C. albicans* (n=21) izolowanych od osób z zakażeniem *H. pylori*.

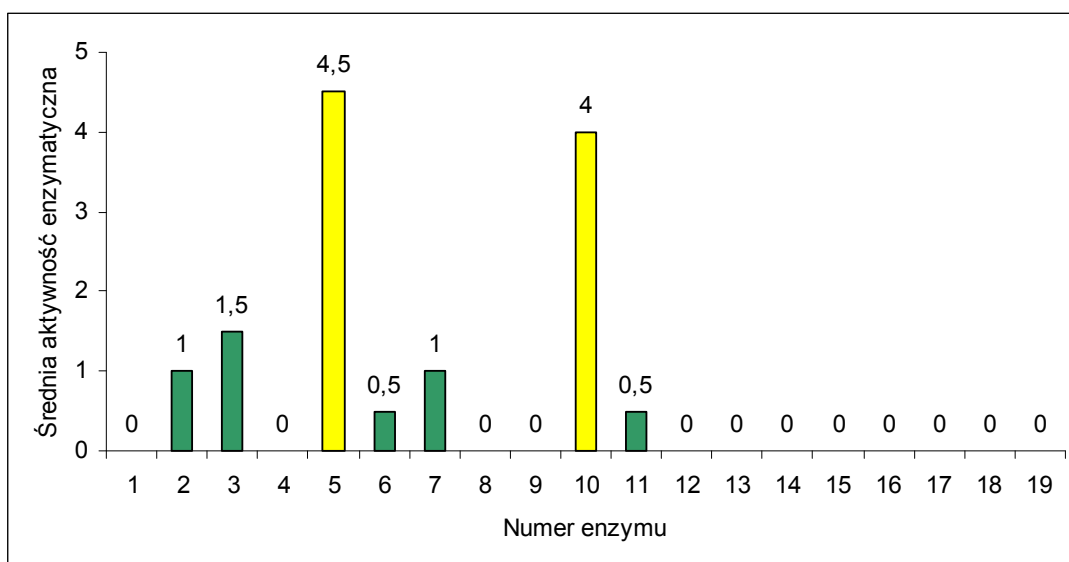


Rycina 23. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów *C. albicans* (n=4) izolowanych od osób bez zakażenia *H. pylori*.

W przypadku szczepów *C. glabrata* podobną aktywność enzymatyczną obserwowano w obydwu grupach, zarówno pod względem ilości aktywnych enzymów (n=7) jak również stopnia aktywności. Odnotowano największą aktywność aryamidazy leucyny oraz kwaśnej fosfatazy (ryciny: 24, 25).

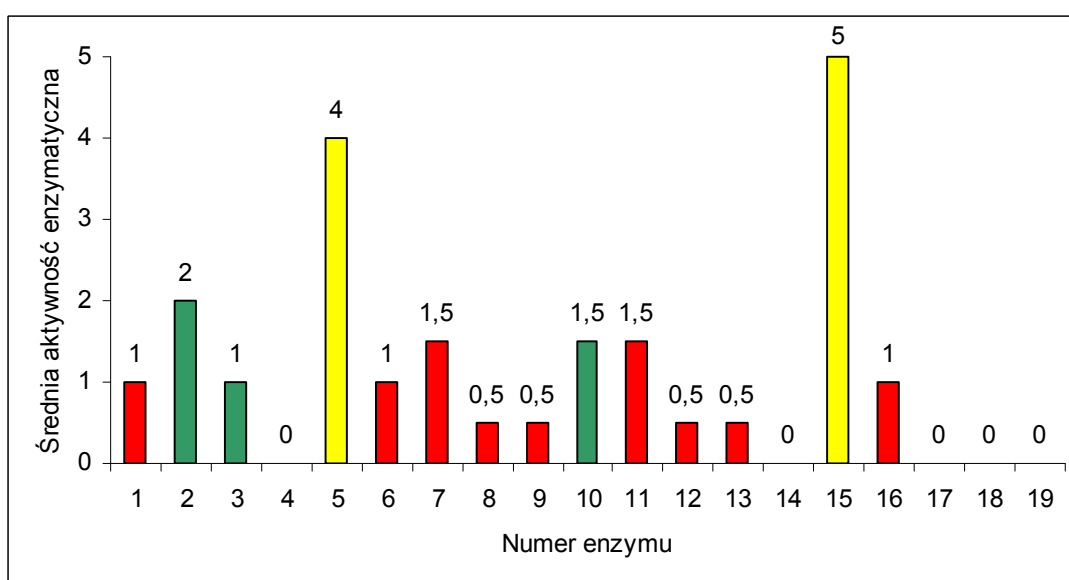


Rycina 24. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepu *C. glabrata* (n=1) izolowanego od pacjenta z zakażeniem *H. pylori*.



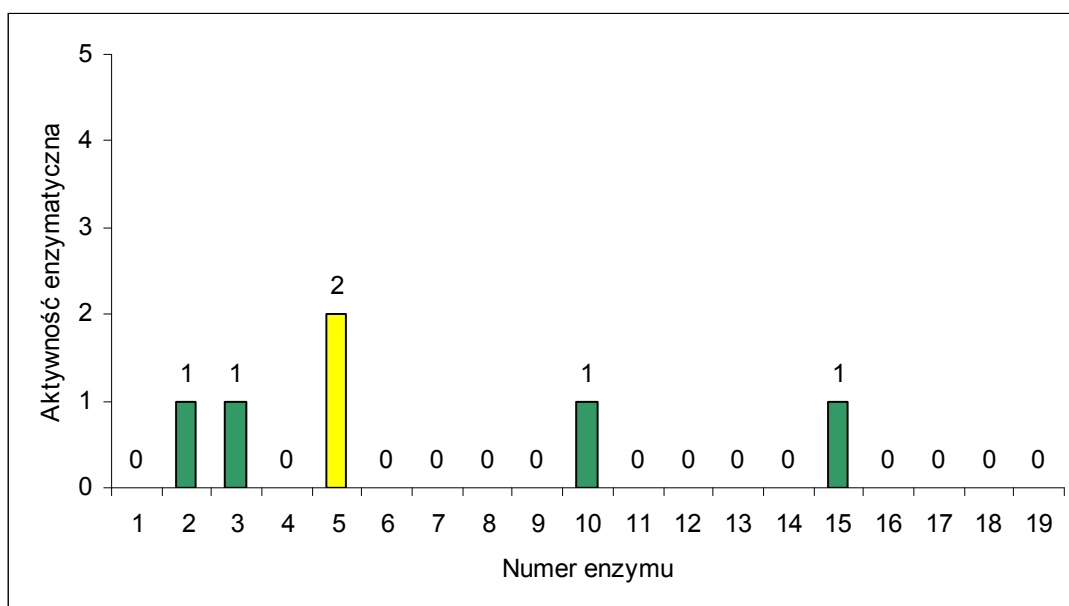
Rycina 25. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów *C. glabrata* (n=2) izolowanych od osób bez zakażenia *H. pylori*.

Szczepy *C. tropicalis*, które współwystępowały z *H. pylori*, łącznie uwolniły 14 enzymów – najbardziej aktywne były: aryamidaza leucyny oraz α -glukozydaza (rycina 26).



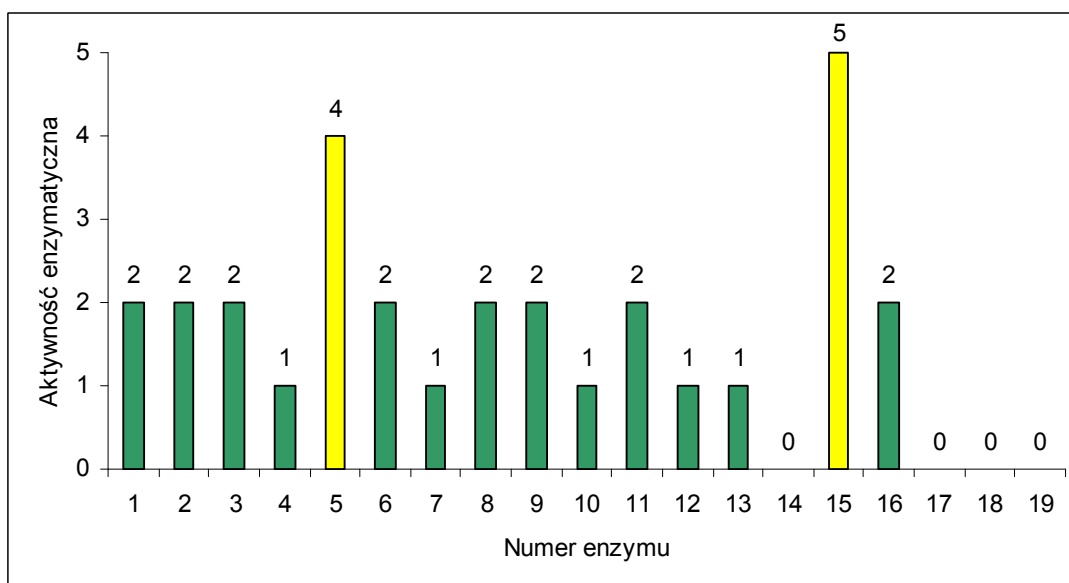
Rycina 26. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów *C. tropicalis* (n=2) izolowanych od osób z zakażeniem *H. pylori*.

Natomiast, u pacjenta bez zakażenia *H. pylori*, szczep *C. tropicalis* wykazał aktywność tylko 5 enzymów (rycina 27).



Rycina 27. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepu *C. tropicalis* (n=1) izolowanego od pacjenta bez zakażenia *H. pylori*.

Szczep *C. lusitaniae*, wyizolowany tylko od pacjenta z zakażeniem *H. pylori*, posiadał aktywność 15 enzymów, w tym największą arylamidazy leucyny oraz α -glukozydazy (rycina 28).



Rycina 28. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepu *C. lusitaniae* (n=1) izolowanego od pacjenta z zakażeniem *H. pylori*.

Aktywność enzymatyczna badanych szczepów grzybów była niska, w zakresie < 3 , w skali 0-5. Tylko dla pojedynczych enzymów odnotowano aktywność > 3 (ryciny 22-28).

4.7. Udział *H. pylori* oraz grzybów *Candida* w wybranych chorobach górnego odcinka przewodu pokarmowego

U wszystkich pacjentów określono współwystępowanie wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego z zakażeniem *H. pylori* i/lub grzybami *Candida*, pomimo obecności tych ostatnich w ilości patologicznie nieznamiennej.

U 35 (13%) chorych, u których stwierdzono w żołądku obecność szczepów *H. pylori* oraz *Candida spp.*, w 26 (12%) przypadkach rozpoznano dyspepsję niewrzodową, w 6 (37.5%) wrzód żołądka oraz w 3 (10%) wrzód dwunastnicy.

W grupie 16 (6%) osób, u których wykazano w żołądku tylko obecność grzybów *Candida spp.*, w 14 (6%) przypadkach rozpoznano dyspepsję niewrzodową oraz w 2 (12.5%) wrzód żołądka.

Obecność *H. pylori*, bez współwystępowania z grzybami *Candida*, potwierdzono u 135 (51%) osób. Rozpoznanie kliniczne obejmowało: 105 (48%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 7 (44%) wrzodów żołądka oraz 23 (77%) wrzody dwunastnicy.

U 81 (30%) osób z grupy *H. pylori*-, *Candida*-, zdiagnozowano 76 (34%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, w 1 (6%) wrzód żołądka oraz w 4 (13%) wrzód dwunastnicy.

Zależność pomiędzy rozpoznaniem klinicznym, a zakażeniem lub brakiem zakażenia *H. pylori* i/lub obecnością *Candida* przedstawiono kolejno w tabelach: 31 a, b oraz 32.

Porównując grupy chorych bez infekcji *H. pylori* oraz obecności *Candida*, z grupą zakażonych *H. pylori* wykazano, że dyspepsja niewrzodowa występowała znamiennej częściej w grupie bez obecności tych drobnoustrojów jednocześnie ($p=0.002$, tabela 31 a).

Taką samą zależność stwierdzono w przypadku chorych *H. pylori*-, *Candida*-, w porównaniu do grupy *H. pylori*+, *Candida*+ ($p=0.003$, tabela 32).

Choroba wrzodowa dwunastnicy występowała znamienne częściej u chorych zakażonych *H. pylori* ($p= 0.01$, tabela 31 a). Natomiast, wrzody żołądka częściej obserwowano u chorych z obecnością tylko *Candida* ($p=0.018$, tabela 31 b), jak również z infekcją *H. pylori* oraz obecnością *Candida* ($p=0.001$, tabela 32).

W pozostałych przypadkach, nie wykazano różnic istotnych statystycznie w częstości występowania omawianych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego, w odniesieniu do poszczególnych grup pacjentów (tabele: 31 a, b, 32).

Tabela 31. Zależność pomiędzy rozpoznaniem klinicznym, a brakiem zakażenia *H. pylori* oraz obecności *Candida spp.*, w porównaniu do grupy: zakażonej *H. pylori* (a); z obecnością *Candida spp.* (b).

a)

Rozpoznanie kliniczne	Grupa <i>H. pylori</i> -, <i>Candida</i> - Liczba (%)	Grupa <i>H. pylori</i> +, <i>Candida</i> - Liczba (%)	p [*]
NUD	76 (94)	105 (78)	0.002
Wrzód żołądka	1 (1)	7 (5)	0.137 NS
Wrzód dwunastnicy	4 (5)	23 (17)	0.01
Łącznie	81 (100%)	135 (100%)	

NUD - non ulcer dyspepsia, * Test Chi², NS - not significant.

b)

Rozpoznanie kliniczne	Grupa <i>H. pylori</i> -, <i>Candida</i> - Liczba (%)	Grupa <i>H. pylori</i> -, <i>Candida</i> + Liczba (%)	p [*]
NUD	76 (94)	14 (87.5)	0.372 NS
Wrzód żołądka	1 (1)	2 (12.5)	0.018
Wrzód dwunastnicy	4 (5)	0 (0)	0.364 NS
Łącznie	81 (100%)	16 (100%)	

NUD - non ulcer dyspepsia, * Test Chi², NS - not significant.

Tabela 32. Zależność pomiędzy rozpoznaniem klinicznym, a brakiem zakażenia *H. pylori* oraz obecności *Candida spp.*, w porównaniu do grupy *H. pylori*+, *Candida*+

Rozpoznanie kliniczne	Grupa <i>H. pylori</i> -, <i>Candida</i> - Liczba (%)	Grupa <i>H. pylori</i> +, <i>Candida</i> + Liczba (%)	p [*]
NUD	76 (94)	26 (74)	0.003
Wrzód żołądka	1 (1)	6 (17)	0.001
Wrzód dwunastnicy	4 (5)	3 (9)	0.451 NS
Łącznie	81 (100%)	35 (100%)	

NUD - non ulcer dyspepsia, * Test Chi², NS - not significant.

5. DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach, scharakteryzowano patogenność szczepów bakterii *H. pylori* oraz grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. Ponadto, podjęto próbę oceny współwystępowania wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego z zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida spp.* Badania wykonano w grupie chorych, zgłaszających się do lekarza gastroenterologa z objawami dyspepsji. U 83% badanych pacjentów zdiagnozowano dyspepsję niewrzodową, u 6% chorobę wrzodową żołądka, a u 11% chorobę wrzodową dwunastnicy.

Od każdego chorego, podczas badania endoskopowego, pobierano wycinki błony śluzowej żołądka, w celu wykonania szybkiego testu ureazowego, badania histopatologicznego oraz mikrobiologicznego. Na podstawie badania histopatologicznego bioptatów oraz szybkiego testu ureazowego stwierdzono, że odpowiednio 62% i 66% pacjentów było zakażonych *H. pylori*. Natomiast u 41% chorych obecność bakterii *H. pylori* potwierdzono mikrobiologicznie. W badaniach Gościński i wsp., przeprowadzonych w latach 1993-2000, odsetek osób dorosłych, od których izolowano *H. pylori* był wyższy i wynosił 57.4% [151].

Na różnice w wynikach wyżej opisanych badań mógł wpłynąć fakt, że przeprowadzono je badając różne wycinki błony śluzowej żołądka, w której jak wiadomo *H. pylori* ma kępkowe, czyli nierównomierne rozmieszczenie oraz może przybierać formę nieaktywną (zarodnikową) [152, 153].

Wśród 64% chorych, u których zakażenie *H. pylori* potwierdzono w badaniu histopatologicznym i/lub mikrobiologicznym, 60% stanowili pacjenci z dyspepsją niewrzodową, 81.5% z wrzodem żołądka oraz 87% z wrzodem dwunastnicy, co potwierdza udowodniony związek pomiędzy zakażeniem *H. pylori*, a chorobą wrzodową [2, 6, 7, 10, 17, 84].

Wśród licznych czynników wirulencji *H. pylori*, szczególne miejsce zajmuje immunogenne białko CagA oraz cytotoksyna wakuolizująca VacA, której aktywność zależy od typów alleli genu *vacA*. Ocena patogenności klinicznych szczepów *H. pylori* opiera się, przede wszystkim, na wykrywaniu obecności genu *cagA* oraz alleli genu *vacA*, które warunkują syntezę tych toksyn [17, 49, 108, 154].

W przeprowadzonych badaniach, w celu potwierdzenia patogenności szczepów *H. pylori*, przy użyciu metody PCR, wykrywano obecność genu *cagA*, alleli *s1*, *s2*, *m1*, *m2* genu *vacA* oraz analizowano związek tych genów z wybranymi chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Szacuje się, że około 60% wszystkich szczepów *H. pylori* posiada gen *cagA*, jakkolwiek odnotowano na świecie różnice w badanych populacjach [57, 69, 70, 155]. W badaniach przeprowadzonych w Europie Północnej oraz Wschodniej, 72.1% szczepów *H. pylori* wykazało obecność genu *cagA*, kolejno, we Francji i Włoszech – 74.1%, w Portugalii oraz w Hiszpanii – 86.7%, w Ameryce Północnej – 73.8%, w Ameryce Środkowej oraz Południowej – 88.8%, w Australii – 66.7%, natomiast w Azji Wschodniej 90.1%. Wyjątek stanowił Egipt, gdzie tylko 35.7% szczepów było *cagA+* [57].

Jak wynika z wieloośrodkowych badań przeprowadzonych w Polsce, częstość zakażeń szczepami *H. pylori cagA+* znacznie różniła się w poszczególnych regionach (od 40% do 90%) i wynosiła średnio 64% w populacji osób dorosłych [16]. W badaniach przedstawionych w tej pracy, częstość zakażeń z udziałem szczepów *H. pylori cagA+* była nieco niższa od średniej i wynosiła 58%.

Gen *vacA*, w odróżnieniu od genu *cagA*, jest obecny we wszystkich szczepach *H. pylori*, natomiast obserwuje się różnice w częstości występowania alleli *s* i *m* genu *vacA* [57, 156]. Jak wynika z wieloośrodkowych badań przeprowadzonych w 24 krajach, w tym również w Polsce, spośród alleli *s* genu *vacA*, w większości badanych populacji dominował allel *s1*. Częstość jego występowania wynosiła 83% w Europie Północnej oraz Wschodniej, 75% we Francji i Włoszech, 88% w Portugalii i Hiszpanii, 74% w Ameryce Północnej, 94% w Ameryce Środkowej i Południowej, 67% w Australii oraz 99% w Azji Wschodniej. Jedynie w Egipcie, tylko 43% szczepów posiadało allel *s1*. Podtyp *s1a* dominował w Europie Północnej i Wschodniej, także w Polsce oraz w Australii, natomiast w Portugalii, Hiszpanii oraz Ameryce Środkowej i Południowej wykazano obecność podtypu *s1b* [57, 157, 158]. Obydwa podtypy występowały niemal równie często we Francji, Włoszech oraz Ameryce Północnej [57]. Z najnowszych badań Boyanova i wsp., opublikowanych

w 2009 roku wynika, że 89.8% populacji bułgarskiej była zakażona szczepami *H. pylori*, *vacA s1a* [155].

W przypadku alleli typu *m*, w Europie Północnej oraz Wschodniej, we Francji i Włoszech, w Ameryce Północnej, w Australii oraz Egipcie częściej występował allel *m2* niż *m1* (odpowiednio 57%, 57%, 57%, 58% oraz 86%). Podobnie, w Bułgarii odsetek szczepów z allelem *m2* wynosił 60.2%. Natomiast w innych krajach, obejmujących Portugalię i Hiszpanię, Amerykę Środkową i Południową, Azję Wschodnią, dominował allel *m1*, odpowiednio 73%, 84% oraz 49% [57, 155].

W przeprowadzonych badaniach, najczęściej występującą sekwencją regionu sygnalnego *s* genu *vacA*, potwierdzoną u 65% szczepów, był allel *s1*. Spośród alleli *m*, dominował typ *m2*, który stwierdzono u 66% szczepów *H. pylori*, co jest zgodne z doniesieniami innych polskich autorów [157, 158, 159, 160].

Tylko w dwóch przypadkach (2%), potwierdzono genotypy mieszane, charakteryzujące się obecnością obydwu wykrywanych alleli *m* (*cagA+*, *vacA s1/m1/m2*), co wskazuje na zakażenie więcej niż jednym szczepem *H. pylori*. Nieco wyższy odsetek zakażeń mieszanych, wynoszący 3.2%, 6.9% oraz 9.7% wykazano odpowiednio w Estonii, Bułgarii oraz Kostaryce [155, 161, 162]. Natomiast w Portugalii zanotowano 37.3% szczepów z mieszanym genotypem *vacA* [58]. W ogólnopolskich badaniach Łaszewicza i wsp., częstość zakażeń mieszanych wynosiła 10.6%, z czego 4.5% stanowiły przypadki z mieszanym genotypem *cagA+*, *vacA s1/m1/m2* [16]. Odmienne wyniki przedstawiono w pracy Zalewskiej-Ziob i wsp., w której wykazano brak występowania zakażeń mieszanych na terenie Śląska [157].

W przedstawionych badaniach, również w przypadku dwóch (2%) szczepów *H. pylori* nie wykazano obecności zarówno alleli *m1* jak i *m2* (*cagA+*, *vacA s1/m?*), natomiast w jednym przypadku (1%) odnotowano brak allelu *s1* jak i *s2* (*cagA+*, *vacA s?/m1*). Może to świadczyć o obecności w badanej populacji, innych niż wykrywane, typów alleli *s* i *m*. Badania przeprowadzone w województwie podlaskim potwierdziły występowanie 28.1% szczepów *H. pylori* nieposiadających alleli *m1* oraz *m2*. Wszystkie te izolaty posiadały allel *s1* lub *s2* [160]. W badaniach przeprowadzonych we Włoszech, u odpowiednio 2% oraz 26% szczepów *H. pylori* nie udało się

określić zarówno genotypu *s* jak i *m*, stosując primery dla alleli *s1*, *s2* oraz *m1*, *m2* [163]. W Niemczech oraz w Chinach (przy zastosowaniu primerów dla alleli *m1*, *m2*) zanotowano obecność nieokreślonych alleli typu *m*, u odpowiednio 18.5% oraz 15% pacjentów. Na podstawie analizy sekwencyjnej DNA nieamplifikowalnych regionów *m*, wykazano ich dużą homologię z allelem *m1*, sugerując obecność nowych podtypów allelu *m1* – *m1a* (Niemcy) oraz *m1b* (Chiny) [51, 52]. W Indiach wykryto allel *m1c* [53]. Van Doorn i wsp., analizując pod względem genetycznym szczepy *H. pylori* pochodzące z różnych krajów świata, wykryli w Azji Wschodniej nowy podtyp allelu *m2*, który nazwali *m2b*, natomiast w przypadku regionu *s*, wyróżnili dodatkowy podtyp *s1c*, który okazał się dominującym w tym rejonie świata [50, 164].

W 2007 roku opisano nowy polimorficzny region w genie *vacA* – region „intermediate” (*i*) [54].

Polimorfizm w obrębie regionu sygnałowego oraz środkowego genu *vacA* *H. pylori* umożliwia tworzenie różnych układów alleli *s* i *m* [49]. W przedstawionej pracy doktorskiej, wykazano obecność trzech, spośród czterech, możliwych kombinacji alleli *s1*, *s2*, *m1*, *m2* genu *vacA*, a mianowicie *s1/m1*, *s1/m2* oraz *s2/m2*, których częstość występowania była podobna, odpowiednio 34%, 31% i 35%. Również w badaniach Gościński i wsp., 35% szczepów posiadało genotyp *s1a/m1*, 36% - *s1a/m2*, a 28% - *s2/m2* [158]. Nieco odmienny odsetek, w zakresie poszczególnych genotypów, wykazali w pracy Zalewska-Ziob i wsp., w której 43% wśród izolatów stanowił genotyp *s1/m2*, 36% - *s2/m2* oraz 21% - *s1/m1* [157]. W Estonii oraz w Portugalii odnotowano odpowiednio 65% oraz 53% szczepów o układzie alleli *s1/m1*, natomiast w populacji bułgarskiej dominował genotyp *s1/m2* (51.8%) [58, 155, 161]. Podobnie jak w wielu pracach, w badaniach wykonanych w przedstawionej pracy doktorskiej, także nie stwierdzono obecności szczepów o genotypie *s2/m1*, które w Europie, Azji, czy w Stanach Zjednoczonych są praktycznie niespotykane [49, 58, 165]. Ich występowanie odnotowano na terenie Meksyku oraz Afryki Południowej [166, 167, 168].

Liczne badania, również własne, potwierdziły, że obecność genu *cagA* jest silnie skorelowana z występowaniem sekwencji *vacA* *s1*. Natomiast

u większości szczepów *cagA*-, stwierdza się obecność allelu *s2* [49, 57, 58, 155, 157, 161, 162, 166, 169]. W przeprowadzonych badaniach, gen *cagA* występował w obecności allelu *s1* w 95% szczepów, natomiast 77% szczepów *cagA*-, posiadało allel *s2* ($p < 0.001$). W przypadku regionu środkowego *m*, gen *cagA* występował podobnie często, zarówno z allelem *m1* jak i *m2* (53% vs 47%), natomiast wśród szczepów *cagA*- dominował allel *m2* (93%, $p < 0.001$). Podobne wyniki przedstawili Strobel i wsp. [51]. Inni autorzy wykazali silną korelację pomiędzy genem *cagA*, a allelem *m1* genu *vacA* [57, 58, 162, 166, 170].

W badaniach przeprowadzonych w polskiej populacji, odsetek izolatów *H. pylori*, posiadających genotypy odpowiadające za zwiększoną wirulencję – *cagA*+, *vacA s1m1/s1m2* stanowił od 54% do 62% i był zbliżony do wyników uzyskanych w badaniach własnych, w których stwierdzono łącznie 55% szczepów *H. pylori* o tych genotypach [16, 157]. Podobne szczepy częściej izolowano w Turcji (69%), czy w Bułgarii (80.5%) [59, 155].

W niniejszej pracy, genotyp *cagA*-, *vacA s2/m2* wykryto u 32% zbadanych szczepów, podobnie jak u Zalewskiej-Ziob i wsp. [157]. Niższy odsetek szczepów o tym genotypie (27%) izolowano w badaniach Łaszewicza i wsp. [16].

W licznych pracach wykazano, że zakażenie szczepami *H. pylori cagA*+ może zwiększać ryzyko rozwoju choroby wrzodowej żołądka, dwunastnicy, jak również raka żołądka [58, 60, 75, 76, 77, 90, 171, 172, 173]. Erzin i wsp. odnotowali korelację pomiędzy obecnością genu *cagA*, a występowaniem choroby wrzodowej dwunastnicy (85.7%, $p = 0.004$) oraz raka żołądka (84.8%, $p = 0.003$). Odsetek pacjentów z dyspepsją niewrzodową, zakażonych szczepami *cagA*+ w tym badaniu wynosił 50% [59]. W badaniach Boyanova i wsp., szczepy *H. pylori cagA*+ izolowano znamienne częściej od pacjentów z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy, niż z dyspepsją niewrzodową (92.3% vs 75.4%, $p = 0.038$) [155]. Figueiredo i wsp., wykazali znamienne częstsze występowanie szczepów *H. pylori cagA*+ u pacjentów z wrzodem dwunastnicy ($p < 0.001$), wrzodem żołądka ($p = 0.009$) oraz rakiem żołądka ($p < 0.001$), w porównaniu do osób z zapaleniem żołądka. Ponadto, na podstawie ilorazu szans stwierdzili, że zakażenie szczepami *cagA*+, zwiększało ryzyko zachorowania na chorobę

wrzodową dwunastnicy, żołądka oraz raka żołądka odpowiednio 7.5, 6.0 oraz 5.8 razy, w porównaniu do zakażenia izolatami *cagA*- [58]. W wieloośrodkowych badaniach Oleastro i wsp., przeprowadzonych m.in. w krajach takich jak: Francja, Szwecja, Niemcy, Portugalia, USA, Brazylia oraz Kolumbia, średnio 72.2% osób z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy oraz 54.6% z dyspepsją niewrzodową, było zakażonych szczepami *H. pylori cagA*+, a różnica ta była istotna statystycznie ($p=0.014$). Dodatkowo, wykazano, że w przypadku zakażenia szczepami *cagA*+, ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową wzrastało ponad dwukrotnie ($OR=2.2$) [60]. Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych, w których, odsetek pacjentów zakażonych szczepami *cagA*+ z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy oraz dyspepsją niewrzodową wynosił odpowiednio 69% oraz 54%, jednak różnica ta nie była znamienna statystycznie ($p=0.170$). Pomimo tego, na podstawie ilorazu szans, podobnie jak w powyższych badaniach, wykazano prawie dwukrotnie większe ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową żołądka lub dwunastnicy w przypadku zakażenia szczepami *cagA*+, w porównaniu do *cagA*- ($OR=1.93$).

Wiele badań potwierdziło również zależność pomiędzy allelem *s1*, a występowaniem wrzodów żołądka i/lub dwunastnicy oraz rakiem żołądka [49, 57, 58, 59, 60, 165]. W badaniach Erzin i wsp., wykazano, że zakażenie szczepami *H. pylori vacA s1a* występowało znamiennie częściej u pacjentów z wrzodem dwunastnicy (96.4%, $p=0.004$) oraz rakiem żołądka (87.9%, $p=0.043$), w porównaniu do osób z dyspepsją niewrzodową (66.7%) [59]. Boyanova i wsp. odnotowali obecność allelu *s1a* w 100% przypadków choroby wrzodowej żołądka lub dwunastnicy oraz 84% dyspepsji niewrzodowej ($p=0.007$) [155]. Badania Figueiredo i wsp. wykazały korelację pomiędzy zakażeniem szczepami *H. pylori vacA s1*, a obecnością wrzodu dwunastnicy ($p<0.001$), wrzodu żołądka ($p=0.008$) oraz raka żołądka ($p<0.001$). U osób z zakażeniem szczepami *H. pylori vacA s1*, ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową dwunastnicy, żołądka oraz raka żołądka było odpowiednio 14.7, 10.0 oraz 15.9 razy większe, niż u osób zakażonych szczepami *vacA s2* [58]. W wieloośrodkowych badaniach Oleastro i wsp., przeprowadzonych m.in. w krajach zachodnich (Francja, Szwecja, Niemcy, Portugalia, USA, Brazylia, Kolumbia), odnotowano znamiennie wyższy

odsetek pacjentów z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy, zakażonych szczepami *H. pylori vacA s1* (71%, $p=0.039$), w porównaniu do osób z dyspepsją niewrzodową (57.4%). Ponadto, wykazano, że zakażenie szczepami *H. pylori vacA s1* zwiększało ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową prawie dwukrotnie ($OR=1.8$) [60]. W badaniach własnych, 73% pacjentów z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy oraz 62% z dyspepsją niewrzodową było zakażonych szczepami *H. pylori vacA s1*. Podobnie jak w przypadku genu *cagA*, różnica ta nie była istotna statystycznie ($p=0.288$). Natomiast na podstawie ilorazu szans wykazano, że ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową u osób zakażonych szczepami *H. pylori vacA s1* wzrastało prawie dwukrotnie, w stosunku do zakażonych *H. pylori* z allelem *s2* ($OR=1.7$).

Należy zaznaczyć, że w niektórych badaniach również nie potwierdzono znamiennych różnic w częstości występowania genu *cagA* i/lub allelu *s1* genu *vacA* wśród chorych z zapaleniem żołądka, chorobą wrzodową, czy rakiem żołądka [161, 170, 174, 175, 176].

Według niektórych badaczy, obecność genu *cagA*, uznawanego za marker wyspy patogenności *cag* PAI, nie musi świadczyć o nienaruszonej strukturze całego fragmentu wyspy. Delecja lub wyłączenie genów warunkujących utworzenie aparatu sekrecyjnego typu IV (TFSS), pomimo obecności genu *cagA*, może spowodować zaburzenia w wydzielaniu białka CagA [177]. Nillson i wsp. wykazali, że szczepy z nienaruszoną *cag* PAI występowały znamiennie częściej u pacjentów z wrzodem dwunastnicy lub rakiem żołądka, w porównaniu do osób z dyspepsją niewrzodową [177]. Natomiast badania Kauser'a i wsp., dowiodły występowania zaburzeń w integralności *cag* PAI wśród większości szczepów *H. pylori*, izolowanych od pacjentów z różnych części świata [178].

W badaniach własnych, nie wykazano istotnych różnic w częstości występowania alleli *m1* lub *m2* u pacjentów z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy oraz dyspepsją niewrzodową ($p=0.905$), co jest zgodne z wynikami innych autorów [57, 59, 155]. Ponadto stwierdzono, że allel *m1* nie wpływał na rozwój choroby wrzodowej, w stosunku do allelu *m2* ($OR=1.06$). Odmienne wyniki otrzymali Figueiredo i wsp., którzy wykazali korelację pomiędzy allelem *m1*, a chorobą wrzodową żołądka ($p=0.007$) oraz

rakiem żołądka ($p < 0.001$), natomiast nie odnotowali takiej zależności w przypadku choroby wrzodowej dwunastnicy ($p = 0.221$) [58].

Sprzeczne doniesienia w przytoczonym piśmiennictwie, dotyczące zależności pomiędzy występowaniem genów warunkujących wirulencję *H. pylori*, a rozpoznaniem klinicznym mogą wynikać z różnic, jakie istnieją pomiędzy szczepami oraz czynnikami osobniczymi i środowiskowymi na całym świecie.

Wykazano, że w patogenezie chorób żołądka/dwunastnicy mogą odgrywać rolę także inne geny *H. pylori*, jak *babA2* (blood-group antigen-binding adhesin gene), *iceA* (induced by contact with epithelium), *oipA* (outer inflammatory protein gene), *homB* (*Helicobacter pylori* outer-membrane protein gene), *hrgA* (*Helicobacter pylori* restriction endonuclease-replacing gene) czy *dupA* (duodenal ulcer promoting gene) [59, 60, 175, 179, 180, 181, 182, 183]. Ponadto należy podkreślić, że na rozwój zmian patologicznych w żołądku czy dwunastnicy, poza toksycznością szczepu *H. pylori*, znaczący wpływ mają zarówno cechy osobnicze, obejmujące m.in. polimorfizm genów kodujących pro i anty-zapalne cytokiny, jak również czynniki środowiskowe, w tym palenie tytoniu, dieta uboga w warzywa oraz owoce, czy stres [75, 89, 90]. Potwierdzają to badania własne, w których odsetek pacjentów z wrzodem trawiennym, zakażonych szczepami *H. pylori* *cagA*-, *vacA* s2 wynosił 23%.

Jakkolwiek w badaniach przeprowadzonych w mojej pracy doktorskiej nie oceniano wpływu genotypu *cagA* oraz *vacA*, na występowanie zmian histopatologicznych w błonie śluzowej żołądka (wyjątek stanowi metaplasja jelitowa), to w wielu pracach wykazano, że u osób zakażonych szczepami *cagA*+, w porównaniu do *cagA*-, występowały silniejsze zmiany zapalne w błonie śluzowej żołądka, w postaci przewlekłego zapalenia, atrofii, uszkodzenia nabłonka powierzchni, czy nacieku neutrofilowego [184, 185, 186, 187]. Atherton i wsp. stwierdzili, że zakażenie szczepami *H. pylori* *vacA* s1a indukowało silniejszy stan zapalny błony śluzowej części antralnej żołądka (w postaci nacieku neutrofilowego oraz limfocytowego), w porównaniu do szczepów o genotypie s1b oraz s2. W przypadku regionu środkowego *m*, badacze nie zaobserwowali takiej zależności, natomiast wykazali, że szczepy *vacA* m1 warunkowały wyższy poziom uszkodzenia

nabłonka powierzchni żołądka, względem izolatów *vacA m2* [165]. Przeciwnie, badania Umit'a i wsp. nie wykazały związku pomiędzy genotypem *s*, a zmianami histopatologicznymi, natomiast silniejszy naciek neutrofilowy zaobserwowano w obecności allelu *m1* [187]. Badania Nogueira i wsp. potwierdziły silną zależność pomiędzy allelami *s1*, *m1* genu *vacA*, a nasileniem przewlekłego stanu zapalnego, zaniku gruczołów, nacieku neutrofilowego oraz uszkodzenia nabłonka powierzchni, w porównaniu do genotypu *s2, m2* [184].

Odmienne wyniki przedstawili w pracy Kaklikkaya i wsp., którzy nie wykazali różnic we wpływie genotypu *s1/s2, m1/m2*, na występowanie zmian histopatologicznych w błonie śluzowej żołądka [186].

Metaplasja jelitowa stanowi fazę pośrednią pomiędzy zapaleniem błony śluzowej żołądka, a rakiem i jest uważana za stan przedrakowy [188]. Przyjmuje się, że postać kompletna metaplasji wiąże się z najmniejszym ryzykiem rozwoju raka żołądka, natomiast w przypadku postaci niekompletnej, ryzyko to jest znacznie większe. Potwierdzają to badania przeprowadzone w krajach o wysokim współczynniku zapadalności na raka żołądka, takich jak Japonia czy Kolumbia [189].

W badaniach własnych, nie wykazano istotnych różnic w częstości występowania metaplasji jelitowej u pacjentów z zakażeniem *H. pylori*, w porównaniu do grupy bez zakażenia ($p=0.134$), co wskazuje na wpływ na rozwój metaplasji jelitowej, także innych, poza infekcją *H. pylori*, czynników. Jest to zgodne z doniesieniami różnych autorów [190, 191]. Należy podkreślić jednak, że w przeprowadzonych badaniach, postać niekompletna metaplasji jelitowej występowała tylko w grupie pacjentów z zakażeniem *H. pylori*, co może świadczyć o udziale tej bakterii w rozwoju raka żołądka. W licznych badaniach wykazano, że osoby zakażone *H. pylori* są częściej predysponowane do rozwoju raka żołądka, w porównaniu do niezakażonych [192, 193, 194]. Ponadto, jak już wcześniej zaznaczono, zakażenie szczepami *H. pylori cagA+* zwiększa ryzyko raka żołądka, w porównaniu do szczepów *H. pylori*, bez tego genu [77, 195].

W badaniach Nogueira i wsp. wykazano silną zależność pomiędzy genotypami *H. pylori cagA+*, *vacA s1, m1*, a występowaniem metaplasji jelitowej [184]. Jednak istnieją także doniesienia o braku zależności

między metaplastją jelitową, a obecnością genów *cagA* i *vacA* [187, 191] lub potwierdzające wpływ tylko genu *cagA* [185, 196, 197].

W badaniach własnych, wykazano zależność między zakażeniem szczepami *H. pylori* z genem *cagA* oraz allelami *s1* i *m1* genu *vacA*, a występowaniem metaplastji jelitowej, jednak ze względu na analizę tylko 14 przypadków metaplastji jelitowej, potwierdzenie tego związku wymaga badań z udziałem większej grupy pacjentów.

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na skuteczność eradykacji zakażenia *H. pylori* jest wrażliwość bakterii na stosowane w leczeniu antybiotyki oraz chemioterapeutyki. Wykazano, że niepowodzenia w terapii wiążą się z opornością na klarytromycynę oraz w mniejszym stopniu na metronidazol. W przypadku szczepów wrażliwych na klarytromycynę, stopień eradykacji sięgał 87.8%. Spadek eradykacji do 18.3% odnotowano, kiedy szczepy były odporne na ten antybiotyk. Wrażliwość na metronidazol dawała sukces terapeutyczny w 97%, a oporność na ten chemioterapeutyk obniżała efektywność eradykacji o 25% [113]. Ze względu na istniejące na całym świecie regionalne różnice w lekowrażliwości szczepów *H. pylori*, Raport Uzgodnieniowy Maastricht III 2005 zaleca monitorowanie pierwotnej oporności na antybiotyki, w celu oceny ryzyka niepowodzenia leczenia [103].

W prezentowanej pracy doktorskiej, jednym z celów badań była analiza oporności szczepów *H. pylori* na antybiotyki oraz chemioterapeutyki, rekomendowane do leczenia tego zakażenia. Wyniki badań dotyczą pierwotnej oporności w populacji osób dorosłych.

Z liczego piśmiennictwa wynika, że amoksycylina, podstawowy lek stosowany w terapii zakażeń o etiologii *H. pylori*, wciąż charakteryzuje się dużą skutecznością w wielu krajach, poza m.in. Brazylią, czy Koreą Południową, gdzie odnotowano dosyć wysoki odsetek szczepów opornych, wynoszący odpowiednio 38% oraz 18.5% [113, 198, 199, 200].

Z badań przeprowadzonych w Polsce w latach 1999-2004 wynika, że wszystkie szczepy *H. pylori* były wrażliwe na amoksycylinę [152, 201]. Sytuacja ta nie zmieniła się od lat, co potwierdziły również badania własne, w których nie zanotowano szczepów opornych, a aktywność amoksycyliny była bardzo wysoka – odnotowano zahamowanie wzrostu 94% szczepów

przy wartości $MIC \leq 0.016$ mg/l. Tylko w przypadku sześciu szczepów, wykazano nieco wyższe wartości MIC, w zakresie od 0.023 do 0.125 mg/l.

Kolejnym lekiem stosowanym w terapii zakażeń *H. pylori* jest metronidazol. Wysoką oporność na ten lek zanotowano m.in. w Korei Południowej, Meksyku czy Brazylii, gdzie odsetek szczepów opornych wynosił odpowiednio 66.2%, 58% oraz 55%, co mogło być skutkiem nagminnego stosowania tanich nitroimidazoli w leczeniu infekcji pasożytniczych, stomatologicznych oraz ginekologicznych [199, 202, 203].

Na podstawie badań przeprowadzonych w Krakowie, w okresie 1999-2002, wykazano 46.7% szczepów opornych na metronidazol [152]. W kolejnych latach 2001-2004, oporność *H. pylori* na ten lek wynosiła w Polsce średnio 42%, przy braku występowania istotnych różnic pomiędzy ośrodkami [201]. W przeprowadzonych badaniach własnych, stwierdzono 40% izolatów opornych na metronidazol. Dodatkowo, zauważono częstszą izolację szczepów opornych u kobiet, w porównaniu do mężczyzn (odpowiednio 59% i 20%, $p < 0.001$), co również mogło być związane z powszechnym użyciem leku w terapii zakażeń ginekologicznych. Uzyskane dane są zgodne z wynikami badań innych autorów [201, 204].

Podobny odsetek szczepów opornych na metronidazol zanotowano w Irlandii oraz Finlandii – 38%, niższy wykazano we Włoszech, Bułgarii, a najniższy w Holandii, odpowiednio 29.4%, 25% oraz 14.4% [200, 204, 205, 206, 207].

Oporność na metronidazol, z wartością $MIC \geq 256$ mg/l, wykazano u 22% badanych szczepów. Większy odsetek takich izolatów, wynoszący 37.7%, odnotował Ziemiak [152]. Liczne badania dowiodły, że oporność na metronidazol nie wpływa jednak tak znacząco na spadek skuteczności 3-lekowej terapii eradykacyjnej, jak oporność na klarytromycynę [113, 208, 209].

Udowodniono, że oporność na metronidazol w warunkach *in vitro* nie musi odpowiadać oporności *in vivo*, dlatego Raport Uzgodnieniowy Maastricht III 2005, nie zaleca rutynowego oznaczania wrażliwości *H. pylori* na metronidazol [103, 210].

Od połowy lat 90-tych obserwuje się narastanie oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę, co prawdopodobnie wynika z nadmiernego stosowania makrolidów w leczeniu wielu infekcji, zwłaszcza zakażeń dróg oddechowych [113, 201, 211, 212, 213].

W Korei Południowej, w 2003 roku, oporność szczepów *H. pylori* na klarytromycynę wynosiła 13.8% i była znacznie wyższa w porównaniu do 1994 roku, w którym wynosiła zaledwie 2.8% [202]. Podobnie – w Japonii, odsetek szczepów opornych wzrósł z 1.8% w 1996 roku do 29% w 2004 roku i utrzymuje się na niezmiennym poziomie [214]. W Bułgarii, w latach 2005-2007, brak wrażliwości na klarytromycynę potwierdzono u 17.8% szczepów, z tendencją wzrostową [200]. Również w Irlandii oraz we Włoszech, odsetek izolatów opornych wynosił odpowiednio 16.5% oraz 24.1% [205, 215].

W nielicznych państwach, takich jak Holandia czy Finlandia, które cechuje, w porównaniu do innych krajów Unii Europejskiej, niska konsumpcja makrolidów, wykazano znikomy odsetek szczepów opornych na klarytromycynę, wynoszący odpowiednio 1% oraz 2% [204, 206, 216].

Ogólnopolskie badania, przeprowadzone w latach 2001-2004, wykazały, że średnio 15% szczepów *H. pylori* było opornych na klarytromycynę. Wyniki uzyskane przez ośrodki biorące udział w badaniach, znacznie różniły się w zależności od regionu [201]. Ziemniak, analizując wrażliwość szczepów *H. pylori* wyizolowanych w Krakowie, w latach 1999-2002, wykazał u 22.2% oporność na klarytromycynę, co jest zgodne z wynikami przeprowadzonych badań, w których brak wrażliwości na ten lek wykryto u 23% szczepów [152].

Zgodnie z zaleceniami Raportu Uzgodnieniowego Maastricht III 2005, w przypadku wystąpienia, w danej populacji, pierwotnej oporności *H. pylori* na klarytromycynę, w zakresie od 15% do 20%, należy wykluczyć stosowanie tego antybiotyku lub wykonać antybiogram przed wprowadzeniem leczenia eradykacyjnego [103]. Zatem w Polsce, nie powinno się stosować klarytromycyny w terapii zakażenia *H. pylori*, bez wstępnej oceny lekowrażliwości. Jakkolwiek Polskie Towarzystwo Gastroenterologiczne nie wprowadziło do polskich wytycznych takich zaleceń, to rekomenduje

w pierwszym rzucie leczenia, w pierwszej kolejności schemat 3-lekowy z zastosowaniem amoksycyliny oraz metronidazolu [105].

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy potwierdzają, że częste stosowanie w eradykacji zakażeń *H. pylori* metronidazolu i klarytromycyny, jest przyczyną pojawienia się szczepów opornych jednocześnie na obydwa leki [113].

W Europie, podwójna oporność szczepów *H. pylori* na metronidazol oraz klarytromycynę, jak wynika z piśmiennictwa, była niska i wahała się w zakresie od 0.8% do 9.1% [113, 204, 212, 217]. Na podstawie badań przeprowadzonych w Bułgarii w latach 2005-2007, odnotowano wystąpienie wśród populacji 8.1% izolatów *H. pylori*, opornych na te leki [200].

W Polsce, według badań przeprowadzonych w latach 2001-2004, odsetek szczepów *H. pylori* wykazujących podwójną oporność na metronidazol oraz klarytromycynę wynosił średnio 9% [201]. Ziemiak, zanotował 15.5% szczepów o podwójnej oporności [152]. W badaniach własnych, odsetek takich szczepów był niższy i wynosił 12%. Podobne wyniki uzyskano w 2007 roku w Irlandii, gdzie wyizolowano 12.6% szczepów o podwójnej oporności [205].

W ostatnich latach duże nadzieje wiązano z wprowadzeniem do leczenia zakażeń o etiologii *H. pylori* lewofloksacyny, reprezentującej III generację fluorochinolonów. Została ona zbadana zarówno jako składnik terapii pierwszego oraz trzeciego wyboru, a w uzyskanych wynikach, otrzymano dosyć wysokie odsetki eradykacji [218, 219, 220]. Istotnym rezultatem badań uzyskanym przez Gatta i wsp., był wysoki odsetek eradykacji (92.3%), stwierdzony u pacjentów uprzednio leczonych, u których szczepy *H. pylori*, przy oporności na metronidazol i klarytromycynę, były wrażliwe na lewofloksacynę. Zastosowano przez 10 dni schemat leczenia: lewofloksacyna + amoksycylina + IPP [220].

Natomiast, w badaniach prowadzonych w Korei Południowej, a także we Włoszech i w Belgii, zanotowano wysoką oporność na lewofloksacynę wśród szczepów *H. pylori*, wynoszącą odpowiednio – 21.5%, 19.1% i 16.8% [147, 198, 207]. Przytoczone dane, prawdopodobnie, wiążą się z wysokim spożyciem fluorochinolonów, w leczeniu różnych typów zakażeń.

W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej, tylko 5% szczepów było opornych na lewofloksacynę. Jednak duża rozpiętość w wartościach MIC, może wskazywać na pojawienie się w przyszłości większej liczby szczepów opornych.

Biorąc pod uwagę łatwe nabywanie oporności bakterii na leki z grupy fluorochinolonów, zasadne wydaje się zastosowanie lewofloksacyny tylko w leczeniu ciężkich przypadków zakażeń [112].

Na szczególne podkreślenie w niniejszej pracy, zasługuje stwierdzenie wśród szczepów *H. pylori*, wyhodowanych od badanych osób, dwóch izolatów (2.5%) opornych na trzy, spośród analizowanych leków: metronidazol, klarytromycynę oraz lewofloksacynę. Wielolekooporność wśród szczepów *H. pylori* zanotowano również w innych krajach, m.in. we Włoszech, Bułgarii, Brazylii oraz Korei Południowej [198, 199, 200, 207]. Zjawisko to budzi duże obawy na przyszłość, w skutecznej eradykacji zakażeń *H. pylori*.

W badaniach przedstawionych w kilku publikacjach, wykazano większą skuteczność eradykacji zakażeń *H. pylori*, w przypadku doboru antybiotyków na podstawie wyniku badania lekowrażliwości, niż leczenia empirycznego [103]. Dlatego, na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że wprowadzenie terapii celowanej, już w pierwszym rzucie leczenia infekcji *H. pylori*, umożliwiłoby uzyskanie szybszych efektów terapeutycznych, bez dodatkowych obciążeń pacjenta, wynikających z wielokrotnego leczenia empirycznego oraz ograniczyłoby narastanie wśród szczepów *H. pylori* oporności.

W wyniku zakażenia *H. pylori*, poza lokalną odpowiedzią immunologiczną, dochodzi również do humoralnej odpowiedzi ogólnoustrojowej. Wówczas, w surowicy zakażonych osób, stwierdza się występowanie swoistych przeciwciał anti-*H. pylori*, głównie klasy IgG oraz IgA [66, 221, 222]. Ich obecność można wykryć m.in. testem ELISA [66, 106, 223, 224].

Metodę tą, zastosowano również w niniejszej pracy, w celu oznaczenia poziomu swoistych przeciwciał klasy IgG anti-*H. pylori*, w surowicy losowo wybranych pacjentów z zakażeniem *H. pylori*. Znamienny poziom przeciwciał klasy IgG anti-*H. pylori* stwierdzono u 84% osób,

w tym u wszystkich z potwierdzonym mikrobiologicznie zakażeniem *H. pylori*. W pracy Gościński wykazano, że 97% osób dorosłych, z potwierdzonym bakteriologicznie zakażeniem *H. pylori*, posiadało podwyższony poziom przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* [66]. Biorąc pod uwagę rozpoznanie kliniczne, w niniejszej pracy, dodatni wynik testu ELISA odnotowano u 81% chorych z dyspepsją niewrzodową oraz u 89% z chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy. Natomiast w badaniach Gościński, odsetki te były wyższe i wynosiły 96.7%, 93.7%. oraz 98.5%, odpowiednio w przypadku przewlekłego zapalenia żołądka, choroby wrzodowej żołądka oraz dwunastnicy [66]. W przeprowadzonych badaniach, ujemny wynik testu ELISA odnotowano u 16% (10) zakażonych, spośród których, u trzech chorych, miano przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* było bliskie wartości granicznej. U pozostałych osób, wyniki badania histopatologicznego wykluczyły ostrą fazę infekcji, w której nie stwierdza się jeszcze w surowicy przeciwciał klasy IgG. Dlatego też, fałszywie ujemne wyniki testu ELISA mogły wynikać z innych przyczyn, takich jak: mała ilość bakterii kolonizujących błonę śluzową żołądka, co wykazano w badaniu histopatologicznym lub osobnicza wydolność układu immunologicznego [225].

Oznaczanie przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* w surowicy jest głównie stosowane w badaniach epidemiologicznych, do monitorowania obecności zakażenia *H. pylori* w danej populacji [16, 226, 227].

Błona śluzowa żołądka często staje się miejscem kolonizacji grzybiczej [141, 143]. Do czynników sprzyjających temu zjawisku zalicza się, m.in. uszkodzenie bariery żołądkowej, w wyniku działania różnych substancji (kwas solny, kwasy żółciowe, alkohol, NLPZ i inne) oraz stosowanie leków zmniejszających kwasowość soku żołądkowego, jak inhibitory pompy protonowej czy H₂ – blokery [120, 140, 228, 229, 230].

W badaniach prezentowanych w tej pracy, grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* wyizolowano od 19% osób z objawami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego. Wyższy odsetek występowania grzybów *Candida* w żołądku osób z objawami dyspepsji sięgający 47%, wykazano w badaniach Zwolińskiej-Wcisło i wsp. [230].

Badania Budak i wsp. oraz Zwolińskiej-Wcisło i wsp., potwierdziły występowanie grzybów z rodzaju *Candida* w ilości patologicznie znamiennej, wynoszącej $\geq 10^5$ CFU/ml, u pacjentów z chorobą wrzodową żołądka, w zakresie od 20.7% do 54.2% oraz z przewlekłym zapaleniem żołądka, w zakresie od 5% do 10.3% [141, 143]. W niniejszej pracy, obecność grzybów *Candida* odnotowano u 50% chorych z wrzodem żołądka, 18% z dyspepsją niewrzodową oraz u 10% z wrzodem dwunastnicy, jednak u wszystkich pacjentów, odmiennie niż w powyższych badaniach, grzyby występowały w stężeniu patologicznie nieznamiennym, $< 10^3$ CFU/ml, co wyklucza infekcję grzybiczą, a świadczy jedynie o kolonizacji.

We wcześniej przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano korelacji pomiędzy ilością grzybów w żołądku, mianem przeciwciał przeciwgrzybiczych oraz obecnością antygenu grzybiczego we krwi u pacjentów z zapaleniem lub wrzodem żołądka, co potwierdza, że kolonizacja grzybicza błony śluzowej żołądka jest najczęściej wtórna [142, 143, 231]. Bardzo rzadko notuje się występowanie nieżytów żołądka spowodowanych pierwotną infekcją *Candida*, które charakteryzują się nietypowym obrazem klinicznym [118, 232].

Badania własne wykazały, zgodnie z innymi autorami, że najczęściej izolowanym z przewodu pokarmowego gatunkiem grzyba był *C. albicans* [118, 143]. W ostatnich latach notuje się wzrost częstości występowania innych gatunków, *nie-albicans* [120]. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano gatunki *C. glabrata* (9.5%), *C. tropicalis* (9.5%) oraz *C. lusitaniae* (3%). Ponadto, coraz częściej od jednego pacjenta izoluje się kilka gatunków grzybów, głównie *C. albicans* i/lub *C. tropicalis* z *C. glabrata* oraz *C. krusei* [120, 143]. Jedną z przyczyn tego zjawiska, obok udoskonalenia metod diagnostycznych, jest częstsze stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania, a także niektórych leków przeciwgrzybiczych, jak np. flukonazolu, który sprzyja rozrostowi grzybów o obniżonej wrażliwości (*C. glabrata*) lub naturalnej oporności na ten lek (*C. krusei*) [120, 143].

W badanej populacji chorych, u dwóch osób odnotowano współwystępowanie w błonie śluzowej żołądka gatunków *C. glabrata* oraz

C. tropicalis. Podobnie, Zwolińska–Wcisło i wsp. izolowali od pacjentów z żołądka mieszane hodowle, jednak ich odsetek był większy [143].

Wyniki badań przedstawione w pracy potwierdziły, że wszystkie szczepy *C. albicans* oraz *C. tropicalis* charakteryzowały się całkowitą wrażliwością na uwzględnione w mikogramie leki przeciwgrzybicze. W przypadku szczepów *C. glabrata*, odnotowano tylko średnią wrażliwość na flukonazol i itraconazol. Podobnie, w pracy Budak i wsp., wszystkie szczepy *C. albicans* były wrażliwe na zastosowane w badaniu leki przeciwgrzybicze, a izolaty *C. glabrata* charakteryzowały się średnią wrażliwością na mikonazol, flukonazol oraz itraconazol. W przypadku ostatniego leku, stwierdzono jeden szczep oporny [141]. Natomiast w badaniach własnych, szczep *C. lusitaniae* był średniowrażliwy na flucytozynę, a wykazał wrażliwość na pozostałe leki.

W patomechanizmie zakażeń grzybiczych, inwazję tkanek przez grzyby drożdżopodobne ułatwiają wydzielane enzymy hydrolityczne, odpowiedzialne za destrukcję białek, lipidów oraz polisacharydów. Ich aktywność oraz charakter mogą świadczyć o zjadliwości grzyba [233].

W przeprowadzonych badaniach, chociaż szczepy *C. albicans*, izolowane od pacjentów z zakażeniem *H. pylori*, charakteryzowała aktywność większej liczby enzymów, niż w przypadku szczepów *C. albicans* izolowanych od pacjentów bez obecności tego drobnoustroju, to jednak aktywność tych enzymów, które wykazano tylko w szczepach grzybów pochodzących od pacjentów z zakażeniem *H. pylori*, była bardzo słaba, w zakresie < 0.5 . Ponadto, liczba szczepów *C. albicans* izolowanych od pacjentów bez zakażenia *H. pylori* była znacznie mniejsza (4 szczepy), w porównaniu do izolatów, uzyskanych od osób z zakażeniem *H. pylori* (21 szczepów), co mogło wpłynąć na otrzymane wyniki średniej aktywności enzymatycznej tych grzybów. Pozostałe gatunki *Candida nie-albicans* izolowano w pojedynczych przypadkach. Dodatkowo, w szczepach *C. albicans*, izolowanych zarówno od pacjentów z zakażeniem *H. pylori* jak również bez zakażenia, średnia aktywność badanych enzymów była niska, w zakresie < 3 . Wyjątek stanowił enzym arylamidaza leucyny, który w obydwu grupach charakteryzował się najwyższą aktywnością. Kolejną pod względem aktywności hydrolazą, także w obydwu grupach, była esteraza C4.

W badaniach Kurnatowskiego i wsp., szczepy *C. albicans*, izolowane z różnych ontocenoz przewodu pokarmowego cechowały się najwyższą aktywnością również aryamidazy leucyny oraz fosfatazy kwaśnej [234].

W badaniach Zwolińskiej-Wcisło i wsp., współwystępowanie *Candida* z *H. pylori* w żołądku odnotowano w 10% przypadków, co potwierdzają przeprowadzone badania, w których jednoczesną obecność tych drobnoustrojów wykazano u 13% pacjentów [230]. Częstsze występowanie grzybów u osób zakażonych *H. pylori* w porównaniu do niezakażonych (13% vs 6%) może świadczyć o tym, że uszkodzenie błony śluzowej żołądka w wyniku infekcji *H. pylori*, sprzyja kolonizacji grzybiczej.

Analiza współwystępowania wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego z zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida spp.*, potwierdziła znamienne częstsze występowanie choroby wrzodowej dwunastnicy u osób z zakażeniem *H. pylori* ($p=0.01$) [2, 6, 7, 10, 17]. Natomiast, wrzody żołądka, były skorelowane z występowaniem obydwu drobnoustrojów jednocześnie ($p=0.001$) lub obecnością tylko grzybów *Candida* ($p=0.018$). Jednak ze względu na patologicznie nieznamiennej ilość grzybów w żołądku, można zakładać, że pierwotną przyczyną wrzodów żołądka mogła być infekcja *H. pylori*, w następstwie której doszło do kolonizacji grzybami *Candida*. Należy przypuszczać, że obecność grzybów tylko u dwóch pacjentów z wrzodami żołądka, bez zakażenia *H. pylori*, pomimo wykazanej istotności statystycznej, prawdopodobnie nie miała związku z patogenezą tej choroby, a wynikała z wcześniejszego uszkodzenia śluzówki żołądka, pod wpływem innych czynników [120, 140, 228, 229, 230].

6. PODSUMOWANIE

1. U 41% osób z grupy 267 chorych z dolegliwościami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego, mikrobiologicznie potwierdzono zakażenie *H. pylori*.
2. Obecność genu *cagA* stwierdzono u 58% szczepów *H. pylori*, natomiast najczęściej występującymi allelami genu *vacA* były: *s1* oraz *m2*, wykazane u odpowiednio 65% i 66% izolatów.
3. 55% chorych było zakażonych szczepami *H. pylori* o zwiększonej wirulencji: *cagA+*, *vacA s1m1/s1m2*.
4. W 2% przypadków odnotowano genotypy mieszane, charakteryzujące się obecnością obydwu wykrywanych alleli *m*, co wskazywało na zakażenie więcej niż jednym szczepem *H. pylori*.
5. Stwierdzenie u 3% szczepów *H. pylori* braku obecności alleli *s* lub *m* mogło świadczyć o występowaniu innych typów alleli.
6. Wykazano, że u osób zakażonych szczepami *H. pylori cagA+*, *vacA s1* istniało dwukrotnie większe ryzyko wystąpienia choroby wrzodowej żołądka lub dwunastnicy, w porównaniu do zakażonych szczepami *cagA-*, *vacA s2*.
7. W badaniu wrażliwości izolatów *H. pylori* na amoksycylinę, stwierdzono wysoką aktywność antybiotyku oraz brak szczepów opornych.
8. Odnotowano wysoki odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol – 40%, klarytromycynę – 23% oraz obydwa leki – 12%. Tylko 5% izolatów było opornych na lewofloksacynę.
9. Szczepy wielolekooporne stanowiły 2.5% wśród badanych *H. pylori*.

10. Znamienny poziom przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* stwierdzono u 84%, spośród losowo wybranych, osób z zakażeniem.

11. Obecność grzybów z rodzaju *Candida* wykazano, tylko w ilości patologicznie nieznacznej, $<10^3$ CFU/ml, u 19% badanych osób.

12. Najczęściej izolowano gatunek *C. albicans*.

13. Wszystkie izolowane szczepy *C. albicans* były wrażliwe na badane leki przeciwgrzybicze.

14. Wykazano niską aktywność enzymatyczną szczepów *C. albicans* izolowanych, zarówno, od osób z zakażeniem jak i bez zakażenia *H. pylori*.

15. Znamienne częstsze występowanie choroby wrzodowej dwunastnicy stwierdzono u osób zakażonych, w porównaniu do niezakażonych, *H. pylori*.

16. Kolonizacja grzybicza u chorych z wrzodem żołądka, zakażonych jak również niezakażonych *H. pylori*, prawdopodobnie była następstwem wcześniejszego uszkodzenia śluzówki żołądka pod wpływem infekcji *H. pylori* i/lub innych czynników.

7. WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania potwierdziły zależność pomiędzy zakażeniem *H. pylori*, a występowaniem choroby wrzodowej dwunastnicy. Natomiast, obecność grzybów z rodzaju *Candida*, występujących w ilości patologicznie nieznacznej u chorych z wrzodem żołądka zakażonych, jak również niezakażonych *H. pylori*, wskazywała jedynie na kolonizację błony śluzowej żołądka, w wyniku jej uszkodzenia pod wpływem zakażenia *H. pylori* i/lub innych czynników.
2. Przeprowadzone badania potwierdziły, że zakażenie szczepami *H. pylori* o genotypie *cagA+*, *vacA s1* zwiększa ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową żołądka lub dwunastnicy.
3. Wysoki odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol oraz klarytromycynę, podstawowe leki stosowane w terapii zakażeń *H. pylori*, wskazuje na konieczność zastąpienia leczenia empirycznego pierwszego rzutu leczeniem celowanym, zgodnie z wykonanym antybiogramem, co wpłynie na poprawę efektywności leczenia oraz ograniczy narastanie oporności.

8. STRESZCZENIE

Celem badań, przedstawionych w prezentowanej pracy doktorskiej, była charakterystyka patogenności szczepów bakterii *H. pylori* i grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz ocena współwystępowania wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego z zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida spp.*

Grupę do badań stanowiło 267 pacjentów z objawami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego. Od każdego chorego, podczas badania endoskopowego, pobierano wycinki błony śluzowej żołądka, w celu wykonania szybkiego testu ureazowego, badania histopatologicznego oraz mikrobiologicznego. Ponadto, od losowo wybranych 61 pacjentów zakażonych *H. pylori* pobrano krew, w celu określenia poziomu przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori*, za pomocą testu ELISA.

Dane dotyczące rozpoznania klinicznego u badanych pacjentów (dyspepsja niewrzodowa, choroba wrzodowa żołądka, choroba wrzodowa dwunastnicy), wyniki szybkiego testu ureazowego oraz wyniki badania histopatologicznego, otrzymywano od lekarza gastroenterologa przeprowadzającego badanie kliniczne.

W grupie 267 pacjentów, którzy zgłosili się do lekarza gastroenterologa rozpoznano: 221 (83%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 16 (6%) przypadków choroby wrzodowej żołądka oraz 30 (11%) przypadków choroby wrzodowej dwunastnicy.

W badaniu histopatologicznym bioptatów, obecność *H. pylori* potwierdzono u 165 (62%) chorych. Dodatni wynik szybkiego testu ureazowego odnotowano u 176 (66%) osób. Bakterie *H. pylori* wyizolowano od 109 (41%) pacjentów. Wśród 170 (64%) chorych, u których zakażenie *H. pylori* potwierdzono w badaniu histopatologicznym i/lub mikrobiologicznym, zdiagnozowano 131 (60%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 13 (81.5%) wrzodów żołądka oraz 26 (87%) wrzodów dwunastnicy.

Analizę genetyczną, pod kątem wykazania obecności genów: *ureB*, *cagA* oraz alleli *s1*, *s2*, *m1*, *m2* genu *vacA*, przeprowadzono u 109 szczepów

H. pylori, stosując metodę PCR. Wszystkie badane szczepy posiadały gen *ureB*, co potwierdziło ich przynależność do gatunku *H. pylori*.

W dwóch przypadkach (2%) odnotowano genotypy mieszane, charakteryzujące się obecnością obydwu wykrywanych alleli *m*, co wskazywało na zakażenie więcej niż jednym szczepem *H. pylori*. Natomiast, w trzech przypadkach (3%) nie wykazano obecności wykrywanych alleli *s* lub *m*, co z kolei mogło świadczyć o występowaniu innych typów alleli *s/m* w badanej populacji. Z tego względu dalszej analizie poddano 104 izolaty *H. pylori*.

Obecność genu *cagA* stwierdzono u 58% szczepów *H. pylori*, natomiast najczęściej występującymi allelami genu *vacA* były: *s1* oraz *m2*, potwierdzone u odpowiednio 65% i 66% izolatów.

Łącznie 55% pacjentów było zakażonych szczepami *H. pylori* o zwiększonej wirulencji: *cagA+*, *vacA s1m1/s1m2*.

Wykazano, że osoby zakażone szczepami *H. pylori cagA+*, *vacA s1* mają dwukrotnie większe ryzyko wystąpienia choroby wrzodowej żołądka lub dwunastnicy, w porównaniu do zakażonych szczepami *cagA-*, *vacA s2*.

Chociaż w przeprowadzonych badaniach wykazano zależność pomiędzy zakażeniem szczepami *H. pylori* z genem *cagA* oraz allelami *s1* i *m1* genu *vacA*, a występowaniem metaplazji jelitowej, to ze względu na analizę tylko 14 przypadków metaplazji jelitowej, potwierdzenie tego związku wymaga badań z udziałem większej grupy pacjentów.

Stosując metodę Etest, oznaczono lekowrażliwość na amoksycylinę, metronidazol oraz klarytromycynę u 97 szczepów *H. pylori*, a w przypadku lewofloksacyny – u 79 szczepów.

W przeprowadzonych badaniach, nie wykazano szczepów *H. pylori* opornych na amoksycylinę, a aktywność tego leku wobec badanych izolatów była bardzo duża. Natomiast, odnotowano wysoki odsetek szczepów opornych na metronidazol – 40%, klarytromycynę – 23% oraz obydwa leki jednocześnie – 12%. Oporność na lewofloksacynę wykryto u 5% izolatów. Niepokojące wydaje się występowanie 2.5% szczepów *H. pylori* o potrójnej oporności – na metronidazol, klarytromycynę oraz lewofloksacynę.

Uzyskane wyniki sugerują konieczność zastąpienia terapii empirycznej pierwszego rzutu, terapią celowaną, według wykonanego antybiogramu,

dla poprawy efektywności leczenia oraz ograniczenia narastania wśród szczepów *H. pylori* oporności.

Znamienny poziom przeciwciał klasy IgG anty-*H. pylori* potwierdzono u 84% losowo wybranych osób z zakażeniem *H. pylori*.

Grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* wyizolowano od 51 (19%) spośród 267 badanych osób. Rozpoznanie kliniczne obejmowało 40 (18%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 8 (50%) wrzodów żołądka oraz 3 (10%) wrzody dwunastnicy. Wychodowano 53 szczepy. Dwóch pacjentów posiadało w badanych materiałach 2 różne gatunki grzybów. Na podstawie analizy wyników posiewu ilościowego bioptatów pobranych z żołądka wykazano, że wszyscy pacjenci posiadali patologicznie nieznamiennej liczbę komórek grzybów, w ilości $<10^3$ CFU/ml.

Spośród 51 osób z grzybami *Candida* w żołądku, 16 (6%) stanowili pacjenci bez zakażenia *H. pylori*, natomiast u 35 (13%) stwierdzono zakażenie tym drobnoustrojem. W grupie pacjentów *H. pylori*-, *Candida*+, rozpoznanie kliniczne obejmowało 14 (6%) przypadków dyspepsji niewrzodowej oraz 2 (12.5%) wrzody żołądka, natomiast wśród osób *H. pylori*+, *Candida*+, rozpoznano 26 (12%) przypadków dyspepsji niewrzodowej, 6 (37.5%) wrzodów żołądka oraz 3 (10%) wrzody dwunastnicy.

Identyfikację do gatunku, określenie profilu enzymatycznego oraz ocenę wrażliwości na leki przeciwgrzybicze, wykonano u 32 szczepów grzybów (pozostałych 21 nie udało się przepasażować w celu wykonania dalszych badań).

Stosując podłoże chromogenne *Candida* ID 2 oraz test ID 32 C, łącznie zidentyfikowano 25 (78%) szczepów z gatunku *C. albicans*, po 3 (9.5%) szczepy *C. glabrata* i *C. tropicalis* oraz 1 (3%) szczep *C. lusitaniae*.

W ocenie wrażliwości na leki przeciwgrzybicze obejmujące: amfoterycynę B, flucytozynę, itraconazol, flukonazol, worykonazol, zastosowano test ATB FUNGUS 3. Wszystkie szczepy *C. albicans* oraz *C. tropicalis* były wrażliwe na uwzględnione w mikogramie leki przeciwgrzybicze. Szczepy *C. glabrata* charakteryzowała średnia wrażliwość na flukonazol oraz itraconazol. Szczep *C. lusitaniae* był średniowrażliwy tylko na flucytozynę, natomiast wrażliwy na pozostałe leki.

Badając aktywność enzymatyczną grzybów, za pomocą testu API ZYM wykazano, że jakkolwiek szczepy *C. albicans*, izolowane od pacjentów z zakażeniem *H. pylori*, charakteryzowała aktywność większej liczby enzymów, niż w przypadku szczepów tego gatunku izolowanych od pacjentów bez obecności *H. pylori*, to jednak aktywność tych enzymów, które wykazano tylko w szczepach pochodzących od pacjentów z zakażeniem *H. pylori*, była bardzo słaba, w zakresie < 0.5 . Ponadto, w analizowanych szczepach *C. albicans*, izolowanych zarówno od pacjentów z zakażeniem *H. pylori* jak również bez zakażenia, średnia aktywność większości enzymów była niska, w zakresie < 3 . Dla gatunków *Candida nie-albicans* uzyskano pojedyncze enzymogramy.

Analiza współwystępowania wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego z zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida spp.*, potwierdziła znamienne częstsze występowanie choroby wrzodowej dwunastnicy u osób z zakażeniem *H. pylori*. Natomiast, wrzody żołądka były skorelowane z występowaniem obydwu drobnoustrojów jednocześnie lub obecnością tylko grzybów *Candida*. Jednak ze względu na patologicznie nieznamiennej ilość grzybów w żołądku, można zakładać, że pierwotną przyczyną wrzodów żołądka mogła być infekcja *H. pylori*, w następstwie której, doszło do kolonizacji grzybami *Candida*. Należy przypuszczać, że obecność grzybów tylko u dwóch pacjentów z wrzodami żołądka, bez zakażenia *H. pylori*, pomimo wykazanej istotności statystycznej, prawdopodobnie nie miała związku z patogenezą tej choroby, a wynikała z wcześniejszego uszkodzenia śluzówki żołądka, pod wpływem innych czynników.

9. SUMMARY

The aim of the PHD study was to characterize the pathogenicity of bacteria *H. pylori* and *Candida* fungi strains and to assess the co-existence of selected disorders of the upper gastrointestinal tract with infection of *H. pylori* and/or *Candida* spp.

Two hundred and sixty seven dyspeptic patients who underwent upper gastrointestinal endoscopy were enrolled in the study. From each patient biopsy specimens of gastric mucosa were taken for histopathology, a rapid urease test and microbiological examination.

Moreover, in order to determine the serum level of IgG antibodies against *H. pylori* by using ELISA method, blood samples were collected from randomly selected 61 patients infected with *H. pylori*.

The results of clinical recognition (non ulcer dyspepsia, gastric or duodenal ulcer), the rapid urease test and histopathology of examined patients were received from the gastroenterologist who conducted the clinical examination.

The results of the endoscopic examination of 267 patients showed 221 (83%) non ulcer dyspepsia cases, 16 (6%) gastric ulcer cases and 30 (11%) cases of duodenal ulcer.

H. pylori infection was confirmed in 165 (62%) patients by the histopathology and in 176 (66%) by the rapid urease test. *H. pylori* strains were isolated from 109 (41%) patients. Among 170 (64%) patients with *H. pylori* infection confirmed by histopathology and/or microbiological examination the clinical recognition included: 131 (60%) non ulcer dyspepsia cases, 13 (81.5%) gastric ulcer cases and 26 (87%) cases of duodenal ulcer.

The presence of *ureB* and *cagA* genes, *s1*, *s2*, *m1*, *m2* alleles of *vacA* gene in each *H. pylori* isolate was determined by polymerase chain reaction (PCR).

All strains harbored *ureB* gene that confirmed their affinity to *H. pylori* species.

In two cases (2%) multiple *vacA* *m*-genotypes were detected, which indicated the infection by more than one *H. pylori* strain. Three isolates (3%) were untypeable with respect to the *s* or *m* region of the *vacA* gene, which

could indicate the presence of distinct types of these alleles in the examined population.

Further genetic analysis concerned 104 *H. pylori* strains which contained complete single genotypes.

H. pylori cagA gene was present in 58% of strains. The most frequent alleles of *vacA* gene were *s1* and *m2* detected in 65% and 66% *H. pylori* strains, respectively.

Fifty seven patients (55%) were infected with *H. pylori* strains carrying genotypes responsible for higher virulence *cagA*+, *vacA s1m1/s1m2*.

It was proved that patients infected with *cagA*+, *vacA s1 H. pylori* strains are at a higher risk for peptic ulcer disease than those carrying *cagA*-, *vacA s2* strains.

Even though significant links between *cagA* gene and *vacA s1* and *m1* alleles and intestinal metaplasia were demonstrated, because of only 14 analyzed cases of intestinal metaplasia, this issue needs to be confirmed.

In the present study, the susceptibility of 97 isolated *H. pylori* strains to amoxicillin, metronidazole and clarithromycin and 79 to levofloxacin was assessed by using Etest method.

All *H. pylori* strains were susceptible to amoxicillin confirming the reported lack of resistance to this agents. In addition, 94% of strains were susceptible to the lowest concentration of amoxicillin.

Resistance to metronidazole, clarithromycin and to both metronidazole and clarithromycin was detected in 40%, 23% and 12% of *H. pylori* isolates, respectively, whereas 5% of strains were resistant to levofloxacin. It is noteworthy that two patients (2.5%) were infected with multidrug resistant *H. pylori* strains (to metronidazole, clarithromycin and levofloxacin).

In conclusion, the obtained data suggest that empirical eradication therapy should be replaced with pretreatment susceptibility testing to improve the effectiveness of therapeutic treatment and to avoid increasing *H. pylori* drug resistance.

The significant level of IgG antibodies against *H. pylori* was confirmed in 84% of randomly selected patients infected with *H. pylori*.

Candida fungi were found in 51 (19%) out of 267 patients. The clinical recognition included: 40 (18%) non ulcer dyspepsia cases, 8 (50%) gastric ulcer cases and 3 (10%) cases of duodenal ulcer.

Two fungal species were isolated from two patients, therefore altogether fifty three *Candida* strains were cultured. The analysis of results of quantitative inoculation showed that all patients possessed pathologically non-significant number of fungal cells in the stomach, $<10^3$ CFU/ml.

Co-existence of *H. pylori* and *Candida* fungi was found in 35 (13%) patients while *Candida* fungi without concurrent presence of *H. pylori* were detected in 16 (6%) persons. In the group *H. pylori*+, *Candida*+, the clinical recognition included: 26 (12%) non ulcer dyspepsia cases, 6 (37.5%) gastric ulcer cases and 3 (10%) cases of duodenal ulcer, whereas in patients with *H. pylori*-, *Candida*+, 14 (6%) cases of non ulcer dyspepsia and 2 (12.5%) gastric ulcer cases were recognized.

The identification, susceptibility testing and assessment of enzymatic activity were performed only for 32 *Candida* strains due to the fact that the remaining 21 strains did not survive.

Chromogenic agar medium *Candida* ID 2 and ID 32 test were used for the identification of *Candida* spp. Twenty five strains (78%) were identified as *C. albicans*, 3 (9.5%) as *C. glabrata* and *C. tropicalis* and 1 (3%) as *C. lusitaniae*.

The susceptibility of *Candida* strains to antifungal drugs (amphotericin B, 5-fluorocytosine, itraconazole, fluconazole and voriconazole) was determined by using ATB FUNGUS 3 test. *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates were susceptible to all agents. *C. glabrata* strains were only intermediate-susceptible to itraconazole and fluconazole whereas *C. lusitaniae* strain was only intermediate-susceptible to 5-fluorocytosine.

The enzymatic activity of *Candida* strains was estimated by using API ZYM test. The research proved that the *C. albicans* strains isolated from patients with *H. pylori* infection and from non-infected persons had similar, rather low (< 3) enzymatic activity. For *Candida non-albicans* strains single enzymograms were obtained.

The analysis of the co-existence of selected disorders of the upper gastrointestinal tract with infection of *H. pylori* and/or *Candida* spp. confirmed

that subjects infected with *H. pylori* suffered from duodenal ulcers more often than those non-infected with this microorganism. Although gastric ulcers were significantly more frequent in patients with the presence of *H. pylori* and *Candida* simultaneously or *Candida* alone, due to the pathologically non-significant number of fungal cells, it may be concluded that gastric ulcers were probably caused only by *H. pylori* that facilitated the further fungal colonization. In addition, it is possible that the presence of *Candida* fungi in two patients with gastric ulcers and without *H. pylori* infection, despite determined significant relevance, was not associated with the pathogenesis of the disease but resulted from an earlier injury of gastric mucosa under the influence of other factors.

10. PIŚMIENICTWO

1. Konturek S.J., Konturek P.C., Brzozowski T., Konturek J.W., Pawlik W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56(4): 507-530
2. Konturek S.J., Konturek P.C., Konturek J.W., Plonka M., Czesnikiewicz-Guzik M., Brzozowski T., Bielanski W. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 29-50
3. Konturek S.J. Laureaci Nagrody Nobla z fizjologii i medycyny w roku 2005: Barry J. Marshall i Robin J. Warren. *Med Dypł* 2005; 14(11): 1-6
4. Brzozowski T. Nagroda Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za rok 2005. *Med Prakt* 2006; 2: 24-28
5. Jagusztyn-Krynica E.K., Godlewska R., Łaniewski P. *Helicobacter pylori* - patogen roku 2005. *Kosmos* 2005; 54(4): 307-319
6. Konturek S.J. Choroba wrzodowa - patofizjologia i leczenie. *Przew Lek* 2001; 4, 1/2: 98-107
7. Konturek S.J., Śliwowski Z. Rola *Helicobacter pylori* w patogenezie zapalenia żołądka i wrzodu trawiennego. *Med Dypł* 2006; Supl 13: 11-17
8. Jaworski W. Podręcznik Chorób Żołądka. Wydawnictwo Dziel Lekarskich Polskich, pierwsze wydanie Kraków 1886
9. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 4, 1: 1273-1275
10. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 16, 1: 1311-1315
11. Jagusztyn-Krynica E.K., Gajkowska A., Godlewska R. Czynniki wirulencji *Helicobacter pylori*. *Mikrobiol Med* 1999; 3(20): 3-13
12. Brown L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22(2): 283-297
13. Goldman K.J., Cockburn M. The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemiology* 2001; 12(2): 266-271

14. Perez-Perez G.I., Rothenbacher D., Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9 Suppl 1: 1-6
15. Bruce M.G., Maaroos H.I. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2008; 13 Suppl 1: 1-6
16. Łaszewicz W. (Kierownik projektu). Wyniki badań nad zakażeniem *Helicobacter pylori* (materiały wdrożeniowe). Trans Humana, Białystok, 2004
17. Dunn B.E., Cohen H., Blaser M.J. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(4): 720-741
18. De Schryver A., Van Winckel M., Cornelis K., Moens G., Devlies G., De Backer G. *Helicobacter pylori* infection: further evidence for the role of feco-oral transmission. *Helicobacter* 2006; 11(6): 523-528
19. www.shef.ac.uk/mbb/staff/kelly
20. Zaremba M.L., Borowski J. Mikrobiologia lekarska. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2004
21. Szewczyk E.M. Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006
22. Bode G., Mauch F., Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 1993; 111(3): 483-490
23. Andersen L.P., Rasmussen L. *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 56(2): 112-115
24. Arabski M., Błasiak J. Molekularne aspekty infekcji wywołanej *Helicobacter pylori*. *Post Biol Kom* 2003; 30(4): 679-694
25. Zawilak A., Zakrzewska-Czerwińska J. Organizacja genomu *Helicobacter pylori*. *Post Hig Med Dośw* 2001; 55, 3: 355-367
26. Godlewska R., Jagusztyn-Krynica E.K. Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki. *Post Mikrobiol* 2003; 42, 2: 115-137
27. Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E.F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H.G., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L.M., Lee N., Adams M.D., Hickey E.K., Berg D.E., Gocayne J.D., Utterback T.R., Peterson J.D., Kelley J.M.,

- Cotton M.D., Weidman J.M., Fujii C., Bowman C., Wattleby L., Wallin E., Hayes W.S., Borodovsky M., Karp P.D., Smith H.O., Fraser C.M., Venter J.C. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388(6642): 539-547
28. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C., Smith D.R., Noonan B., Guild B.C., deJonge B.L., Carmel G., Tummino P.J., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D.M., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S.D., Jiang Q., Taylor D.E., Vovis G.F., Trust T.J. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397(6715): 176-180
29. Smoot D.T., Mobley H.L., Chippendale G.R., Lewison J.F., Resau J.H. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1990; 58(6):1992-1994
30. Blaser M.J. *Helicobacter pylori*: microbiology of a 'slow' bacterial infection. *Trends Microbiol* 1993; 1(7): 255-260
31. Suzuki M., Miura S., Suematsu M., Fukumura D., Kurose I., Suzuki H., Kai A., Kudoh Y., Ohashi M., Tsuchiya M. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 1): G719-G725
32. Mai U.E., Perez-Perez G.I., Allen J.B., Wahl S.M., Blaser M.J., Smith P.D. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J Exp Med* 1992; 175(2): 517-525
33. Bury-Moné S., Skouloubris S., Labigne A., De Reuse H. The *Helicobacter pylori* Urel protein: role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Mol Microbiol* 2001; 42(4): 1021-1034
34. Tsuda M., Karita M., Morshed M.G., Okita K., Nakazawa T. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 1994; 62(8): 3586-3589

35. Radosz-Komoniewska H., Bek T., Józwiak J., Martirosian G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(8): 602-610
36. Suerbaum S., Josenhans C., Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 1993; 175(11): 3278-3288
37. Josenhans C., Labigne A., Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol* 1995; 177(11): 3010–3020
38. Leunk R.D., Johnson P.T., David B.C., Kraft W.G., Morgan D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26(2): 93-99
39. Telford J.L., Ghiara P., Dell'Orco M., Comanducci M., Burroni D., Bugnoli M., Tecce M.F., Censini S., Covacci A., Xiang Z., Papini E., Montecucco C., Parente L., Rappuoli R. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994; 179(5): 1653-1658
40. Cover T.L. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 1996; 20(2): 241-246
41. Marchetti M., Aricò B., Burroni D., Figura N., Rappuoli R., Ghiara P. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science* 1995; 17, 267(5204): 1655-1658
42. Forsyth M.H., Atherton J.C., Blaser M.J., Cover T.L. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (vacA) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3088-3094
43. Reyrat J.M., Pelicic V., Papini E., Montecucco C., Rappuoli R., Telford J.L. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Mol Microbiol* 1999; 34(2): 197-204
44. Torres V.J., Ivie S.E., McClain M.S., Cover T.L. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 2005; 280(22): 21107-21114

45. Lupetti P., Heuser J.E., Manetti R., Massari P., Lanzavecchia S., Bellon P.L., Dallai R., Rappuoli R., Telford J.L. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Cell Biol* 1996; 133(4): 801-807
46. Yahiro K., Niidome T., Hatakeyama T., Aoyagi H., Kurazono H., Padilla P.I., Wada A., Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238(2): 629-632
47. Yahiro K., Niidome T., Kimura M., Hatakeyama T., Aoyagi H., Kurazono H., Imagawa K., Wada A., Moss J., Hirayama T. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase beta. *J Biol Chem* 1999; 274(51): 36693-36699
48. De Bernard M., Papini E., de Filippis V., Gottardi E., Telford J., Manetti R., Fontana A., Rappuoli R., Montecucco C. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J Biol Chem* 1995; 270(41): 23937-23940
49. Atherton J.C., Cao P., Peek R.M. Jr, Tummuru M.K., Blaser M.J., Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270(30): 17771-17777
50. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Sanna R., Pena S., Midolo P., Ng E.K., Atherton J.C., Blaser M.J., Quint W.G. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2597-2603
51. Strobel S., Bereswill S., Balig P., Allgaier P., Sonntag H.G., Kist M. Identification and analysis of a new vacA genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol* 1998; 36(5): 1285-1289
52. Pan Z.J., Berg D.E., van der Hulst R.W., Su W.W., Raudonikiene A., Xiao S.D., Dankert J., Tytgat G.N., van der Ende A. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis* 1998; 178(1): 220-226
53. Mukhopadhyay A.K., Kersulyte D., Jeong J.Y., Datta S., Ito Y., Chowdhury A., Chowdhury S., Santra A., Bhattacharya S.K., Azuma T.,

- Nair G.B., Berg D.E. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol* 2000; 182(11): 3219-3227
54. Rhead J.L., Letley D.P., Mohammadi M., Hussein N., Mohagheghi M.A., Eshagh Hosseini M., Atherton J.C. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007; 133(3): 926-936
 55. Pagliaccia C., de Bernard M., Lupetti P., Ji X., Burroni D., Cover T.L., Papini E., Rappuoli R., Telford J.L., Reyrat J.M. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(17): 10212-10217
 56. Blaser M.J., Atherton J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113(3): 321-333
 57. Van Doorn L.J., Figueiredo C., Mégraud F., Pena S., Midolo P., Queiroz D.M., Carneiro F., Vanderborght B., Pegado M.D., Sanna R., De Boer W., Schneeberger P.M., Correa P., Ng E.K., Atherton J., Blaser M.J., Quint W.G. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116(4): 823-830
 58. Figueiredo C., Van Doorn L.J., Nogueira C., Soares J.M., Pinho C., Figueira P., Quint W.G., Carneiro F. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(2): 128-135
 59. Erzin Y., Koksai V., Altun S., Dobrucali A., Aslan M., Erdamar S., Dirican A., Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006; 11(6): 574-580
 60. Oleastro M., Cordeiro R., Yamaoka Y., Queiroz D., Mégraud F., Monteiro L., Ménard A. Disease association with two *Helicobacter pylori* duplicate outer membrane protein genes, homB and homA. *Gut Pathog* 2009; 1(1): 12
 61. Gościński G., Przondo-Mordarska A., Poniewierka E., Iwańczak B., Bilska A. Relationship between antibody to cytotoxin and *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48(3): 415-421

62. Gościński G., Przondo-Mordarska A., Iwańczak B., Poniewierka E. Neutralisation of cytotoxic vacuolating activity by serum antibodies of *Helicobacter pylori*-infected patients. *Int J Med Microbiol* 2001; 291(1): 27-32
63. Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A. Wyspy patogenności. *Post Mikrobiol* 2002; 41, 1: 51-69
64. Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25): 14648-14653
65. Fischer W., Püls J., Buhrdorf R., Gebert B., Odenbreit S., Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001; 42(5): 1337-1348
66. Gościński G. Przeciwciała w zakażeniach *Helicobacter pylori*. Rozprawa na stopień doktora habilitowanego. Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław, 2000
67. Cover T.L., Dooley C.P., Blaser M.J. Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990; 58(3): 603-610
68. Cover T.L., Glupczynski Y., Lage A.P., Burette A., Tummuru M.K., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. Serologic detection of infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6): 1496-1500
69. Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burrone D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N., Rappuoli R. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(12): 5791-5795
70. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61(5): 1799-1809
71. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(9): 688-694

72. Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A., Girardin S.E., Moran A.P., Athman R., Mémet S., Huerre M.R., Coyle A.J., DiStefano P.S., Sansonetti P.J., Labigne A., Bertin J., Philpott D.J., Ferrero R.L. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5(11): 1166-1174
73. Hatakeyama M., Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2006; 11 Suppl 1: 14-20
74. Gocki J., Bartuzi Z., Dziedziczko A. Geny cytotoksyczności *Helicobacter pylori*. *Annales Academiae Medicae Bydgosiensis* 2003; 17/2: 65-70
75. Ando T., Goto Y., Maeda O., Watanabe O., Ishiguro K., Goto H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(2): 181-186
76. Konturek S.J., Starzynska T., Konturek P.C., Karczewska E., Marlicz K., Lawniczak M., Jaroszewicz-Heigelman H., Bielanski W., Hartwich A., Ziemniak A., Hahn E.G. *Helicobacter pylori* and CagA status, serum gastrin, interleukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37(8): 891-898
77. Parsonnet J., Friedman G.D., Orentreich N., Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40(3): 297-301
78. Higashi H., Tsutsumi R., Fujita A., Yamazaki S., Asaka M., Azuma T., Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(22): 14428-14433
79. Azuma T., Yamazaki S., Yamakawa A., Ohtani M., Muramatsu A., Suto H., Ito Y., Dojo M., Yamazaki Y., Kuriyama M., Keida Y., Higashi H., Hatakeyama M. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis* 2004; 189(5): 820-827
80. Xiang Z., Censini S., Bayeli P.F., Telford J.L., Figura N., Rappuoli R., Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be

- divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63(1): 94-98
81. Telford J.L., Covacci A., Rappuoli R., Chiara P. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Curr Opin Immunol* 1997; 9(4): 498-503
 82. Bukanov N.O., Berg D.E. Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol Microbiol* 1994; 11(3): 509-523
 83. Tummuru M.K., Cover T.L., Blaser M.J. Mutation of the cytotoxin-associated cagA gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62(6): 2609-2613
 84. Makola D., Peura D.A., Crowe S.E. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41(6): 548-558
 85. Wotherspoon A.C. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Yale J Biol Med* 1996; 69(1): 61-68
 86. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 61: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon. France: International Agency for Research on Cancer, 1994
 87. Konturek P.C., Brzozowski T., Konturek S.J., Kwiecień S., Pajdo R., Drozdowicz D., Stachura J., Karczewska E., Hahn E.G. Functional and morphological aspects of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in Mongolian gerbils. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15(7): 745-754
 88. Konturek P.C. *Helicobacter pylori* w raku żołądka. *Med Dypl* 2006; Supl 13: 18-21
 89. Amieva M.R., El-Omar E.M. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008; 134(1): 306-323
 90. Atherton J.C. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut* 1997; 40(6): 701-703
 91. Konturek S.J., Brzozowski T., Konturek P.C., Schubert M.L., Pawlik W.W., Padol S., Bayner J. Brain-gut and appetite regulating hormones in the control of gastric secretion and mucosal protection. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 2: 7-31
 92. McColl K.E., El-Omar E., Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29(3): 687-703

93. Dixon M. Acid, ulcers, and *H. pylori*. *Lancet* 1993; 342(8868): 384-385
94. Lee A., Dixon M.F., Danon S.J., Kuipers E., Mégraud F., Larsson H., Mellgard B. Local acid production and *Helicobacter pylori*: a unifying hypothesis of gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7(5): 461-465
95. Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 153-156
96. El-Omar E.M., Carrington M., Chow W.H., McColl K.E., Bream J.H., Young H.A., Herrera J., Lissowska J., Yuan C.C., Rothman N., Lanyon G., Martin M., Fraumeni J.F. Jr, Rabkin C.S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404(6776): 398-402
97. Malfertheiner P., Sipponen P., Naumann M., Moayyedi P., Mégraud F., Xiao S.D., Sugano K., Nyrén O. Lejondal *H. pylori*-Gastric Cancer Task Force. *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(9): 2100-2115
98. Crowe S.E. *Helicobacter* infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(1): 32-38
99. Suzuki H., Nishizawa T., Hibi T. Therapeutic strategies for functional dyspepsia and the introduction of the Rome III classification. *J Gastroenterol* 2006; 41(6): 513-523
100. Chang L. Review article: epidemiology and quality of life in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 7: 31-39
101. Łaszewicz W. Rola i znaczenie *Helicobacter pylori* w dyspepsji czynnościowej. *Med Dopl* 2006; Supl 13: 26-30
102. Moayyedi P., Deeks J., Talley N.J., Delaney B., Forman D. An update of the Cochrane systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy in nonulcer dyspepsia: resolving the discrepancy between systematic reviews. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(12): 2621-2626
103. Malfertheiner P., Mégraud F., O' Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J. Current concepts

- in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56(6): 772-781
104. Zwolińska-Wcisło M., Galicka-Latała D. Epidemiologia, podział oraz zasady postępowania w dyspepsji czynnościowej. *Przegl Lek* 2008; 65, 12: 867-873
 105. Dzieniszewski J., Jarosz M. oraz Grupa Robocza PTG-E do spraw zakażenia *Helicobacter pylori*. Ustalenia Grupy Roboczej PTG-E dotyczące postępowania w zakażeniu *Helicobacter pylori* – consensus 2008. *Gastroenterol Pol* 2008; 15(5): 323-331
 106. Bielański W. Diagnostyka zakażenia *Helicobacter pylori*. *Med Dypl* 2006; Supl 13: 44-49
 107. Bartnik W. Komentarz. Aktualne poglądy na wykrywanie i leczenie zakażenia *Helicobacter pylori*. Raport Uzgodnieniowy Maastricht III. *Med Prakt* 2007; 7-8: 174-175
 108. Dzierżanowska D., Murawska B., Patzer J., Gzyl A. Application of molecular techniques for diagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *Mikrobiol Med* 1998; 2(15): 48-52
 109. Covacci A. Rappuoli R. PCR amplification of gene sequences from *Helicobacter pylori* strains (w) *Helicobacter pylori*: techniques for clinical diagnosis and basic research. Lee A., Megraud F. (Red.), W. B. Saunders, Philadelphia, 1996, 7: 94-111
 110. Ziemniak W. Praktyczne aspekty leczenia infekcji żołądkowej *Helicobacter pylori*. *Med Dypl* 2006; Supl 13: 69-74
 111. Dzierżanowska D. Antybiotykoterapia praktyczna. α-Medica Press, Bielsko-Biała, 2008
 112. Cianci R., Montalto M., Pandol F., Gasbarrini G.B., Cammarota G. Third-line rescue therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12(15): 2313-2319
 113. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384
 114. Bernhardt H., Knoke M. Mycological aspects of gastrointestinal microflora. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997; 222: 102-106
 115. Macura A.B. Patomechanizm zakażeń grzybiczych (w) Zarys mikologii lekarskiej. Baran E. (Red.), Volumed, Wrocław, 1998; 7: 297-309

116. Kurnatowska A., Kwaśniewska J. Charakterystyka grzybów drożdżopodobnych (w) Zarys mikologii lekarskiej. Baran E. (Red.), Volumed, Wrocław, 1998; 5: 255-288
117. Macura A.B. Czynniki sprzyjające zakażeniom grzybiczym (w) Zarys mikologii lekarskiej. Baran E. (Red.), Volumed, Wrocław, 1998; 6: 289-295
118. Budak A. Grzybice przewodu pokarmowego (w) Zarys mikologii lekarskiej. Baran E. (Red.), Volumed, Wrocław, 1998; 14: 393-403
119. Baran E. (Red). Zarys mikologii lekarskiej. Volumed, Wrocław, 1998
120. Zwolińska-Wcisło M., Brzozowski T., Kwiecień S., Drozdowicz D., Bogdał J., Budak A., Konturek S., Pawlik W. Kolonizacja grzybicza przewodu pokarmowego w badaniach klinicznych i doświadczalnych. *Przew Lek* 2003; 6, 9: 81-89
121. Zwolińska-Wcisło M. Zakażenie grzybicze żołądka i jego znaczenie kliniczne. *Przegl Lek* 1993; 50, 3/4: 109-112
122. Nawrot U., Karpiewska A. Patogeneza zakażeń wywołanych przez *Candida albicans*. *Mikol Lek* 2002; 9(3): 137-143
123. Mnichowska M., Giedrys-Kalemba S. Funkcjonalne, strukturalne i molekularne spojrzenie na adhezję *Candida spp.* *Mikol Lek* 2004; 11(4): 309-316
124. Chaffin W.L., López-Ribot J.L., Casanova M., Gozalbo D., Martínez J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(1): 130-180
125. Calderone R., Suzuki S., Cannon R., Cho T., Boyd D., Calera J., Chibana H., Herman D., Holmes A., Jeng H.W., Kaminishi H., Matsumoto T., Mikami T., O'Sullivan J.M., Sudoh M., Suzuki M., Nakashima Y., Tanaka T., Tompkins G.R., Watanabe T. *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Med Mycol* 2000; 38 Suppl 1: 125-137
126. Mitchell A.P. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1(6): 687-692
127. Cutler J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 187-218

128. Bernhardt J., Herman D., Sheridan M., Calderone R. Adherence and invasion studies of *Candida albicans* strains, using in vitro models of esophageal candidiasis. *J Infect Dis* 2001; 184(9): 1170-1175
129. Rüchel R., de Bernardis F., Ray T.L., Sullivan P.A., Cole G.T. *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol* 1992; 30 Suppl 1: 123-132
130. Hube B. Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib Microbiol* 2000; 5: 126-137
131. Colina A.R., Aumont F., Deslauriers N., Belhumeur P., de Repentigny L. Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infect Immun* 1996; 64(11): 4514-4519
132. Kaminishi H., Tanaka M., Cho T., Maeda H., Hagihara Y. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 1990; 58(7): 2139-2143
133. Pranav Kumar S.K., Kulkarni V.M. Insights into the selective inhibition of *Candida albicans* secreted aspartyl protease: a docking analysis study. *Bioorg Med Chem* 2002; 10(4): 1153-1170
134. Ghannoum M.A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1): 122-143
135. Shah D.T., Larsen B. Clinical isolates of yeast produce a gliotoxin-like substance. *Mycopathologia* 1991; 116(3): 203-208
136. Ghannoum M.A., Abu-Elteen K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses* 1990; 33(6): 265-282
137. Maródi L. Local and systemic host defense mechanisms against *Candida*: immunopathology of candidal infections. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(8): 795-801
138. Zwolińska-Wcisło M., Budak A., Bogdał J., Trojanowska D., Stachura J. Effect of fungal colonization of gastric mucosa on the course of gastric ulcers healing. *Med Sci Monit* 2001; 7(2): 266-275
139. Zwolińska-Wcisło M., Brzozowski T., Mach T., Budak A., Trojanowska D., Konturek P.C., Pajdo R., Drozdowicz D., Kwiecień S. Are probiotics effective in the treatment of fungal colonization of the gastrointestinal tract? Experimental and clinical studies. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 9: 35-49

140. Brzozowski T., Zwolińska-Wcisło M., Konturek P.C., Kwiecien S., Drozdowicz D., Konturek S.J., Stachura J., Budak A., Bogdał J., Pawlik W.W., Hahn E.G. Influence of gastric colonization with *Candida albicans* on ulcer healing in rats: effect of ranitidine, aspirin and probiotic therapy. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40(3): 286-296
141. Budak A., Trojanowska D., Zwolińska-Wcisło M., Bucka A., Borecka B. Charakterystyka grzybów izolowanych z żołądka u chorych z wrzodami oraz z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej. *Mikol Lek* 2002; 9(1): 7-12
142. Zwolińska-Wcisło M., Budak A., Bogdał J., Trojanowska D., Mach T., Kleszcz P. Obecność grzybów w żołądku i ich wpływ na leczenie wrzodu i zapalenia żołądka. *Przegl Lek* 1993; 1-2: 43-46
143. Zwolińska-Wcisło M., Budak A., Bogdał J., Trojanowska D., Stachura J. Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. *Med Sci Monit* 2001; 7(5): 982-988
144. Macura A.B., Pawlik B. Leczenie grzybic (w) Zarys mikologii lekarskiej. Baran E. (Red.), Volumed, Wrocław, 1998; 27: 591-632
145. CLSI M100-S18, 2008
146. BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 7, 2008
147. Bogaerts P., Berhin C., Nizet H., Glupczynski Y. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter* 2006; 11(5): 441-445
148. Gzyl A., Augustynowicz E., Dzierzanowska D., Rozynek E., Dura W., Celińska-Cedro D., Berg D.E. Genotypes of *Helicobacter pylori* in Polish population. *Acta Microbiol Pol* 1999; 48(3): 261-275
149. Chen X.J., Yan J., Shen Y.F. Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H. pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang Province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases. *Chin Med J* 2005; 118(6): 460-467
150. Budak A. Badanie ilościowe grzybów w materiałach klinicznych (w) Zarys mikologii lekarskiej. Baran E. (Red.), Volumed, Wrocław, 1998; 23: 573-574

151. Gościński G., Poniewierka E., Iwańczak B. Częstość występowania zakażenia *Helicobacter pylori* u chorych w zależności od rozpoznania klinicznego. *Przegl Lek* 2005; 62, 9: 848-850
152. Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into account its resistance to antibiotics. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 123-141
153. Hua J., Yeoh K.G., Ng H.C., Zheng P.Y., Lim S.G., Ho B. Improving the success of culturing *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Microbios* 1998; 96(384): 95-101
154. Mégraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(2): 280-322
155. Boyanova L., Markovska R., Yordanov D., Marina M., Ivanova K., Panayotov S., Gergova G., Mitov I. High prevalence of virulent *Helicobacter pylori* strains in symptomatic Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64(4): 374-380
156. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* typing as a tool for tracking human migration. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(9): 829-834
157. Zalewska-Ziob M., Wiczowski A., Strzelczyk J.K., Adamek B., Gawron K., Trapp G., Sieroń A., Gadowska-Cicha A. The prevalence of *Helicobacter pylori* vacA alleles in patients with chronic gastritis. *Adv Clin Exp Med* 2007; 16, 1: 29-33
158. Gościński G., Gaszewska-Mastalarz A., Przondo-Mordarska A., Zakrzewska-Czerwińska J., Iwańczak B., Poniewierka E. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA gene and cytotoxin production. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 662-667
159. Gzyl A., Berg D.E., Dzierzanowska D. Epidemiology of cagA/vacA genes in *H. pylori* isolated from children and adults in Poland. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48(3): 333-343
160. Maciorkowska E., Roszko I., Kowalczyk O., Kaczmarek M., Chyczewski L., Kemona A. The evaluation of vacA gene alleles frequency in *Helicobacter pylori* strains in children and adults in Podlaskie region. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45(3): 215-219
161. Andreson H., Loivukene K., Sillakivi T., Maaroos H.I., Ustav M., Peetsalu A., Mikelsaar M. Association of cagA and vacA genotypes of

- Helicobacter pylori* with gastric diseases in Estonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1): 298-300
162. Con S.A., Takeuchi H., Valerín A.L., Con-Wong R., Con-Chin G.R., Con-Chin V.G., Nishioka M., Mena F., Brenes F., Yasuda N., Araki K., Sugiura T. Diversity of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes in Costa Rica: its relationship with atrophic gastritis and gastric cancer. *Helicobacter* 2007; 12(5): 547-552
 163. Basso D., Zambon C.F., Letley D.P., Stranges A., Marchet A., Rhead J.L., Schiavon S., Guariso G., Ceroti M., Nitti D., Rugge M., Plebani M., Atherton J.C. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135(1): 91-99
 164. Zhou W., Yamazaki S., Yamakawa A., Ohtani M., Ito Y., Keida Y., Higashi H., Hatakeyama M., Si J., Azuma T. The diversity of vacA and cagA genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40(1): 81-87
 165. Atherton J.C., Peek R.M. Jr, Tham K.T., Cover T.L., Blaser M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112(1): 92-99
 166. Garza-Gonzalez E., Bosques-Padilla F.J., Tijerina-Menchaca R., Perez-Perez G.I. Characterisation of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(1): 41-45
 167. Letley D.P., Lastovica A., Louw J.A., Hawkey C.J., Atherton J.C. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa: rarity of the vacA s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4): 1203-1205
 168. Morales-Espinosa R., Castillo-Rojas G., Gonzalez-Valencia G., Ponce de León S., Cravioto A., Atherton J.C., López-Vidal Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different vacA and cagA genotypes. *J Clin Microbiol* 1999; 37(9): 3001-3004
 169. Saribasak H., Salih B.A., Yamaoka Y., Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1648-1651

170. Dabiri H., Maleknejad P., Yamaoka Y., Feizabadi M.M., Jafari F., Rezadehbashi M., Nakhjavani F.A., Mirsalehian A., Zali M.R. Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE, oipA and vacA in different major ethnic groups in Tehran, Iran. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(8): 1380-1386
171. Blaser M.J., Perez-Perez G.I., Kleanthous H., Cover T.L., Peek R.M., Chyou P.H., Stemmermann G.N., Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55(10): 2111-2115
172. Proenca Módena J.L., Lopes Sales A.I., Olszanski Acrani G., Russo R., Vilela Ribeiro M.A., Fukuhara Y., da Silveira W.D., Módena J.L., de Oliveira R.B., Brocchi M. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the cag pathogenicity island. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59(1): 7-16
173. Nomura A.M., Pérez-Pérez G.I., Lee J., Stemmermann G., Blaser M.J. Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 2002; 155(11): 1054-1059
174. Yamaoka Y., Kodama T., Gutierrez O., Kim J.G., Kashima K., Graham D.Y. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2274-2279
175. Caner V., Yilmaz M., Yonetci N., Zencir S., Karagenc N., Kaleli I., Bagci H. *H. pylori* iceA alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007; 13(18): 2581-2585
176. Hussein N.R., Mohammadi M., Talebkhan Y., Doraghi M., Letley D.P., Muhammad M.K., Argent R.H., Atherton J.C. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. *J Clin Microbiol* 2008; 46(5): 1774-1779
177. Nilsson C., Sillén A., Eriksson L., Strand M.L., Enroth H., Normark S., Falk P., Engstrand L. Correlation between cag pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun* 2003; 71(11): 6573-6581

178. Kauser F., Khan A.A., Hussain M.A., Carroll I.M., Ahmad N., Tiwari S., Shouche Y., Das B., Alam M., Ali S.M., Habibullah C.M., Sierra R., Megraud F., Sechi L.A., Ahmed N. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5302-5308
179. Lu H., Hsu P.I., Graham D.Y., Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2005; 128(4): 833-848
180. Peek R.M. Jr, Thompson S.A., Donahue J.P., Tham K.T., Atherton J.C., Blaser M.J., Miller G.G. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110(6): 531-544
181. Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Borén T., Rad R., Schepp W., Miehlke S., Classen M., Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12778-12783
182. Yamaoka Y., Kikuchi S., El-Zimaity H.M., Gutierrez O., Osato M.S., Graham D.Y. Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002; 123(2): 414-424
183. Ando T., Wassenaar T.M., Peek R.M. Jr, Aras R.A., Tschumi A.I., Van Doorn L.J., Kusugami K., Blaser M.J. A *Helicobacter pylori* restriction endonuclease-replacing gene, *hrgA*, is associated with gastric cancer in Asian strains. *Cancer Res* 2002; 62(8): 2385-2389
184. Nogueira C., Figueiredo C., Carneiro F., Gomes A.T., Barreira R., Figueira P., Salgado C., Belo L., Peixoto A., Bravo J.C., Bravo L.E., Realpe J.L., Plaisier A.P., Quint W.G., Ruiz B., Correa P., Van Doorn L.J. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol* 2001; 158(2): 647-654
185. Warburton V.J., Everett S., Mapstone N.P., Axon A.T., Hawkey P., Dixon M.F. Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Clin Pathol* 1998; 51(1): 55-61
186. Kaklikkaya N., Cubukcu K., Aydin F., Bakir T., Erkul S., Tosun I., Topbas M., Yazici Y., Buruk C.K., Erturk M. Significance of *cagA* status and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in determining gastric

- histopathology: virulence markers of *H. pylori* and histopathology. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(6): 1042-1047
187. Umit H., Tezel A., Bukavaz S., Unsal G., Otkun M., Soylu A.R., Tucer D., Otkun M., Bilgi S. The relationship between virulence factors of *Helicobacter pylori* and severity of gastritis in infected patients. *Dig Dis Sci* 2009; 54(1): 103-110
 188. Korzonek M., Poziomkowska-Gęsicka I., Ciechanowski K. Udział zakażenia *Helicobacter pylori* w patogenezie raka żołądka. *Pol Arch Med Wew* 2003; 109(2): 195-200
 189. Dixon M.F., Genta R.M., Yardley J.H., Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20(10): 1161-1181
 190. Konturek P.C., Bielański W., Konturek S.J., Hahn E.G. *Helicobacter pylori* associated gastric pathology. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50(5): 695-710
 191. Kim N., Park Y.S., Cho S.I., Lee H.S., Choe G., Kim I.W., Won Y.D., Park J.H., Kim J.S., Jung H.C., Song I.S. Prevalence and risk factors of atrophic gastritis and intestinal metaplasia in a Korean population without significant gastroduodenal disease. *Helicobacter* 2008; 13(4): 245-255
 192. Eslick G.D., Lim L.L., Byles J.E., Xia H.H., Talley N.J. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(9): 2373-2379
 193. Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001; 49(3): 347-353
 194. Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowski T. Gastric cancer and *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 51-65
 195. Huang J.Q., Zheng G.F., Sumanac K., Irvine E.J., Hunt R.H. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1636-1644
 196. Schneller J., Gupta R., Mustafa J., Villanueva R., Straus E.W., Raffaniello R.D. *Helicobacter pylori* infection is associated with a high

- incidence of intestinal metaplasia in the gastric mucosa of patients at inner-city hospitals in New York. *Dig Dis Sci* 2006; 51(10): 1801-1809
197. Plummer M., Van Doorn L.J., Franceschi S., Kleter B., Canzian F., Vivas J., Lopez G., Colin D., Munoz N., Kato I. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(17): 1328-1334
 198. Kim J.M., Kim J.S., Kim N., Kim S.G., Jung H.C., Song I.S. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(1): 6-13
 199. Godoy A.P., Ribeiro M.L., Benvengo Y.H., Vitiello L., Miranda M. de C., Mendonca S., Pedrazzoli J.Jr. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 20
 200. Boyanova L., Gergova G., Nikolov R., Davidkov L., Kamburov V., Jelev C., Mitov I. Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60(4): 409-415
 201. Dzierżanowska-Fangrat K., Rożynek E., Celińska-Cedro D., Jarosz M., Pawłowska J., Szadkowski A., Budzyńska A., Nowak J., Romańczuk W., Prosiecki R., Józwiak P., Dzierżanowska D. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26(3): 230-234
 202. Kim J.M., Kim J.S., Jung H.C., Kim N., Kim Y.J., Song I.S. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12): 4843-4847
 203. Chihu L., Ayala G., Mohar A., Hernández A., Herrera-Goepfert R., Fierros G., González-Márquez H., Silva J. Antimicrobial resistance and characterization of *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican adults with clinical outcome. *J Chemother* 2005; 17(3): 270-276
 204. Koivisto T.T., Rautelin H.I., Voutilainen M.E., Niemelä S.E., Heikkinen M., Sipponen P.I., Färkkilä M.A. Primary *Helicobacter pylori*

- resistance to metronidazole and clarithromycin in the Finnish population. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19(9): 1009-1017
205. Taneike I., Nami A., O'Connor A., Fitzgerald N., Murphy P., Qasim A., O'Connor H., O'Morain C. Analysis of drug resistance and virulence-factor genotype of Irish *Helicobacter pylori* strains: is there any relationship between resistance to metronidazole and cagA status? *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30(7): 784-790
 206. Janssen M.J., Hendrikse L., de Boer S.Y., Bosboom R., de Boer W.A., Laheij R.J., Jansen J.B. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in a Dutch region: trends over time. *Neth J Med* 2006; 64(6): 191-195
 207. Zullo A., Perna F., Hassan C., Ricci C., Saracino I., Morini S., Vaira D. Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated in northern and central Italy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25(12): 1429-1434
 208. Fischbach L., Evans E.L. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26(3): 343-357
 209. Broutet N., Tchamgoué S., Pereira E., Lamouliatte H., Salamon R., Mégraud F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy - results of an individual data analysis of 2751 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17(1): 99-109
 210. Gerrits M.M., van der Wouden E.J., Bax D.A., van Zwet A.A., van Vliet A.H.M., de Jong A., Kusters J.G., Thijs J.C., Kuipers E.J. Role of the rdxA and frxA genes in oxygen-dependent metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 2004; 53(Pt 11): 1123-1128
 211. Mégraud F. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Br Med Bull* 1998; 54(1): 207-216
 212. Boyanova L., Mentis A., Gubina M., Rozynek E., Gosciniak G., Kalenic S., Göral V., Kupcinskas L., Kantarceken B., Aydin A., Archimandritis A., Dzierzanowska D., Vcev A., Ivanova K., Marina M., Mitov I., Petrov P., Ozden A., Popova M. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in eastern Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(7): 388-396

213. Karczewska E., Wojtas I., Budak A. Występowanie pierwotnej oporności *Helicobacter pylori* na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie. *Post Mikrobiol* 2009; 48, 1: 31-41
214. Horiki N., Omata F., Uemura M., Suzuki S., Ishii N., Iizuka Y., Fukuda K., Fujita Y., Katsurahara M., Ito T., Cesar G.E., Imoto I., Takei Y. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan. *Helicobacter* 2009; 14(5): 86-90
215. De Francesco V., Margiotta M., Zullo A., Hassan C., Valle N.D., Burattini O., D'Angelo R., Stoppino G., Cea U., Giorgio F., Monno R., Morini S., Panella C., Ierardi E. Clarithromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. *J Microbiol* 2006; 44(6): 660-664
216. Cars O., Mölsted S., Melander A. Variation in antibiotic use in the European Union. *Lancet* 2001; 357(9271): 1851-1853
217. Elviss N.C., Owen R.J., Xerry J., Walker A.M., Davies K. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(2): 435-440
218. Nista E.C., Candelli M., Zocco M.A., Cremonini F., Ojetti V., Finizio R., Spada C., Cammarota G., Gasbarrini G., Gasbarrini A. Levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(9): 1985-1990
219. Antos D., Schneider-Brachert W., Bästlein E., Hänel C., Haferland C., Buchner M., Meier E., Trump F., Stolte M., Lehn N., Bayerdörffer E. 7-day triple therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and high-dose esomeprazole in patients with known antimicrobial sensitivity. *Helicobacter* 2006; 11(1): 39-45
220. Gatta L., Zullo A., Perna F., Ricci C., De Francesco V., Tampieri A., Bernabucci V., Cavina M., Hassan C., Ierardi E., Morini S., Vaira D. A 10-day levofloxacin-based triple therapy in patients who have failed two eradication courses. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(1): 45-49
221. Ferrero R.L. Immune responses to mucosal infection: the *Helicobacter pylori* paradigm. *Res Immunol* 1997; 148(2): 91-107

222. Malfertheiner P. (Red.). *Helicobacter pylori* od podstaw do leczenia. Wydawnictwo Medyczne Sanmedica, Warszawa, 1997
223. Rośniak-Bąk K., Pawłowska A., Olszowiec K., Stępień A., Paradowski M. Ocena użyteczności klinicznej immunoenzymatycznego ilościowego testu ELISA nowej generacji do rozpoznawania zakażeń *Helicobacter pylori*. *Diagn Lab* 2008; 44(3): 305-315
224. Palka M., Tomasik T., Windak A., Margas G., Mach T., Bohonos A. The reliability of ELISA in predicting *H. pylori* infection in dyspeptic populations under age 45. *Med Sci Monit* 2010; 16(1): PH24-28
225. Tatemichi M., Sasazuki S., Inoue M., Tsugane S.; JPHC Study Group. Clinical significance of IgG antibody titer against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2009; 14(3): 231-236
226. Matysiak-Budnik T., Knapik Z., Mégraud F., Lubczynska-Kowalska W., Gosciniak G., Bouchard S., Przondo-Mordarska A., Poniewierka E., Helemejko M., Klempous J. *Helicobacter pylori* infection in Eastern Europe: seroprevalence in the Polish population of Lower Silesia. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(12): 2513-2515
227. Yim J.Y., Kim N., Choi S.H., Kim Y.S., Cho K.R., Kim S.S., Seo G.S., Kim H.U., Baik G.H., Sin C.S., Cho S.H., Oh B.H. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in South Korea. *Helicobacter* 2007; 12(4): 333-340
228. Greenfield R.A., Joyce W.A. Gastric colonization with *Candida albicans*. *Mycopathologia* 1993; 122(1): 1-5
229. Szczepaniak W., Zawirska A., Adamski Z. Rola grzybów drożdżopodobnych rodzaju *Candida* w etiopatogenezie wybranych schorzeń przewodu pokarmowego. *Now Lek* 2004; 73, 6: 475-478
230. Zwolińska-Wcisło M., Budak A., Karczewska E., Trojanowska D., Bogdał J. Ocena współwystępowania grzybów *Candida* i bakterii *Helicobacter pylori* w żołądku u pacjentów z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy oraz przewlekłym zapaleniem żołądka. XI Kongres PTG-E, Warszawa, 2004
231. Wu C.S., Wu S.S., Chen P.C. A prospective study of fungal infection of gastric ulcers: clinical significance and correlation with medical treatment. *Gastrointest Endosc* 1995; 42(1): 56-58

232. Hirasaki S., Koide N., Ogawa H., Tsuji T. Benign gastric ulcer associated with *Candida* infection in a healthy adult. *J Gastroenterol* 1999; 34(6): 688-693
233. Krajewska-Kułak E., Niczyporuk W., Łukaszuk C., Sobaniec H., Wojtukiewicz M., Krawczuk-Rybak M., Szczurzewski M. Biotypy enzymatyczne a wrażliwość na leki przeciwgrzybicze szczepów *Candida albicans* izolowanych z ontocenozy jamy ustnej pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi. *Mikol Lek* 2000; 7(1): 27-34
234. Kurnatowski M., Wąsowska-Królikowska K., Toporowska-Kowalska E., Kurnatowska A. Charakterystyka grzybów izolowanych z górnego odcinka przewodu pokarmowego u dzieci zakażonych *Helicobacter pylori*. *Ped Wsp Gastroenterol Hep Żyw Dziecka* 2000; 3, 1: 185-188

11. SPIS RYCIN

Rycina 1. <i>Helicobacter pylori</i> [19].	9
Rycina 2. Polimorfizm genu <i>vacA</i> oraz budowa białka VacA [5].	14
Rycina 3. Główne szlaki przemian indukowane przez białko CagA [5].	19
Rycina 4. Czynniki etiologiczne wrzodów żołądka i dwunastnicy [6].	22
Rycina 5. Schemat rozwoju wrzodu dwunastnicy oraz wrzodu lub raka żołądka w zakażeniu <i>H. pylori</i> [6].	23
Rycina 6. Klasyfikacja leków przeciwgrzybiczych stosowanych w terapii grzybic układowych [111].	41
Rycina 7. Wzrost szczepu klinicznego <i>H. pylori</i> nr 413 na podłożu Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej.	49
Rycina 8. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego <i>H. pylori</i> nr 413 na amoksycylinę, MIC < 0.016 mg/l.	51
Rycina 9. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego <i>H. pylori</i> nr 413 na metronidazol, MIC > 256 mg/l.	51
Rycina 10. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego <i>H. pylori</i> nr 284 na klarytromycynę, MIC = 3 mg/l.	52
Rycina 11. Ocena wrażliwości za pomocą Etestu szczepu klinicznego <i>H. pylori</i> nr 413 na lewofloksacynę, MIC = 0.125 mg/l.	52
Rycina 12. Wzrost szczepów klinicznych grzybów: <i>C. albicans</i> nr 368 W; <i>Candida nie-albicans</i> nr 398 W, 406 W; na podłożu chromogennym Candida ID 2	63
Rycina 13. Oznaczenie lekowrażliwości szczepu klinicznego <i>C. albicans</i> nr 413 przy użyciu testu ATB FUNGUS 3.	64
Rycina 14. Oznaczenie profilu enzymatycznego dla szczepu klinicznego <i>C. albicans</i> nr 474 za pomocą testu API ZYM.	66
Rycina 15. Elektroforeza w 2% żelu agarozowym produktów reakcji PCR dla genów: <i>ureB</i> , <i>cagA</i> oraz alleli <i>s1</i> , <i>s2</i> , <i>m1</i> , <i>m2</i> genu <i>vacA</i> u wybranych 20 szczepów klinicznych <i>H. pylori</i> oraz szczepu wzorcowego.	73
Rycina 16. Aktywność amoksycyliny wobec szczepów <i>H. pylori</i> wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).	82
Rycina 17. Aktywność metronidazolu wobec szczepów <i>H. pylori</i> wyrażona w MIC (MIC > 4 mg/l dla szczepów opornych).	83
Rycina 18. Aktywność klarytromycyny wobec szczepów <i>H. pylori</i> wyrażona w MIC (MIC ≥ 1 mg/l dla szczepów opornych).	84

Rycina 19. Aktywność lewofloksacyny wobec szczepów <i>H. pylori</i> wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).	85
Rycina 20. Występowanie przeciwciał klasy IgG anty- <i>H. pylori</i> w surowicy badanych pacjentów.....	86
Rycina 21. Rozkład wartości dodatniego miana przeciwciał klasy IgG anty- <i>H. pylori</i> w surowicy badanych pacjentów.....	86
Rycina 22. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów <i>C. albicans</i> (n=21) izolowanych od osób z zakażeniem <i>H. pylori</i>	93
Rycina 23. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów <i>C. albicans</i> (n=4) izolowanych od osób bez zakażenia <i>H. pylori</i>	94
Rycina 24. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepu <i>C. glabrata</i> (n=1) izolowanego od pacjenta z zakażeniem <i>H. pylori</i>	94
Rycina 25. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów <i>C. glabrata</i> (n=2) izolowanych od osób bez zakażenia <i>H. pylori</i>	95
Rycina 26. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepów <i>C. tropicalis</i> (n=2) izolowanych od osób z zakażeniem <i>H. pylori</i>	95
Rycina 27. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepu <i>C. tropicalis</i> (n=1) izolowanego od pacjenta bez zakażenia <i>H. pylori</i>	96
Rycina 28. Aktywność enzymatyczna (w skali punktowej) szczepu <i>C. lusitaniae</i> (n=1) izolowanego od pacjenta z zakażeniem <i>H. pylori</i>	96

12. SPIS TABEL

Tabela 1. Stężenia graniczne antybiotyków/chemioterapeutyków dla <i>H. pylori</i>	53
Tabela 2. Primery zastosowane w reakcji PCR dla amplifikacji genów: <i>ureB</i> , <i>cagA</i> oraz alleli genu <i>vacA</i> (<i>s1</i> , <i>s2</i> , <i>m1</i> , <i>m2</i>).	56
Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.....	57
Tabela 4. Interpretacja wyniku badania ilościowego grzybów z rodzaju <i>Candida</i> w biopsatach błony śluzowej żołądka.....	62
Tabela 5. Stężenia graniczne leków przeciwgrzybiczych dla <i>Candida spp.</i>	65
Tabela 6. Szczepy kliniczne <i>H. pylori</i> o genotypach <i>ureB</i> +, <i>cagA</i> +, <i>vacA s1/m1</i>	69
Tabela 7. Szczepy kliniczne <i>H. pylori</i> o genotypach <i>ureB</i> +, <i>cagA</i> -, <i>vacA s1/m1</i>	69
Tabela 8. Szczepy kliniczne <i>H. pylori</i> o genotypach <i>ureB</i> +, <i>cagA</i> +, <i>vacA s1/m2</i>	70
Tabela 9. Szczepy kliniczne <i>H. pylori</i> o genotypach <i>ureB</i> +, <i>cagA</i> -, <i>vacA s1/m2</i>	70
Tabela 10. Szczepy kliniczne <i>H. pylori</i> o genotypach <i>ureB</i> +, <i>cagA</i> +, <i>vacA s2/m2</i> ...	71
Tabela 11. Szczepy kliniczne <i>H. pylori</i> o genotypach <i>ureB</i> +, <i>cagA</i> -, <i>vacA s2/m2</i> . ..	71
Tabela 12. Szczepy kliniczne <i>H. pylori ureB</i> +, <i>cagA</i> +, o mieszanych lub niepełnych genotypach <i>vacA</i>	72
Tabela 13. Rozkład genotypów <i>vacA</i> oraz genu <i>cagA</i> w badanych szczepach <i>H. pylori</i>	74
Tabela 14. Zależność pomiędzy allelami <i>s</i> oraz <i>m</i> genu <i>vacA</i> , a statusem genu <i>cagA</i> w badanych szczepach <i>H. pylori</i>	75
Tabela 15. Zależność pomiędzy genotypem <i>s/m vacA</i> , a statusem genu <i>cagA</i> w badanych szczepach <i>H. pylori</i>	75
Tabela 16. Rozkład genu <i>cagA</i> oraz alleli <i>s/m</i> genu <i>vacA</i> w zależności od rozpoznania klinicznego.	77
Tabela 17. Ryzyko zachorowania na chorobę wrzodową żołądka lub dwunastnicy w grupie eksponowanej na czynniki ryzyka: allel <i>s1</i> (a), <i>m1</i> (b), gen <i>cagA</i> (c); w stosunku do grupy nieeksponowanej.....	78
Tabela 18. Częstość występowania metaplastji jelitowej w żołądku pacjentów z zakażeniem <i>H. pylori</i> oraz bez zakażenia.	79
Tabela 19. Genotypy <i>H. pylori</i> u pacjentów z metaplastją jelitową w żołądku.....	80
Tabela 20. Zależność pomiędzy częstością występowania w żołądku metaplastji jelitowej, a obecnością genu <i>cagA</i>	80
Tabela 21. Zależność pomiędzy częstością występowania w żołądku metaplastji jelitowej, a obecnością <i>H. pylori</i> z allelem <i>s1</i> lub <i>s2</i> genu <i>vacA</i>	81
Tabela 22. Zależność pomiędzy częstością występowania w żołądku metaplastji jelitowej, a obecnością <i>H. pylori</i> z allelem <i>m1</i> lub <i>m2</i> genu <i>vacA</i>	81

Tabela 23. Lekowrażliwość badanych szczepów <i>H. pylori</i>	82
Tabela 24. Zależność pomiędzy częstością występowania oporności <i>H. pylori</i> na metronidazol, a płcią.	83
Tabela 25. Współwystępowanie w żołądku badanych osób grzybów z rodzaju <i>Candida</i> oraz <i>H. pylori</i>	87
Tabela 26. Wyniki posiewu ilościowego biopłatów z żołądka u badanych chorych, w celu określenia ilości występujących grzybów <i>Candida spp.</i>	88
Tabela 27. Charakterystyka szczepów <i>Candida spp.</i> poddanych badaniom mikologicznym z uwzględnieniem ich współwystępowania z <i>H. pylori</i>	89
Tabela 28. Analiza lekowrażliwości grzybów <i>Candida spp.</i> izolowanych od pacjentów z zakażeniem <i>H. pylori</i>	90
Tabela 29. Analiza lekowrażliwości grzybów <i>Candida spp.</i> izolowanych od pacjentów bez zakażenia <i>H. pylori</i>	91
Tabela 30. Badane testem API ZYM enzymy hydrolityczne oraz ich substraty.	92
Tabela 31. Zależność pomiędzy rozpoznaniem klinicznym, a brakiem zakażenia <i>H. pylori</i> oraz obecności <i>Candida spp.</i> , w porównaniu do grupy: zakażonej <i>H. pylori</i> (a); z obecnością <i>Candida spp.</i> (b).	98
Tabela 32. Zależność pomiędzy rozpoznaniem klinicznym, a brakiem zakażenia <i>H. pylori</i> oraz obecności <i>Candida spp.</i> , w porównaniu do grupy <i>H. pylori</i> +, <i>Candida</i> +.	99