

1837
2017
ΧΡΟΝΙΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

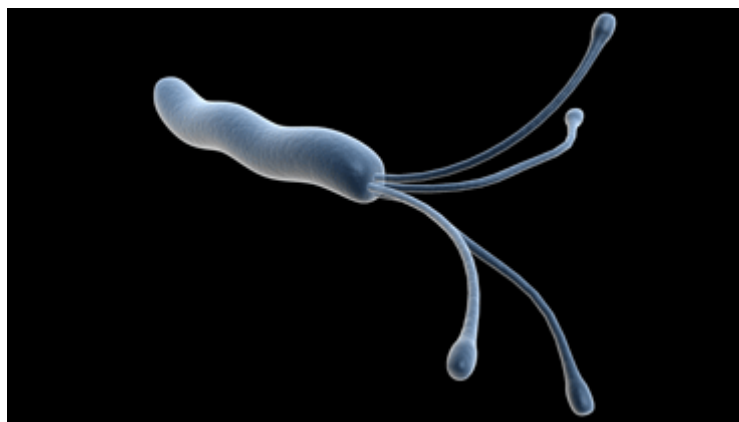
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση των υπεύθυνων μεταλλαγών για την ανάπτυξη αντοχής
του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού έναντι των φθοριοκινολονών (λεβοφλοξασίνης)
σε κλινικά στελέχη Ελλήνων συμπτωματικών φορέων.»

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ



Διευθύντρια Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επιβλέπουσα
Παναγούλα Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Επιστημονικός υπεύθυνος
Διονύσιος Σγούρας, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, ΕΠΠ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Διπλωματική Εργασία

**«Διερεύνηση των υπεύθυνων μεταλλαγών για την ανάπτυξη ανοχής
του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού έναντι των φθοριοκινολονών (λεβοφλοξασίνης)
σε κλινικά στελέχη Ελλήνων συμπτωματικών φορέων.»**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ - Α.Μ.: 225304- ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Τόπος διεξαγωγής της έρευνας

Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (ΕΙΠ)

Διευθύντρια Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδικεύσεως

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επιβλέπουσα

Παναγούλα Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Επιστημονικός υπεύθυνος

Διονύσιος Σγούρας, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, ΕΙΠ

Τριμελής επιτροπή

Παναγούλα Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Διονύσιος Σγούρας, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, ΕΙΠ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της . Ευχαριστώ θερμά τον Ερευνητή κύριο Διονύση Σγούρα, που μου εμπιστεύτηκε το θέμα της εργασίας αυτής και με δέχθηκε στο εργαστήριό του, καθώς και για την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του, τη συμπαράστασή του, τη συνεχή του υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου ΕΚΠΑ και την κυρία Βασιλική Αλέπορου – Μαρίνου, Καθηγήτρια Βιοχημικής και Μοριακής Γενετικής ΕΚΠΑ για τις εποικοδομητικές τους υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κυρία Beatriz Martinez-Gonzalez και σε όλους εκείνους από το Διαγνωστικό Τμήμα του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ που με στήριξαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ιωάννη Καραγιάννη για την βοήθεια στην οργάνωση και την διαμόρφωση καθώς και για τις συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής, στοιχεία χωρίς τα οποία η παρούσα εργασία δεν θα είχε αποπερατωθεί.

Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1. Γενικά	4
1.1. Ιστορική αναδρομή.....	4
1.2. Συστηματική κατάταξη	5
1.3. Μορφολογία	6
1.4. Απαιτήσεις ανάπτυξης.....	6
1.5. Γονιδίωμα	7
1.6. Εγκαθίδρυση της λοίμωξης.....	7
1.7. Παράγοντες παθογένειας	8
1.7.1. CagA.....	8
1.7.2. Εκκρινόμενη κυτταροτοξίνη VacA	9
1.7.3. OipA.....	10
1.7.4. BabA	11
1.7.5. SabA.....	11
2. Λοίμωξη.....	11
2.1. Φυσική ιστορία της μόλυνσης	11
2.2. Δημογραφική εξάπλωση.....	12
2.3. Πηγές λοίμωξης.....	14
2.3.1. Ζώα ως πιθανή πηγή λοίμωξης.....	14
2.3.2. Το νερό ως πιθανή πηγή λοίμωξης από <i>H. pylori</i>	15
2.3.3. Ανθρωπογενής μετάδοση του <i>H. pylori</i>	16
2.4. Οδός μεταφοράς	16
2.4.1. Γαστρο-στοματική μετάδοση	16
2.4.2. Μετάδοση στόμα με στόμα	17
2.4.3. Ιατρογενής μετάδοση	17
2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάδοσή του <i>H. pylori</i>	18
2.5.1. Κοινωνικοοικονομική κατάσταση	18
2.5.2. Γενετική προδιάθεση.....	18
2.6. Κλινική έκβαση της λοίμωξης από <i>H. pylori</i>	19
3. Διάγνωση.....	22
3.1. Επεμβατικές δοκιμές	22
3.1.1. Καλλιέργεια.....	22
3.1.1.1. Συλλογή δείγματος.....	23
3.1.1.2. Μεταφορά δειγμάτων βιοψίας.....	24
3.1.1.3. Καλλιέργεια σε τρυβλία.....	24
3.1.1.4. Φαινοτυπική ταυτοποίηση	25
3.1.1.5. Διατήρηση στελεχών	26
3.1.2. Ιστοπαθολογική διάγνωση	26
3.1.3. Δοκιμασία ουρεάσης.....	27
3.2. Μη επεμβατικές τεχνικές.....	28
3.2.1. Ανίχνευση αντισωμάτων.....	28
4. Θεραπεία της λοίμωξης από <i>H. pylori</i>	29

4.1. Περιοχές με χαμηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη.....	31
4.1.1. Θεραπεία πρώτης γραμμής	31
4.1.2. Θεραπεία δεύτερης γραμμής.....	31
4.1.3. Θεραπεία τρίτης γραμμής	32
4.2. Περιοχές με υψηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη.....	32
4.2.1. Θεραπεία πρώτης γραμμής	32
4.2.2. Θεραπεία δεύτερης γραμμής.....	33
4.2.3. Θεραπεία τρίτης γραμμής	33
5. ΑΝΤΟΧΗ ΤΟΥ <i>H. PYLORI</i> ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	34
5.1. Κλαριθρομυκίνη	35
5.2. Μετρονιδαζόλη	38
5.3. Αμοξικιλίνη.....	39
5.4. Τετρακυκλίνη	39
5.5. Φθοριοκινολόνες.....	40
5.6. Ριφαμυκίνες	46
5.7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	46
5.7.1. Φαινοτυπική ανίχνευση της αντοχής-δοκιμές αραίωσης.....	46
5.7.2. Μέθοδος ενσωμάτωσης σε άγαρ.....	47
5.7.3. Μέθοδος αραίωσης του υγρού μέσου	47
5.7.4. E-test (Epsilonmeter test)	47
5.7.4. Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών στο άγαρ.....	48
5.7.5. Γονοτυπική ανίχνευση της αντοχής.....	48
6. Σκοπός	50
Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
1. Καλλιέργεια και απομόνωση κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i>	51
2. Κρυο-συντήρηση στελεχών <i>H. pylori</i>	51
3.Απομόνωση DNA	52
4. Προσδιορισμός ευαισθησίας στελεχών <i>H. pylori</i> σε αντιβιοτικά με μέθοδο του E-test	52
5. Προσδιορισμός ευαισθησίας στελεχών <i>H. pylori</i> με την χρήση Μοριακών Τεχνικών	54
5.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	54
5.2. Ηλεκτροφόρηση	55
5.3.Απομόνωση και Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	55
5.4. Ανάγνωση αλληλουχίας DNA.....	55
5.5. ΤΟΡΟ ΤΑ κλωνοποίηση	56
5.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)	58
6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	59
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	61
1. Φαινοτυπική ανίχνευση αντοχής.....	61
2. Προετοιμασία στελεχών <i>H. pylori</i> για αλληλούχιση	62
3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχισης	63
4. PCR από βιοπτικό υλικό.....	68

5. Real Time-PCR.....	69
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	81
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, το οποίο προσβάλλει το γαστρικό βλεννογόνο του ανθρώπου, με επιπολασμό περίπου 50% παγκοσμίως. Στην πλειονότητα των φορέων, η λοίμωξη εκδηλώνεται ως χρόνια γαστρίτιδα, συνήθως ασυμπτωματική, εμμένουσα έως την εκρίζωση του βακτηρίου. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η κλινική εικόνα μεταβαίνει είτε στην εμφάνιση γαστρικού ή δωδεκαδακτυλικού έλκους, είτε στην ανάπτυξη γαστρικού αδενοκαρκινώματος ή σπανιότερα γαστρικού MALT λεμφώματος. Η συνήθης θεραπεία πρώτης γραμμής για την εκρίζωση του *H. pylori* περιλαμβάνει δύο αντιβιοτικά, την κλαριθρομυκίνη και την αμοξικιλίνη, καθώς και έναν αναστολέα της αντλίας πρωτονίων (PPI). Η θεραπεία δεύτερης γραμμής περιλαμβάνει τη λεβοφλοξασίνη. Η αποτυχία των θεραπειών σχετίζεται με την ικανότητα ανάπτυξης αντοχής του βακτηρίου έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται. Η εν λόγω αντοχή δεν οφείλεται σε πρόσληψη πλασμιδιακού DNA, αλλά στην παρουσία σημειακών μεταλλαγών στο βακτηριακό γενετικό υλικό. Τα ποσοστά αντοχής του *H. pylori* στη λεβοφλοξασίνη εμφανίζουν αυξητικές τάσεις παγκοσμίως και ως εκ τούτου, καθίσταται αναγκαία η ανίχνευση της αντοχής του κλινικού στελέχους έναντι του εν λόγω αντιβιοτικού, ειδικότερα μετά από αποτυχημένες θεραπείες εκρίζωσης. Στην κλινική πράξη, η ανίχνευση της αντοχής βασίζεται σε φαινοτυπικές μεθόδους αντιβιογράμματος, οι οποίες προϋποθέτουν την απομόνωση των στελεχών του *H. pylori* από γαστρικές βιοψίες ασθενών. Επιπλέον, η μοριακή ανίχνευση σημειακών μεταλλαγών αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας έναντι των αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, η αντοχή στη λεβοφλοξασίνη έχει συσχετιστεί κυρίως, όχι όμως αποκλειστικά, με μεταλλαγές στο βακτηριακό γονίδιο *gyrA*, οι οποίες συνήθως οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος στις θέσεις 87 (N87K) ή 91 (D91G, D91N, ή D91Y). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η χαρτογράφηση των μεταλλαγών υπεύθυνων για την ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στη λεβοφλοξασίνη στον Ελληνικό πληθυσμό. Αρχικά, απομονώθηκαν στελέχη *H. pylori* από βιοψίες ασθενών και προσδιορίστηκε φαινοτυπικά η ευαισθησία τους στη λεβοφλοξασίνη με χρήση του E-test. Καταρτίστηκε συλλογή κλινικών *H. pylori* στελεχών ευαίσθητων και ανθεκτικών στην λεβοφλοξασίνη, αλλά και σε άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται τη θεραπεία εκρίζωσης και απομονώθηκε γενωμικό DNA. Λόγω έλλειψης δημοσιευμένων μελετών για τις επικρατούσες μεταλλαγές στα ανθεκτικά στελέχη *H. pylori* στον Ελληνικό πληθυσμό, σχεδιάστηκαν εκκινήτες για τον πολλαπλασιασμό των υπό μελέτη περιοχών του γονιδίου *gyrA* και ακολούθησε ανάγνωση της αλληλουχίας τους. Μετά από συσχέτιση των μοριακών με τις φαινοτυπικά αποτελέσματα αντοχής έναντι της λεβοφλοξασίνης, σχεδιάστηκε μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού-χρόνου (Real Time PCR) για τον προσδιορισμό της αντοχής στη λεβοφλοξασίνη.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram-negative bacterium that infects the human gastric mucosa with a prevalence of about 50% worldwide. As a rule, the infection manifests as chronic active gastritis, usually asymptomatic, while in 10% of the cases it presents the etiologic factor for the development of duodenal or peptic ulceration. Worldwide the infection is a primary risk factor for the development of non-cardia gastric adenocarcinoma and gastric MALT lymphoma. The usual first-line treatment for the eradication of *H. pylori* includes two antibiotics, such as clarithromycin and amoxicillin, and a PPI proton pump inhibitor. The second-line schemes include the use of fluoroquinolones, such as levofloxacin. *H. pylori* can develop resistance against the antibiotics used to treat the infection, not by usual mechanisms of plasmid transfer, but through the occurrence of point mutations in the bacterial genome. The percent of *H. pylori* resistance to levofloxacin are alarmingly rising, making it imperative to detect the resistance of the bacteria to levofloxacin, especially after failed eradication efforts. In daily practice, the detection of resistance to both clarithromycin and levofloxacin is based on phenotypic antibiotic methods, which require the isolation of the *H. pylori* strain from the gastric biopsy, which is not always feasible. Molecular detection of point mutations to assess bacterial susceptibility can be an alternative approach. Levofloxacin resistance has been shown to correlate mainly, but not exclusively, with mutations in the *gyrA* gene resulting in modifications mainly to aa residue 87 (N to K) or aa residue 91 (D to G, D to N or D to Y). The purpose of this study was to characterize the mutations in bacterial genome, responsible for the resistance to levofloxacin in the Greek population of symptomatic patients. Initially, *H. pylori* clinical strains were isolated from symptomatic patient biopsies and their susceptibility was determined phenotypically using the E-test. A collection of susceptible, as well as, resistant clinical *H. pylori* strains to levofloxacin and other antibiotics used in eradication schemes, was prepared and genomic DNA isolated. Due to a lack of published studies on prevalent mutations in levofloxacin-resistant *H. pylori* strains in the Greek population, primers were designed to amplify the *gyrA* gene regions under study, followed by sequencing. After plotting the molecular and phenotypic effects against levofloxacin resistance, a real-time PCR was designed to determine levofloxacin resistance.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά

1.1. Ιστορική αναδρομή

Η παρουσία σπειροειδών μικροοργανισμών στο στομάχι θηλαστικών ήταν ήδη γνωστή από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. (Bizzozzero 1893, Salomon 1896). Πολύ σύντομα, παρόμοια σπειροειδή βακτήρια παρατηρήθηκαν και σε ανθρώπους, κάποιοι από τους οποίους έπασχαν από πεπτικό έλκος ή γαστρικό καρκίνο (Luger 1917, Pel 1899).

Αρχικά, προτάθηκε αιτιολογική συσχέτιση των βακτηρίων με την ανάπτυξη των παραπάνω ασθενειών, ενώ οι πάσχοντες υποβάλλονταν ενίοτε σε θεραπεία με υψηλές δόσεις βισμούθιου (Pel 1899). Στη συνέχεια όμως, μελέτες πάνω στην αιτιολογική σχέση βακτηρίου-κλινικής έκφανσης παραμερίστηκαν, λόγω της παρουσίας του μικροβίου και στο στομάχο ατόμων, στα οποία απουσίαζαν κλινικά συμπτώματα (Palmer, 1954). Μάλιστα, έως τις αρχές της δεκαετίας του '80, τα βακτήρια που παρατηρούνταν στον ανθρώπινο στομάχο θεωρούνταν αποτέλεσμα επιμολύνσεων της τροφής.

Το 1979 ο Αυστραλός παθολογοανατόμος Robin Warren παρατήρησε σπειροειδή βακτήρια στις βιοψίες ασθενών με πεπτικό έλκος και το 1981, σε συνεργασία με τον Αυστραλό ιατρό γαστρεντερολόγο Barry Marshall, ήταν οι πρώτοι που κατάφεραν να καλλιεργήσουν το βακτήριο από δείγματα στομάχου. Στην φημισμένη πλέον ανακοίνωση τους το 1983 (McNulty & Watson, 1984), υποστήριζαν ότι οι περισσότερες περιπτώσεις έλκους του στομάχου και γαστρίτιδας οφείλονται σε λοίμωξη από αυτό το βακτήριο και όχι στο στρες ή σε πικάντικες τροφές, όπως πιστευόταν ως τότε. Η ιατρική κοινότητα παρέμενε επιφυλακτική στην αποδοχή αυτής της άποψης, έως ότου συσσωρεύτηκαν ευρήματα περισσότερων μελετών μεταξύ των οποίων κι εκείνη στην οποία ο Marshall προκειμένου να αποδείξει ότι το *H. pylori* πληροί τα κριτήρια του Koch για να χαρακτηριστεί ως παθογόνο, κατάπνευσε αποικία βακτηρίων που πήρε από θετική καλλιέργεια ασθενούς με γαστρίτιδα. Δέκα ημέρες αργότερα εμφάνισε δυσπεπτικά ενοχλήματα και η ενδοσκοπική εξέταση έδειξε κλινικά σημεία γαστρίτιδας, η οποία επιβεβαιώθηκε με βιοψία από το άντρο του στομάχου, ενώ η καλλιέργεια της βιοψίας βρέθηκε θετική για το βακτήριο. Οι Warren και Marshall για το σημαντικό τους αυτό επίτευγμα, τιμήθηκαν το 2005 με το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής. Αρχικά, το βακτήριο ονομάστηκε *Campylobacter pyloridis*. Στη συνέχεια μετονομάστηκε σε *Campylobacter pylori* ώσπου το 1989, μετά από τη μελέτη της αλληλουχίας του DNA και σε συνδυασμό με άλλα στοιχεία διαπιστώθηκε ότι δεν ανήκει στο γένος των

Καμπυλοβακτηρίων, αλλά στο γένος των Ελικοβακτηρίων κι έτσι πήρε την τελική του ονομασία «Ελικοβακτήριο του πυλωρού –*Helicobacter pylori*» (McNulty & Watson, 1984).

Σ’ αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ο Έλληνας ιατρός παθολόγος- ερευνητής Ιωάννης Λυκούδης, ο οποίος από τη δεκαετία του 1950 είχε την πεποίθηση ότι παθογόνοι μικροοργανισμοί υπεισέρχονται στην αιτιολογία του έλκους και θεράπευε ασθενείς με χορήγηση αλάτων βισμούθιου που ασκούν αντιμικροβιακή δράση. Ο Λυκούδης υπήρξε και ο ίδιος ελκοπαθής και κατάφερε να θεραπεύσει τον εαυτό του με αυτό τον τρόπο. Ο μετέπειτα νομπελίστας B. Marshall στο βιβλίο του “*Helicobacter Pioneers*” συμπεριέλαβε τον Λυκούδη μεταξύ εκείνων που από νωρίς είχαν τη διαίσθηση ότι μικροβιακοί παράγοντες σχετίζονται με το πεπτικό έλκος. Όπως ο Marshall και αρκετοί άλλοι, έτσι και ο Λυκούδης λοιδορήθηκε στη εποχή του για αυτές τις απόψεις του (Phillips, 2000), (Rigas, Feretis, & Papavassiliou, 1999).

Οι επιδημιολογικές και οι κλινικές μελέτες που έγιναν από τότε μέχρι σήμερα, έχουν αναδείξει ότι το 90% περίπου των ασθενών με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα και αυτών με Β-κυτταρικό MALT λέμφωμα του στομάχου ήταν θετικοί για *H. pylori*. Ο γαστρικός καρκίνος είναι ο 5^{ος} σε συχνότητα καρκίνος παγκοσμίως και ευθύνεται για το θάνατο πάνω από 950000 ατόμων ετησίως (International Agency for Research on Cancer 2018). Λόγω της ισχυρής συσχέτισης γαστρικού καρκίνου και λοίμωξης από *H. pylori*, το 1994 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ) κατηγοριοποίησε το *H. pylori* ως καρκινογόνο πρώτης τάξης (class 1 carcinogen).

1.2. Συστηματική κατάταξη

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση του *H. pylori* (Woese *et al.* 1990)

Επικράτεια	Βακτήρια
Φύλο	Πρωτεοβακτήρια
Υπόφυλο	δ/ε Υποκατηγορία
Ομοταξία	ε-Πρωτεοβακτήρια
Τάξη	Campylobacterales
Οικογένεια	Helicobacteraceae
Γένος	<i>Helicobacter</i>

Το βακτήριο *H. pylori* ανήκει στο γένος των *Helicobacters* που μολύνουν τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά (Πίνακας 1). Υπάγεται στην οικογένεια των *Helicobacteraceae*, στην οποία συμπεριλαμβάνονται τα γένη *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfurimonas*, *Thiomicrospira* και *Thiovulum*. Μέχρι σήμερα, στο γένος *Helicobacter* ανήκουν παραπάνω από 35 αναγνωρισμένα είδη (Boyanova, 2011). Τα μέλη του γένους *Helicobacter* υποδιαιρούνται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες: στα γαστρικά είδη και στα εντεροηπατικά. Οι δύο αυτές ομάδες χαρακτηρίζονται από υψηλή οργανική εξειδίκευση, τέτοια ώστε τα γαστρικά είδη να αδυνατούν να αποικίσουν το έντερο ή το ήπαρ και αντίστροφα.

1.3. Μορφολογία

Το *H. pylori*, είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο εντοπίζεται στο γαστρικό βλεννογόνο. Διαθέτει σπειροειδές σχήμα, διαστάσεων περίπου 3μm σε μήκος και 0.5 μm σε πλάτος ενώ έχει την ικανότητα κίνησης μέσω ενός θυσάνου 2-6 πολικών μαστιγίων. Αυτές οι κατασκευές φέρουν επίσης έναν τελικό βολβό, ο οποίος πιθανώς διευκολύνει το βακτήριο να διατρύπεί τη βλέννα που καλύπτει τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου (Chan *et al.*, 1994). Παράλληλα, διαθέτει την ικανότητα να μεταπίπτει από τη σπειροειδή, σε μία βιώσιμη μεν, αλλά μη καλλιεργήσιμη, κοκκώδη μορφή. Αμφότερες οι μορφές πιθανόν συμπεριλαμβάνονται στις στρατηγικές επιβίωσης του βακτηρίου, ενώ ενδεχομένως ενέχονται και στην επιδημιολογία του (Chan *et al.*, 1994).

1.4. Απαιτήσεις ανάπτυξης

Σε εργαστηριακό περιβάλλον, τα περισσότερα στελέχη του *H. pylori* συνήθως αναπτύσσονται στους 37°C, υπό μικροαερόφιλες συνθήκες, δηλαδή παρουσία οξυγόνου, σε μικρότερη όμως, συγκέντρωση από αυτήν της ατμόσφαιρας. Η απαιτούμενη περιεκτικότητα σε αέρια είναι η εξής: 85 % N₂, 10 % CO₂ και 5 % O₂ κατ' όγκο (Shen *et al.*, 1997). Επιπλέον για την καλλιέργεια του *H. pylori* απαιτείται ένα μέσο ανάπτυξης με συγκεκριμένη σύσταση, η οποία συχνά συμπεριλαμβάνει αίμα ή ορό, ως επιπρόσθετες πηγές θρεπτικών ουσιών αλλά και ως πιθανοί παράγοντες εξουδετέρωσης τοξικών λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας. Στην τελευταία λειτουργία συμβάλλει επίσης ο εμπλουτισμός του θρεπτικού με κυκλοδεξτρίνες ή IsoVitaleX (Taneera *et al.* 2002).

Συγκεκριμένα, τα στερεά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και καλλιέργεια του *H. pylori* περιέχουν συνήθως Columbia ή Mueller-Hinton άγαρ με αίμα αλόγου και ορό αλόγου ή βόειο εμβρυικό. Προαιρετική είναι η προσθήκη ενός μίγματος αντιβιοτικών σε διάφορες παραλλαγές, αποτελούμενο συνήθως από βανκομυκίνη, τριμεθοπρίμη, αμφοτερισίνη και πολυμυξίνη B (Skirrow 1977, Dent & McNulty 1988). Τα υγρά θρεπτικά μέσα αποτελούνται

συνήθως από ζωμό Müller-Hinton ή Brain Heart Infusion Broth με 2-10 % βόειο ορό ή 0.2-1 % κυκλοδεξτρίνες, συνοδευόμενα από μίγμα αντιβιοτικών Dent ή Skirrow.

1.5. Γονιδίωμα

Το *H. pylori* ήταν από τα πρώτα είδη βακτηρίων στα οποία προσδιορίστηκε η πλήρης γονιδιωματική αλληλουχία. Συγκεκριμένα, έγιναν διαθέσιμες οι αλληλουχίες δύο στελεχών: του 26695 και του J99 ενώ το μέγεθος του γονιδιώματος υπολογίστηκε στις 1.7 Mb, με περιεκτικότητα σε βάσεις G+C 35-40 % (Tomb *et al.*, 1997). Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε απουσία πολλών από τις ρυθμιστικές περιοχές που εντοπίζονται στο εκτενέστερο γονιδίωμα του βακτηρίου *E. coli*. Επιπλέον το *H. pylori* εμφανίζει μεγάλη γενετική ετερογένεια και ως εκ τούτου στερείται κλωνικότητας. Υπολογίζεται μάλιστα πως κάθε φορέας φέρει ένα διακριτό στέλεχος, με μικρότερες όμως αποκλίσεις μεταξύ των συγγενών ατόμων (Kansau *et al.*, 1996). Η γενετική του ποικιλομορφία πιθανόν αποτελεί μία ευρύτερη στρατηγική προσαρμογής στο γαστρικό περιβάλλον και στην ανοσολογική απόκριση του εκάστοτε ξενιστή (Gerrits *et al.*, 2006).

Η νουκλεοτιδική ετερογένεια του *H. pylori* έχει αποδοθεί σε διάφορους μηχανισμούς αναδιάταξης του DNA καθώς και στην ενσωμάτωση και απαλοιφή ξένων αλληλουχιών (Suerbaum & Achtman, 2004).

1.6. Εγκαθίδρυση της λοίμωξης

Ο γαστρικός αυλός, κυρίως λόγω του όξινου *pH*, αποτελεί αφιλόξενο περιβάλλον για τα περισσότερα μικρόβια. Το *H. pylori* ωστόσο, διαθέτει μηχανισμούς που του επιτρέπουν να υπερβαίνει τις επικρατούσες συνθήκες και να εγκαθιστά εμμένουσα λοίμωξη. Καταρχάς, το βακτήριο ανθίσταται στις όξινες συνθήκες του γαστρικού περιβάλλοντος μέσω της παραγωγής της κυτοσολικής ουρεάσης, ενός ενζύμου ικανού να διασπά την ουρία σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία, εξουδετερώνοντας το *pH* της εγγύς περιοχής (Parsonnet *et al.*, 1994). Κατόπιν φαίνεται να διαθέτει την ικανότητα να μεταναστεύει από το γαστρικό αυλό, στο βλεννογόνο, με τη βοήθεια των μαστιγίων του και να διατρυπά το παχύ στρώμα βλέννας, το οποίο καλύπτει και προστατεύει το επιθήλιο του γαστρικού βλεννογόνου.

Εκεί, διασχίζει την πηκτή στιβάδα της βλέννας, προσομοιάζοντας τη σπειροειδή κίνηση ενός κοχλίου (Y Yamaoka *et al.*, 2000). Το *H. pylori* προσδένεται ισχυρά στα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου, με τη βοήθεια γλυκολιπιδίων και πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες BabA, SabA και HpA (Kwok *et al.*, 2002), (Algood & Cover, 2006).

Το βακτήριο είναι ικανό να εγκαθιστά τη λοίμωξη στον ξενιστή, για μεγάλες χρονικές περιόδους, χωρίς να καθίσταται δυνατή η εξάλειψη του από το ανοσοποιητικό σύστημα ή από τις συχνές

αλλαγές στο γαστρικό περιβάλλον. Παράλληλα, το *H. pylori* φαίνεται να διαθέτει μια πλειάδα μηχανισμών, μέσω των οποίων στρατολογεί και μετριάξει τη δράση της ανοσιακής απόκρισης. Συγκεκριμένα, λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίοι εκφράζονται στην επιφάνειά του διαθέτουν χαμηλή ενδοτοξική και ανοσοβιολογική δράση, συγκριτικά με αυτούς άλλων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Muotiala *et al.*, 1992). Οι λιποπολυσακχαρίτες του *H. pylori* δρουν ανταγωνιστικά στη σηματοδότηση από τον ενδογενή ανοσολογικό υποδοχέα Toll-Like Receptor 4 (TLR4) (Lepper *et al.*, 2005). Αυτή η ανταγωνιστική ιδιότητα τους βασίζεται σε εξειδικευμένες τροποποιήσεις του λιπιδιακού συστατικού A, αλλά και στη στέλεχο-ειδική έκφραση LPS αντιγόνων-O, τα οποία προσομοιάζουν δομικά με τα αντιγόνα επιφανείας των ομάδων αίματος κατά Lewis (Appelmelk *et al.*, 1996) (Moran, 1997). Αυτός ο μοριακός μιμητισμός δεν συμμετέχει μόνο σε αυτοάνοσες αποκρίσεις, αλλά ενδεχομένως να επιτρέπει στους LPS του *H. pylori* να διαφεύγουν την αναγνώριση από το ενδογενές ανοσιακό σύστημα (Appelmelk *et al.*, 1996).

1.7. Παράγοντες παθογένειας

Το γεγονός ότι ορισμένοι μόνο από τους μολυσμένους με *H. pylori* ασθενείς εμφανίζουν επιπλοκές πέραν της ενεργού χρόνιας γαστρίτιδας, οδήγησε στην υπόθεση πως κάποια βακτηριακά στελέχη είναι περισσότερο παθογόνα από άλλα. Συγκεκριμένα, παλιότερες έρευνες συσχέτισαν τη βαρύτητα της παθογένειας με την ικανότητα ενός στελέχους να επάγει έντονες μορφολογικές αλλαγές και εκτεταμένη βλάβη σε καλλιέργειες κυττάρων (Leunk *et al.*, 1988). Στην κλινική έκφανση της λοίμωξης συμμετέχουν διάφοροι βακτηριακοί παράγοντες, ενώ η ευρεία γενετική ποικιλομορφία του *H. pylori* δυσκολεύει στη διερεύνησή τους. Έχουν ωστόσο εντοπιστεί αρκετοί γονιδιακοί τύποι που κωδικοποιούν παράγοντες παθογένειας, όπως είναι το νησίδιο παθογένειας *cag* (*cagPAI*), η κυτταροτοξίνη CagA, η εκκρινόμενη τοξίνη VacA και η προσκολλητίνη Bab2, οι οποίοι συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου και πεπτικού έλκους (Gerhard *et al.*, 1999), (van Doorn *et al.*, 1998).

1.7.1. CagA

Η CagA είναι ο πιο μελετημένος μολυσματικός παράγοντας του *H. pylori*. Υπάρχουν δύο τύποι κλινικών *H. pylori* που έχουν απομονωθεί: i) τα στελέχη που παράγουν πρωτεΐνη CagA (CagA-θετικά) και ii) τα στελέχη που δεν παράγουν CagA (CagA-αρνητικά). Στις Δυτικές χώρες, έχειδειχθεί ότι οι ασθενείς που έχουν μολυνθεί από *H. pylori* CagA-θετικά στελέχη έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν πεπτικό έλκος ή γαστρικό καρκίνο, σε σύγκριση με εκείνους που έχουν μολυνθεί από CagA-αρνητικά στελέχη (Yamaoka *et al.*, 2002). Επιπλέον, γαστρο-ειδική διαγονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης CagA σε ποντίκια κατέληξε στην ανάπτυξη

γαστρεντερολογικής και αιματολογικής φύσεως νεοπλασιών, επιβεβαιώνοντας την ογκογενετική ικανότητά της (Ohnishi *et al.*, 2008). Αυτή η γνώση οδήγησε στο χαρακτηρισμό της CagA ως μίας βακτηριακής ογκοπρωτεΐνης.

Το γονίδιο *cagA* είναι πολυμορφικό, καθώς η πρωτεΐνη CagA που κωδικοποιεί ποικίλει στα κλινικά στελέχη. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών φωσφορυλίωσης της τυροσίνης, της μορφής γλουταμικού-προλίνης-ισολευκίνης-τυροσίνης-αλανίνης (EPIYA), στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης CagA (Yamaoka *et al.*, 2000). Επιπλέον, περιοχή με τις επαναλήψεις βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά ανάμεσα σε στελέχη από την Ασία και σε δυτικά στελέχη του *H. pylori* (Yamaoka *et al.*, 2002). Οι επαναλαμβανόμενες EPIYA περιοχές της πρωτεΐνης CagA ταξινομούνται με βάση τις αλληλουχίες που ακολουθούν σε EPIYA-A, -B και -C, ως εξής, EPIYA-A: KKELNEKFNFNNNNGLKN(ST)EPIYAKVNKKK, EPIYA-B: (A/T/V/S)GQ(V/A)ASP-EPIY(A/T)(Q/K)VAKKVNA και EPIYA-C: FPLKRHDKVDDLK VG(R/L)S(V/A)SPEPIYATIDDLGGP. Στελέχη από συμπτωματικούς φορείς προέλευσης Δυτικών χωρών διαθέτουν συνήθως από μία επανάληψη EPIYA-A και EPIYA-B, καθώς και 1-3 επαναλήψεις της περιοχής EPIYA-C για τα στελέχη δυτικού τύπου ή μία περιοχή EPIYA-D: AINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASEPIYATIDFDEANQAG για στελέχη που προέρχονται από την Ασία (Hatakeyama, 2004). Πολλές μελέτες έδειξαν ότι οι θέσεις φωσφορυλίωσης τυροσίνης EPIYA της CagA παίζουν άμεσο ρόλο στην παθογένεια του *H. pylori* (Azuma, *et al.*, 2004, Panayotopoulou *et al.*, 2007, Papadakos *et al.*, 2013). Μετά την ενδοκυτταρική μεταφορά της πρωτεΐνης CagA στα επιθηλιακά κύτταρα, η πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται ιεραρχικά στα μοτίβα EPIYA, από κινάσες των οικογενειών κινάσων Src και Abl (Mueller *et al.*, 2012). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία μίας ποικιλίας ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, που ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την δημιουργία φλεγμονής, καθώς και την κυτταρική πολικότητα και διασπορά των επιθηλιακών κυτάρων. Έχουν προταθεί τουλάχιστον 20 γνωστοί κυτταρικοί παράγοντες που έχουν δείχθει ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη CagA, με τρόπο ο οποίος μπορεί να εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της ή μη σε θέσεις EPIYA, ο μεγαλύτερος αριθμός για οποιοδήποτε παράγοντα παθογένειας στο μικροβιακό κόσμο (Yoshio Yamaoka, 2010).

1.7.2. Εκκρινόμενη κυτταροτοξίνη VacA

Το *H. pylori* εκκρίνει μία αυτομεταφερόμενη κεντοποιητική κυτταροτοξίνη (VacA), στην οποία οφείλεται η σημαντική δημιουργία αριθμού κεντοπίων στα επιθηλιακά κύτταρα μετά από λοίμωξη. Η πρωτεΐνη VacA είναι ο δεύτερος πλέον εκτενώς μελετημένος μολυσματικός παράγοντας του *H. pylori*. Εκτός από την επαγωγή δημιουργίας κεντοπίων, η VacA επάγει πολλαπλές κυτταρικές δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού μεμβρανικού

καναλιού και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια που οδηγεί σε απόπτωση (Boncristiano *et al.*, 2003) και εμπλέκεται στην ειδική ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων (Mimuro *et al.*, 2007). Μελέτες υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες VacA και CagA μπορεί να έχουν αντίθετη δράση καθώς φαίνεται ότι μπορούν να αναστείλουν κάποια από τα μονοπάτια η μία της άλλης (M M Gerrits *et al.*, 2006). Για παράδειγμα, η CagA έχει δείχθει ότι επάγει την έκφραση του αναστολέα της απόπτωσης Mcl1 και αναστέλλει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων που προκαλεί η δράση της πρωτεΐνης VacA (Oldani *et al.*, 2009).

Αυτά τα δεδομένα αναδεικνύουν τη σημασία των τεχνικών πειραματικής *in vitro* μόλυνσης, με τις οποίες καθίσταται δυνατή η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μολυσματικών παραγόντων του *H. pylori* (Yamaoka, 2010).

Πρακτικά, όλα τα στελέχη *H. pylori* έχουν ένα λειτουργικό *vacA* γονίδιο, ωστόσο υπάρχει διαφορά στην ικανότητα δημιουργίας κενотоπιών ανάμεσα στα κλινικά στελέχη *H. pylori* που απομονώνονται από τους ασθενείς (Atherton *et al.*, 1995, Cover & Blaser, 1992).

1.7.3. OipA

Περίπου το 4 % του γενόματος του *H. pylori* θεωρείται ότι κωδικοποιεί πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs), μερικές από τις οποίες δρουν ως προσκολλητίνες. Μία από αυτές τις OMPs είναι η OipA, η οποία ταυτοποιήθηκε το 2000 (Yamaoka *et al.*, 2000). Η λειτουργική κατάσταση (Yamaoka *et al.*, 2000) της OipA ρυθμίζεται από μηχανισμό λανθασμένου ταιριάσματος των βάσεων λόγω ολίσθησης, η οποία καθορίζεται από τον αριθμό των επαναλήψεων CT δινουκλεοτιδίων στην 5' περιοχή του γονιδίου (Yamaoka *et al.*, 2000). Η OipA αρχικά αναγνωρίστηκε ως πρωτεΐνη που επάγει προ-φλεγμονώδη απόκριση, λόγω του ότι τα ισογενή μεταλλάγματα *H. pylori* με σίγαση της έκφρασής της (Δ Oip), παρείχαν μειωμένη ικανότητα επαγωγής πρωτεΐνης IL-8, μετά από μόλυνση κυτταρικών σειρών γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων (Yamaoka *et al.*, 2000). Η ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της IL-8 σε μολυσμένα με *H. pylori* γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα φαίνεται ότι γίνεται με OipA- και *cagPAI*-εξαρτώμενο τρόπο μέσω μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B, AP1 και ISRE (interferon-stimulated responsive element) που εντοπίζονται στον υποκινητή του γονιδίου της IL-8 (Yamaoka *et al.*, 2004). Σταδιακά έγινε ξεκάθαρο ότι μία λειτουργία της OipA είναι η επαγωγή της φλεγμονής και η μεταβολή της δυναμικής της ακτίνης μέσω φωσφορυλίωσης πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκεται στην προσκόλληση του *H. pylori* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* (Yamaoka *et al.*, 2002).

1.7.4. BabA

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, πειράματα προσκόλλησης στελεχών *H. pylori* σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* διευκόλυναν στην ταυτοποίηση των φουκοσυλιωμένων αντιγόνων των ομάδων αίματος ABO και Lewis b (Le^b) ως διαμεσολαβητών της προσκόλλησης του *H. pylori* στα ανθρώπινα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα. Αργότερα, οι προσκολλητίνες Le^b ονομάστηκαν BabA. Δύο γονίδια που κωδικοποιούν BabA κλωνοποιήθηκαν: *babA1* και *babA2*, αλλά μόνο το γονίδιο *babA2* φαίνεται ότι είναι λειτουργικό. Ο βακτηριακός φαινότυπος πρόσδεσης Le^b είναι επιδημιολογικά συνδεδεμένος με την παρουσία του νησιδίου παθογένειας *cagPAI* (Yamaoka, 2010). Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την κλινική σημασία του γονιδίου *babA2*, καταδεικνύοντάς το ως δείκτη ταυτοποίησης ασθενών με υψηλό κίνδυνο για ειδικές νόσους που σχετίζονται με το *H. pylori*. Με βάση την κλινική σημασία της πρωτεΐνης BabA, έχει προταθεί ότι θα μπορούσε να είναι δυνατή η δημιουργία ενός εμβολίου βασισμένο σε αυτήν την προσκολλητίνη για τη στόχευση μολυσματικών στελεχών *H. pylori* (Magalhaes *et al.*, 2010), κάτι το οποίο όμως δεν έχει γίνει μέχρι στιγμής. Σύγχρονες μελέτες καταδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη BabA διαδραματίζει ρόλο επιλεκτικού προσδέτη στα Le^b αντιγόνα σε συνάρτηση με το pH του περιβάλλοντος και διευκολύνουν με αυτό τον τρόπο την εγκατάσταση της λοίμωξης στο γαστρικό βλεννογόνο (Boyanova *et al.*, 2016).

1.7.5. SabA

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί δύο πρωτεΐνες δέσμησης σιαλικού οξέος του *H. pylori*, η πρωτεΐνη SabA και η πρωτεΐνη HP-NAP. Η SabA είναι ο μοναδικός παράγοντας που ευθύνεται για την πρόσδεση του *H. pylori* στους γαγγλιοζίτες, όπως δείχτηκε πρόσφατα με χρήση στελεχών *H. pylori* μεταλλαγμάτων που στερούνται έκφρασης της SabA (Unemo *et al.*, 2005). Η πρωτεΐνη SabA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις γαστρικές παθήσεις και στις παθήσεις του δωδεκαδακτύλου, καθώς η παραγωγή της έχει συσχετιστεί με σοβαρές εντερικές μεταπλασίες, γαστρική ατροφία και ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου (Yamaoka *et al.*, 2008).

2. Λοίμωξη

2.1. Φυσική ιστορία της μόλυνσης

Η μόλυνση από *H. pylori* λαμβάνει χώρα κυρίως κατά την παιδική ηλικία και μετά την εγκατάστασή της στο γαστρικό βλεννογόνο, παραμένει εφ' όρου ζωής. Μελέτες σε παιδιά υποδεικνύουν ότι σε μικρές ηλικίες πριν από την εγκατάσταση της μόλυνσης, είναι κοινές οι

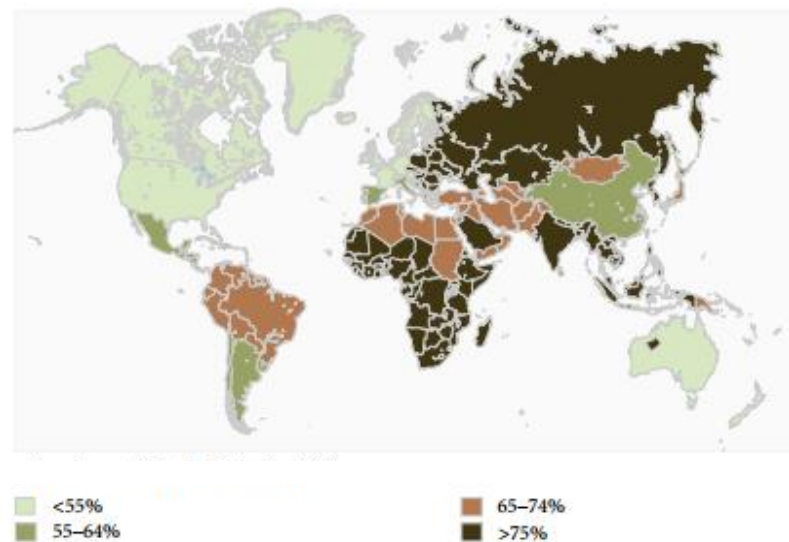
παροδικές λοιμώξεις με *H. pylori* (Patton *et al.*, 2006). Μία από τις πρώτες μελέτες που περιέγραψαν την απουσία της *H. pylori* λοίμωξης σε παιδιά έγινε από τους Granstrom και συν., οι οποίοι παρακολούθησαν τον επιπολασμό της λοίμωξης από *H. pylori* σε 294 παιδιά από τη Σουηδία στις ηλικίες των 6, 8, 10 και 18 μηνών καθώς και στα 2, 4 και 11 έτη. Η μελέτη έδειξε ότι ενώ στην ηλικία των 2 ετών το 10 % των παιδιών ήταν θετικό για το *H. pylori*, μέχρι την ηλικία των 11 ετών μόνο το 3 % παρέμεινε οροθετικό (Granstrom *et al.*, 1997). Παρόλο που οι παραπάνω μελέτες υποδεικνύουν απουσία του *H. pylori* στα παιδιά, δυστυχώς σε καμία μελέτη δεν έγινε έλεγχος για τη ενδεχόμενη κατανάλωση αντιβιοτικών για άλλους λόγους, ενός παράγοντα που μπορεί να επηρεάσει την κατάσταση. Η κατανάλωση αντιβιοτικών λήφθηκε υπόψη σε μία μελέτη παρακολούθησης δίχρονων σε 48 παιδιά στην Ιταλία, τα οποία ήταν θετικά στο *H. pylori* (Perrì *et al.*, 1998). Η κατάσταση αυτών των παιδιών παρακολουθήθηκε μέσω του τεστ ουρίας, ανά διαστήματα 6 μηνών, για μία περίοδο 2 ετών. Σε αυτή τη μελέτη 40 από τα παιδιά παρέμειναν θετικά στο *H. pylori*, αν και τα 10 από αυτά υποβλήθηκαν σε θεραπεία για ταυτόχρονες λοιμώξεις για μία σύντομη περίοδο με λήψη αντιβιοτικών. Τα υπόλοιπα 8 παιδιά βρέθηκαν αρνητικά μετά από 2 χρόνια και από αυτά, τα 2 είχαν υποβληθεί σε θεραπεία για ταυτόχρονες λοιμώξεις (Perrì *et al.*, 1998). Η απόκτηση και η απώλεια της λοίμωξης διαφέρει ανάμεσα σε παιδιά, με κοινή κοινωνικό-οικονομική κατάσταση αλλά και διαφορετική φυλετική καταγωγή (Malaty & Graham, 1994). Σε αυτήν την ορολογική μελέτη παρακολούθησης που διήρκεσε 12 χρόνια βρέθηκε ότι το ποσοστό της απόκτησης της λοίμωξης σε παιδιά Αφρο-αμερικανών ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με το ποσοστό παιδιών Καυκάσιων γονέων. Η απουσία της λοίμωξης κατά την περίοδο των 12 χρόνων ήταν σημαντικά υψηλότερη στα Καυκάσια παιδιά (50 %) σε σύγκριση με τα Αφρο-αμερικάνικα παιδιά (4 %), με την τελευταία ομάδα να παραμένει μολυσμένη ή να επαναμολύνεται. Καταλήγοντας, με βάση τις παρούσες ενδείξεις, φαίνεται ότι στα αρχικά χρόνια της ζωής είναι πιθανή η αυθόρμητη εκκαθάριση της μόλυνσης. Περισσότερες ωστόσο μελέτες χρειάζονται για να προσδιοριστούν οι παράγοντες που μπορεί να οδηγούν στη φυσική εκκαθάριση της μόλυνσης στα παιδιά (Redlinger *et al.*, 1999).

2.2. Δημογραφική εξάπλωση

Η λοίμωξη από το *H. pylori* αποτελεί την πιο κοινή μόλυνση στον άνθρωπο σε όλο τον κόσμο, βάση του γεγονότος ότι περίπου το 50 % του παγκόσμιου πληθυσμού είναι μολυσμένο (πάνω από 3 δισεκατομμύρια) (Wroblewski *et al.*, 2010). Η μόλυνση εμφανίζεται στην πρώιμη παιδική ηλικία (30 % -50 %) ενώ κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής ο επιπολασμός φτάνει πάνω από το 90% στις αναπτυσσόμενες χώρες. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στη χαμηλή κοινωνικοοικονομική κατάσταση και σε συνθήκες συνωστισμού. Η μόλυνση στις αναπτυγμένες χώρες είναι λιγότερο συχνή σε μικρά παιδιά, ενώ φτάνει έως και το 60 % σε μεγαλύτερες ηλικίες (Cheng *et al.*, 2009). Στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει αναφερθεί ποσοστό μόλυνσης 20 % μεταξύ των εφήβων και

πρόσφατα αναφέρθηκε ένα ποσοστό συνολικού επιπολασμού 36 %, γεγονός που υποδηλώνει την ταχεία βελτίωση των κοινωνικοοικονομικών συνθηκών (Smith *et al.*, 2009). Αν και ο επιπολασμός της μόλυνσης έχει μειωθεί σημαντικά σε πολλά μέρη της Βόρειας Αμερικής και της Δυτικής Ευρώπης, δεν έχει ωστόσο παρατηρηθεί μείωση στην πλειοψηφία του αναπτυσσόμενου κόσμου (Frenck & Clemens, 2003).

Παρά το γεγονός ότι η μόλυνση εμφανίζει παγκόσμια κατανομή (Εικόνα 1), υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό της νόσου τόσο μέσα στην ίδια χώρα όσο και παγκοσμίως (Woodward *et al.*, 2000). Σε μία έρευνα που διεξήχθη στη νότια Κίνα, ο συνολικός επιπολασμός της μόλυνσης από *H. pylori* σε Κινέζους πολίτες ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι σε Αυστραλούς πολίτες, συγκεκριμένα 44,2% και 21% αντίστοιχα.



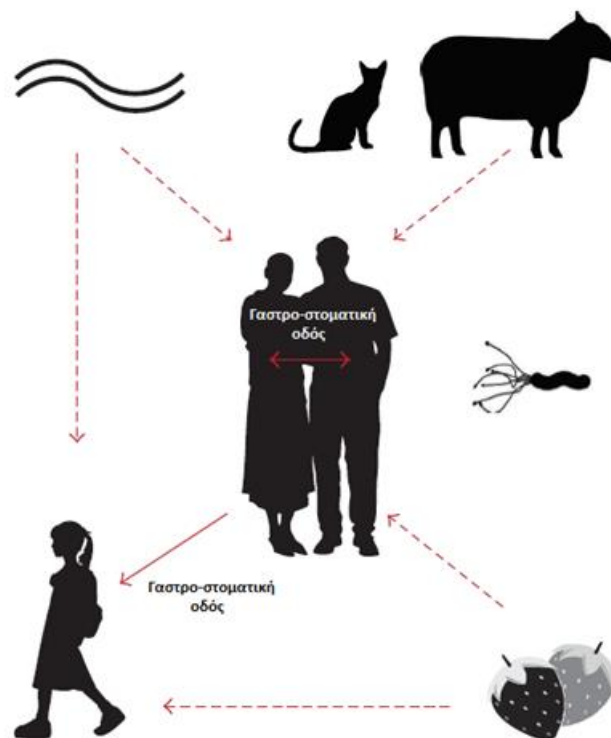
Εικόνα 1: Ο επιπολασμός του *H. pylori* παγκοσμίως. Τα ποσοστά των λοιμώξεων είναι υψηλότερα στην Αφρική, στην Ασία και στη Νότια Αμερική. Προσαρμογή από (Mitchell *et al.*, 1992.)

Η εξέταση των δεδομένων όσον αφορά στο χρονο-εξαρτώμενο επιπολασμό έδειξε ότι αυτή η διαφορά σχετίζεται με τη συχνότητα μόλυνσης από *H. pylori* πριν την ηλικία των 10 ετών. Ο επιπολασμός της μόλυνσης σε παιδιά στην Αυστραλία είναι 4 %, σε σύγκριση με παιδιά στην Κίνα στα οποία το ποσοστό είναι 27 %. Αντίθετα, σε ηλικίες μεγαλύτερες των 10 ετών, η συχνότητα μόλυνσης και στις δύο χώρες είναι παρόμοια, περίπου 1 % το χρόνο (Mitchell *et al.*, 1992).

Στην Ελλάδα, η μόλυνση με το μικρόβιο είναι πλέον ασυνήθιστη στην παιδική ηλικία, αλλά γίνεται πιο συχνή κατά την ενήλικη ζωή. Έτσι, υπολογίζεται ότι πάνω από το 60 % του ενήλικου ελληνικού πληθυσμού είναι φορέας λοίμωξης *H. pylori*. Επίσης, περίπου το 10 % του πληθυσμού αναπτύσσει δωδεκαδακτυλικό έλκος σε κάποια φάση της ζωής του, κυρίως στην ηλικία των 35-55 χρονών (Mitchell *et al.*, 1992).

2.3. Πηγές λοίμωξης

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός μελετών προτείνει ότι η λοίμωξη από *H. pylori* συσχετίζεται με παράγοντες του περιβάλλοντος όπως το νερό και η γειννίαση με ζώα (Εικόνα 2) (Salih *et al.*, 2010).



Εικόνα 2: Οδοί μετάδοσης του *H. pylori*. Οι ακριβείς τρόποι μετάδοσης του *H. pylori* δεν είναι ακόμα ξεκάθαρα διευκρινισμένοι. Η μετάδοση από άτομο σε άτομο είτε μέσω στοματικής οδού είτε μέσω των κοπράνων είναι η πιο πιθανή. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν μετάδοση και μέσω του νερού, των κατοικίδιων και του φαγητού αλλά η πλειοψηφία των δεδομένων υποστηρίζει ότι η λοίμωξη συμβαίνει στις μικρές ηλικίες μέσω της μετάδοσης από την οικογένεια. Προσαρμογή από (Salih, 2010).

2.3.1. Ζώα ως πιθανή πηγή λοίμωξης

Η πιθανότητα της *H. pylori* λοίμωξης να αποτελεί μία ζωνόσο προτάθηκε καταρχήν, μετά από δύο οροεπιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες κατέδειξαν ότι ο επιπολασμός της *H. pylori* λοίμωξης σε τομείς ζωϊκής παραγωγής ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με άλλα επαγγέλματα, στα οποία οι εργαζόμενοι δεν είχαν άμεση επαφή με ζώα ή ζωικά προϊόντα (Vaira *et al.*, 1998).

Παρά το γεγονός ότι αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει την απομόνωση του *H. pylori* από πιθήκους ρέζους, δεδομένης της σπάνιας σχέσης μεταξύ ανθρώπων και πιθήκων, είναι αμφίβολο κατά πόσον οι δεύτεροι αποτελούν σημαντική δεξαμενή της λοίμωξης από *H. pylori* (Handt *et al.*, 1997). Οροεπιδημιολογικές μελέτες που εξετάζουν τη σχέση μεταξύ των ιδιοκτητών κατοικίδιων ζώων με τη μόλυνση από *H. pylori* δεν έχουν καταφέρει να υποστηρίξουν μια τέτοια υπόθεση (Bode *et al.*, 1998).

Επιπλέον, δύο μελέτες έχουν εξετάσει το ενδεχόμενο η οικιακή μύγα να αποτελεί φορέα του *H. pylori* αλλά και να το μεταδίδει (Barry J Marshall, 2001). Τελικά, διαπιστώθηκε πως το βακτήριο δεν μπορεί να ανακτηθεί από μύγες που τρέφονται με ανθρώπινα περιττώματα παρά μόνο από αυτές που έχουν μολυνθεί με φυσικό ή τεχνητό τρόπο, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η εγχώρια οικιακή μύγα δεν μπορεί να αποτελεί ούτε φορέα για τη μετάδοση ούτε δεξαμενή *H. pylori* λοίμωξης (Barry J Marshall, 2001).

2.3.2. Το νερό ως πιθανή πηγή λοίμωξης από *H. pylori*

Η παρουσία DNA του *H. pylori* σε πηγές νερού που υπάρχουν στο περιβάλλον έχει αναφερθεί από έναν αριθμό μελετών (Sasaki *et al.*, 1999). Σε μία περιβαλλοντική μελέτη της παροχής νερού που διεξήχθη στη Σουηδία, οι Hulten *και συν.*, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς εκκινητές για τα πειράματά τους με PCR (προσκολλητίνη και 16S rRNA), βρήκαν ότι 9 από τις 24 ιδιωτικές γεωτρήσεις, 3 από τις 25 δημοτικές πηγές νερού βρύσης και 3 από τα 25 δείγματα λυμάτων ήταν θετικά στην παρουσία του *H. pylori* (Hulten *et al.*, 1998). Παρόλο που τέτοιες μελέτες μπορούν εν μέρει να υποστηρίξουν την παρουσία του *H. pylori* στο νερό, υπάρχουν ωστόσο σημαντικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη, όπως ότι η ανίχνευση DNA του *H. pylori* δεν συνηγορεί απαραίτητα στη βιωσιμότητα των βακτηρίων ενώ προσπάθειες για την καλλιέργεια του *H. pylori* από δείγματα νερού έχουν αποδειχθεί ανεπιτυχείς. Η αποτυχία μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι κατά την έκθεση του βακτηρίου σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, ο οργανισμός μεταπίπτει σε μια μη καλλιεργήσιμη, κοκκώδη μορφή (Bode *et al.*, 1993). Αν και αρχικές μελέτες ανέφεραν ότι οι μη καλλιεργήσιμες, κοκκώδεις μορφές του *H. pylori* είναι μεταβολικά ενεργές, μετέπειτα μελέτες δείχνουν πως αυτές μπορεί να αντιπροσωπεύουν πρώιμα στάδια βακτηριακού θανάτου (Kusters *et al.*, 1997).

Όπως προκύπτει από τα προηγούμενα, πέραν του ανθρώπινου στομάχου, δεν έχουν προσδιοριστεί περιβαλλοντικές πηγές του *H. pylori*. Επιπλέον, η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *H. pylori* δείχνει ότι από το βακτήριο αυτό απουσιάζουν ένζυμα, τα οποία απαιτούνται για έναν αποκλειστικό αερόβιο ή αναερόβιο μεταβολισμό, συνηγορώντας η ικανότητά του να επιβιώνει στο φυσικό περιβάλλον φαίνεται λιγότερο πιθανή (Tomb *et al.*, 1997).

2.3.3. Ανθρωπογενής μετάδοση του *H. pylori*

Η απομόνωση του *H. pylori* αποκλειστικά από τον άνθρωπο υποδηλώνει ενδεχομένως την άμεση από άτομο σε άτομο, ως την πιθανότερη οδό μετάδοσης. Η σημασία της στενής επαφής τονίζεται περαιτέρω από το εύρημα ότι ο επιπολασμός της *H. pylori* λοίμωξης είναι σημαντικά αυξημένος σε οικογένειες με προϋπάρχοντα μολυσμένα μέλη, συγκριτικά με οικογένειες χωρίς ιστορικό μόλυνσης (Lambert *et al.*, 1995).

Ανάλογα ευρήματα έχουν οδηγήσει στην άποψη ότι η μετάδοση του *H. pylori* γίνεται κυρίως εντός του οικογενειακού περιβάλλοντος. Μάλιστα, ο σχετικός κίνδυνος ενός παιδιού να μολυνθεί με το βακτήριο είναι περίπου οκτώ φορές μεγαλύτερος, αν έχει μολυνθεί η μητέρα και περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερος εάν έχει μολυνθεί ο πατέρας του (Mitchell *et al.*, 1992).

Μία μελέτη σχετική με τη μετάδοση του *H. pylori* μεταξύ συζύγων, κατέδειξε ότι ένας σημαντικός αριθμός ζευγαριών είχε μολυνθεί με το ίδιο βακτηριακό στέλεχος (Georgopoulos *et al.*, 1996). Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε φυλογενετική ανάλυση των *H. pylori* στελεχών με βάση συγκεκριμένες αλληλουχίες rRNA. Βρέθηκε ότι 8 από τα 18 ζευγάρια που μελετήθηκαν έφεραν πανομοιότυπο στέλεχος *H. pylori* ενώ στα υπόλοιπα 10 εντοπίστηκαν διαφορετικά στελέχη. Μάλιστα, κατά τη λοίμωξη μεταξύ των γονέων, δεν αποκλείεται η μεσολάβηση μεταφοράς του στελέχους σε ένα από τα παιδιά τους (Breuer *et al.*, 1996).

2.4. Οδός μεταφοράς

Λαμβάνοντας υπόψη την οικοθέση (niche) της λοίμωξης αλλά και τις υποχρεωτικές συνθήκες *in vivo* ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού του βακτηρίου, οι περισσότερες έρευνες συνηγορούν στην κατάποση ως το πιθανότερο μέσο πρόσβασης του *H. pylori* στον άνθρωπο. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο το βακτήριο εισέρχεται στη στοματική κοιλότητα παραμένει αμφίβολος. Η είσοδός του σε αυτή μπορεί να επιτυγχάνεται μέσω της γαστρο-στοματικής οδού, με επαφή από στόμα σε στόμα, ή ακόμα και μέσω της κοπρανοστοματικής οδού. Ειδικότερα, μία σημαντική δυσκολία στην προσπάθεια καλλιέργειας του *H. pylori* από περιττώματα ή τη στοματική κοιλότητα είναι η παρουσία πολυποίκιλης αυτόχθονης μικροχλωρίδας. Τα βακτήρια που την αποτελούν τείνουν να πολλαπλασιάζονται ταχύτερα από το *H. pylori*, καλύπτοντας πολύ συχνά την παρουσία του (Hulten *et al.*, 1996).

2.4.1. Γαστρο-στοματική μετάδοση

Η ανίχνευση του *H. pylori* στο γαστρικό υγρό του 58 % των μολυσμένων ατόμων, το καθιστά πιθανό μέσο μετάδοσης του βακτηρίου (Varoli *et al.*, 1991). Πράγματι, η άμεση επαφή με εκκρίσεις γαστρικού οξέος έχει ενοχοποιηθεί για υψηλότερο επιπολασμό της *H. pylori*-λοίμωξης

(Lin *et al.*, 1994). Για παράδειγμα, μία παλαιότερη μελέτη αναφέρει ότι η πιο πιθανή οδός μετάδοσης του *H. pylori* είναι οι εκκρίσεις του στομάχου ή ο έμετος. Παρά το γεγονός ότι εκείνη την εποχή δεν υπήρχε κανένα στοιχείο που να υποστηρίζει την ορθότητα αυτής της άποψης, ο έμετος και η παλινδρόμηση του γαστρικού υλικού στο στόμα είναι αρκετά συχνά κατά την παιδική ηλικία και μπορεί να αντιπροσωπεύουν μία σημαντική οδό μετάδοσης, στα παιδιά (Leung *et al.*, 1999), αλλά και στους ενήλικες (Parsonnet *et al.*, 1999).

2.4.2. Μετάδοση στόμα με στόμα

Προσπάθειες για την καλλιέργεια του *H. pylori* από τη στοματική κοιλότητα έχουν αποβεί σε πολλές περιπτώσεις άκαρπες. Υπάρχει όμως περιορισμένος αριθμός μελετών όπου το *H. pylori* έχει απομονωθεί από την οδοντική πλάκα και το σάλιο *H. pylori*-θετικών ασθενών. Μάλιστα, τα στελέχη αυτά προέκυψαν γενετικά συγγενή με τα αντίστοιχα απομονωθέντα από τις γαστρικές βιοψίες (Shames *et al.*, 1989). Επιπλέον, απομόνωση του γαστρικού στελέχους *H. pylori* κατέστη εφικτή μετά την πρόκληση εμετού σε ασθενείς (Parsonnet *et al.*, 1999).

2.4.3. Ιατρογενής μετάδοση

Η ενδοσκόπηση είναι μια κοινή ιατρική διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση και τη διαχείριση των γαστρεντερικών ασθενειών. Λόγω της πολύπλοκης δομής του ενδοσκοπίου και της δυσκολίας στην απολύμανσή του, η δυνατότητα ιατρογενούς λοίμωξης σε ασθενείς μετά από ενδοσκόπηση αποτελεί δυνητικό παράγοντα κινδύνου όχι μόνο για το *H. pylori*, αλλά και για άλλες μολυσματικές ασθένειες όπως ηπατίτιδα Β, ηπατίτιδα C, φυματίωση, και, ενδεχομένως, ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Brown, 2000).

Στην πραγματικότητα, η νοσοκομειακή μετάδοση του *H. pylori* είναι ο μόνος αποδεδειγμένος τρόπος μετάδοσής του (Brown, 2000). Σύμφωνα με τον Tytgat, το ποσοστό της ιατρογενούς λοίμωξης είναι κατά προσέγγιση τέσσερις ανά 1.000 ενδοσκοπήσεις (0,4 %), όταν ο επιπολασμός του *H. pylori* στον εξεταζόμενο πληθυσμό είναι περίπου 60 % (Tytgat, 1995). Ο Tytgat εισηγήθηκε ότι το ποσοστό αυτό μπορεί να φθάσει το 1 % σε περιοχές του κόσμου όπου χρησιμοποιούνται ακατάλληλες τεχνικές απολύμανσης (Tytgat, 1995). Η αναδρομική μελέτη από τους Langenberg *et al.* στην Ολλανδία βρήκε ένα ποσοστό 1,1 % για τους αρνητικούς ασθενείς στο *H. pylori* να αναπτύξουν ιατρογενή λοίμωξη από ενδοσκόπηση, όταν χρησιμοποιήθηκε το αλκοόλ αντί της γλουταραλδεΐδης ως απολυμαντικό (Langenberg *et al.*, 1990).

2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάδοση του *H. pylori*

2.5.1. Κοινωνικοοικονομική κατάσταση

Ο ρόλος της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός, αν εξετάσει κανείς επιπολασμό της λοίμωξης από *H. pylori* σε φτωχότερες φυλετικές ομάδες, οποίες ζουν σε ανεπτυγμένες χώρες. Σε μελέτη στην οποία εξετάστηκε η σχέση της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης στην παιδική ηλικία και της επικράτησης του *H. pylori* σε Αφρο-Αμερικανούς και ισπανόφωνους πληθυσμούς που κατοικούν στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι Malaty και συν. βρήκαν ότι ο επιπολασμός της λοίμωξης στην χαμηλότερη κοινωνική τάξη είναι σημαντικά υψηλότερος (85 %) από ότι στην υψηλότερη κοινωνική τάξη (11 %) (Malaty *et al.*, 1994).

Τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες ωστόσο, η διαβίωση υψηλού συγχρωτισμού σχετίζεται με αυξημένο επιπολασμό της *H. pylori*-λοίμωξης. Η σημασία της στενής επαφής στη μόλυνση από το βακτήριο τονίζεται από το εύρημα ότι τα παιδιά τα οποία κοιμούνται στο ίδιο κρεβάτι εμφανίζουν αυξημένο επιπολασμό της λοίμωξης (McCallion *et al.*, 1996).

Το μορφωτικό επίπεδο, επίσης, αποτελεί έναν δείκτη της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης. Έχειδειχθεί ότι, τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για την επικράτηση του *H. pylori* (Forman *et al.*, 1993). Για παράδειγμα, σε μία μεγάλη οροεπιδημιολογική μελέτη που εξέτασε τον επιπολασμό της λοίμωξης σε 3194 ασυμπτωματικά άτομα που ζούσαν σε 17 διαφορετικούς πληθυσμούς, οι Forman και συν. έδειξαν πως υπάρχει μία αντίστροφη σχέση μεταξύ του επιπολασμού της λοίμωξης και του μορφωτικού επιπέδου. Το 34 % των ατόμων με τριτοβάθμια εκπαίδευση βρέθηκαν μολυσμένα σε σύγκριση με το 47 % εκείνων με δευτεροβάθμια εκπαίδευση και το 63 % που είχαν μόνο πρωτοβάθμια σχολική εκπαίδευση (Forman *et al.*, 1993).

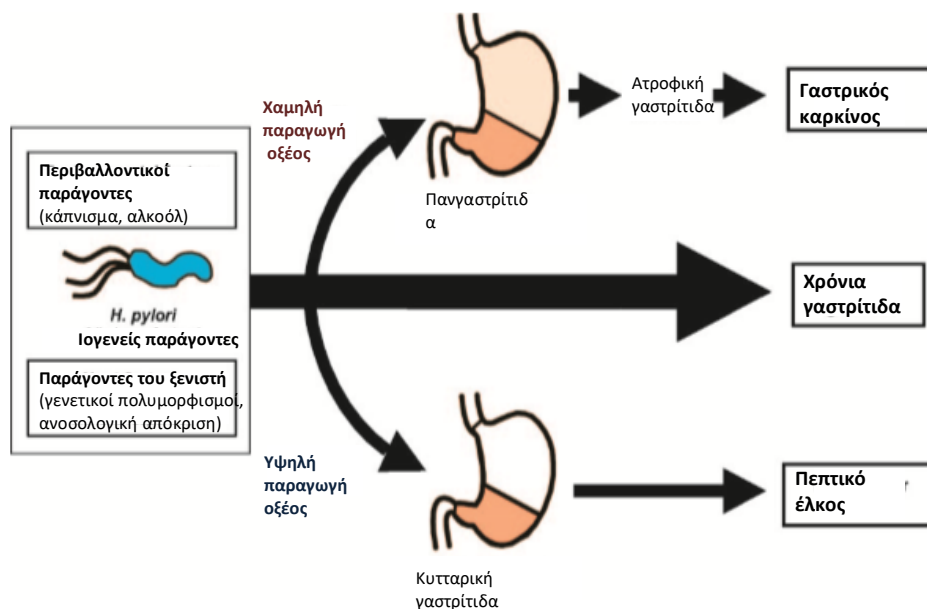
2.5.2. Γενετική προδιάθεση

Μέχρι σήμερα, λίγες μελέτες έχουν εξετάσει το ρόλο της γενετικής προδιάθεσης στη λοίμωξη από *H. pylori*. Σε μία προσπάθεια να εξεταστεί η σημασία των γενετικών παραγόντων στην απόκτηση της λοίμωξης, οι Malaty και συν. σύγκριναν την οροθετικότητα σε 100 μονοζυγωτικά και διζυγωτικά δίδυμα που ανατράφηκαν είτε μαζί, είτε χωριστά. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν πως ο συντελεστής συσχέτισης για τη σχετική σημασία της γενετικής προδιάθεσης στην απόκτηση της λοίμωξης από *H. pylori* είναι περίπου 0,66, με το υπόλοιπο της διακύμανσης να βασίζεται στην ανατροφή σε κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (20 %) και μη κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (23 %) (Malaty *et al.*, 1994). Ως αποτέλεσμα αυτής της μελέτης, οι Malaty και συν. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι γενετικοί παράγοντες επηρέασαν τη λοίμωξη από

το βακτήριο, εξ' αιτίας μεγαλύτερων ομοιοτήτων ανάμεσα στα μονοζυγωτικά δίδυμα σε συνδυασμό με το κοινό περιβάλλον ανατροφής (Malaty *et al.*, 1994).

2.6. Κλινική έκβαση της λοίμωξης από *H. pylori*

Η πλειονότητα των μολυσμένων ατόμων με *H. pylori* αναπτύσσουν επιφανειακή γαστρική φλεγμονή, ήπιας βαρύτητας (μέτρο της λεμφοκυτταρικής διήθησης) και δραστηριότητας (μέτρο της ουδετεροφιλικής διήθησης), η οποία βαίνει συνήθως ασυμπτωματικά (M. Malfertheiner *et al.*, 2015). Σε ορισμένες περιπτώσεις η μόλυνση μπορεί να εκδηλωθεί αρχικά ως οξεία φλεγμονή, με συμπτώματα ναυτίας και γαστρικών ενοχλήσεων, μεταπίπτοντας τελικά σε χρόνια ενεργό γαστρίτιδα. (M. Malfertheiner *et al.*, 2015). Εκτιμάται πως ενώ το σύνολο των μολυσμένων ατόμων εμφανίζουν γαστρίτιδα, εντούτοις σε έναν περιορισμένο αριθμό περιστατικών, της τάξης του 10-15 %, η λοίμωξη καταλήγει στη δημιουργία πεπτικού ή δωδεκαδακτυλικού έλκους, στο 1-2 % των περιπτώσεων οι φορείς αναπτύσσουν γαστρικό καρκίνο, ενώ σε λιγότερο από το 1 % των φορέων εμφανίζεται Β-κυτταρικής προέλευσης MALT λέμφωμα (M. Malfertheiner *et al.*, 2015). Μάλιστα, ήδη από το 1994 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει κατατάξει το *H. pylori* ως καρκινογόνο τύπου 1 (Parkin *et al.*, 2002).

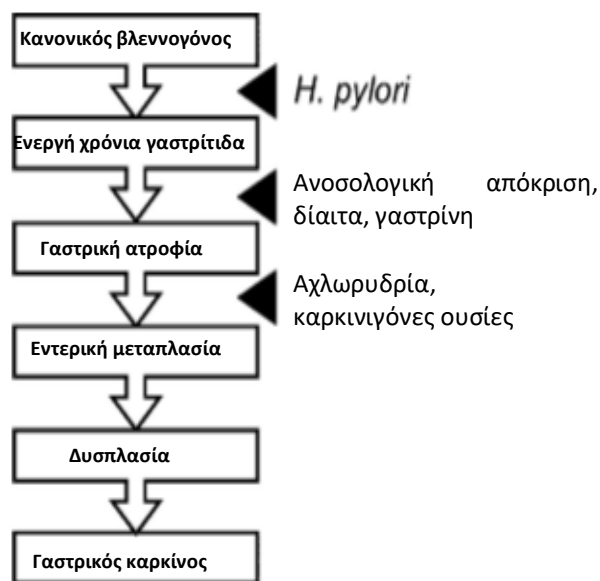


Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων που συμβάλλουν στην ανάπτυξη γαστρικών παθήσεων λόγω της λοίμωξης από *H. pylori*. (Προσαρμογή από Kusters *et al.*, 2006).

Η φλεγμονή του βλεννογόνου είναι αποτέλεσμα της ανταγωνιστικής δράσης του γαστρικού οξέος έναντι της εμμένουσας ανάπτυξης του βακτηρίου. Παράλληλα, τα επίπεδα έκκρισης του οξέος είναι καθοριστικής σημασίας τόσο για την τοπολογία όσο και τη μετέπειτα έκβαση της λοίμωξης (Εικόνα 3). Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με φυσιολογική έκκριση οξέος, το *H. pylori* αποικίζει το γαστρικό άντρο, όπου βρίσκεται μικρός αριθμός τοιχωματικών κυττάρων. Το εν λόγω πρότυπο αποικισμού συνδέεται αντίστοιχα με την ανάπτυξη καθ' υπεροχήν γαστρίτιδας άντρου. Στην περίπτωση αυτή, εκτίμηση της ιστοπαθολογίας δειγμάτων από το γαστρικό σώμα εμφανίζει περιορισμένη φλεγμονή και μικρό αριθμό αποικούντων βακτηρίων.

Ειδικότερα, έχειδειχθεί ότι η καθ' υπεροχήν γαστρίτιδα άντρου συνδέεται με την προδιάθεση για δωδεκαδακτυλικό έλκος (Conteduca *et al.* 2013). Το έλκος ορίζεται ως ασυνέχεια του βλεννογόνου, διαμέτρου τουλάχιστον 0,5cm. Δωδεκαδακτυλικά έλκη αναπτύσσονται στο βολβό του δωδεκαδακτύλου, ο οποίος αποτελεί την περιοχή που είναι περισσότερο εκτεθειμένη στο γαστρικό οξύ. Επιπλέον, γαστρικά έλκη συμβαίνουν ως επί το πλείστον, κατά μήκος του χαμηλότερου τμήματος του στομάχου, συγκεκριμένα κάτω από το σώμα, στο άντρο του βλεννογόνου (Zanten *et al.*, 1999).

Στον αντίποδα, σε άτομα στα οποία η έκκριση οξέος είναι περιορισμένη, τα βακτήρια κατανέμονται τόσο στο άντρο όσο και στο σώμα, οδηγώντας σε πανγαστρίτιδα. Η μείωση στην έκκριση οξέος μπορεί να οφείλεται, είτε σε απώλεια τοιχωματικών κυττάρων, ως αποτέλεσμα ατροφικής γαστρίτιδας, είτε σε καταστολή της λειτουργίας τους λόγω κατασταλτικών φαρμάκων, όπως είναι οι αναστολείς αντλίας πρωτονίων (PPIs) (Kuipers *et al.* 1995). Στη συνέχεια, η χρόνια πανγαστρίτιδα και ειδικότερα η καθ' υπεροχήν γαστρίτιδα σώματος, μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια της αρχιτεκτονικής του γαστρικού βλεννογόνου, συνοδευόμενη από καταστροφή των γαστρικών αδένων και αντικατάστασή τους από ινώδη ιστό (ίνωση) και επιθήλιο εντερικού τύπου (μεταπλασία). Η διαδικασία ανάπτυξης ατροφικής γαστρίτιδας και εντερικής μεταπλασίας έχει αναφερθεί περίπου στους μισούς περίπου φορείς της λοίμωξης (Kuipers *et al.*, 1995). Αρχικά, στις περιοχές όπου η λοίμωξη είναι πιο σοβαρή (Kusters *et al.*, 2006), παρατηρείται απώλεια γαστρικών αδένων (ατροφία) και παρουσία εντερικής μεταπλασίας, βλάβες οι οποίες επεκτείνονται πολυεστιακά με το χρόνο (Εικόνα 4). Παρόλο που οι ασθενείς ενδέχεται να μην εμφανίζουν συμπτωματολογία, εντούτοις αυξάνεται ο κίνδυνος γαστρικού καρκίνου από 5 έως και 90 φορές ανάλογα με το μέγεθος, την έκταση και τη σοβαρότητα της ατροφίας (Kusters *et al.*, 2006).



Εικόνα 4: Μοντέλο που αναπαριστά το ρόλο του *H. pylori* και άλλων παραγόντων στη γαστρική καρκινογένεση, βασιζόμενο στον καταρράκτη γεγονότων που πρότεινε ο Correa. (Προσαρμογή από Correa *et al*, 1975).

Η πιθανότητα εμφάνισης ατροφίας και γαστρικού καρκίνου φαίνεται ότι επηρεάζεται καταρχάς από στοιχεία γενετικής προδιάθεσης του ξενιστή και ειδικότερα από τους πολυμορφισμούς σε γονίδια της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης, όπως είναι για παράδειγμα τα γονίδια που σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή της κυτοκίνης IL-1 (El-Omar *et al.*, 2000). Επιπλέον, καθοριστική συμβολή έχει η έκφραση βακτηριακών παραγόντων παθογένειας από το *H. pylori* με έναν από τους βασικότερους την πρωτεΐνη CagA (Parsonnet *et al.*, 1997). Τέλος, λαμβάνονται υπόψιν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες αλλά και οι διατροφικές συνήθειες, όπως για παράδειγμα η κατανάλωση τροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε νάτριο (Parsonnet *et al.*, 1997).

Στις Δυτικές χώρες, η πιθανότητα ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από *H. pylori* υπολογίζεται περίπου 1 έως 2 % ενώ έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση της εμφάνισης γαστρικών εξαλλαγών τις τελευταίες δεκαετίες (Kusters *et al.*, 2006). Η μείωση αυτή είναι ανάλογη της μείωσης του επιπολασμού του *H. pylori* στις χώρες αυτές. Αντίθετα, στις αναπτυσσόμενες χώρες το 60 έως 80 % των περιστατικών γαστρικού καρκίνου έχουν συνδεθεί με την εμμένουσα παρουσία του βακτηρίου. Παρά τη μειωμένη εμφάνισή του στις Δυτικές χώρες, ο γαστρικός καρκίνος παραμένει η τέταρτη πιο συχνή μορφή κακοήθειας στον κόσμο, καθώς τα επίπεδα εμφάνισής του παραμένουν πολύ υψηλά σε περιοχές με μεγάλο πληθυσμό όπως είναι η Ανατολική Ασία και η Νότια Αμερική. Δεδομένου ότι οι τελευταίες περιοχές εμφανίζουν διαρκή

πληθυσμιακή αύξηση, αναμένεται ότι ο ετήσιος αριθμός των περιστατικών γαστρικού καρκίνου πρόκειται να αυξηθεί αρκετά τα επόμενα 20 χρόνια (Kusters *et al.*, 2006).

3. Διάγνωση

Για την ανίχνευση του *H. pylori* έχουν αναπτυχθεί αρκετές διαγνωστικές δοκιμές, οι οποίες κατατάσσονται σε επεμβατικές, οι οποίες βασίζονται σε γαστρικές βιοψίες για καλλιέργεια, ιστολογική μελέτη, μοριακές ή άλλες μεθόδους, καθώς και σε μη επεμβατικές, βασισμένες σε περιφερικά δείγματα (αίμα, ούρα κ.α.) για περαιτέρω αναλύσεις. Η επιλογή της διαγνωστικής δοκιμής για έναν συγκεκριμένο ασθενή βασίζεται στις υποδομές και στην προϊούσα εμπειρία του εκάστοτε εργαστηρίου (Vaira *et al.*, 1999). Μάλιστα, ενώ στην κλινική πράξη φαίνεται να επαρκεί η εφαρμογή μίας δοκιμής, στη βασική έρευνα ωστόσο εφαρμόζονται τουλάχιστον δύο (Zagari *et al.*, 1999).

3.1. Επεμβατικές δοκιμές

Οι επεμβατικές δοκιμές ήταν οι πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάγνωση του *H. pylori*. Το στομάχι είναι συνήθως προσβάσιμο από ενδοσκόπιο οπτικών ινών, με το οποίο συλλέγονται δείγματα βιοψίας. Σημειωτέον ότι με την κλασική τεχνολογία τα ενδοσκοπικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης δεν είναι εμφανή, καθώς ενδεχομένως να φανεί ερύθημα και οίδημα, αλλά πολύ συχνότερα δεν διακρίνεται οπτικά περαιτέρω ιστολογική αλλοίωση (Ohkusa *et al.*, 2000). Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να παρατηρηθεί θυλακιώδης γαστρίτιδα, ιδίως σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες (Rudelli *et al.*, 1996), καθώς και σοβαρές αλλοιώσεις, όπως έλκος, πολύποδες και όγκοι. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει πρόοδος για τη βελτίωση διακριτικής ικανότητας παρατήρησης των ανωμαλιών του γαστρικού βλεννογόνου με απεικόνιση στενής ζώνης (Kim *et al.*, 2004), ενδοκυτοσκοπία (Inoue *et al.*, 2004) και συνεστιακή μικροσκοπία (Kiesslich *et al.*, 2005). Η τελευταία τεχνική επέτρεψε για πρώτη φορά τον εντοπισμό του *H. pylori* με μικροσκοπική απεικόνιση επιφανείας ζωντανού ιστού κατά τη διάρκεια της ενδοσκόπησης. Χρησιμοποιώντας δύο χρωστικές αντίθεσης, τοπικά ακριφλαβίνη και ενδοφλέβια φλουορεσκίνη, με ένα ενδοσκόπιο, καθίσταται δυνατή η παρατήρηση συσσωματωμάτων βακτηρίων καθώς και μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων χρωματισμένων με την ακριφλαβίνη, τόσο στην επιφάνεια, όσο και στα βαθύτερα στρώματα του γαστρικού επιθηλίου. Η εν λόγω μελέτη αποτελεί μία πραγματική επανάσταση στις τρέχουσες δυνατότητες της διάγνωσης (Kiesslich *et al.*, 2005).

3.1.1. Καλλιέργεια

Το *H. pylori* απαιτεί ειδικά υλικά και συνθήκες για την καλλιέργειά του. Για τον λόγο αυτό, η καλλιέργεια είναι μία ακριβή διαγνωστική δοκιμασία, δύσκολη, χρονοβόρα και διενεργείται σε

περιορισμένο αριθμό κέντρων. Για την επιτυχημένη καλλιέργεια του μικροβίου από βιοψίες στομάχου ιδιαίτερη σημασία έχει ο σωστός τρόπος λήψης και μεταφοράς του δείγματος.

3.1.1.1. Συλλογή δείγματος

Τα καταλληλότερα δείγματα για την καλλιέργεια του *H. pylori* φαίνεται να είναι τα δείγματα βιοψίας τα οποία συλλέγονται κατά τη διάρκεια της ενδοσκόπησης. Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να διασφαλιστεί ότι ο ασθενής δεν έλαβε αντιβιοτικά ή αντιεκκριτικά φάρμακα, ιδιαίτερα PPIs, για διάστημα 2 εβδομάδων προ της λήψης. Παρόλο που οι PPIs δεν έχουν άμεση αντιμικροβιακή δράση στην συγκέντρωση που βρίσκονται στο γαστρικό βλεννογόνο (Megraud *et al.*, 1991), ωστόσο παρεμβαίνουν έμμεσα στην κατανομή του *H. pylori* στο στομάχι, αλλάζοντας το pH και οδηγώντας έτσι στην εξάλειψη του βακτηρίου από το άντρο. Εν προκειμένω, συστήνεται να αποφεύγεται η κατανάλωση αυτών των φαρμάκων τουλάχιστον δύο εβδομάδες πριν από την ενδοσκόπηση. Σημειώνεται ότι το αποτέλεσμα της δράσης των PPIs εξαρτάται επίσης από τη δόση και τη διάρκεια της θεραπείας, καθώς μία δόση δε θα είναι τόσο επιζήμια ούτε θα αλλάξει πρακτικά την οξύτητα του στομάχου (Megraud & Lehours, 2007).

Επιπλέον, η πιθανή επιμόλυνση των δειγμάτων της βιοψίας μέσω των ενδοσκοπίων ήταν ένα μείζον πρόβλημα στο παρελθόν, αλλά φαίνεται να επιλύεται, τουλάχιστον στις αναπτυγμένες χώρες. Μετά την ανακάλυψη των prions και των ιών, όπως του ανθρώπινου ιού της ανοσοανεπάρκειας και του ιού της ηπατίτιδας C, οι οποίοι μπορούν να μεταδοθούν μέσω των ενδοσκοπίων, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στον καθαρισμό και στην απολύμανση των τελευταίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, οι ιατρικές κοινότητες συνιστούν το χειρισμό λαβίδων μίας χρήσης, ελαττώνοντας έτσι περαιτέρω την πιθανότητα επιμολύνσεων των γαστρικών βιοψιών. Σημειώτεον ότι κάτω από μη άσηπτες συνθήκες, είναι δυνατόν να υπάρχει επιμόλυνση με το ίδιο το *H. pylori* από έναν ασθενή στον άλλο. Ήδη από προηγούμενα χρόνια, περιπτώσεις επιμολύνσεων έχουν αποδοθεί σε οξεία αχλωρυδρία στη θέση ενδοσκόπησης (Megraud and Lehours, 2007). Επιπροσθέτως, ο αριθμός και η τοπολογία λήψης των βιοψιών καθορίζουν την ευαισθησία διάγνωσης της *H. pylori* μόλυνσης. Συγκεκριμένα, δεδομένου ότι το *H. pylori* ενδέχεται να εμφανίζει ανομοιογενή κατανομή, όσα περισσότερα δείγματα αναλύονται από διαφορετικά σημεία του στομάχου, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να εντοπιστεί επιτυχώς το βακτήριο (Bayerdorffer *et al.*, 1989). Συγκεκριμένα, συνιστάται η λήψη τουλάχιστον δύο δειγμάτων από το άντρο, καθώς και το πρόσθιο και το οπίσθιο τμήμα του σώματος. Αν και συνήθως το *H. pylori* είναι παρόν σε όλες τις περιοχές σε σπάνιες περιπτώσεις το βακτήριο εντοπίζεται μόνο στο σώμα του στομάχου. Ειδικότερα, μετά την κατανάλωση αντιεκκριτικών φαρμάκων, το σώμα τείνει να παραμένει ως η μόνη θετική περιοχή στην παρουσία του βακτηρίου. (Megraud and Lehours, 2007).

3.1.1.2. Μεταφορά δειγμάτων βιοψίας

Κομβική κρίνεται η ταχεία μεταφορά των δειγμάτων από το χώρο όπου πραγματοποιήθηκε η ενδοσκόπηση, στο εργαστήριο, καθώς πολλές αποτυχημένες καλλιέργειες του βακτηρίου οφείλονται σε προβλήματα κατά το ενδιάμεσο αυτό στάδιο. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι το *H. pylori* αναπτύσσεται κάτω από αυστηρά μικροαερόφιλες συνθήκες, είναι αναγκαίο να προστατεύεται από την ξηρασία, την επαφή με το οξυγόνο, ειδικότερα όταν μεταφέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συνεπώς, είναι υποχρεωτικό οι βιοψίες να μην εκτίθενται στον ατμοσφαιρικό αέρα, και να διατηρούνται είτε σε ισότονο αλατούχο διάλυμα (Meunier *et al.*, 1997), είτε σε ειδικό μέσο μεταφοράς, αποτελούμενο συνήθως από αναγωγικό διάλυμα θειογλυκολικού ή από ημιστερέο άγαρ. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η μεταφορά πρέπει να γίνεται εντός 4 ωρών στους 4°C. Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, οι βιοψίες το *H. pylori* μπορούν να διατηρηθούν μέχρι και 24 ώρες (Grove *et al.*, 2001). Εναλλακτικά, προτείνεται η κατάψυξη και μεταφορά των βιοψιών με ξηρό πάγο στους -70°C ή σε υγρό άζωτο. (Megraud and Lehours, 2007).

3.1.1.3. Καλλιέργεια σε τρυβλία

Για την καλλιέργεια του *H. pylori* έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία διάφορα υλικά, όπως το Brain Heart άγαρ, το Columbia άγαρ ή το Chalgren Wilkins άγαρ, τα οποία περιέχουν συμπληρώματα ανάπτυξης (αίμα ή/και ορό αλόγου) και αντιβιοτικά. Το ποσοστό του αίματος ή του ορού κυμαίνεται από 5 έως και 7 % ή προτιμότερα 10 % κατ' όγκο. Τα ειδικά συμπληρώματα (αντιβιοτικά) είναι επίσης πολύ σημαντικά εξαιτίας πιθανής επιμόλυνσης, από ενδοστοματική χλωρίδα ή εντερική χλωρίδα. Επιπλέον, έχουν προταθεί διαφορετικά ειδικά συμπληρώματα που περιέχουν αντιμικροβιακά συστατικά, όπως τα εμπορικά ειδικά συμπληρώματα Skirrows και Dents που περιέχουν βανκομυκίνη, τριμεθοπρίμη, αμφοτερικίνη Β και κεφσουλοδίνη.

Αρκετά συστήματα μπορούν να εφαρμοστούν ώστε να επιτευχθούν μικροαερόφιλες συνθήκες, από τις πιο τεχνολογικά αναπτυγμένες, όπως αυτή του μικροαερόβιου ερμάριου ή του επωαστήρα με ρυθμιζόμενα επίπεδα διοξειδίου του άνθρακα. Επιπλέον, είναι δυνατή η χρήση αεροστεγών δοχείων όπου η δημιουργία των μικροαερόφιλων συνθηκών δημιουργείται, είτε με μια αυτόματη συσκευή ρύθμισης του ποσοστού υδρογόνου-διοξειδίου του άνθρακα, είτε με πακέτα παραγωγής μικροαερόφιλων συνθηκών, τα οποία μετά τη προσθήκη νερού δημιουργούν ατμόσφαιρα αυξημένων επιπέδων υδρογόνου-διοξειδίου του άνθρακα. Η ατμόσφαιρα σε αεροστεγή δοχεία, μπορεί να ποικίλει ανάλογα και με την ποσότητα των βακτηρίων που καταναλώνουν το οξυγόνο και για το λόγο αυτό, τα πακέτα μικροαερόφιλων συνθηκών θα πρέπει να αλλάζονται κάθε δεύτερη μέρα. Η ιδανική θερμοκρασία για την καλλιέργεια του *H. pylori* είναι στους 37°C, υποδεικνύοντας την προσαρμογή του βακτηρίου στον άνθρωπο (Francis Megraud *et al.*, 2013).

Στην πρωτογενή καλλιέργεια, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, μπορεί να εμφανιστούν αποικίες μετά από 3 μέρες και βρίσκονται στη βέλτιστή τους κατάσταση την τέταρτη μέρα. Παρόλα αυτά, σε περίπτωση αρνητικής καλλιέργειας, συνιστάται η επώαση για 7-10 μέρες για την επιβεβαίωση ότι η καλλιέργεια είναι αρνητική. Είναι πολύ σημαντική η υπενθύμιση ότι όταν το *H. pylori* φτάσει στο όριο ανάπτυξής του, μεταπίπτει στη κοκκοειδή μορφή και μειώνεται η βιωσιμότητά του, πιθανώς λόγω έλλειψης απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Οι περισσότεροι επιστήμονες πιστεύουν ότι αυτές οι μορφές είναι μη καλλιεργήσιμες και μη βιώσιμες, ωστόσο, κάποιοι άλλοι υποστηρίζουν ότι αποτελούν μία ανθεκτική δομή του βακτηρίου (Benaissa *et al.*, 1996). Η καλλιέργεια εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υγρασία, την επαφή με τον αέρα και τη θερμοκρασία. Εάν τηρηθούν όλες οι προϋποθέσεις, η διαγνωστική ευαισθησία της καλλιέργειας μπορεί να φτάσει το 95 %, με ειδικότητα να πλησιάζει το 100 %.

3.1.1.4. Φαινοτυπική ταυτοποίηση

Η ανάπτυξη μικρών, κυκλικών, λείων αποικιών που παρατηρείται μετά από 3 έως 4 μέρες καλλιέργειας σε ειδικά μέσα, των δειγμάτων γαστρικών βιοψιών αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο για την ταυτοποίηση του *H. pylori*. Δεν παρατηρείται αιμολυτική δραστηριότητα εύκολα, αλλά μπορεί να εμφανιστεί μετά από μερικές μέρες στους 4°C. Η μικροσκοπική εξέταση των καλλιεργηθέντων βακτηρίων μπορεί να αναδείξει μία διαφορετική μορφολογία από αυτή των βακτηρίων που είναι παρόντα στα δείγματα βιοψίας. Η βακτηριακή ταυτοποίηση, σε μεγάλο βαθμό στηρίζεται στον έλεγχο παρουσίας συγκεκριμένων ενζύμων, όπως της κυτοχρωμικής οξειδάσης, της καταλάσης και της ουρεάσης, που είναι το πιο σημαντικό ένζυμο για την ταυτοποίηση του *H. pylori*. Για την επιβίωσή του στη συγκεκριμένη οικοθέση του, το *H. pylori* παράγει μεγάλες ποσότητες αυτού του ενζύμου για να ρυθμίσει το pH και να δημιουργήσει ένα μικροπεριβάλλον ουδέτερων συνθηκών (Marshall *et al.*, 1990). Οι Mobley και συν. ανακοίνωσαν ότι μέχρι και το 6 % της συνολικής πρωτεϊνικής περιεκτικότητας μπορεί να αποτελείται από ουρεάση. Έτσι τα διαγνωστικά τεστ που βασίζονται στην ανίχνευση της ουρεάσης είναι η ταχεία δοκιμή ουρεάσης στη καλλιέργεια ή στο δείγμα βιοπτικού υλικού και το τεστ αναπνοής ουρεάσης μετά από χορήγηση από στόματος σημασμένης ουρίας, καθώς και ορολογικός ή και μοριακός έλεγχος με PCR, που στοχεύουν γονίδια της ουρεάσης (Megraud and Lehours, 2007). Άλλη μέθοδος που στηρίζεται στην ταυτοποίηση μέσω ενζυμικής αναγνώρισης αποτελεί η ταινία ApiCampy (bioMerieux) που επιτρέπει την ταυτοποίηση του *H. pylori* μέσω θετικής ανίχνευσης ουρεάσης, γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάσης, αλκαλικής φωσφατάσης και απουσία ανίχνευσης νιτρικής ρεδοукτάσης και ιππουρικού. Όταν τα βακτήρια απομονώνονται από δείγματα γαστρικών βιοψιών τα φαινοτυπικά τεστ επαρκούν για τον ακριβή προσδιορισμό. Ωστόσο, αυτό δεν είναι δυνατό όταν τα βακτήρια απομονώνονται από άλλου είδους δείγματα, όπως είναι τα κόπρανα, ο σίελος και περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς στα δείγματα αυτά μπορεί να υπάρχουν και άλλα

γνωστά και άγνωστα βακτήρια που μοιράζονται τα ίδια χαρακτηριστικά με το *H. pylori*. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητο η ταυτοποίησή του να γίνει και με μοριακές μεθόδους. Εάν χρησιμοποιείται η τεχνική της PCR, αντιδράσεις που στοχεύουν τουλάχιστον δύο διαφορετικά γονίδια πρέπει να είναι θετικές ταυτόχρονα.

3.1.1.5. Διατήρηση στελεχών

Το *H. pylori* είναι δύσκολο να διατηρηθεί. Οι αποικίες μπορούν να επιβιώσουν σε τρυβλία για μία εβδομάδα υπό την προϋπόθεση ότι επωάζονται σε μικροαερόβιες συνθήκες, στους 4°C. Για μακροχρόνια συντήρηση, τα βακτήρια πρέπει να καταψύχονται σε χαμηλή θερμοκρασία. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά μέσα, πάντα με κρυοπροστατευτικούς παράγοντες, όπως η γλυκερόλη, σε φυαλίδια κατάψυξης. Η διαδικασία ψύξης-απόψυξης είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη διαδικασία καθώς, για τα περισσότερα βακτήρια, ένα ποσοστό δεν επιβιώνει. Για το λόγο αυτό, για την διαδικασία ψύξης είναι υποχρεωτική η χρήση βακτηρίων που βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης κατά την οποία είναι και πιθανότερη η επιβίωσή τους. Τα παγωμένα δείγματα *H. pylori* μπορούν να διατηρηθούν για δεκαετίες στους -70°C. Η ψύξη τους στους -20°C είναι ανεπαρκής και η λυοφιλίωσή τους δύσκολη. Απώλεια βιωσιμότητας παρατηρείται ιδιαίτερα κατά τη φάση της αφυδάτωσης (Owen *et al.*, 1989). Η αποθήκευση λυοφιλιωμένων φυαλιδίων στους 4°C μπορεί να βοηθήσει τη βακτηριακή επιβίωση (Spengler *et al.*, 1992).

3.1.2. Ιστοπαθολογική διάγνωση

Αυτή η μέθοδος διάγνωσης είναι μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες, τουλάχιστον στις χώρες στις οποίες η ενδοσκόπηση χρησιμοποιείται συστηματικά. Οι γαστρεντερολόγοι έχουν μακρά παράδοση συνεργασίας με τους παθολόγους σε αντίθεση με τους μικροβιολόγους (Megraud and Lehours, 2007). Για την ιστοπαθολογική ανίχνευση τα δείγματα βιοψίας πρέπει να εισάγονται αμέσως σε ένα μέσο που περιέχει 10 % φορμαλδεΐδη. Στη συνέχεια η μεταφορά μπορεί να γίνει σε θερμοκρασία δωματίου (Megraud and Lehours, 2007). Το μέσο διατηρεί τη μορφολογία του βακτηρίου ενώ υπάρχει δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν πολλές χρωστικές. Παρόλα αυτά, μετά από μία εβδομάδα αποθήκευσης σε φορμαλδεΐδη, η διάγνωση γίνεται δύσκολη (Fich *et al.*, 1989).

Αν και έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες χρώσεις για την ανίχνευση του *H. pylori* σε ιστολογικά παρασκευάσματα, σήμερα χρησιμοποιούνται συνήθως, η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και η τροποποιημένη Wright-Giemsa. Οι άλλες χρώσεις που κατά καιρούς εφαρμόστηκαν είναι η τεχνική του λευκόχρυσου (Warthin-Starry), η χρώση κατά Gram, η χρώση Giemsa, Gimenez και χρώση πορτοκαλί της ακριδίνης. Στη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης το *H. pylori* ανιχνεύεται στο 85 % των περιπτώσεων και στις πιο ειδικές χρώσεις το ποσοστό ανίχνευσης ανέρχεται στο 99 %. Η παρουσία του είναι δυνατόν να πιστοποιηθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και με *in situ* υβριδισμό, καθώς και σε κυτταρολογικά επιχρίσματα από γαστρικό βλεννογόνο.

Σε όλες τις ιστολογικές εξετάσεις του γαστρικού βλεννογόνου θεωρείται απαραίτητη η αναφορά της παρουσίας ή μη του *H. pylori*. Αυτό είναι εύκολο να παρατηρηθεί με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση του *H. pylori* σε υπερήλικες ασθενείς, σε περιπτώσεις υποχλωρδρίας, με εκτεταμένη εντερική μεταπλασία του γαστρικού βλεννογόνου και σε ασθενείς που προηγήθηκε λήψη αντιβιοτικών είναι πολύ δύσκολη. Η λήψη δύο δειγμάτων βιοψίας από το άντρο και δύο από το σώμα, αυξάνει τη δυνατότητα ανίχνευσης (Dixon *et al.*, 1996).

Το σύστημα ταξινόμησης και περιγραφής της γαστρίτιδας που έχει προταθεί από παθολογοανατόμους και γαστρεντερολόγους και που έχει επικρατήσει είναι το τροποποιημένο σύστημα κατά Sydney (Dixon *et al.*, 1996). Η ταξινόμηση αυτή απαιτεί πέντε βιοψίες, δύο από το σώμα, δύο από το άντρο και μία από τη γωνία του στομάχου και αξιολογεί τη **βαρύτητα** (αριθμός λεμφοκυττάρων που εισβάλλουν στο χόριο) και **δραστηριότητα** (αριθμός ουδετεροφίλων στο χόριο) της επαγόμενης φλεγμονής, καθώς και τον **αριθμό *H. pylori***. Για την αξιολόγηση των ανωτέρω χρησιμοποιείται κλίμακα διαβάθμισης-απουσία, ήπια, μέτρια και ικανή. Επιπλέον, αξιολογείται προσεκτικά η παρουσία ή απουσία **ατροφίας** (απώλεια οξυντικών τοιχωματικών κυττάρων) και **εντερικής μεταπλασίας** (αντικατάσταση των επιθηλιακών γαστρικών κυττάρων με κύτταρα εντερικού φαινοτύπου). Άλλα στοιχεία που συνεκτιμώνται στη βιοψία είναι η ύπαρξη κοκκιωμάτων, λεμφοζιδίων, ηωσινόφιλων πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και τα ενδοεπιθηλιακών λεμφοκυττάρων. Το συγκεκριμένο σύστημα ταξινόμησης της γαστρίτιδας δίνει έμφαση στη σημασία του συνδυασμού τοπογραφικών, μορφολογικών και αιτιολογικών πληροφοριών σε ένα σχήμα το οποίο παρουσιάζει αναπαραγώγιμες και κλινικά χρήσιμες διαγνώσεις (Dixon *et al.*, 1996).

3.1.3. Δοκιμασία ουρεάσης

Η δοκιμασία ουρεάσης χρησιμοποιείται ευρέως επειδή είναι απλή, χαμηλού κόστους και εύκολη στην πραγματοποίησή της (Binek *et al.*, 1999), καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί αμέσως στο χώρο της ενδοσκόπησης και δίνει γρήγορο αποτέλεσμα. Η δοκιμασία ουρεάσης εφαρμόστηκε αρχικά από τους McNulty και Wise για άμεση και γρήγορη διάγνωση (McNulty & Wise, 1985). Βακτήρια θετικά σε παραγωγή ουρεάσης που απομονώνονται από το γαστρικό βλεννογόνο, όπως οι στρεπτόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι, παράγουν μικρότερες ποσότητες ουρεάσης, οι οποίες δεν παρεμβαίνουν στη σύντομη ανίχνευση, καθιστώντας τη μέθοδο αυτή ειδική για το *H. pylori*. Η αρχή της μεθόδου ανίχνευσης με την αντίδραση ουρεάσης βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου να διασπά την ουρία σε διοξείδιο του άνθρακα και αμμωνία, καθώς τα ιόντα αμμωνίας είναι υπεύθυνα για την αύξηση του *pH* και επομένως την αλλαγή χρώματος του δείκτη *pH* ερυθρού της φαινόλης από κίτρινο σε κόκκινο ή και μωβ (Megraud and Lehours, 2007).

3.2. Μη επεμβατικές τεχνικές

Παρά το γεγονός ότι η άμεση διάγνωση του *H. pylori* μέσω της ενδοσκόπησης έχει αποδειχθεί πολύτιμη και η συγκεκριμένη μέθοδος θεωρείται η μέθοδος αναφοράς από πολλούς, έχει κάποια μειονεκτήματα τα οποία οδήγησαν στην ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων. Το κύριο πρόβλημα είναι συνυφασμένο με τη διεισδυτικότητα της μεθόδου. Παρόλο που υπάρχουν μικρά ενδοσκόπια όπως είναι τα νανο-γαστρικά, η διαδικασία παραμένει άβολη και ένας μεγάλος αριθμός ασθενών επιθυμεί να την αποφύγει. Υπάρχει η δυνατότητα χρήσης αναισθησίας, η οποία όμως αυξάνει τον κίνδυνο της διαδικασίας, ο οποίος αν και πολύ χαμηλός θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Ο κίνδυνος επιμολύνσεων από ιούς, όπως ο ανθρώπινος ιός της ανοσοανεπάρκειας ή ο ιός της Ηπατίτιδας C, αν και θεωρητικά δεν υπάρχει, αποτελεί απειλή για ορισμένους ασθενείς. Επιπλέον, το κόστος της ενδοσκόπησης είναι υψηλό και επιβαρύνεται ακόμα περισσότερο αν πραγματοποιηθεί αναισθησία. Υπάρχει ανάγκη για αναλώσιμα υλικά και ο ασθενής χάνει τουλάχιστον μία μέρα από τη δουλειά του. Άλλος ένας περιορισμός της άμεσης διάγνωσης είναι ότι ερευνά μόνο ένα μικρό μέρος του στομάχου. Έτσι υπάρχει πιθανότητα λάθους ενώ ο ασθενής μπορεί να χρειαστεί να υποβληθεί σε αρκετές ενδοσκοπήσεις. Από την ανακάλυψη του *H. pylori*, η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ορολογική ανίχνευση. Ωστόσο, λόγω της δυσκολίας να επιτευχθεί η βέλτιστη ειδικότητα έχουν προταθεί άλλες μέθοδοι προσδιορισμού ειδικών αντιγόνων στα ούρα ή τον σίελο (Megraud and Lehours, 2007).

3.2.1. Ανίχνευση αντισωμάτων

Η μόλυνση από *H. pylori* προκαλεί αμέσως μία ειδική συστηματική ανοσολογική απόκριση, η οποία συνήθως αντικατοπτρίζει την παραγωγή αντισωμάτων στο γαστρικό βλεννογόνο. Μόνο 2 % των ασθενών δεν εμφανίζει ορομετατροπή (Kuipers *et al.*, 1993). Η απόκριση αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη διάγνωση της μόλυνσης όταν ανακαλύφθηκε το *H. pylori*. Η ανοσολογική απόκριση διαφέρει ανάλογα με τα αντιγόνα που υπάρχουν στο στέλεχος και τον ξενιστή. Αρχικά, εμφανίζονται τα ειδικά IgM και IgA αντισώματα, τα οποία μετέπειτα δίνουν θέση στα ειδικά IgG αντισώματα. Ο προσδιορισμός των αντισωμάτων στον ορό γίνεται με ορολογικές μεθόδους, σχετικά γρήγορες, απλές και λιγότερο δαπανηρές από της επεμβατικές τεχνικές. Από όλες τις ορολογικές μεθόδους που υπάρχουν, οι ανοσοενζυμικές (ELISA) παρουσιάζουν τα περισσότερα πλεονεκτήματα. Όμως, η απόδοση της ELISA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση των αντιγόνων που χρησιμοποιούνται. Θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ανοσογονικά, να παρουσιάζουν ιδιαίτερα ικανοποιητική ικανότητα πρόσδεσης στις κυψελίδες της πλάκας και να παραμένουν σταθερά κατά την αποθήκευση. Οι περισσότερες εμπορικές ELISA χρησιμοποιούν ένα μείγμα ειδικών αντιγόνων για τα οποία η ακριβής σύνθεση είναι πατενταρισμένη. Γενικώς, η απόδοση των kits του εμπορίου προσεγγίζουν τυπικά το 90 % τόσο σε ευαισθησία όσο και σε ειδικότητα.

Ιδιαίτερη σημασία, για ερευνητικούς σκοπούς κυρίως, έχουν τα ορολογικά τεστ για τον εντοπισμό αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης CagA με βάση τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως όταν αυτά τα ορολογικά τεστ χρησιμοποιήθηκαν σε ορό από ασθενείς με γαστρικό αδενοκαρκίνωμα, εντοπίστηκαν περισσότερες περιπτώσεις σε σύγκριση με την κλασική ELISA για το *H. pylori*. Αυτό συνέβη πιθανώς επειδή η CagA είναι ένα πολύ ανοσογονικό μόριο, οπότε τα αντίστοιχα αντισώματα παραμένουν για μεγάλες χρονικές περιόδους (Ekstrom *et al.*, 2001).

Τα ειδικά IgG αντισώματα για το *H. pylori* εξαλείφονται στα ούρα. Οι Alemohammad και συν. παρουσίασαν το 1993 τα πρώτα δεδομένα χρησιμοποιώντας ELISA και ανοσοαποτύπωση. Στην Ιαπωνία έχουν αναπτυχθεί ορισμένα ιδιαίτερα εμπορικά τεστ, μία κλασική ELISA και μία εξέταση που βασίζεται στην ανοσοχρωματογραφία με ικανοποιητική ευαισθησία αλλά όχι τόσο καλή ειδικότητα (Katsuragi *et al.*, 1998). Επιπρόσθετα, οι περισσότερες μελέτες πραγματοποιήθηκαν στην Ασία, οπότε στη Δύση θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη άλλες παράμετροι δεδομένης της διαφοράς των στελεχών μεταξύ Δύσης και Ασίας (Megraud and Lehours, 2007).

Τα αντισώματα που υπάρχουν στο σάλιο εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των μολυσματικών παραγόντων του *H. pylori*. Παραδόξως, για τα ειδικά IgA για το *H. pylori* δε φαίνονταν διαφορές ανάμεσα σε ασθενείς και μη μολυσμένα άτομα, σε αντίθεση με τα IgG (Luzza *et al.*, 1995). Ωστόσο, η ευαισθησία και η ειδικότητα των μεθόδων που προκύπτουν από τις προαναφερθείσες μελέτες είναι συνήθως χαμηλή και σπανίως αγγίζει το 90 % (Megraud and Lehours, 2007).

Τελευταία, η ανίχνευση αντισωμάτων *H. pylori* στα κόπρανα με την τεχνική της ELISA είχε 94,1 % ευαισθησία και 91,8 % ειδικότητα. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του *H. pylori* επικαλυμμένα σε κυψελίδες για τον εντοπισμό των *H. pylori* αντιγόνων και πολυκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση για τον εντοπισμό του ανοσοσυμπλόκου. Η ανίχνευση των αντισωμάτων στα κόπρανα όμως έχει και κάποιους περιορισμούς. Η επίδραση των κινήσεων του εντέρου δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Ένα μικρό διάστημα διέλευσης από το έντερο ευνοεί την εξάλειψη των αναλλοίωτων αντισωμάτων, ενώ η δυσκοιλιότητα οδηγεί σε αποικοδόμηση των αντιγόνων. Η αποθήκευση των δειγμάτων κοπράνων δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο (Megraud and Lehours, 2007).

4. Θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori*

Η επιτυχία της θεραπευτικής αγωγής στην λοίμωξη από *H. pylori* φαίνεται να εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων όπως το σχήμα αντιβιοτικών ουσιών που χορηγείται, η δόση, η συχνότητα και η διάρκεια χορήγησης τους. Δευτερευόντως όμως, καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της εκρίζωσης είναι, αφ' ενός η συμμόρφωση του ασθενούς στην φαρμακευτική αγωγή, αφ' ετέρου δε,

η ενδεχόμενη ανάπτυξη αντοχής έναντι των χορηγούμενων αντιβιοτικών σκευασμάτων. Για το λόγο αυτό, επί σειρά ετών, ανά τακτά διαστήματα δημοσιεύονται κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ομάδας Μελέτης του *H. pylori* για την εκκρίζωση του εν λόγω βακτηρίου, γνωστές ως κατευθυντήριες οδηγίες Maastricht, από το όνομα της πόλης που φιλοξένησε την πρώτη συνάντηση Ομοφωνίας (Malfertheiner *et al.*, 1997). Ακολούθησαν άλλες 4 αναθεωρήσεις των κατευθυντηρίων Οδηγιών (Malfertheiner *et al.*, 2002), (Malfertheiner *et al.*, 2005), (Malfertheiner *et al.*, 2007), (Malfertheiner *et al.*, 2012). Βάσει της τελευταίας συνάντησης Ομοφωνίας (Maastricht V/Florence Consensus Report)-(Malfertheiner *et al.*, 2017), προτείνονται θεραπευτικά σχήματα πρώτης, δεύτερης και τρίτης γραμμής για την αντιμετώπιση της λοίμωξης. Καταρχάς, ως θεραπεία πρώτης επιλογής για την αντιμετώπιση της *H. pylori*-λοίμωξης έχει προταθεί το λεγόμενο τριπλό θεραπευτικό σχήμα. Η αγωγή αυτή περιλαμβάνει έναν αναστολέα αντλίας πρωτονίων (PPIs), σε δοσολογία τέτοια ώστε να καταστέλλει πλήρως τη γαστρική έκκριση, καθώς και 2 αντιβιοτικά, συνήθως κλαριθρομυκίνη και αμοξυκιλλίνη ή μετρονιδαζόλη, χορηγούμενα δύο φορές ημερησίως, για 10-14 ημέρες.

Παρόλα αυτά, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα του παραπάνω συνδυασμού έχει ελαττωθεί σε επίπεδα μικρότερα από το 80 %, ποσοστό το οποίο είχε τεθεί αρχικά ως στόχος. Σημειωτέον ότι, ενώ δεν έχει αναπτυχθεί κάποιο καινούριο φάρμακο, έχουν ωστόσο πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιούνται διαφορετικοί συνδυασμοί γνωστών φαρμάκων. Η τριπλή θεραπεία με PPIs, κλαριθρομυκίνη και αμοξυκιλλίνη, χωρίς να προηγηθεί δοκιμασία αντοχής, συστήνεται ότι πρέπει να εγκαταλείπεται όταν τα ποσοστά αντοχής στην κλαριθρομυκίνη σε μία περιοχή είναι μεγαλύτερα από 15-20 % (Goderska *et al.*, 2018).

Υπάρχουν αρκετοί λόγοι που εξηγούν τη μείωση της αποτελεσματικότητας της τριπλής θεραπείας, όπως είναι η μη συμμόρφωση του ασθενούς στην αγωγή, η υψηλή γαστρική οξύτητα, ο τύπος των στελεχών και ο πιο σημαντικός, η αύξηση της αντοχής του *H. pylori* στα αντιβιοτικά και ειδικά στην κλαριθρομυκίνη. Η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη στην Ευρώπη αυξήθηκε από 9 % το 1998 σε 17,5 % το διάστημα 2008-2009 (Megraud *et al.*, 2013). Στην Ελλάδα, η αντοχή σε ενήλικες ασθενείς στην κλαριθρομυκίνη έχει αυξηθεί σημαντικά από το 1998, όπου τα επίπεδα αντοχής ήταν 2,3 % μέχρι σήμερα που έχει φθάσει στο 27,2 % (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2015). Αυτή η ταχεία ανάπτυξη της αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη στην Ελλάδα και το γεγονός ότι έχει ξεπεράσει το όριο του 20 %, κατατάσσει την Ελλάδα στις χώρες με υψηλά ποσοστά αντοχής στο αντιβιοτικό αυτό (Papastergiou *et al.*, 2014). Από την άλλη, στις χώρες της βόρειας Ευρώπης το ποσοστό αυτό είναι μικρότερο από 10%, το οποίο θεωρείται εκτιμάται ως χαμηλό.

Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) προτείνει την αξιολόγηση των φαρμακολογικών σκευασμάτων, τα οποία συστήνονται για την αντιμετώπιση των βακτηριακών παθογόνων, ανάλογα με την αντοχή τους σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Πιο συγκεκριμένα, τα παθογόνα

κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες σύμφωνα με το ποσοστό ευαισθησίας τους στα εν λόγω σκευάσματα, ήτοι: 1) Ευαίσθητα (0-10 % αντοχή), 2) Μετρίως Ευαίσθητα (10-50 % αντοχή) και 3) Ανθεκτικά (>50 % αντοχή). Το *H. pylori*, όσον αφορά την αντοχή του στην κλαριθρομυκίνη, ανήκει στη δεύτερη κατηγορία, με εξαίρεση τις χώρες της βόρειας Ευρώπης και για το λόγο αυτό έχει προταθεί διαφοροποίηση της θεραπείας σύμφωνα με την αντοχή του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη, για τη συγκεκριμένη περιοχή.

4.1. Περιοχές με χαμηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη

4.1.1. Θεραπεία πρώτης γραμμής

Σε αυτές τις περιοχές, η βασική τριπλή θεραπεία PPIs-κλαριθρομυκίνη και αμοξυκιλλίνη (PCA) προτείνεται ακόμα ως θεραπεία πρώτης γραμμής. Έχουν προταθεί ωστόσο διάφοροι τρόποι για τη βελτίωση αυτής της θεραπείας, όπως είναι η αύξηση της δόσης των PPIs. Μάλιστα, ενδείξεις οι οποίες προκύπτουν από διάφορες έρευνες, καταδεικνύουν ότι η υψηλή δόση των PPIs ήταν απαραίτητη για την αποτελεσματικότητα των διπλών θεραπειών. Επιπλέον, η παράταση της θεραπείας έχει βρεθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά εκκρίζωσης του *H. pylori*. Επί τούτω, τέσσερις ανεξάρτητες μετα-αναλύσεις (Calvet et al, 2000), (Fuccio et al., 2007) καταλήγουν στα ίδια αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, συμπέραναν ότι μία 10-ήμερη θεραπεία βελτιώνει το ποσοστό εκκρίζωσης του βακτηρίου κατά 4 % ενώ μία 14-ήμερη παρουσιάζει βελτίωση κατά 5-6 %. Παράλληλα, δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά, όσον αφορά τα ποσοστά των παρενεργειών ανάμεσα στις διαφορετικές χρονικές περιόδους θεραπείας. Παρ' όλο που η διαφορά στην αποτελεσματικότητα εμφανίζεται στατιστικά σημαντική, μπορεί να ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες, όπως το κόστος. Ακόμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μετρονιδαζόλη (PCM) αντί της αμοξυκιλλίνης ως δεύτερο αντιβιοτικό. Οι αναλύσεις για τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας των δύο σχημάτων PCA και PCM παρουσίασαν μικρές, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η λακτοφερρίνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της θεραπείας του *H. pylori* ενώ δύο διαφορετικές μετα-αναλύσεις συνηγορούν στο γεγονός ότι η λακτοφερρίνη αυξάνει την αποτελεσματικότητα της τριπλής θεραπείας (Di Mario et al., 2003). Τέλος, άλλοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη θεραπεία περιλαμβάνουν τη μειωμένη γαστρική ροή του αίματος, τη μείωση του εσω-γαστρικού pH σε περιπτώσεις καπνιστών καθώς και η κακή συμμόρφωση του ασθενούς στην αγωγή (Malfertheiner et al., 2017).

4.1.2. Θεραπεία δεύτερης γραμμής

Κατά τη θεραπεία δεύτερης γραμμής αναμένεται η εγκατάλειψη της κλαριθρομυκίνης, δεδομένου ότι είναι πιθανό από την αγωγή πρώτης γραμμής να έχει προκύψει επιλογή στελεχών με αντοχή στο αντιβιοτικό αυτό. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η τριπλή θεραπεία πρώτης γραμμής,

όταν ακολουθείται από τετραπλή θεραπεία, η οποία περιλαμβάνει PPIs, τρία διαφορετικά αντιβιοτικά, με παράλληλη χρήση ή μη βισμούθιου, παρουσιάζει υψηλά ποσοστά εκκρίωσης του βακτηρίου (J P Gisbert *et al.*, 2015).

Η τετραπλή θεραπεία καλύπτει τις προϋποθέσεις για θεραπεία δεύτερης γραμμής, καθώς δεν περιλαμβάνει κλαριθρομυκίνη και ως εκ τούτου δεν επηρεάζεται από την αντοχή στο εν λόγω αντιβιοτικό, εμφανίζεται αποτελεσματική στα περισσότερα μέρη του κόσμου, υπό την προϋπόθεση ότι ο ασθενής τηρεί ανελλιπώς την αγωγή (Malfertheiner *et al.*, 2017). Παράλληλα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια 10-ήμερη αγωγή με PPIs-λεβοφλοξασίνη-αμοξυκιλλίνη, ως μία εναλλακτική λύση για τη θεραπεία δεύτερης γραμμής (Malfertheiner *et al.*, 2017).

Σημειωτέον ότι η ταχεία απόκτηση αντοχής στη λεβοφλοξασίνη μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα που θα έχει στο μέλλον αυτή η θεραπεία. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η λεβοφλοξασίνη να μην χορηγείται σε ασθενείς με χρόνιες λοιμώδεις βρογχοπνευμονοπάθειες, για τις οποίες είναι πιθανό να έχουν χορηγηθεί ήδη κινολόνες (Malfertheiner *et al.*, 2017).

4.1.3. Θεραπεία τρίτης γραμμής

Μετά από δύο αποτυχημένες προσπάθειες εκκρίωσης προτείνεται η συνταγογράφηση αντιβιοτικών, τα οποία δεν χρησιμοποιήθηκαν στις δύο προηγούμενες θεραπείες. Για το σκοπό αυτό, κρίνεται απαραίτητη η λήψη βιοψίας από τον ασθενή, με σκοπό την καλλιέργεια και τη διενέργεια δοκιμασίας αντοχής σε διάφορα αντιβιοτικά, έτσι ώστε να προσδιοριστεί το κατάλληλο σχήμα για την εκκρίωση του βακτηρίου (Malfertheiner *et al.*, 2017).

4.2. Περιοχές με υψηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη

4.2.1. Θεραπεία πρώτης γραμμής

Σε περιοχές με υψηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη, οι τετραπλές θεραπείες που περιλαμβάνουν βισμούθιο αποτελούν την πρωταρχική επιλογή. Παράλληλα, σημαντική κρίνεται η αποφυγή της κλαριθρομυκίνης, η οποία χρησιμοποιείται στις κλασικές αγωγές. Το θεραπευτικό σχήμα προτείνει άλατα βισμούθιου, για τα οποία δεν υπάρχουν ενδείξεις αντοχής του βακτηρίου, τετρακυκλίνη, στην οποία η αντοχή είναι σπάνια στην Ευρώπη και μετρονιδαζόλη, για την οποία η *in vitro* αντοχή εμφανίζεται συχνότερα αλλά μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της δόσης και την επιμήκυνση της διάρκειας της θεραπείας. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει θετικά αποτελέσματα με αυτά τα θεραπευτικά σχήματα. Επιπλέον, παρά το μεγάλο αριθμό των φαρμάκων, η συμμόρφωση των ασθενών συνήθως είναι ικανοποιητική και τα σχήματα που περιέχουν βισμούθιο δεν

προκαλούν περισσότερες παρενέργειες απ' ό,τι το κλασικό τριπλό σχήμα με κλαριθρομυκίνη. Ωστόσο, τα φάρμακα με βισμούθιο μπορεί να μην είναι διαθέσιμα σε μερικές περιοχές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η τετραπλή θεραπεία χωρίς βισμούθιο, ή αλλιώς ταυτόχρονη, θεωρείται ικανοποιητική εναλλακτική επιλογή (Malfertheiner *et al.*, 2017).

4.2.2. Θεραπεία δεύτερης γραμμής

Μετά την πρώτη αποτυχημένη προσπάθεια εκρίζωσης προτείνεται η χρήση του τριπλού σχήματος με PPIs και λεβοφλοξασίνη. Ωστόσο, λόγω της αυξανόμενης αντοχής σε αυτό το αντιβιοτικό, συστήνεται προσεκτική του χρήση (Malfertheiner *et al.*, 2017).

4.2.3. Θεραπεία τρίτης γραμμής

Η πρόταση για την θεραπεία τρίτης γραμμής είναι η ίδια με αυτήν που προτείνεται σε περιοχές με χαμηλή αντοχή στην κλαριθρομυκίνη (Malfertheiner *et al.*, 2017)

Στην Ελλάδα κατόπιν προτάσεων της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου του Πυλωρού Λοιμών Λοιμώξεων του Πεπτικού (ΕΜΕΛΟΠ), από τις 20 Μαΐου του 2015 (<http://www.eopyy.gov.gr>), καταρτίστηκαν οι εξής κατευθυντήριες οδηγίες για την εκρίζωση του *H. pylori*:

1. Η αγωγή για την εκρίζωση του *H. pylori* παρέχεται από ιατρό, γαστρεντερολόγο, παιδίατρο, παθολόγο, γενικής ιατρικής ή γενικής χειρουργικής, μετά από θετικές δοκιμασίες ανίχνευσης του βακτηρίου. Η συνταγογράφηση της αγωγής δεν εξαρτάται από την παρουσία ή μη πεπτικού έλκους. Ως κωδικός διάγνωσης ICD10 τίθεται ο B98 ή B98.0 και καλύπτει όλα τα φάρμακα των θεραπευτικών σχημάτων που αναφέρονται στη συνέχεια.
2. Σύμφωνα με τις προτάσεις της ΕΜΕΛΟΠ, λόγω υψηλών ποσοστών αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη (>20 %), προτείνονται τα εξής θεραπευτικά σχήματα.
 1. Αγωγή πρώτης γραμμής: Ένα από τα εξής σχήματα:
 - i. Διαδοχικό σχήμα: PPI x2 + αμοξυκιλλίνη 1g x2 για 5-7 ημέρες. Ακολούθως PPI x2 + κλαριθρομυκίνη 500 mg x2 + μετρονιδαζόλη 500 mg x2 για άλλες 5-7 ημέρες.
 - ii. Ταυτόχρονο σχήμα: PPI x2 + αμοξυκιλλίνη 1g x2 + κλαριθρομυκίνη 500 mg x2 + μετρονιδαζόλη 500 mg x2 για 10-14 ημέρες.

- iii. Υβριδικό σχήμα: PPI x2 + αμοξυκιλλίνη 1g x2 για 7 ημέρες. Ακολούθως PPI x2 + αμοξυκιλλίνη 1g x2 + κλαριθρομυκίνη 500 mg x2 + μετρονιδαζόλη 500 mg x2 για άλλες 7 ημέρες.

2. Αγωγή δεύτερης γραμμής (μετά από αποτυχία της θεραπείας πρώτης γραμμής):

- i. PPI x2 + αμοξυκιλλίνη 1g x2 + λεβοφλοξασίνη 500 mg x2 για 10 ημέρες.

Μετά από αποτυχία και της θεραπείας δεύτερης γραμμής συνιστάται λήψη δείγματος και πραγματοποίηση καλλιέργειας.

5. ANTOXH TOY *H. PYLORI* ΣΤΑ ANTIBIOTIKA

Όπως προαναφέρθηκε, η επιτυχία εκρίζωσης του *H. pylori* επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, όπως ο συνδυασμός των αντιβιοτικών σχημάτων που χορηγούνται, η δόση, η συχνότητα, η διάρκεια χορήγησης και η συμμόρφωση του ασθενούς. Η πλέον όμως, καθοριστική παράμετρος τείνει να είναι η ανάπτυξη αντοχής του βακτηρίου έναντι των χορηγούμενων φαρμακευτικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση. Πρόσφατα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), δημοσίευσε έναν κατάλογο με είδη βακτηρίων, για τα οποία είναι επιτακτική η χρήση νέων αντιβιοτικών. Ανάμεσα σε 12 ταξινομικές οικογένειες, ομαδοποιημένες κατά προτεραιότητα (κρίσιμη, υψηλή και μέση), τα στελέχη του *H. pylori* με αντοχή στην κλαριθρομυκίνη περιλαμβάνονται στην ομάδα υψηλής προτεραιότητας (WHO, Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017).

Στη βιβλιογραφία, η αντοχή στα αντιβιοτικά ορίζεται ποικιλοτρόπως, ενώ αφορά τόσο σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως επι παραδείγματι ο ρυθμός αύξησης, όσο και σε γονοτυπικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων, όπως η παρουσία ή/και έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Η αντοχή ορίζεται επιπλέον, ως προς την προέλευσή της, σε *ενδογενή* και *επίκτητη*, αλλά και ως προς τον τύπο της, σε *απλή*, *πολλαπλή* και *διασταυρούμενη*. Καθώς δεν υπάρχει ένας κοινά αποδεκτός ορισμός, η βακτηριακή αντοχή στα αντιβιοτικά είναι αναγκαίο να πληροί τα εξής κριτήρια (Davison *et al.*, 2000):

- Η αντοχή πρέπει να περιγράφεται ως μία ποσοτικοποιήσιμη μεταβλητή ως προς τον αριθμό των βακτηρίων συγκριτικά με έναν πληθυσμό αναφοράς
- Η μέθοδος ταυτοποίησης της αντοχής πρέπει να χαρακτηρίζεται από ευαισθησία, ειδικότητα και επαναληψιμότητα
- Οι πληθυσμοί του βακτηρίου πρέπει να προσδιορίζονται με ακρίβεια
- Το πλαίσιο της δειγματοληψίας πρέπει να καθορίζεται επακριβώς, καθορίζοντας τον τρόπο επιλογής των δειγμάτων από πληθυσμούς βακτηρίων, των κυττάρων του ξενιστή ή από το περιβάλλον

Τα ποσοστά της αντοχής του *H. pylori* στα αντιβιοτικά ποικίλλουν γεωγραφικά ενώ σε πολλές χώρες εμφανίζουν συν τω χρόνω αυξητικές τάσεις. Παράλληλα, τα ποσοστά εκκρίωσης του βακτηρίου φθίνουν διαρκώς σε παγκόσμιο επίπεδο. Η αντοχή εμφανίζεται γενικά υψηλότερη σε αναπτυσσόμενες χώρες ή σε περιπτώσεις όπου η χρήση αντιβιοτικών γίνεται άνευ συνταγογράφησης. Υψηλά ποσοστά αντοχής ωστόσο έχουν καταγραφεί σε ασθενείς αναπτυγμένων χωρών, όπως είναι η Γαλλία (Ducourneau *et al.*, 2016) και οι ΗΠΑ (Cen *et al.*, 2018), ειδικότερα κατόπιν ανεπιτυχούς θεραπείας. Σημειώνεται πως τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για λοιμώξεις βακτηρίων εκτός του *H. pylori* ενοχοποιούνται επίσης για την ανάπτυξη της αντοχής του βακτηρίου.

Η αντοχή στα αντιβιοτικά διαφοροποιείται επίσης ανάλογα με την ηλικία, καθώς τα παιδιά συνήθως εμφανίζουν υψηλότερη αντοχή στην κλαριθρομυκίνη και χαμηλότερη στη λεβοφλοξασίνη. Επιπλέον, έχουν καταγραφεί υψηλότερα επίπεδα αντοχής σε ασθενείς, στους οποίους έχει προηγηθεί μη επιτυχημένη θεραπεία εκκρίωσης, συγκριτικά με αυτούς που υποβάλλονται σε θεραπεία για πρώτη φορά (Boyanova *et al.*, 2016).

Η θεραπεία ενάντια στο *H. pylori* αποδεικνύεται όλο και δυσκολότερη τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της ραγδαίας μείωσης της αποτελεσματικότητας των κλασικών θεραπειών εκκρίωσης. Παρόλο που ένα στέλεχος *H. pylori* μπορεί να εμφανίσει *in vitro* ευαισθησία σε πολλά αντιβιοτικά, μόνο μερικά από αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν *in vivo* για την εκκρίωσή του. Παράλληλα, οι διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους το *H. pylori* αποκτά αντοχή στα διάφορα αντιβιοτικά δυσχεραίνουν τον προσδιορισμό της αντοχής του στην εκάστοτε αντιμικροβιακή ουσία (Boyanova *et al.*, 2016). Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται οι τρόποι δράσης των κυριότερων αντιβιοτικών, τα οποία χρησιμοποιούνται ενάντια στο *H. pylori* καθώς και οι μηχανισμοί αντοχής του βακτηρίου απέναντι σε αυτά. Για κάθε αντιβιοτικό που χορηγείται για την εκκρίωση του *H. pylori*, ακολουθεί ανασκόπηση των ποσοστών αντοχής του βακτηρίου καθώς και περιγραφή των οδών δράσης της ουσίας. Επιπλέον γίνεται αναφορά στους μηχανισμούς ανάπτυξης αντοχής του βακτηρίου απέναντι στο κάθε αντιβιοτικό.

5.1. Κλαριθρομυκίνη

Την περασμένη δεκαετία, ανάμεσα στα αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του *H. pylori*, παρατηρήθηκε ότι η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη αυξήθηκε προοδευτικά σε πολλές χώρες. Η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη έχει μελετηθεί ευρέως και υπάρχουν δεδομένα από σχεδόν όλες τις περιοχές του κόσμου που δείχνουν ότι το ποσοστό αντοχής κυμαίνεται από 5,46% έως 30,8%. Σε περιοχές της Ευρώπης, η μικρότερη αντοχή στην κλαριθρομυκίνη εντοπίστηκε στη Νορβηγία (5,9%), ενώ η υψηλότερη στην Ισπανία (32,01%) και την Πορτογαλία (42,35%). Στη Ελλάδα, μετά από μία πρόσφατη Πανελλαδική πολυκεντρική μελέτη της ευαισθησίας του *H. pylori*

στα κοινώς χορηγούμενα αντιβιοτικά την περίοδο 2012-2015, παρατηρήθηκε αντοχή στη κλαριθρομυκίνη σε επίπεδο 27,2% (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2015). Τα τελευταία χρόνια λόγω της παγκόσμιας χρήσης κλαριθρομυκίνης για την αντιμετώπιση αναπνευστικών λοιμώξεων ιδιαίτερα στα παιδιά, τα ποσοστά της αντοχής έχουν αυξηθεί σε διάφορες περιοχές ενώ υπάρχει μία συσχέτιση ανάμεσα σε χρόνια χρήση μακρολίδων και στην αντοχή στην κλαριθρομυκίνη (Nishizawa & Suzuki, 2014).

Η βακτηριοστατική δραστηριότητα των μακρολίδων, όπως η ερυθρομυκίνη και η κλαριθρομυκίνη, εξαρτάται από την ικανότητα της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω της σύνδεσής τους στην 23S ριβοσωμική υπομονάδα (23S rRNA). Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικές μεταλλάξεις στην περιοχή της πεπτιδυλτρανσφεράσης που κωδικοποιείται στην περιοχή V του 23S rRNA είναι υπεύθυνες για την αντοχή στις μακρολίδες. Αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν στην αναστολή της πρόσδεσης μεταξύ της κλαριθρομυκίνης και της ριβοσωμικής υπομονάδας. Συγκεκριμένα, οι κύριες μεταλλάξεις στο 23S rRNA περιλαμβάνουν μία μετάπτωση από αδενίνη σε γουανίνη στη θέση 2142 (11,7%) και 2143 (69,8%), και μία μεταστροφή από αδενίνη σε κυτοσίνη στη θέση 2142 (2,6%).

Έχουν παρατηρηθεί και αρκετές άλλες μεταλλάξεις όπως η A2115G, η T2117C, η G2141A, η T2182C, η G2224A, η C2245T, η T2289C, η C2611A και η T2717C. Λόγω της χαμηλής συχνότητά τους, η κλινική σημασία των μεταλλαγών A2115G, T2117C, G2141A, G2224A, T2289C, C2245T δεν έχει αποδειχτεί ακόμα. Οι μεταλλάξεις T2182C, C2611A και T2717C έχουν σχετιστεί με μειωμένα επίπεδα αντοχής (De Francesco *et al.*, 2011).

Άλλος ένας μηχανισμός που έχει σχετιστεί με την αντοχή στις μακρολίδες αποδίδεται στο σύστημα των αντλιών εκροής. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 4 συντηρημένες οικογένειες συστημάτων αντλιών εκροής που έχουν σχετιστεί με βακτηριακή αντοχή στα αντιβιοτικά (Bina *et al.*, 2000). Μία από αυτές, βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα Gram (-) βακτήρια, είναι η οικογένεια RND (resistance-nodulation-cell division) (Cutler *et al.*, 1995). Οι Bina και συν. αναγνώρισαν την RND αντλία εκροής στο *H. pylori*. Το HP0605 του *H. pylori* είναι ομόλογο με το γονίδιο του *E. coli tolC*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη TolC της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ τα HP0607 και HP0606 είναι ομόλογα με τα αντίστοιχα γονίδια του *E. coli acrA* και *acrB* που κωδικοποιούν τη μεμβράνη σύντηξης και την RND κυτταροπλασματική πρωτεΐνη της αντλίας (Bina *et al.*, 2000).

Πίνακας 2: Τρόποι δράσης και μηχανισμοί αντοχής των κυριότερων αντιβιοτικών (Ghotaslou *et al.*, 2015, Davidson *et al.*, 2000).

Αντιβιοτικό	Τρόπος δράσης	Μηχανισμός αντοχής
Μετρονιδαζόλη	Διεργασίες αναγωγής ηλεκτρονίων που οδηγούν στο σχηματισμό ριζών νιτρο-ανιόντων και σε επακόλουθη βλάβη του DNA	(1) Χαμηλή απορρόφηση του φαρμάκου ή αύξηση αποβολής του (2) Αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA (3) Αυξημένη ικανότητα δέσμευσης οξυγόνου
Κλαριθρομυκίνη	Αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης μέσω δέσμευσης και επιβράδυνσης της βακτηριακής ριβοσωμικής υπομονάδας	Σημειακές μεταλλάξεις στο rRNA
Αμοξυκιλλίνη	Αναστολή σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>pbp</i> , μεταβολές στη διαπερατότητα της μεμβράνης και αντλίες εκροής
Τετρακυκλίνη	Αναστρέψιμη αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης	Μεταλλάξεις στο γονίδιο 16S rRNA gene
Φθοριοκινολόνες	Αναστολή της DNAγύρασης, της τοποϊσομεράσης II και της τοποϊσομεράσης IV	Σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή QRDR (Quinolone Resistance Determining Region)
Νιτροϊμιδαζόλες	Αναγωγή προφαρμάκου από τις νιτρορεδουκτάσες, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό ριζών νιτρικών ανιόντων, ενδιάμεσων ενώσεων ιμιδαζόλης και επακόλουθη βλάβη του DNA	Απουσία μείωσης της ιμιδαζόλης λόγω μειωμένης ή εντελώς απύσας δραστηριότητας των πρωτεϊνών μεταφοράς ηλεκτρονίων (RdxA, FrxA, FdxB)
Πενικιλίνες	Πρόσδεση των β-λακταμικών αντιβιοτικών στις περιοχές πρόσδεσης της πενικιλίνης (PBP) και αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης	Μειωμένη σύνδεση της αμοξυκιλλίνης στις PBP D ή στην περιοχή PBP1A (αντοχή που προκύπτει λόγω σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο <i>pbp1A</i>), και μειωμένη μεμβρανική διαπερατότητα
ΡΙφαμυκίνες	Πρόσδεση την RNA πολυμεράση οδηγώντας σε αναστολή της μεταγραφής	Σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο της RNA πολυμεράσης, <i>rpoB</i>
Νιτροφουράνια	Αναγωγή προφαρμάκου από τις νιτρορεδουκτάσες, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό ριζών νιτρικών ανιόντων και επακόλουθη βλάβη του DNA	-
Αναστολείς αντλίας ηλεκτρονίων	Αναστολή του μηχανισμού κίνησης του βακτηρίου και αποσταθεροποίηση της θέσης αποικισμού του στο στομάχι	-
Βισμούθιο	Αναστολή πρωτεϊνσύνθεσης, ATP-σύνθεσης και της σύνθεσης της κυτταρικής μεμβράνης	-

5.2. Μετρονιδαζόλη

Η αντοχή του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη κυμαίνεται από 8-80% παγκοσμίως (Suzuki *et al.*, 2010) ενώ εμφανίζεται πολύ υψηλότερη, πάνω από 60%, σε αναπτυσσόμενες χώρες σε σχέση με τις αναπτυγμένες (Banatvala *et al.*, 1994). Ειδικότερα, στην Ελλάδα, τα ποσοστά πρωτογενούς αντοχής στη μετρονιδαζόλη είναι ιδιαίτερα υψηλά (32,1%), ωστόσο παρατηρείται μία ελαφρά τάση μείωσης της αντοχής τα τελευταία έτη, γεγονός που πιθανώς αντικατοπτρίζει την σταθερή χρήση του αντιβιοτικού αυτού στην χώρα μας (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2015).

Η μετρονιδαζόλη χορηγείται ως πρόδρομη ουσία, η οποία μεταπίπτει σε δραστική μορφή μέσω αναγωγής της νιτροομάδας που συνδέεται με το δακτύλιο ιμιδαζολίου. Η αναγωγή αυτή οδηγεί στην παραγωγή βλαβερών για το DNA ενώσεων που περιέχουν υδροξυλαμίνη και νιτρικά ιόντα. Η αναγωγή της μετρονιδαζόλης γίνεται κυρίως με τη μεσολάβηση της αδρανούς στο οξυγόνο NADPH νιτροαναγωγάσης (RdxA), της NADPH-φλαβινοξειδοαναγωγάσης (FrxA) καθώς και ενζύμων που μοιάζουν με τη φερρεδοξίνη (FrxB), παραγόμενα από το *H. pylori* (De Francesco *et al.*, 2011).

Ο μηχανισμός αντοχής του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη εμφανίζεται πολύπλοκος, καθώς έχουν περιγραφεί 4 πιθανές εκδοχές. Η αντοχή αποδίδεται καταρχάς, στην ελάττωση της πρόσληψης του αντιβιοτικού μέσω του βακτηριακού τοιχώματος και δεύτερον, στη μειωμένη δραστηριότητα των αναγωγικών ενζύμων της πρόδρομης ουσίας της μετρονιδαζόλης. Επιπλέον, αποδίδεται στην αυξημένη δραστηριότητα του συστήματος δέσμευσης ελεύθερων ριζών οξυγόνου, καθώς και στην ενεργοποίηση επιδιορθωτικών ενζύμων του DNA (Hu *et al.*, 2016). Μάλιστα, μελέτες όπου συγκρίνεται η ευρωστία των ανθεκτικών *H. pylori* στελεχών με αυτή των μη-ανθεκτικών, κατέδειξαν πως η αντοχή στη μετρονιδαζόλη δεν επηρεάζει την ικανότητα ανάπτυξης του βακτηρίου (Hu *et al.*, 2016).

Αναφορικά με τη μειωμένη δραστηριότητα των αναγωγικών ενζύμων του βακτηρίου, σε ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη στελέχη, έχουν βρεθεί διάφορες μεταλλαγές στο γονίδιο *rdxA*. Συγκεκριμένα, διάφορα γενετικά συμβάντα, όπως η εισδοχή και η απαλοιφή τρανσποζονίων ή οι πλαισιοτροποποιητικές μεταλλαγές και μεταλλαγές αντικατάστασης βάσης, είναι δυνατόν να επιδρούν ταυτόχρονα στο γονίδιο *rdxA*. Υπογραμμίζεται ότι οι μεταλλαγές αυτές αναγνωρίζονται ως ο κύριος μηχανισμός αντοχής του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη, ενώ λόγω της πολυπλοκότητάς τους, οι μοριακές τεχνικές δοκιμασίας για την αντοχή στα αντιβιοτικά δε μπορούν να εφαρμοστούν για τη μετρονιδαζόλη (Nishizawa & Suzuki, 2014).

Επιπλέον, σημειακές μεταλλαγές στα γονίδια *frxA* και *frxB* μπορούν να αυξήσουν περαιτέρω τη βακτηριακή αντοχή παρουσία μεταλλαγών στο γονίδιο *rdxA*.

Σημειωτέον ότι, έχει αναφερθεί ένας ακόμη μηχανισμός αντοχής του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη, ο οποίος σχετίζεται με την απορρύθμιση της έκφρασης της υπεροξειδικής δισμουτάσης, ως αποτέλεσμα μεταλλαγής του γονιδίου του ρυθμιστή πρόσληψης σιδήρου (*Fur*) (Tsugawa *et al.*, 2012), θωρακίζοντας το βακτήριο έναντι των ελεύθερων ριζών οξυγόνου.

5.3. Αμοξυκιλλίνη

Τα ποσοστά αντοχής του *H. pylori* στην αμοξυκιλλίνη διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα ενώ οι περισσότερες μελέτες εκτιμούν ότι δεν ξεπερνούν το 2% παγκοσμίως, με εξαίρεση το Μπαγκλαντές (6,6%). Στην Ευρώπη, πρόσφατη έρευνα επιβεβαιώνει τα παραπάνω ποσοστά (Selgrad *et al.*, 2014).

Η αμοξυκιλλίνη δρα παρεμβαίνοντας στη σύνθεση των πεπτιδογλυκανών, ειδικότερα μέσω της παρεμπόδισης μεταφορέων, αναφερόμενοι και ως πρωτεΐνες που δεσμεύουν πενικιλίνη (PBP). Πολλαπλές μεταλλαγές στο γονίδιο *pbp1* αποτελούν την κύρια αιτία αντοχής στην αμοξυκιλλίνη. Παρόλο που γενικότερα η αντοχή στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό αναφέρεται σπάνια για το *H. pylori*, έχει δειχθεί ότι κατόπιν κάθε αποτυχημένης θεραπείας εκκρίωσης, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της αμοξυκιλλίνης διπλασιάζεται (Tseng *et al.*, 2009). Σε στελέχη με χαμηλή αντοχή στο αντιβιοτικό, με MIC 06–0.25 µg/ml, προσδιορίστηκαν έως 2 μεταλλαγές αντικατάστασης ενώ στελέχη με υψηλή αντοχή διέθεταν 1-3 μεταλλαγές αντικατάστασης.

Η χαμηλή αντοχή στην αμοξυκιλλίνη έχει συνδεθεί με μία σημειακή μεταλλαγή στο γονίδιο *pbp1* ενώ περαιτέρω συσσώρευση μεταλλαγών στον ίδιο γενετικό τόπο μπορεί να οδηγήσει σε σταδιακά αυξανόμενη αντοχή στην αμοξυκιλλίνη. Επιπλέον οι Tseng *et al.* κατέδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα αντοχής στην αμοξυκιλλίνη συνδέονται με την παραγωγή ενεργού β-λακταμάσης από το βακτήριο (Tseng *et al.*, 2009), αν και παραγωγή β-λακταμάσης στο *H. pylori* έχει σπάνια παρατηρηθεί και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως σχεδόν ανενεργή διαδικασία. Λόγω της πληθώρας των διαφόρων μεταλλαγών στο γονίδιο της *pbp1*, μοριακές δοκιμασίες αντοχής στα αντιβιοτικά δε μπορούν να εφαρμοστούν για την αμοξυκιλλίνη (Nishizawa & Suzuki, 2014).

5.4. Τετρακυκλίνη

Τα επίπεδα αντοχής του *H. pylori* στην τετρακυκλίνη παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα και ποσοστό μικρότερο του 2% στις περισσότερες μελέτες (Suzuki *et al.*, 2010). Οι τετρακυκλίνες είναι βακτηριοστατικά φάρμακα τα οποία ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση στην 30S υπομονάδα

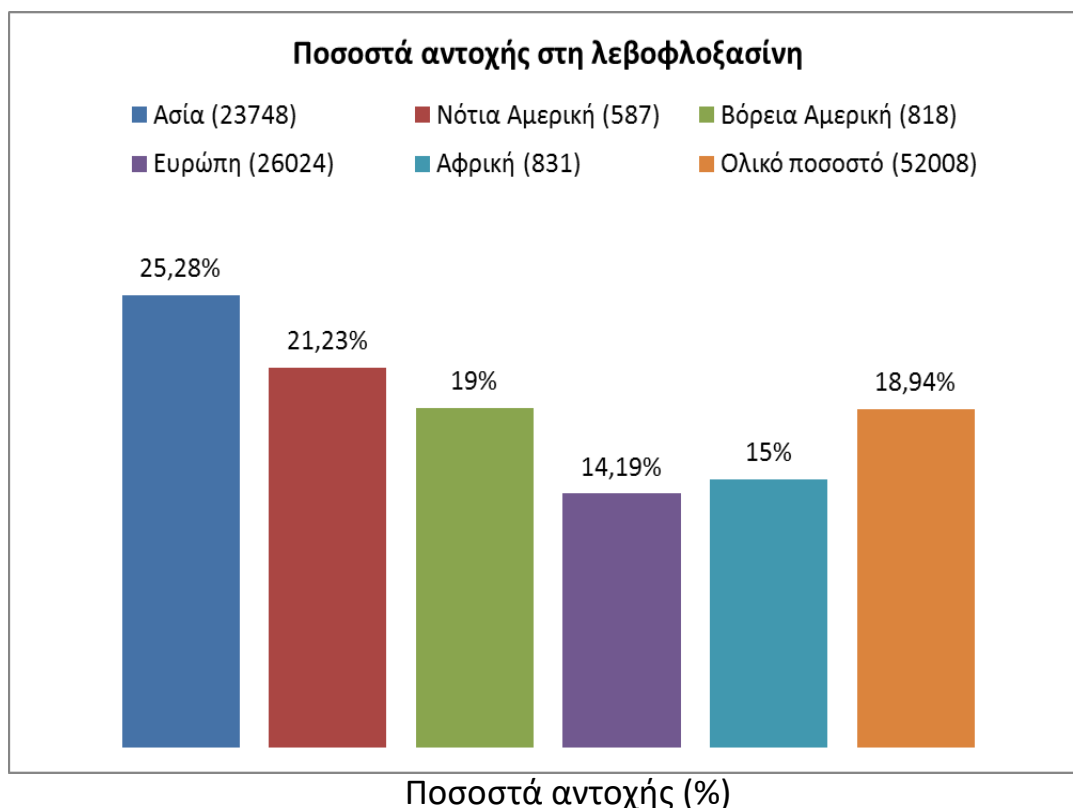
του ριβοσώματος και εμποδίζουν την πρόσδεση των αμινοακυλ-tRNA, παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση.

Η αντοχή του *H. pylori* στις τετρακυκλίνες έχει διαπιστωθεί ότι οφείλεται σε σημειακές μεταλλαγές στο 16S rRNA (Gerrits *et al.*, 2002), καθώς ταυτόχρονες τριπλές σημειακές μεταλλαγές στις θέσεις 965-7 του γονιδίου έχουν αναγνωριστεί ως ο κύριος λόγος για την αντοχή στις τετρακυκλίνες. Τα επίπεδα της αντοχής είναι ανάλογα με τον αριθμό των αλλαγών στο κωδικόνιο AGA 965-97. Μονές και διπλές σημειακές μεταλλαγές είναι συνδεδεμένες με χαμηλά επίπεδα αντοχής. Αντίθετα, υψηλά επίπεδα αντοχής παρατηρούνται κατά την αλλαγή του κωδικονίου AGA στο κωδικόνιο TTC. Οι Ribeiro και συν. ανέπτυξαν μία PCR-RFLP μέθοδο επιτρέποντας γρήγορη και αναπαραγώγιμη ταυτοποίηση των μεταλλαγών που σχετίζονται με υψηλά επίπεδα αντοχής στις τετρακυκλίνες. Η αλλαγή της τριπλέτας AGA στην τριπλέτα TTC δημιουργεί μία επιπλέον θέση κοπής από το περιοριστικό ένζυμο HinfI. Αυτή η PCR-RFLP μέθοδος διακρίνει τα στελέχη *H. pylori* τα οποία έχουν υψηλά επίπεδα αντοχής στις τετρακυκλίνες από αυτά με τα χαμηλά επίπεδα αντοχής (Nishizawa & Suzuki, 2014).

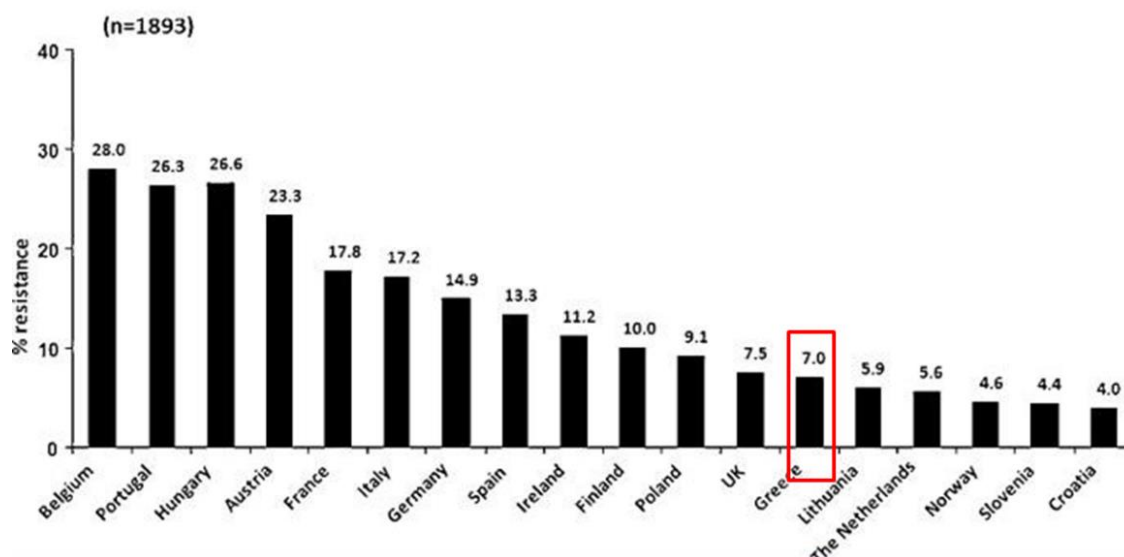
5.5. Φθοριοκινολόνες

Η αρχική αντοχή του *H. pylori* στις φθοριοκινολόνες έχει παρατηρηθεί ότι κυμαίνεται από 2 έως 22% (Ghotaslou *et al.*, 2015). Η αντοχή σε αυτά τα αντιβιοτικά αποκτάται εύκολα και είναι σημαντικά υψηλότερη σε χώρες στις οποίες γίνεται υψηλή κατανάλωση αυτών των αντιβιοτικών, κυρίως για λοιμώξεις του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος. Ειδικότερα, παρά την εκτεταμένη χρήση τους τα τελευταία χρόνια, δεν έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα αντοχής στις φθοριοκινολόνες κατά τη διάρκεια της θεραπείας του *H. pylori*, εκτός από τις περιπτώσεις εκκρίωσης των *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, τα οποία αναπτύσσουν ταχύτατα αντοχή στα εν λόγω αντιβιοτικά. Η αντοχή του *H. pylori* στην λεβοφλοξασίνη παγκοσμίως παρατηρείται κατά μέσο όρο, στα 16,2% με μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ ηπείρων και χωρών (Διάγραμμα 1) . Στην Ελλάδα, η πρωτογενής αντοχή στη λεβοφλοξασίνη εκτιμάται σε λιγότερο από 10%, με μία σταθερή αυξητική πορεία από το 2008 (7,7%) μέχρι και σήμερα (8,2%). Επιπλέον, αναφορικά με τη δευτεροπαθή αντοχή στη λεβοφλοξασίνη, τα επίπεδα αντοχής έχουν ξεπεράσει το 25% (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017). Η λεβοφλοξασίνη όπως και οι άλλες κινολόνες, πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή διότι έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη αντοχή μεταξύ άλλων φθοριοκινολονών.

Διάγραμμα 1: Τα ποσοστά αντοχής στη λεβοφλοξασίνη παγκοσμίως (προσαρμοσμένο από Ghotaslou et al., 2015).



Διάγραμμα 2: Ποσοστά αντοχής στη λεβοφλοξασίνη στην Ευρώπη (Megraud et al., 2013)



Οι κινολόνες είναι μία οικογένεια ευρέως φάσματος συνθετικών αντιβιοτικών. Οι κινολόνες και τα παράγωγά τους απομονώνονται από φυσικές πηγές όπως τα φυτά, τα ζώα και τα βακτήρια και μπορούν να δράσουν ως φυσικά αντιμικροβιακά και/ή σηματοδοτικά μόρια (Heeb *et al.*, 2011). Στον Πίνακα 3 αναφέρονται οι κυριότερες από αυτές.

Πίνακας 3: Κατηγορίες κινολονών και κυριότεροι εκπρόσωποι από κάθε κατηγορία.

1ης γενιάς	2ης γενιάς	3ης γενιάς	4ης γενιάς
Ναλιδιζικό οξύ	Νορφλοξασίνη	<u>Λεβοφλοξασίνη</u>	Μοξιφλοξασίνη
Πιπεμιδικό οξύ	Σιπροφλοξασίνη	Γκατιφλοξασίνη	Κλιναφλοξασίνη
Πιρομιδικό οξύ	Ρουφλοξασίνη	Σπαρφλοξασίνη	Σιταφλοξασίνη
Ροσοξασίνη	Οφλοξασίνη	Μπαλοφλοξασίνη	Τροβαφλοξασίνη
Κινοξασίνη	Νορφλοξασίνη	Τεμαφλοξασίνη	Προυλιφλοξασίνη
Οξολινικό οξύ	Φλεροξασίνη	Σπαρφλοξασίνη	Τζεμιφλοξασίνη

Οι κινολόνες απορροφώνται ταχέως από τον οργανισμό, εμφανίζουν υψηλή διεισδυτικότητα στους ιστούς ενώ τελικά αποβάλλονται μέσω των νεφρών, χαρακτηριστικά τα οποία δικαιολογούν στη χρήση τους σε πολλά κλινικά σύνδρομα. Ειδικότερα, η λεβοφλοξασίνη είναι ένα αντιβιοτικό, το οποίο χρησιμοποιείται για ένα ευρύ φάσμα βακτηριακών λοιμώξεων, όπως είναι η οξεία βακτηριακή κολπίτιδα, η πνευμονία, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, η χρόνια προστατίτιδα και σε μερικές περιπτώσεις η γαστρεντερίτιδα. Χορηγείται από στόματος ή ενδοφλέβια (Megraud *et al.*, 2013) ενώ ο μεγάλος χρόνος ημιζωής της επιτρέπει τη χρήση της σε

καθημερινή βάση. Κατά τη θεραπεία του *H. pylori* με λεβοφλοξασίνη, κατόπιν χορήγησης μέσω της στοματικής οδού, ακολουθεί ταχεία απορρόφηση, η οποία οδηγεί στη μέγιστη συγκέντρωσή της εντός μίας ώρα. Παράλληλα, η βιοδιαθεσιμότητά της είναι περίπου 100% ενώ η τροφή έχει πολύ μικρές επιπτώσεις στην απορρόφησή της.

Περίπου το 30-40% της λεβοφλοξασίνης προσδένεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος και κατά τη διάρκεια θεραπείας με 500mg ημερησίως, δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική συσσώρευση του φαρμάκου στον οργανισμό διάρκειας αρκετών ημερών έχει δείξει ότι δεν προκαλεί. Η λεβοφλοξασίνη μεταβολίζεται σε σπάνιες περιπτώσεις, με παράγωγα τη διμεθυλολεβοφλοξασίνη και το N-οξείδιο της λεβοφλοξασίνης (Nishizawa & Suzuki, 2014). Σημειωτέον ότι, αυτοί οι μεταβολίτες αποτελούν λιγότερο από το 5% της δόσης που απεκκρίνεται από τα νεφρά. Μετά τη χορήγηση της η λεβοφλοξασίνη αποβάλλεται σχετικά αργά από το πλάσμα. Δεν παρατηρούνται διαφορές στη φαρμακοκινητική του φαρμάκου ανάμεσα στη χορήγηση από το στόμα και την ενδοφλέβια χορήγηση. Η φαρμακοδυναμική αφορά στη χρονική πορεία της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο σώμα και προσφέρει πληροφορίες για τη σχέση ανάμεσα στη συγκέντρωση του φαρμάκου και στα επίπεδα της αντιμικροβιακής επίδρασης. Η πιο σημαντική παράμετρος της φαρμακοδυναμικής ενός αντιβιοτικού έναντι ενός μικροοργανισμού είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της ουσίας που είναι ικανή να αναστείλει *in vitro* τελείως την ανάπτυξη (MIC) του στόχου. Όσον αφορά στις κινολόνες, το καλύτερο θεραπευτικό σχήμα μεγιστοποιεί τη συγκέντρωση του φαρμάκου, επάγοντας ταχύτερη και αποτελεσματικότερη καταστροφή του βακτηρίου.

Ανάμεσα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται κλινικά, μόνο οι φθοριοκινολόνες αναστέλλουν άμεσα τη σύνθεση του βακτηριακού DNA. Ο μηχανισμός δράσης των φθοριοκινολών περιλαμβάνει την απενεργοποίηση της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV του βακτηρίου. Η DNA γυράση αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες-2A και 2B (Ghotaslou *et al.*, 2015), κωδικοποιούμενες από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* αντίστοιχα. Το ένζυμο αυτό δημιουργεί αρνητικές υπερελικώσεις στο DNA, αφαιρεί τις θετικές υπερελικώσεις ενώ επιδρά στον πολυμερισμό του χρωμοσωμικού υλικού. Παράλληλα, η τοποϊσομεράση IV, παρουσιάζει ομολογία με τη DNA γυράση, τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία, με τη διαφορά ότι εστιάζει στον αποχωρισμό του θυγατρικού χρωμοσώματος. Κατά την πρόσδεση του αντιβιοτικού στο σύμπλοκο του DNA με ένα από τα δύο ένζυμα, δημιουργείται ένα τριμερές με διαφορετική στερεοδομή, το οποίο προκαλεί δικλωνικά θραύσματα. Επιπλέον, η συνεχής παρουσία του αντιβιοτικού εμποδίζει τη συρραφή των κομμένων αλυσίδων DNA. Με αυτόν τον τρόπο, καταλύεται η περαιτέρω αντιγραφή του DNA, οδηγώντας στο θάνατο του βακτηριακού κυττάρου.

Υπεύθυνες για την αντοχή στις φθοριοκινολόνες είναι μεταλλάξεις σε χρωμοσωμικά γονίδια, τα οποία αφορούν είτε τα ένζυμα στόχους, δηλαδή την DNA γυράση και την τοποϊσομεράση IV, είτε μηχανισμούς διαπερατότητας του βακτηρίου. Στους τελευταίους εμπλέκεται η ρύθμιση έκφρασης

πρωτεϊνών διαμεμβρανικών αντλιών μεταφοράς, συστατικών των καναλιών διάχυσης της εξωκυττάριας μεμβράνης.

Ακόμα, είναι γνωστό ότι οι φθοριοκινολόνες και η επακόλουθη αναστολή της τοποϊσομεράσης βακτηριακού τύπου II ενεργοποιεί επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του βακτηρίου. Συγκεκριμένα, κάθε τμήμα DNA που έχει υποστεί βλάβη επάγει ένα δίκτυο γονιδίων SOS, το οποίο με τη σειρά του κινητοποιεί την έκφραση διαφόρων επιδιορθωτικών πρωτεϊνών. Το σύστημα SOS απαρτίζουν πάνω από 40 γονίδια, υπό τον έλεγχο των πρωτεϊνών RacA και LexA, με επαγωγική και κατασταλτική δράση αντίστοιχα. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη LexA καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων *qnrA*, *B* και *S*, τα οποία έχουν πλασμιδιακή προέλευση και προσδίδουν στο βακτήριο αντοχή απέναντι στις φθοριοκινολόνες (Da Re *et al.*, 2009). Γενικότερα, οι βακτηριακές DNA τοποϊσομεράσες προστατεύονται από τις κινολόνες μέσω του πεπτιδίου QnrB, το οποίο προσδίδει χαμηλά επίπεδα αντοχής απέναντι στις τελευταίες. Επιπλέον, αντοχή έναντι σε αυτά τα αντιβιοτικά αποκτάται με μεταλλάξεις στο γονίδιο *qnrB*, μέσω της δράσης των πολυμερασών Pol II, Pol IV και PolV. Οι τελευταίες έχουν πρόσβαση στο *qnrB* κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του συστήματος SOS, όταν δηλαδή αίρεται η καταστολή του γονιδίου από τον LexA (Da Re *et al.*, 2009). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το ίδιο το αντιβιοτικό, λειτουργώντας σαν ερέθισμα που ενεργοποιεί επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του βακτηρίου, προάγει παράλληλα την ανάπτυξη αντοχής.

Πίνακας 4: Κυριότερες μεταλλάξεις του γονιδίου *gyrA*.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>gyrA</i>		
Κωδικόνιο	Αμινοξύ	Μετάλλαξη
91	D	N, Y, G
87	N	K, Y
45	L	F
55	A	S
57	H	Y
60	G	S
62	T	I
65	V	I
85	G	C

88	A	V
97	A	T, V
140	R	K
145	D	G
150	V	A
191	M	I
194	I	T
199	V	I, A

Το παραπάνω παράδειγμα της πρωτεΐνης QnrB υπάγεται στις περιπτώσεις, κατά τις οποίες η αντοχή στις φθοριοκινολόνες προσδίδεται από πλασμίδια, καθιστώντας τη μεταβιβάσιμη. Η μεσολαβούμενη από πλασμίδια αντοχή περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό μηχανισμών όπως είναι οι πρωτεΐνες Qnr, η ακυλοτρανσφεράση αμινογλυκοσιδίων AAC(6')-Ib-cr καθώς και οι πρωτεΐνες OqxAB και QepA. Η εμφάνιση αυτή προσδιορίστηκε ότι επάγεται από μία από τις οικογένειες πενταπεπτιδικών επαναλήψεων Qnr. Η αναστολή των κινολονών εμποδίζεται από την αλληλεπίδραση της DNA γυράσης με την πρωτεΐνη Qnr. Η πρωτεΐνη Qnr επάγει αντοχή στο ναλιδιξικό οξύ και μειώνει την ευαισθησία στις κινολόνες. Επιπλέον τα γονίδια *qnrA* και *qnrB* συνήθως δημιουργούν ιντεγκρόνια που περιλαμβάνουν γονίδια όπως οι αμινογλυκοσιδάσες απενεργοποιώντας ένζυμα ή β-λακταμάσες, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αντοχή σε άλλα αντιβιοτικά. Ως αποτέλεσμα αυτής της σχέσης των γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν γονίδια που προσδίδουν αντοχή στα αντιβιοτικά, τα πλασμίδια αυτά έχουν περισσότερες πιθανότητες να επιλεγούν και να διαδοθούν στις τάξεις των στελεχών που είναι ανθεκτικά στις φθοριοκινολόνες.

Οι κυριότερες μεταλλαγές αφορούν τα κωδικόνια 91 και 87. Στο κωδικόνιο 91 το ασπαρτικό οξύ μετατρέπεται συνηθέστερα σε ασπαραγίνη, τυροσίνη και γλυκίνη ενώ στο κωδικόνιο 87 η ασπαραγίνη μετατρέπεται σε λυσίνη ή τυροσίνη. Με έναν παρόμοιο τρόπο είναι πιθανό να λειτουργεί και το γονίδιο *gyrB*. Λόγω της συσχέτισης της αντοχής με μεταλλαγές στο γονίδιο *gyrA* στις θέσεις 87 και 91, ο ρόλος του γονιδίου *gyrB* στην αντοχή στις φθοριοκινολόνες έχει περιοριστεί. Ωστόσο η συμμετοχή μεταλλαγών του γονιδίου *gyrA* αλλά και του *gyrB* έχουν παρατηρηθεί στο 83,8% των ανθεκτικών στη λεβοφλοξασίνη στελεχών (Ghotaslou *et al.*, 2015).

5.6. Ριφαμυκίνες

Οι ριφαμυκίνες είναι ομάδα αντιβιοτικών, που συντίθενται είτε φυσικά από το βακτήριο *Ammycolatopsis mediterranei*, είτε τεχνητά. Αποτελούν μία υποδιαίρεση της ευρύτερης οικογένειας των ανσαμυκινών. Οι ριφαμυκίνες είναι ιδιαίτερα δραστικές κατά μυκοβακτηρίων και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται κατά λοιμώξεων φυματίωσης, λέπρας, συμπλέγματος *Mycobacterium avium* (MAC). Η ομάδα των ριφαμυκινών συμπεριλαμβάνει την κλασσική ριφαμυκίνη, καθώς και τα παράγωγά της ριφαμικίνη (ή ριφαμίνη), ριφαμπουτίνη, ριφαπεντίνη και ριφαλαζίλη. Η ριφαμπουτίνη είναι το σημαντικότερο αντιβιοτικό της κατηγορίας των ριφαμυκινών. Η βιολογική δράση των ριφαμυκινών βασίζεται στην αναστολή της DNA εξαρτημένης RNA σύνθεσης, καθώς ταιριάζει σε προκαρυωτικές RNA πολυμεράσες και πιο συγκεκριμένα στην αναστολή της επιμήκυνσης της ολιγονουκλεοτιδικής αλυσίδας (Calvori *et al.*, 1965). Τα αντιβιοτικά αυτά έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στη β-υπομονάδα της DNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, οδηγώντας σε αναστολή της μεταγραφής. Η β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης κωδικοποιείται από το γονίδιο *rpoB*. Η αντοχή επιτυγχάνεται μέσω σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *rpoB*. Σύμφωνα με 11 διαφορετικές έρευνες, στις οποίες μελετήθηκαν συνολικά 2982 ασθενείς, το ποσοστό μέσης αντοχής του *H. pylori* στη ριφαμπουτίνη υπολογίστηκε στο 1.3% (Gisbert & Calvet, 2012).

5.7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η αποτυχία της θεραπείας εκκρίωσης του *H. pylori* αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα, καθώς η εκκρίωση του βακτηρίου συστήνεται στο σύνολο των φορέων της λοίμωξης για την αποφυγή εμφάνισης περαιτέρω κλινικών συμπτωμάτων (Sugano *et al.*, 2015). Τα υψηλά επίπεδα αντοχής που έχουν παρατηρηθεί σε σχέση με τα ευρέως χορηγούμενα αντιβιοτικά, καθιστούν πλέον αναγκαία την ανάπτυξη αλγορίθμου εκκρίωσης, βασισμένης σε δοκιμασία ευαισθησίας έναντι των αντιβιοτικών πριν την έναρξη της θεραπείας (Ghotaslou *et al.*, 2015).

Οι μέθοδοι διάγνωσης της αντοχής του *H. pylori* στα αντιβιοτικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις φαινοτυπικές και τις γονοτυπικές. Οι φαινοτυπικές είναι οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται αυτήν τη στιγμή. Οι γονοτυπικές εφαρμόζονται σε περιπτώσεις όπου η αντοχή οφείλεται σε σημειακές μεταλλάξεις ή ελλείψεις σε συγκεκριμένα γονίδια.

5.7.1. Φαινοτυπική ανίχνευση της αντοχής-δοκιμές αραίωσης

Οι δοκιμές αραίωσης διενεργούνται για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC) ενός μικροβιακού παράγοντα. Η MIC ορίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Ο

προσδιορισμός της MIC χρησιμεύει στη (α) ρύθμιση της θεραπευτικής δόσης του αντιβιοτικού και (β) στον έλεγχο προτύπων αντιμικροβιακής ευαισθησίας, βακτηρίων με αργή ανάπτυξη.

5.7.2. Μέθοδος ενσωμάτωσης σε άγαρ

Η ποσοτική μέθοδος ενσωμάτωσης σε άγαρ χρησιμοποιείται για τον *in vitro* προσδιορισμό της MIC ενός αντιμικροβιακού παράγοντα, ο οποίος αναστέλλει την ανάπτυξη του παθογόνου. Το υπό εξέταση αντιβιοτικό ενσωματώνεται στο άγαρ σε ένα εύρος συγκεντρώσεων και στη συνέχεια το μείγμα τοποθετείται σε ειδικά τρυβλία. Μετά την προσθήκη του μικροοργανισμού, τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C, για όσο χρόνο απαιτεί η ανάπτυξη του εκάστοτε παθογόνου. Τέλος, γίνεται παρατήρηση της ανάπτυξης του παθογόνου στα τρυβλία και προσδιορίζεται η MIC ως η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού το οποίο είναι ικανό να αναστείλει την ανάπτυξη (Parija *et al.*, 2009).

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, η οποία θεωρείται μέθοδος αναφοράς για τον έλεγχο της αντοχής στα αντιβιοτικά, είναι η ακρίβεια με την οποία προσδιορίζεται η αντοχή. Επιπλέον, αυτή η μέθοδος έχει υψηλή επαναληψιμότητα και είναι πολύ πιο οικονομική από άλλες μεθόδους αραίωσης (Parija, 2009), πρόκειται όμως για μια αρκετά χρονοβόρα μέθοδο ενώ κάθε φορά μπορεί να ελέγχει την αντοχή σε ένα μόνο αντιβιοτικό τη φορά (Parija *et al.*, 2009).

5.7.3. Μέθοδος αραίωσης του υγρού μέσου

Η μέθοδος αραίωσης υγρού μέσου πραγματοποιείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης πολλαπλών κυψελίδων, με χρήση Brucella Broth και συμπληρώματος αίματος. Το αντιβιοτικό προστίθεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις και στη συνέχεια επωάζονται για 16 έως 24 ώρες στους 35°C, παρουσία του υπό εξέταση βακτηρίου σε επωαστικό θάλαμο. Μετά το πέρας της επώασης, παρατηρείται αν υπάρχει ανάπτυξη του βακτηρίου, στον πάτο της πλάκας από στρώμα κυττάρων ή αν ο ζωμός παρουσιάζει θολερότητα. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να ελεγχθεί η αντοχή για πολλαπλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα με μεγάλη ακρίβεια. Άλλα πλεονεκτήματα είναι η εμπορική διαθεσιμότητα των πλακών και η ευκολία της εξέτασης (Englekirk, 2008).

5.7.4. E-test (Epsilometer test)

Το E-test είναι μία ποσοτική μέθοδος που βασίζεται στις αρχές της μεθόδου διάχυσης δίσκων ώστε να προσδιορίσει το MIC ενός βακτηριακού στελέχους. Στη μέθοδο αυτή, καλλιεργείται ένα βακτηριακό στέλεχος σε ένα τριβλίο και στη συνέχεια τοποθετείται μία ταινία με αυξανόμενη διαβάθμιση συγκέντρωσης αντιβιοτικού. Ακολουθεί επώαση στους 37°C και ο χρόνος καθώς και

οι συνθήκες επώσης προσδιορίζονται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης του βακτηρίου. Η προτεινόμενη διάρκεια επώσης είναι από 18 έως 24 ώρες, διάστημα το οποίο καλύπτει τους χρόνους σχεδόν όλων των βακτηρίων. Μετά την τοποθέτηση της ταινίας στην επιφάνεια του άγαρ, το αντιβιοτικό απελευθερώνεται στην επιφάνεια του άγαρ δημιουργώντας μία συμμετρική ζώνη αναστολής με κέντρο της την ταινία. Το MIC προσδιορίζεται στην τιμή όπου η έλλειψη συναντάει την ταινία (Parija *et al.*, 2009).

5.7.4. Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών στο άγαρ

Στη μέθοδο αυτή αρχικά τοποθετούνται δίσκοι εμποτισμένοι με γνωστές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σε ένα τριβλίο με άγαρ όπου έχει εμβολιαστεί με μια καλλιέργεια ενός βακτηρίου. Το τριβλίο επωάζεται για 18 έως 24 ώρες. Μετά την επώση, το αντιβιοτικό έχει διαχυθεί γύρω από τους δίσκους. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού παραμένει υψηλότερη κοντά στους δίσκους και σταδιακά ελαττώνεται. Η αντοχή μετράται με τον υπολογισμό της ζώνης αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης γύρω από το δίσκο (Parija *et al.*, 2009).

5.7.5. Γονοτυπική ανίχνευση της αντοχής

Η αντοχή του *H. pylori* έναντι των αντιβιοτικών οφείλεται κυρίως σε σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της PCR. Η PCR είναι μία μοριακή τεχνική, η οποία μπορεί να πολλαπλασιάσει ένα τμήμα DNA σε διάφορες τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα όμοια με το αρχικό τμήμα. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη, οικονομική και αξιόπιστη (Bartlett and Stirling, 2003). Επίσης, η αντοχή του *H. pylori* μπορεί να προσδιοριστεί και με τη μέθοδο της Real Time PCR., μια εξέλιξη της απλής PCR που είναι ικανή να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία-στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Η Real Time PCR πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή και έχει την ικανότητα να φωτίζει κάθε δείγμα με μία δέσμη φωτός ενός καθορισμένου μήκους κύματος και να εντοπίζει το φθορισμό που εκπέμπεται. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Ο διαχωρισμός των αλυσίδων του DNA περίπου στους 95 °C
- Η πρόσδεση των εκκινητών στο συμπληρωματικό τους DNA σε θερμοκρασία 50-60 °C
- Ο πολυμερισμός του DNA από την DNA πολυμεράση στους 68 - 72 °C

Επιπλέον υπάρχει και ένα τέταρτο στάδιο που περιλαμβάνει τη μέτρηση του φθορισμού που παράγεται σε κάθε κύκλο στους 80 °C. Ο φθορισμός που παράγεται σε κάθε κύκλο είναι ανάλογος του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών σε κάθε θερμοδυναμικό κύκλο (Sambrook and Russel, 2001).

6. Σκοπός

Η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στη διερεύνηση των υπεύθυνων μεταλλαγών για την ανάπτυξη αντοχής του *Helicobacter pylori* έναντι των φθοριοκινολονών (λεβοφλοξασίνης) σε κλινικά στελέχη Ελλήνων συμπτωματικών φορέων καθώς και στη δημιουργία ενός μοριακού αλγορίθμου για τον προσδιορισμό της αντοχής του *H. pylori* στις φθοριοκινολόνες (λεβοφλοξασίνη) απευθείας από βιοπτικό υλικό, με απώτερο σκοπό να καλύψει τις περιπτώσεις εκείνες όπου δεν είναι δυνατή η απομόνωση του στελέχους από το βιοπτικό υλικό.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Καλλιέργεια και απομόνωση κλινικών στελεχών *H. pylori*

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας απομονώθηκαν στελέχη *H. pylori* από γαστρικές βιοψίες. Τα δείγματα στέλνονταν από συνεργαζόμενους με το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ (Ε.Ι.Π.) γαστρεντερολόγους, μετά από ενδοσκόπηση στομάχου ασθενών και περιελάμβαναν συνήθως δύο βιοψίες από το άντρο και δύο από το σώμα. Οι βιοψίες μεταφέρονταν στο εργαστήριο μέσα σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό μεταφοράς, περιεκτικότητας 0,5 g/L σε θειογλυκολικό νάτριο (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε στο εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ε.Ι.Π., μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Αρχικά, στα δείγματα προστίθεντο αποστειρωμένες γυάλινες μπίλιες και ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση τους σε vortex, με σκοπό τη λειοτρίβιση των βιοψιών και την απελευθέρωση των βακτηρίων. Στη συνέχεια, τα δείγματα καλλιεργούνταν σε στερεό θρεπτικό υλικό Columbia Blood Agar Base (Oxoid Basingstoke, United Kingdom), εμπλουτισμένο με 7% (vol/vol) αίμα αλόγου, 5% vol/vol ορό αλόγου, 1% (vol/vol) Vitox (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) παρουσία μείγματος αντιβιοτικών: (βανκομυκίνη 10 µg/ml, τριμεθοπρίμη 10 µg/ml, πολυμυξίνη Β 104 IU/l, αμφοτερικίνη Β 2 µg/ml ναλιδιξικό οξύ 10 µg/ml, βακιτρακίνη 30 µg/ml και φθοριοκντοσίνη 5 µg/ml), για 48 ώρες στους 37°C, υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂). Οι μικροαερόφιλες συνθήκες εξασφαλιζόνταν με τη χρήση καταλύτη (Campygen, Oxoid Basingstoke, United Kingdom) και ειδικών σφραγισμένων δοχείων (Anaerobic jar, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom).

2. Κρυο-συντήρηση στελεχών *H. pylori*

Τα στελέχη *H. pylori* που καλλιεργήθηκαν από τις βιοψίες τοποθετήθηκαν σε CryoTubes™ που περιείχαν υγρό καλλιέργειας BHIB και 20% γλυκερόλη. Συγκεκριμένα, το σύνολο της βιομάζας ενός τρυβλίου ανεπτυγμένης και μακροσκοπικά διακριτής καλλιέργειας *H. pylori* επαναιωρείτο μέσα σε 1,8 ml BHIB με 20% γλυκερόλη σε αμπούλες κρυο-συντήρησης, και αποθηκευόταν στους -80°C.

3. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση ολικού DNA από καλλιέργειες *H. pylori* και από βιοπτικό υλικό πραγματοποιήθηκε με εμπορικό kit (Macherey-Nagel,) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της βακτηριακής καλλιέργειας, γινόταν συλλογή και επαναιώρηση βακτηριακής βιομάζας σε dH₂O καθώς και διαδοχική φυγοκέντρίσή της σε 8000x g για 5min και αφαίρεση του υπερκειμένου διαλύματος. Για την απελευθέρωση του ολικού DNA, από τη βακτηριακή βιομάζα ή το ιστοτεμάχιο κλινικής βιοψίας, λάμβανε χώρα πρωτεόλυση του δείγματος σε 180μl διαλύματος του ανιονικού αποδιατακτικού παράγοντα δωδεκανικό θειικό νάτριο-SDS (διάλυμα T1), με προσθήκη 25μl πρωτεϊνάσης K και ολονύχτια επώαση στους 56°C. Την επόμενη ημέρα γινόταν προσθήκη 200μl διαλύματος χαοτροπικού άλατος υδροχλωρικής γουανιδίνης (διάλυμα B3) και επώαση στους 75°C, για 10min. Ακολουθούσε καταβύθιση του DNA, μετά την προσθήκη 210μl 96-100% αιθανόλης, και ο συνολικός όγκος μεταφερόταν σε στήλη πυριτίου, όπου γινόταν απομάκρυνση του υγρού με φυγοκέντρωση στα 11000x g για 1 λεπτό, ούτως ώστε το καταβυθισμένο DNA να προσκολληθεί στη στήλη. Ακολουθούσαν διαδοχικές πλύσεις του DNA με 500μl διαλύματος αλκοολικών διαλυμάτων BW και 600μl διαλύματος B5 για την απομάκρυνση της περίσσειας των αλάτων. Ακολουθούσε έκλουση του γενομικού DNA με τη χρήση 100μl 5mM Tris/HCl, pH 8.5 (διάλυμα BE).

4. Προσδιορισμός ευαισθησίας στελεχών *H. pylori* σε αντιβιοτικά με μέθοδο του E-test

Το αντιβιογράμμα ή τεστ ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας του βακτηρίου στα διάφορα αντιμικροβιακά φάρμακα. Από τρυβλία με αποικίες *H. pylori*, γινόταν συλλογή βακτηριακής βιομάζας, με τη χρήση καλλιεργητικού κρίκου, μεταφορά της σε 4ml φυσιολογικού ορού και προσθήκη αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων. Ακολουθούσε έντονη ανάδευση στο vortex και επίστρωση του εναιωρήματος σε τρυβλίο, διαμέτρου 140 mm, με στερεό θρεπτικό υλικό Mueller Hinton II (BD Diagnostics), εμπλουτισμένο με 7% αίμα αλόγου, απουσία αντιβιοτικών. Μετά την πλήρη απορρόφηση του υλικού, γινόταν τοποθέτηση ταινιών διαβαθμισμένης συγκέντρωσης αντιβιοτικού (E-test bioMerieux, S.A.). Χρησιμοποιούνταν ταινίες για 5 διαφορετικά αντιβιοτικά: αμοξυκιλίνη, μετρονιδαζόλη, κλαριθρομυκίνη, τετρακυκλίνη και λεβοφλοξασίνη (Εικόνα B1). Τα κλινικά όρια προσδιορίζονταν σύμφωνα με της οδηγίες του Eucast (Πίνακα 5). Μετά από 48 ώρες γινόταν αξιολόγηση των ζωνών αναστολής που προκύπτουν από τις ταινίες των αντιβιοτικών και προσδιορισμός της ευαισθησίας του βακτηρίου με βάση τις τιμές συγκέντρωσης, τις οποίες ορίζει το EUCAST.



Εικόνα 5: Ενδεικτική φωτογραφία πειραματικής διάταξης για την μέτρηση της ευαισθησίας έναντι της λεβοφλοξασίνης με τη μέθοδο E-τεστ Διακρίνεται η ζώνη αναστολής ανάπτυξης.

Πίνακας 5: Κλινικά όρια του EUCAST (2017) για το *H. pylori* για τα κυριότερα αντιβιοτικά .

Αντιβιοτικά	Κλινικά όρια του Eucast (mg/L)	
	Ευαίσθητο $\leq$	Ανθεκτικό $>$
Αμοξυκιλίνη	0.125	0.125
Λεβοφλοξασίνη	1	1
Κλαριθρομυκίνη	0.25	0.5
Τετρακυκλίνη	1	1
Μετρονιδαζόλη	8	8
ΡΙφαμπικίνη	1	1

5.2. Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης, στηρίζεται στο δεδομένο ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, και κινείται προς το θετικό πόλο υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Παράλληλα, η κινητικότητα εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων, τη στερεοδιαμόρφωσή τους, τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα καθώς και την τάση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1% αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος TBE pH 8.3 (44.5mM Tris, 44.5mM βορικό οξύ, 1mM EDTA pH 8.0), παρουσία 0.5μg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύθηκαν και φωτογραφήθηκαν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, με το σύστημα Gel Doc (Biorad, Hercules, CA, USA).

5.3. Απομόνωση και Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Η απομόνωση του προϊόντος της PCR από το πήκτωμα της αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εμπορικού kit (Macherey-Nagel). Αρχικά γινόταν αφαίρεση τμήματος του πηκτώματος που περιείχε το επιθυμητό τμήμα DNA και μεταφορά του σε προζυγισμένο σωλήνα erpendorf. Η διαλυτοποίηση του εν λόγω τεμαχίου λάμβανε χώρα με προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος NTI, το οποίο περιείχε αποδιατακτικό παράγοντα (θειοκυανική γουανιδίνη) και δείκτη αλλαγής του pH. Το δείγμα επωαζόταν στους 50°C, για 5-10 λεπτά, έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το τεμάχιο και κατόπιν μεταφερόταν σε στήλη πυριτίου. Ακολουθούσαν δύο διαδοχικές πλύσεις με 700μl διαλύματος NT3, περιέχον αιθανόλη, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας προσμίξεων και αλάτων και την καταβύθιση του DNA. Τέλος γινόταν έκλουση του DNA σε καθαρό σωλήνα συλλογής, με χρήση 15μl NE. Στα παραπάνω βήματα μεσολαβούσαν φυγοκεντρήσεις στα 11000xg, για 30sec.

5.4. Ανάγνωση αλληλουχίας DNA

Η αλληλούχιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger από το μηχάνημα 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Η μέθοδος Sanger, ή αλλιώς κλασική μέθοδος τερματισμού αλυσίδας απαιτεί ένα μονόκλωνο εκμαγείο DNA, έναν εκκινητή DNA, μία DNA πολυμεράση, κανονικά δεοξυνουκλεοσιδοτριφωσφορικά νουκλεοτιδία (dNTPs) και τροποποιημένα δι-δεοξυνουκλεοσιδοτριφωσφορικά νουκλεοτιδία (ddNTPs). Τα τελευταία είναι αυτά που τερματίζουν την επιμήκυνση του κλώνου. Αυτά τα νουκλεοτιδία που τερματίζουν την επιμήκυνση αλυσίδας στερούνται ομάδας 3'-OH που απαιτείται για το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ δύο νουκλεοτιδίων, προκαλώντας τον τερματισμό της λειτουργίας της DNA πολυμεράσης όταν ενσωματώνεται ένα διδείοξυ-νουκλεοτίδιο (ddNTP). Τα ddNTPs μπορεί να

είναι σημασμένα με ραδιενέργεια ή φθορισμό προκρίμενου να ανιχνεύονται σε αυτόματες μηχανές αλληλούχισης. Το δείγμα DNA χωρίζεται σε τέσσερις ξεχωριστές αντιδράσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας που περιέχουν και τα 4 dNTPs και την DNA πολυμεράση. Σε κάθε αντίδραση προστίθεται μόνο ένα από τα τέσσερα ddNTPs, ενώ τα υπόλοιπα είναι dNTPs. Η συγκέντρωση των ddNTPs που προστίθεται είναι 100 φορές χαμηλότερη από τη συγκέντρωση των υπολοίπων δεοξυ-νουκλεοτιδίων, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή αρκετών θραυσμάτων για την πλήρη αλληλούχιση. Μετά από αρκετούς κύκλους επέκτασης του DNA εκμαγείου, τα τμήματα που προκύπτουν αποδιατάσσονται με θέρμανση και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους με τη χρήση πηκτώματος αгарόζης.

Καταρχήν, στο καθαρισμένο προϊόν PCR κάθε δείγματος, εκτιμήθηκε η συγκέντρωση DNA σε ng/μl, καθώς και ο λόγος καθαρότητας 260/280. Ο προσδιορισμός των μετρήσεων έγινε με φωτομέτρηση στη συσκευή nanodrop (Thermofischer). Η αλληλούχιση έλαβε χώρα στο εργαστήριο κυτταρικών, μοριακών και ανοσολογικών εφαρμογών Cemía (Λάρισα), με τη μέθοδο Sanger. Εκτός από τα δείγματα, στάλθηκαν και οι εκκινητές (10pg/μl), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας του γονιδίου *gyrA*.

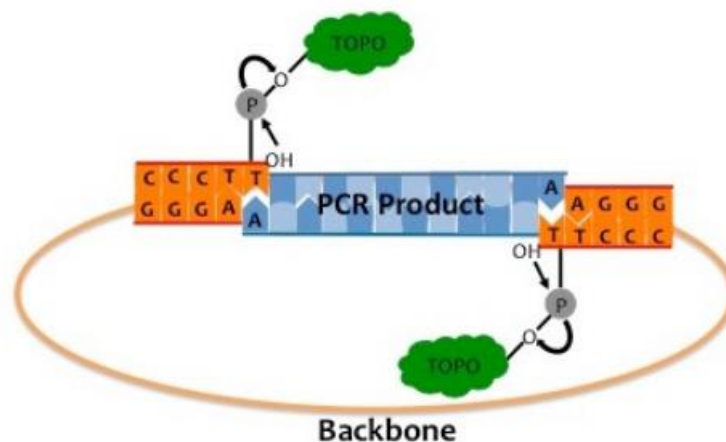
5.5. TOPO TA κλωνοποίηση

Η διαδικασία της κλωνοποίησης βάσει τοποϊσομεράσης (TOPO κλωνοποίηση) αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου κλωνοποίησης DNA, καθώς δεν περιλαμβάνει τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και DNA λιγάσης. Η μέθοδος αυτή πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη δημιουργία ενός εσωτερικού μάρτυρα, για την ποσοτικοποίηση του προϊόντος κατά τη Real Time PCR. Έγινε χρήση του εμπορικού kit TOPO® TA Cloning® (Invitrogen, Germany), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, η επιθυμητή αλληλουχία προς κλωνοποίηση ενισχύεται με μια αντίδραση PCR, στην οποία η Taq πολυμεράση διαθέτει δραστηριότητα τελικής τρανσφεράσης (terminal transferase activity-TOPO TA cloning). Το εν λόγω ένζυμο προσθέτει μία δεοξυριβοαδενοσίνη (A) στο 3' άκρο των προϊόντων της PCR, δημιουργώντας έτσι μονόκλωνα άκρα από αζευγάρωτες βάσεις. Στη συνέχεια, το προϊόν αναμιγνύεται με γραμμοποιημένο πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος διαθέτει μονόκλωνα συμπληρωματικά 3' άκρα.

Η γραμμοποίηση του πλασμιδίου έχει επιτευχθεί μέσω της τοποϊσομεράσης I, ένζυμο το οποίο αναγνωρίζει και τέμνει την αλληλουχία (δίκλωνου) DNA 5'-(C/T)CCTT-3'. Η τοποϊσομεράση παραμένει προσδεδεμένη μέσω ομοιοπολικού δεσμού στα αζευγάρωτα 3' άκρα του φορέα.

Κατόπιν ανάμιξης με το προϊόν της PCR, ο ομοιοπολικός δεσμός καταλύεται ενώ η ενέργεια που απελευθερώνεται χρησιμοποιείται για την υβριδοποίηση των μορίων στα συμπληρωματικά τους

άκρα (Εικόνα Β3). Συμπερασματικά, οι ενεργότητες της περιοριστικής ενδονουκλεάσης και της λιγάσης εμπεριέχονται στη δράση του ενζύμου τοποϊσομεράση Ι.



Εικόνα 7: Κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τη χρήση της DNA τοποϊσομεράσης Ι. (Προσαρμοσμένο από *addgene.org*).

Αρχικά, ενισχύθηκε μέσω αντίδρασης PCR η επιθυμητή αλληλουχία του γονιδίου *gyrA*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες της αντίδρασης παρέμειναν ως είχαν, με εξαίρεση την DNA πολυμεράση (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen). Ακολούθησε προετοιμασία του TOPO® cloning reaction mix, όπου προστέθηκαν τα προϊόντα της PCR και διαδοχική επώαση για 5min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα αντιδραστήρια καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του διαλύματος TOPO® cloning.

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και ποσότητες τους για τη δημιουργία του διαλύματος TOPO® cloning

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Προϊόν PCR	2μL
Διάλυμα αλάτων	1μL
Νερό	2μL
Φορέας: pCR™2.1-TOPO® vector	1μL
Τελικός όγκος	6μL

Στη συνέχεια, το ανασυνδυασμένο DNA χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* (DH5a), τα οποία έχουν καταστεί επιδεκτικά (competent) μέσω χημικής κατεργασίας στην πρόσληψη ξένου DNA. Ακολούθως, γίνεται ανάλυση και επιλογή των μετασχηματισμένων με το ανασυνδυασμένο DNA βακτηριακών κλώνων. Σημειώνεται ότι το ένθεμα παρεμβάλλεται του

πλασμιδιακού γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης, οπότε κατόπιν και ανάλυση λευκών αποικιών για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του ενθέματος.

Για το μετασχηματισμό των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό LB (Lysogeny broth), περιέχοντα 50 µg/mL καναμυκίνη, ως αντιβιοτικό επιλογής. Τα τρυβλία επιστρώθηκαν με 40µl X-gal (40mg/mL) και επώαστηκαν στους 37°C, έως ότου χρησιμοποιηθούν. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 2µL από το διάλυμα TOPO® Cloning σε φιαλίδιο με competent DH5a *E. coli* και το μίγμα επώαστηκε για 30min. Τα βακτήρια υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ, στους 42°C και κατόπιν μεταφέρθηκαν στον πάγο (4°C), όπου προστέθηκαν 250µL διαλύματος S.O.C. Ακολούθησε οριζόντια ανακίνηση των δειγμάτων σε 200 rpm, στους 37°C, για 1h. Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 3 τρυβλία, στα οποία προστέθηκαν 10 µL, 20 µL και 50 µL μετασχηματισμένων βακτηρίων αντίστοιχα. Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύκτια ενώ την επόμενη ημέρα, από κάθε δείγμα απομονώθηκαν 6 λευκές αποικίες, οι οποίες και ανακαλλιεργήθηκαν. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA σε 2 από αυτές και συνακόλουθα μία επιβεβαιωτική PCR, ούτως ώστε να επαληθευτεί ότι τα βακτήρια είχαν προσλάβει επιτυχώς το ένθεμα. Οι υπόλοιπες 4 αποικίες αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

5.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής μεθόδου PCR, η οποία μπορεί να ενισχύσει, να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει μια αλληλουχία-στόχο με μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης σε οποιοδήποτε στάδιο. Η λειτουργία της τεχνολογίας Real Time PCR στηρίζεται στη χρήση μηχανισμών σήμανσης, με τη βοήθεια ειδικών φθορίζουσών χρωστικών, οι οποίες διεγείρονται και εκπέμπουν φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Οι εν λόγω χρωστικές είτε ενσωματώνονται απευθείας στο δίκλωνο DNA (π.χ. SybrGreen), είτε συνδέονται ομοιοπολικά με ολιγονουκλεοτίδια ιχνηθέτες (probes). Ο φθορισμός που εκπέμπεται σε κάθε κύκλο αντίδρασης είναι ανάλογος του πληθυσμού των παραγόμενων αλληλουχιών.

Ειδικότερα, η Real Time PCR, βασισμένη στο φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας φθορισμού με αντήχηση (fluorescence resonance energy transfer, FRET), περιλαμβάνει δύο φθοροφόρα μόρια, συνδεδεμένα με ξεχωριστούς ιχνηθέτες, οι οποίοι υβριδίζονται εν σειρά σε κοντινή απόσταση επί του ιδίου κλώνου της αλληλουχίας-στόχου. Το φαινόμενο FRET βασίζεται στη μεταφορά ενέργειας, εξαρτώμενη της απόστασης, από ένα μόριο δότη σε ένα μόριο δέκτη. Λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου στις αποστάσεις των μορίων, χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση μοριακών αλληλεπιδράσεων. Η μέθοδος FRET δεν παράγει ραδιενέργεια και το μόριο δότης έχει μία χρωστική ή ένα χρωμοφόρο, το οποίο αρχικά απορροφάει την ενέργεια ενώ το μόριο δέκτης είναι το χρωμοφόρο στο οποίο μεταφέρεται η ενέργεια. Αυτή η αλληλεπίδραση συμβαίνει σε

αποστάσεις μεγαλύτερες των διατομικών, χωρίς την μετατροπή της ενέργειας σε θερμική. Η μεταφορά ενέργειας οδηγεί σε μείωση της έντασης του φθορισμού του δότη και σε μία αύξηση της έντασης του φθορισμού του δέκτη. Τα μόρια του δότη και του δέκτη πρέπει να βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους συνήθως από 10 μέχρι 100 Å. Το εύρος της απορρόφησης ή της διέγερσης του μορίου δέκτη πρέπει να ξεπερνά το εύρος φθορισμού του δότη. Γενικά, τα μόρια του δότη και του δέκτη ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες και με αυτόν τον τρόπο μπορεί αυτή η μέθοδος να ανιχνεύσει το φθορισμό του δέκτη ή τη μείωση του φθορισμού του δότη. Το μόριο δότης είναι πάντα ένα φθορίζον μόριο.

Η βακτηριακή αντοχή στις φθοριοκινολόνες μπορεί να διαγνωσθεί με γενετικό έλεγχο του γονιδίου *gyrA*. Η ανάλυση καμπυλών τήξης με τεχνολογία FRET έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση αντοχής του *H. pylori* σε φθοριοκινολόνες χρησιμοποιώντας δύο συνδυασμούς ιχνηθετών για τον προσδιορισμό των κυριότερων μεταλλάξεων στις αμινοξικές θέσεις 87 ή 91 του γονιδίου της *gyrA* (Glocker and Kist, 2004).

Η Real Time PCR πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην προαναφερθείσα PCR, με παράλληλη χρήση των εξής ιχνηθετών:

- anchor probe 91: 5-AAAAATCTTGCGCCATTCTCACTAGCG-3 (σημασμένος στο 3' με φλουορεσκίνη)
mutation probe 91: 5-ACCATAAACGGCATTATCGCCA-3 (σημασμένος στο 5' με LightCycler red 640 και με φωσφορυλιωμένο 3')

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου έγινε έλεγχος των ποσοτήτων των εκκινητών και των ιχνηθετών καθώς και της ποσότητας μαγνησίου στο διάλυμα της αντίδρασης, που περιγράφεται στα αποτελέσματα.

Ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 20μL και περιείχε 5μL DNA, 2μL 10x Fast Start, 0.8μL LEVOF, 0.8μL LEVOR, 0,4μL anchor probe, 0,4μL mutation probe, 1,2μL MgCl₂ και 9,4μL H₂O. Η Real Time PCR βασίστηκε στο άρθρο των Glocker και Kist (Glocker & Kist, 2004) ενώ κατόπιν βελτιστοποίησης, οι συνθήκες ήταν οι ακόλουθες: αποδιάταξη στους 95°C για 10 min ακολουθούμενη από 40 κύκλους των 10sec αποδιάταξης στους 95°C, 10sec υβριδοποίησης στους 60°C και 17sec επιμήκυνσης στους 72°C.

Οι αντιδράσεις της Real Time PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα LightCycler 2.0.

6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 και το Fisher's exact test με την χρήση του στατιστικού πακέτου GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Φαινοτυπική ανίχνευση αντοχής

Συνολικά, εξετάστηκαν 51 στελέχη *H. pylori*, τα οποία απομονώθηκαν από βιοψίες ασθενών. Η φαινοτυπική ανίχνευση αντοχής των βακτηρίων έναντι της λεβοφλοξασίνης αξιολογήθηκε με τη μέθοδο E-test. Στον Πίνακα Γ-1 συνοψίζονται οι τιμές MIC του αντιβιοτικού για το σύνολο των δειγμάτων.

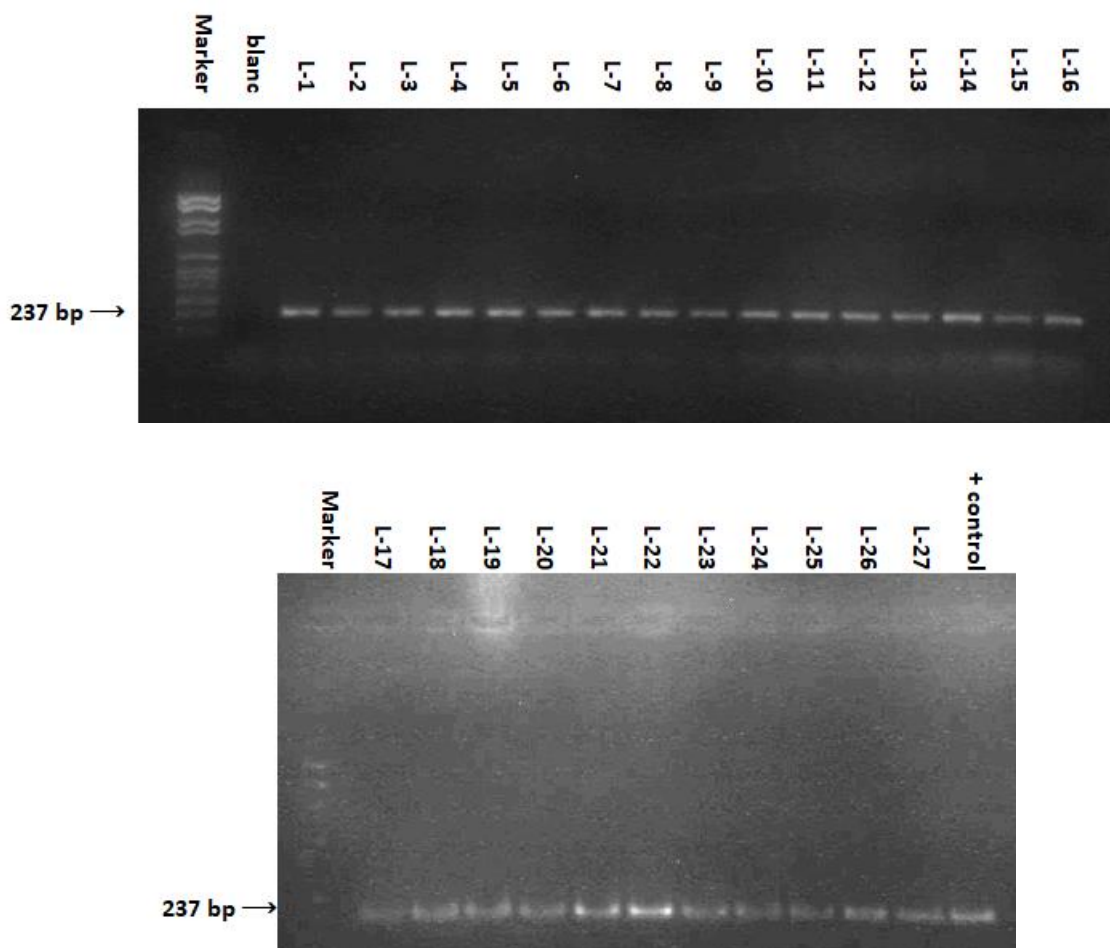
Πίνακας 7: Προσδιορισμός ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC) των κλινικών δειγμάτων έναντι της λεβοφλοξασίνης

Κωδικός Δείγματος	MIC (mg/L)	Κωδικός Δείγματος	MIC (mg/L)
Lev-1	32	Lev-27	32
Lev-2	32	Lev-28	32
Lev-3	32	Lev-29	32
Lev-4	32	Lev-30	0,75
Lev-5	1	Lev-31	32
Lev-6	32	Lev-32	32
Lev-7	32	Lev-33	0,75
Lev-8	32	Lev-34	0,75
Lev-9	32	Lev-35	0,75
Lev-10	32	Lev-36	0,125
Lev-11	32	Lev-37	0,75
Lev-12	32	Lev-38	1
Lev-13	32	Lev-39	0,094
Lev-14	32	Lev-40	32
Lev-15	32	Lev-41	32
Lev-16	32	Lev-42	32
Lev-17	32	Lev-43	0,064
Lev-18	32	Lev-44	0,023
Lev-19	32	Lev-45	32
Lev-20	32	Lev-46	32
Lev-21	32	Lev-47	32
Lev-22	1	Lev-48	16
Lev-23	32	Lev-49	32
Lev-24	32	Lev-50	32
Lev-25	32	Lev-51	32
Lev-26	32		

Ανάμεσα στα 51 στελέχη *H. pylori* που μελετήθηκαν, 39 (76,5%) βρέθηκαν ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη με MIC που κυμαινόταν από 16-32mg/L. Αντίθετα, 12 (23,5%) στελέχη παρουσίασαν ευαισθησία στη λεβοφλοξασίνη, με τιμές MIC από 0,023-1mg/L.

2. Προετοιμασία στελεχών *H. pylori* για αλληλούχιση

Η προετοιμασία των δειγμάτων πριν σταλούν για αλληλούχιση περιλάμβανε ποιοτικό έλεγχο των απομονωθέντων ολικού γενωμικού DNA. Εν συντομία, από τα 51 κλινικά στελέχη *H. pylori* που καλλιεργήθηκαν πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA. Στη συνέχεια ακολούθησε PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος του γονιδίου *gyrA* μήκους 237bp (ζευγών βάσεων) και έπειτα έγινε επιβεβαίωση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1%, προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητά τους. Στην Εικόνα 8 παρατίθενται τα προϊόντα ηλεκτροφόρησης ενδεικτικών στελεχών.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης 1 %. Διακρίνονται τμήματα μήκους 237 ζευγών βάσεων, τα οποία αντιστοιχούν στο γονίδιο *gyrA*.

Ακολούθως, από το πήκτωμα αгарόζης πραγματοποιήθηκε εκτομή του τμήματος DNA, το οποίο αντιστοιχούσε στο προϊόν του γονιδίου *gyrA*. Κατόπιν μετρήθηκε η συγκέντρωση καθώς και η καθαρότητα των δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Στον Πίνακα 8 παρατίθενται οι συγκεντρώσεις 26 δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από κλινικά στελέχη *H. pylori*.

Πίνακας 8: Συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων στα δείγματα υπό μελέτης, μετά από απομόνωση και καθαρισμό από πήκτωμα αгарόζης.

Κωδικός Δείγματος	ng/μl	Κωδικός Δείγματος	ng/μl
Lev-1	8,3	Lev-27	11,8
Lev-2	37,2	Lev-28	12,5
Lev-3	10,5	Lev-29	9,8
Lev-4	9,0	Lev-30	10,5
Lev-5	11,8	Lev-31	10,2
Lev-6	10,2	Lev-32	32,6
Lev-7	11,8	Lev-33	9,8
Lev-8	18,8	Lev-34	9,9
Lev-9	24,5	Lev-35	10,5
Lev-10	14,0	Lev-36	11,6
Lev-11	9,7	Lev-37	14,7
Lev-12	9,3	Lev-38	18,6
Lev-13	11,2	Lev-39	25,4
Lev-14	12,3	Lev-40	36,2
Lev-15	19,8	Lev-41	25,2
Lev-16	9,7	Lev-42	21,0
Lev-17	17,5	Lev-43	22,3
Lev-18	12,1	Lev-44	18,9
Lev-19	15,0	Lev-45	16,1
Lev-20	18,1	Lev-46	17,8
Lev-21	16,3	Lev-47	34,2
Lev-22	20,0	Lev-48	16,5
Lev-23	24,8	Lev-49	9,9
Lev-24	14,6	Lev-50	12,5
Lev-25	29,1	Lev-51	13,2
Lev-26	31,0		

3. Επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχησης

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης κατά Sanger πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα BioEdit 7.2. Η ανάλυση προϊόντων ενίσχυσης προϊόντων βασίστηκε στη σύγκριση με

την αλληλουχία στου στελέχους αναφοράς *H. pylori* αναφοράς 26695 για την ανίχνευση τυχών μεταλλαγών. Τα αποτελέσματα των 51 δειγμάτων (12 ευαίσθητα + 39 ανθεκτικά παρατίθενται στην Εικόνα 9.

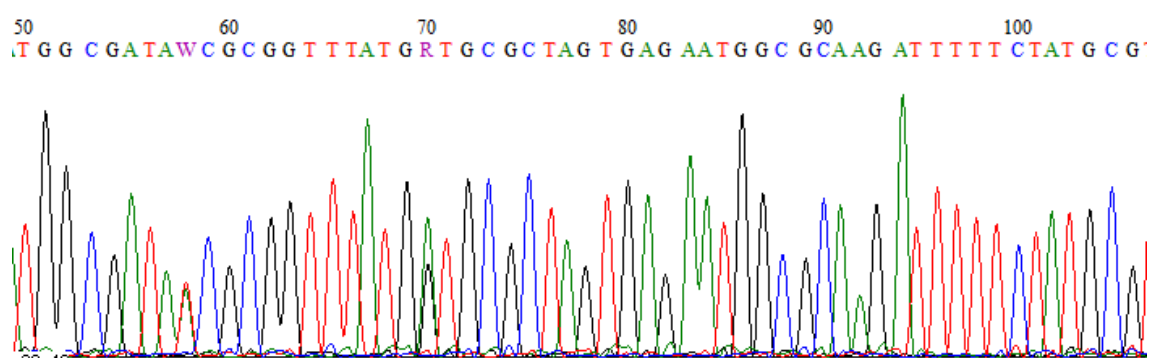
	60	70	80	90	100	110	120	130	
Hp 26695	LG	LTSKVAYKKS	ARIVGDVIGK	YHPHGDNAVY	DALVRMAQDF	SMRLELVGGQ	GNFGSIDGDN	AAAMRYTEAR	MTKA 192
Lev-5	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-22	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-30	..	S	..	..	..	..	..	..	192
Lev-33	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-34	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-35	..	S	..	..	..	..	..	..	192
Lev-36	..	S	..	..	..	..	..	..	192
Lev-37	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-38	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-39	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-43	..	..	..	..	..	..	GG	..	192
Lev-44	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-1	..	..	..	Y	..	..	..	..	192
Lev-2	..	..	..	T	..	..	..	..	192
Lev-3	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-4	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-6	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-7	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-8	..	..	..	N	..	F	..	P	192
Lev-9	..	..	..	G	..	..	PTA	..	192
Lev-10	..	..	..	G	..	..	..	..	192
Lev-11	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-12	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-13	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-14	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-15	..	..	..	G	..	..	DP	P	192
Lev-16	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-17	..	..	..	Y	..	..	..	..	192
Lev-18	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-19	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-20	..	T	..	..	..	..	..	..	192
Lev-21	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-23	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-24	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-25	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-26	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-48	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-49	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-50	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-51	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-32	..	..	..	K	G	..	..	..	192
Lev-31	..	..	..	..	..	..	..	..	192
Lev-27	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-45	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-46	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-47	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-28	..	..	..	N	..	..	..	..	192
Lev-29	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-40	..	..	..	K	..	..	..	..	192
Lev-41	..	S	..	K	..	..	..	..	192
Lev-42	..	..	..	K	..	..	..	..	192

Εικόνα 9: Στοίχιση των αλληλουχιών του συνόλου των στελεχών της μελέτης, οι οποίες αντιστοιχούν σε υποπεριοχή του γονιδίου *gyrA*. Με γαλάζιο φόντο σημειώνονται τα ευαίσθητα στελέχη και με το κίτρινο τα ανθεκτικά στελέχη στη λεβοφλοξασίνη. Με κωδικό ενός γράμματος σημειώνονται οι μεταλλάξεις αντικατάστασης ως προς το στέλεχος αναφοράς 26695. Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις στις θέσεις 87 και 91 θεωρούνται υπεύθυνες για την ανοχή στη λεβοφλοξασίνη

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των 12 φαινοτυπικά ευαίσθητων στελεχών ανέδειξε στη πλειοψηφία τους έλλειψη σημειακών μεταλλαγών στο υπό μελέτη τμήμα του γονιδίου *gyrA*, εκτός δύο περιπτώσεων (16,67%) των στελεχών Lev-22 και Lev-33 με μεταλλαγές D91N και K87N αντίστοιχα (Εικόνα 9). Αντίθετα, στη συντριπτική πλειονότητα των ανθεκτικών στελεχών

έναντι της λεβοφλοξασίνης παρατηρήθηκε τουλάχιστον μία εκ των δύο μεταλλαγών στα κωδικόνια 87 και 91. Πιο συγκεκριμένα, από τα 39 ανθεκτικά στελέχη, 18 (46,14%) έφεραν μεταλλαγή στο κωδικόνιο 87 και 18 (46,17%) στο κωδικόνιο 91, ενώ 4 (10,26%) (στελέχη Lev-14, -20, -24, -31) δεν έφεραν καμία μεταλλαγή στα εν λόγω κωδικόνια. Όσον αφορά το κωδικόνιο 87, 17 ανθεκτικά στελέχη (43,59%) έφεραν την N87K (Lev-6, -11, -16, -18, -19, -23, -29, -32, -40, -41, -42, -45, -48, -49, -50, -51) και ένα (2,56%) την N87T (Lev-2). Αντίστοιχα όσον αφορά το κωδικόνιο 91, 12 ανθεκτικά στελέχη (30,77%) έφεραν την D91N (Lev-3, -4, -7, -8, -12, -13, -21, -25, -26, -28, -46, -47), 4 (10,26%) την D91G (Lev-9, -10, -15, -32) και 2 (5,13%) την D91Y (Lev-1, -17). Να σημειωθεί ότι ένα (2,56%) ανθεκτικό στέλεχος (Lev-32) έφερε ταυτόχρονα μεταλλαγή στο κωδικόνιο N87K και D91G.

Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι στο ηλεκτροφερογράφημα της αλληλούχισης του δείγματος Lev-10 (Εικόνα 10) παρατηρούνται δύο κορυφές στις νουκλεοτιδικές θέσεις που αντιστοιχούν στα κωδικόνια 87 και 91. Στη θέση 87 θα μπορούσε να είναι σε αναλογία 1:1, είτε το κωδικόνιο AAC που κωδικοποιεί για το αμινοξύ N (αγρίου τύπου) ή το κωδικόνιο ATC που κωδικοποιεί για το αμινοξύ I που σχετίζεται με αντοχή στη λεβοφλοξασίνη. Στη θέση 91, θα μπορούσε να είναι σε αναλογία 3:2 είτε το κωδικόνιο GAT που κωδικοποιεί για το αμινοξύ D (αγρίου τύπου) είτε το κωδικόνιο GGT που κωδικοποιεί για το αμινοξύ G, που σχετίζεται με αντοχή στη λεβοφλοξασίνη. Ο συνεντοπισμός των εν λόγω πολυμορφισμών υποδηλώνει ενδεχομένως ταυτόχρονη παρουσία ευαίσθητων και ανθεκτικών υποπληθυσμών στην καλλιέργεια (απουσία κλωνικότητας), από την οποία απομονώθηκε το συγκεκριμένο γενετικό υλικό.



Εικόνα 10: Ηλεκτρογράφημα δείγματος που έχει αλληλουχιθεί με τη μέθοδο Sanger.

Σε 3 ευαίσθητα (Lev-30, -35, -36) καθώς και σε ένα ανθεκτικό (Lev-41) εντοπίστηκε η μεταλλαγή T62S χωρίς υφίσταται κάποια βιβλιογραφική συσχέτιση της συγκεκριμένης μεταλλαγής με αντοχή στη λεβοφλοξασίνη. Επιπλέον ένα ευαίσθητο στέλεχος (Lev-43) παρουσίασε ταυτόχρονα μεταλλαγές στα κωδικόνια A121G και A122G.

Παράλληλα, 3 ανθεκτικά στελέχη παρουσίασαν πλέον των μεταλλαγών στα κωδικόνια 87 και 91, επιπλέον αντικαταστάσεις ως ακολούθως: S115F, A129P στο Lev-8 στέλεχος, R125P, Y126T, T127A το Lev-9 στέλεχος και E128D, A129P, A134P το Lev-15 στέλεχος. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τη συνεισφορά των ανωτέρω αντικαταστάσεων στην αντοχή έναντι της λεβοφλοξασίνης.

Τέλος, σε 4 δείγματα (10,3 %) που φαινοτυπικά ήταν ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη δεν εντοπίστηκε μεταλλαγή στο τμήμα μεταξύ των κωδικονίων 59-137 του γονιδίου *gyrA*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά τα στελέχη μπορεί να είχαν κάποια άλλη μεταλλαγή, η οποία τους προσέδωσε αντοχή στη λεβοφλοξασίνη σε κάποιο άλλο τμήμα του γονιδίου *gyrA* ή στο γονίδιο *gyrB*.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα γονοτυπικής ανάλυσης και τιμές MIC των 51 στελεχών *H. pylori*

Κωδικός δείγματος	Μετάλλαξη	MIC (mg/L)
Lev-1	D91Y	32
Lev-2	N87T	32
Lev-3	D91N	32
Lev-4	D91N	32
Lev-5	--	1
Lev-6	N87K	32
Lev-7	D91N	32
Lev-8	D91N	32
Lev-9	D91G	32
Lev-10	N87I & D91G	32
Lev-11	N87K	32
Lev-12	D91N	32
Lev-13	D91N	32
Lev-14	--	32
Lev-15	D91G	32
Lev-16	N87K	32
Lev-17	D91Y	32
Lev-18	N87K	32
Lev-19	N87K	32
Lev-20	--	32
Lev-21	D91N	32
Lev-22	D91N	1
Lev-23	N87K	32
Lev-24	--	32
Lev-25	D91N	32
Lev-26	D91N	32
Lev-27	N87K	32
Lev-28	D91N	32
Lev-29	N87K	32
Lev-30	--	0,75
Lev-31	--	32
Lev-32	N87K & D91G	32
Lev-33	N87K	0,75
Lev-34	--	0,75
Lev-35	--	0,75
Lev-36	--	0,125
Lev-37	--	0,75
Lev-38	--	1
Lev-39	--	0,094
Lev-40	N87K	32

Lev-41	N87K	32
Lev-42	N87K	32
Lev-43	--	0,064
Lev-44	--	0,023
Lev-45	N87K	32
Lev-46	D91N	32
Lev-47	D91N	32
Lev-48	N87K	16
Lev-49	N87K	32
Lev-50	N87K	32

Μοριακή Μέθοδος (Αλληλούχιση κατά Sanger)	Ανθεκτικά MIC>1mg/L	Ευαίσθητα MIC≤1mg/L	Σύνολο
Παρουσία μετάλλαξης	35	2	37
Απουσία μετάλλαξης	4	10	14
Σύνολο	39	12	51

Lev-51	N87K	32
--------	------	----

Σε αυτή την μελέτη δεν ήταν δυνατή η συσχέτιση των επιπέδων MIC με τις θέσεις μεταλλαγών αντικατάστασης, καθώς τα περισσότερα ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη *H. pylori* στελέχη είχαν MIC 32mg/L.

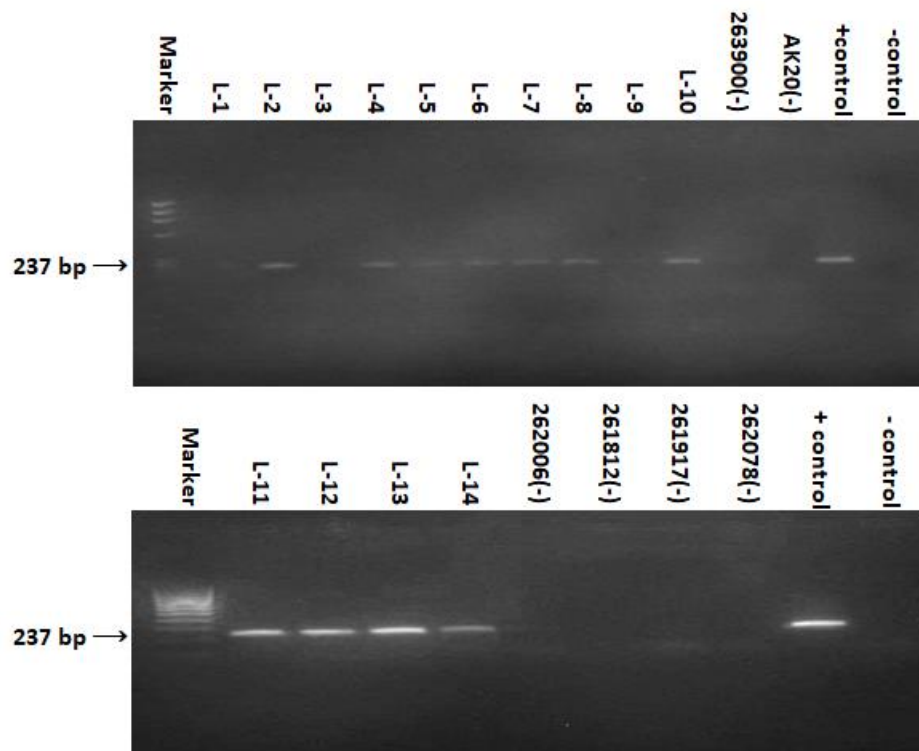
Πίνακας 10: Συσχέτιση φαινοτυπικής μεθόδου ανίχνευσης αντοχής στη λεβοφλοξασίνη (δοκιμασία E-test) με τη μοριακή μέθοδο (αλληλούχιση κατά Sanger).

Προσδιορίστηκαν επίσης η ευαισθησία και η ειδικότητα της PCR, συγκριτικά με τη δοκιμασία E-test, δεδομένου ότι η φαινοτυπική προσέγγιση αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς (Gold standard) για την ανίχνευση αντοχής σε αντιβιοτικά. Η ευαισθησία της PCR εκτιμήθηκε σε ποσοστό 89,7 % ενώ η ειδικότητα σε 83,3 % (Πίνακας 10). Παράλληλα, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *gyrA* ανάμεσα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη στη λεβοφλοξασίνη (ακριβής πιθανότητα του Fisher $p < 0,0001$).

4. PCR από βιοπτικό υλικό

Πριν από τη βελτιστοποίηση της Real Time PCR, ήταν αναγκαία η πιστοποίηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας **των εκκινητών** για τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του *H. pylori*. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε απλή PCR σε γενωμικό υλικό, το οποίο απομονώθηκε απευθείας από γαστρικές βιοψίες ασθενών. Από το σύνολο των 51 δειγμάτων επιλέχθηκαν ορισμένες βιοψίες, ως θετικοί μάρτυρες στην παρουσία του *H. pylori* ενώ παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε βιοπτικό υλικό από κλινικά δείγματα ασθενών, αρνητικά στην παρουσία του βακτηρίου, για την εκτίμηση της ευαισθησίας των εκκινητών. Επιπλέον, για την εκτίμηση της μεθ, ως αρνητικοί μάρτυρες, συμπεριλήφθηκαν δείγματα DNA από τα εξής βακτήρια: *E.coli*, *P.aeruginosa* και *C.jejuni*.

Τα προϊόντα της PCR από τις βιοψίες ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα 1 % αгарόζης και τα αποτελέσματα παρατίθενται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση επιλεγμένων δειγμάτων DNA από βιοπτικό υλικό σε πήκτωμα 1 % αгарόζης.

Σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση, από το βιοπτικό υλικό ενισχύθηκαν τα επιλεγμένα θετικά στην παρουσία του *H. pylori* δείγματα. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι κανένα δείγμα από αυτά που βρέθηκαν αρνητικά για το *H. pylori* στην καλλιέργεια δεν ενισχύθηκε στην PCR από τις

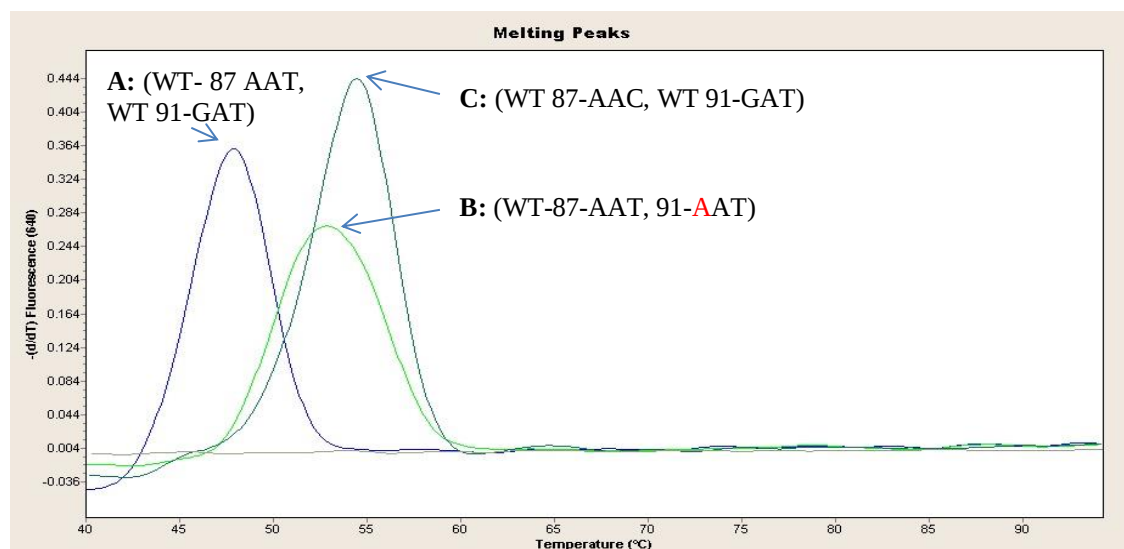
αντίστοιχες βιοψίες. Παράλληλα, δεν ενισχύθηκαν δείγματα από τα άλλα βακτήρια πέραν του *H. pylori*.

Συμπερασματικά, τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητα της PCR από βιοπτικό υλικό ήταν συγκρίσιμη με αυτή της καλλιέργειας, όσον αφορά την ανίχνευση του *H. pylori*.

5. Real Time-PCR

Πραγματοποιήθηκε Real Time PCR με ζεύγος ιχνηθετών, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση μεταλλαγών στο κωδικόνο 91 ενώ αναγνωρίζουν επίσης κάποιες μεταλλαγές στο κωδικόνιο 87. Τα αποτελέσματα από τη RealTime-PCR παρατίθενται στην Εικόνα 12, καθώς και στον Πίνακα 11.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 12, η κορυφή C, η οποία αντιστοιχεί στην υψηλότερη θερμοκρασία τήξης (54°C), αφορά το δείγμα με κωδικόνια αγρίου τύπου (WT) WT 87-AAC και WT 91-GAT. Η κορυφή B αντιστοιχεί στους 52°C και αφορά το δείγμα με κωδικόνιο WT 87-AAT και 91-AAT, το οποίο αντιστοιχεί στη μετάλλαξη D91N. Τέλος, η κορυφή A, με θερμοκρασία τήξης 47°C, αντιστοιχεί στα δείγματα με κωδικόνια WT 87-AAT και WT 91-GAT.



Εικόνα 12: Καμπύλες αποδιάταξης της real time-PCR με τη χρήση ζεύγους ιχνηθετών για τις μεταλλαγές του γονιδίου της *gyrA* που αντιστοιχούν στις αμινοξικές θέσεις 87 και 91. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί μεταλλαγών απεικονίζονται ως τρεις διαφορετικές κορυφές (A, B και Γ) (Αγρίου Τύπου-WT).

Πίνακας 11: Αναλυτικά οι θερμοκρασίες τήξης καθώς και τα κωδικόνια που αντιστοιχούν στις αμινοξικές θέσεις 87 και 91, για τα 51 υπό μελέτη δείγματα. Με κόκκινο επισημαίνονται οι μεταλλαγές αντικατάστασης.

Στέλεχος	Κωδικόνιο Θέση 87	Αμινοξύ	Κωδικόνιο Θέση 91	Αμινοξύ	Θερμοκρασία τήξης (°C)
Lev-1	AAC	N	TAT	Y	44,32
Lev-2	ACC	T	GAT	D	53,98
Lev-3	AAC	N	AAT	N	44,62
Lev-4	AAT	N	AAT	N	52,08
Lev-5	AAC	N	GAT	D	54,88
Lev-6	AAA	K	GAT	D	48,33
Lev-7	AAC	N	AAT	N	44,32
Lev-8	AAT	N	AAT	N	52,24
Lev-9	AAT	N	GGT	G	59,35
Lev-10	AAC	N	GGT	G	51,97
Lev-11	AAA	K	GAT	D	48,43
Lev-12	AAT	N	AAT	N	52,34
Lev-13	AAT	N	AAT	N	52,45
Lev-14	AAT	N	GAT	D	47,32
Lev-15	AAC	N	GGT	G	44,32
Lev-16	AAA	K	GAT	D	48,43
Lev-17	AAC	N	TAT	Y	44,36
Lev-18	AAG	K	GAT	D	51,62
Lev-19	AAA	K	GAT	D	48,09
Lev-20	AAC	N	GAT	D	54,02
Lev-21	AAC	N	AAT	N	43,99
Lev-22	AAC	N	AAT	N	44,02
Lev-23	AAG	K	GAT	D	51,45
Lev-24	AAC	N	GAT	D	54,01
Lev-25	AAC	N	AAT	N	44,33
Lev-26	AAT	N	AAT	N	52,48
Lev-27	AAA	K	GAT	D	48,06
Lev-28	AAC	N	AAT	N	51,89
Lev-29	AAA	K	GAT	D	48,04

Lev-30	AAC	N	GAT	D	54,69
Lev-31	AAC	N	GAT	D	54,60
Lev-32	AA A	K	GG T	G	51,88
Lev-33	AA A	K	GAT	D	48,01
Lev-34	AAT	N	GAT	D	47,13
Lev-35	AAC	N	GAT	D	54,65
Lev-36	AAT	N	GAT	D	47,45
Lev-37	AAC	N	GAT	D	54,59
Lev-38	AAC	N	GAT	D	54,62
Lev-39	AAC	N	GAT	D	54,60
Lev-40	AA A	K	GAT	D	48,26
Lev-41	AA A	K	GAT	D	48,39
Lev-42	AA A	K	GAT	D	48,08
Lev-43	AAC	N	GAT	D	54,28
Lev-44	AAT	N	GAT	D	47,60
Lev-45	AA A	K	GAT	D	47,98
Lev-46	AAT	N	AAT	N	52,34
Lev-47	AAT	N	AAT	N	52,21
Lev-48	AA A	K	GAT	D	48,55
Lev-49	AA A	K	GAT	D	48,47
Lev-50	AA A	K	GAT	D	48,62
Lev-51	AA A	K	GAT	D	48,61

Στον Πίνακα 12 συνοψίζεται κάθε συνδυασμός κωδικονίων 87 και 91 με την αντίστοιχη θερμοκρασία τήξης, όπως προέκυψε από τον Πίνακα 11. Παρατηρείται ότι οι δύο συνδυασμοί κωδικονίων αγρίου τύπου, ο 87-AAC και 91-GAT καθώς και ο 87-AAT και 91-GAT, είχαν θερμοκρασία τήξης 54°C και 47°C, αντίστοιχα. Η συχνότερη μεταλλαγή N87K (45,9%), ανάλογα με την αντικατάσταση βάσης που έλαβε χώρα, παρουσίασε δύο διαφορετικούς θερμοκρασίες τήξης: κατά την αντικατάσταση της θυμίνης από αδερίνη (87-AA**A**) η θερμοκρασία τήξης ήταν 48°C ενώ όταν η θυμίνη αντικαταστάθηκε από γουανίνη (87-AA**G**), η θερμοκρασία τήξης ήταν 52°C.

Πίνακας 12: Σύνοψη συνδυασμών κωδικονίων με την αντίστοιχη θερμοκρασία τήξης. Υπογραμμίζονται τα κωδικόνια αγρίου τύπου ενώ με κόκκινο χρώμα οι μεταλλάξεις αντικατάστασης βάσης.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>gyrA</i>		Θερμοκρασία τήξης (°C)
WT	<u>87-AAC</u> και <u>91-GAT</u>	<u>54</u>
	<u>87-AAT</u> και <u>91-GAT</u>	<u>47</u>
	87-AA <u>A</u> και <u>91-GAT</u>	48
N87K	87-AA <u>G</u> και <u>91-GAT</u>	52
	<u>87-AAC</u> και 91- <u>AAT</u>	44
D91N	<u>87-AAT</u> και 91- <u>AAT</u>	52
	<u>87- AAC</u> και 91- <u>GGT</u>	52
D91G	<u>87-AAT</u> και 91- <u>GGT</u>	59
D91Y	<u>87- AAC</u> και 91- <u>TAT</u>	44

Η δεύτερη συχνότερη μεταλλαγή ήταν η D91N (29,7 %). Σε αυτήν την περίπτωση η θερμοκρασία τήξης φάνηκε να εξαρτάται από το κωδικόνιο στη θέση 87: όταν στη θέση 87 υπάρχει το κωδικόνιο AAC τότε η μεταλλαγή αυτή εμφάνισε θερμοκρασία τήξης στους 44°C, ενώ όταν υπάρχει το κωδικόνιο AAT τότε η μεταλλαγή αυτή εμφάνισε θερμοκρασία τήξης 52°C. Άλλες μεταλλαγές που εμφανίστηκαν σε μικρότερα ποσοστά ήταν οι D91G (5,4 %) και D91Y (2,7 %). Η μετάλλαξη D91G όταν το κωδικόνιο 87 ήταν το AAC θερμοκρασία τήξης ήταν 52°C ενώ παρουσία του 87-AAT η θερμοκρασία τήξης ήταν 59°C. Τέλος, η μεταλλαγή D91Y εμφάνισε θερμοκρασία τήξης 44°C.

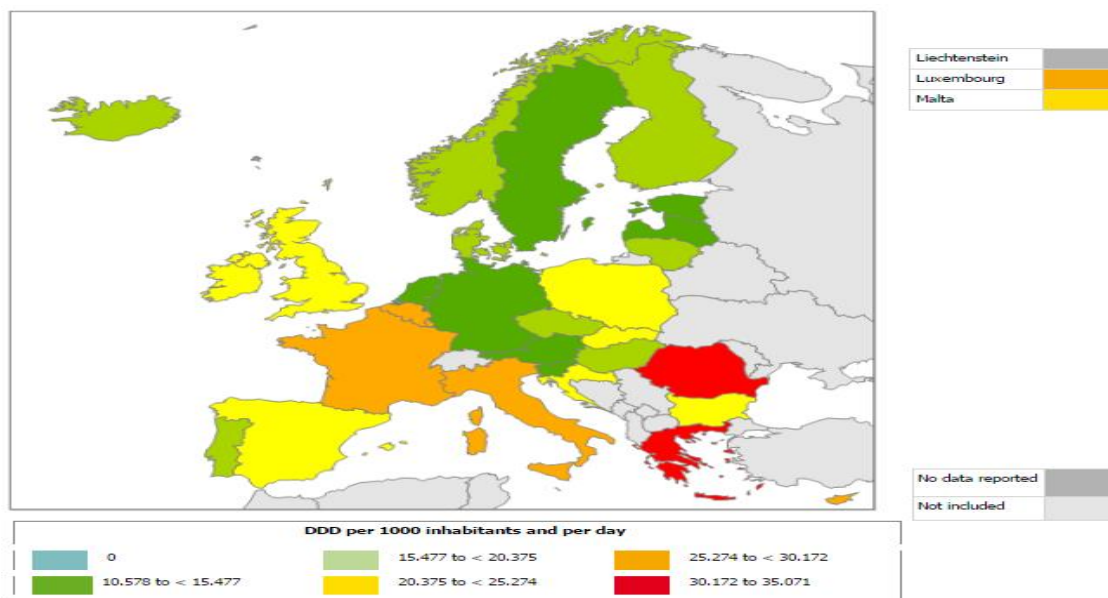
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη αντοχής στα κοινώς χορηγούμενα αντιβιοτικά αποτελεί την κυριότερη αιτία αποτυχίας των σχημάτων εκρίζωσης της *H. pylori* λοίμωξης. Θεωρείται ότι σε ένα ποσοστό των ασθενών, το κλασικό τριπλό θεραπευτικό σχήμα δεν οδηγεί σε εκρίζωση του βακτηρίου ενώ θα καταστεί αναγκαία 2^η ή και 3^η γραμμής θεραπεία. Σε περίπτωση αποτυχίας μιας θεραπείας, η επόμενη επιλογή είναι η καλλιέργεια του βακτηρίου και ο έλεγχος της ευαισθησίας του απέναντι σε διαφορετικά αντιβιοτικά (αντιβιογράμμα). Υπάρχει όμως η πιθανότητα να μην προκύψει σαφές αποτέλεσμα από την καλλιέργεια, συνήθως λόγω ανεπαρκούς βιοπτικού υλικού, καθυστέρησης στη μεταφορά των δειγμάτων, λανθασμένης μεθόδου, απειρίας και τέλος, λήψης αντιβιοτικών ή αναστολέων αντλίας πρωτονίων 2 εβδομάδες προ της συλλογής της βιοψίας. Στην παραπάνω περίπτωση, ενισχυτική θα ήταν η παράλληλη διενέργεια μοριακής ανίχνευσης της αντοχής απ'ευθείας του βιοπτικού υλικού. Οι μοριακές μέθοδοι που εφαρμόζονται ήδη στη διάγνωση σε επίπεδο ρουτίνας, αφορούν την ανίχνευση του *H. pylori* και ταυτόχρονα των μεταλλαγών που προσδίδουν αντοχή έναντι της κλαριθρομυκίνης. Σημειώνεται ότι η Ελλάδα βρίσκεται ανάμεσα στις χώρες με υψηλά ποσοστά αντοχής στην κλαριθρομυκίνη (27,2%) (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2015) και ως εκ τούτου είναι πολύ σημαντικός ο προσδιορισμός της αντοχής τόσο σε αυτή, όσο και σε διαφορετικά αντιβιοτικά, όπως η λεβοφλοξασίνη.

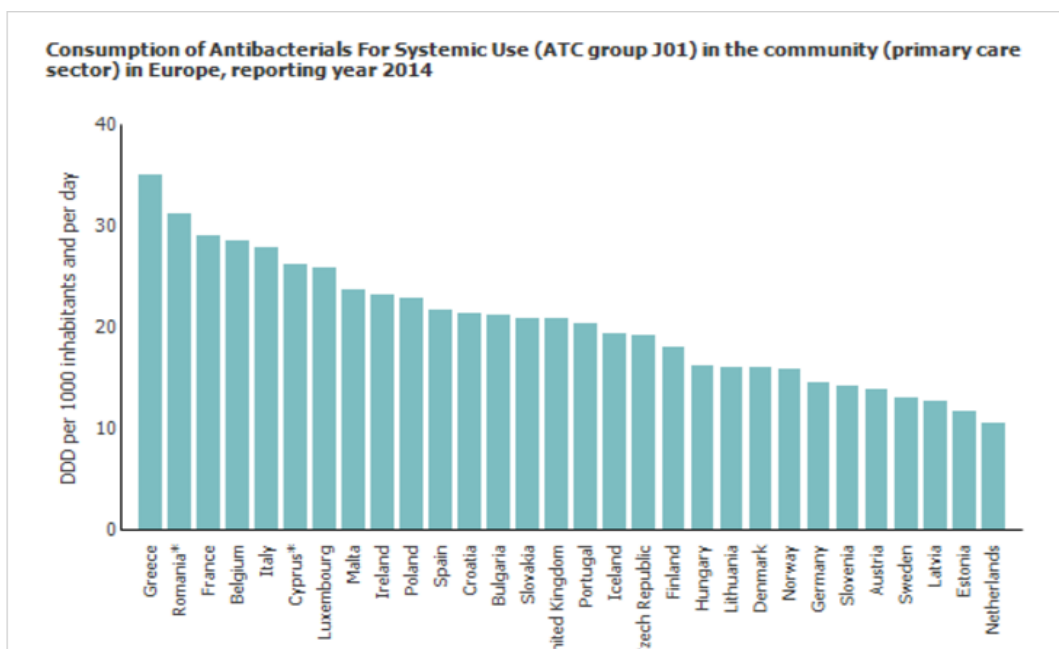
Η λεβοφλοξασίνη είναι μία κινολόνη, η οποία χρησιμοποιείται στα θεραπευτικά σχήματα 2^η και 3^η γραμμής, με ποσοστό επιτυχίας 85-95 %. Παρόλο που τα επίπεδα αντοχής στη λεβοφλοξασίνη στη χώρα μας παραμένουν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (8,2%), παρατηρείται ωστόσο μία μικρή συν τω χρόνω αύξηση σε αυτά ενώ έχουν συνδεθεί δευτερογενώς (25%) και με τη χρήση άλλων φθοριοκινολονών (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017). Ο προσδιορισμός της αντοχής του *H. pylori* στην λεβοφλοξασίνη μπορεί να προσδιοριστεί σε μοριακό επίπεδο, κατευθείαν από το βιοπτικό υλικό με τη χρήση μίας απλής PCR και κατόπιν αλληλούχησης του ενισχυμένου τμήματος. Εναλλακτικά, η πλέον γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος της Real Time PCR, είναι δυνατόν να δώσει άμεσα αποτελέσματα, τόσο για την παρουσία του *H. pylori* όσο και για την αντοχή του εκάστοτε στελέχους στη λεβοφλοξασίνη. Η εν λόγω μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία και επαναληψιμότητα, λόγω της χρήσης ιχνηθετών, οι οποίοι εντοπίζουν 2 από τις συχνότερες μεταλλάξεις, υπεύθυνες για την αντοχή στη συγκεκριμένη φθοροκινολόνη.

Η παρούσα μελέτη αποσκοπούσε στη διερεύνηση των υπευθύνων μεταλλαγών για την ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* έναντι της λεβοφλοξασίνης, σε κλινικά στελέχη Ελλήνων συμπτωματικών φορέων. Δευτερευόντως, αποσκοπούσε στη δημιουργία ενός διαγνωστικού μοριακού αλγορίθμου για τον προσδιορισμό της αντοχής του *H. pylori* στην λεβοφλοξασίνη απευθείας από βιοπτικό υλικό, με απώτερο στόχο να καλύψει τις περιπτώσεις εκείνες όπου δεν είναι δυνατή η απομόνωση του στελέχους.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το μεγαλύτερο ποσοστό των επιλεγμένων δειγμάτων *H. pylori* παρουσίασε MIC μεγαλύτερη από 32 mg/L, υποδηλώνοντας ότι τα στελέχη αυτά ήταν ιδιαίτερα ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη. Τα υψηλά ποσοστά αποδόθηκαν στο γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς, οι οποίοι υποβάλλονται σε γαστροσκόπηση και κατόπιν προχωρούν σε καλλιέργεια και αντιβιογράμμο για την ανίχνευση παρουσίας του *H. pylori*, έχουν ακολουθήσει ήδη τουλάχιστον 2 αποτυχημένες προσπάθειες εκρίζωσης του βακτηρίου. Το πρώτο θεραπευτικό σχήμα περιλαμβάνει τη χορήγηση 2 αντιβιοτικών, της κλαριθρομυκίνης και ενός εκ των αμοξυκιλίνης ή μετρονιδαζόλης. Στο δεύτερο θεραπευτικό σχήμα περιλαμβάνεται συνήθως η λεβοφλοξασίνη, οπότε είναι αναμενόμενο οι ασθενείς, οι οποίοι ακολουθούν διαδοχικά τρίτη θεραπευτική αγωγή, να εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά αντοχής στη λεβοφλοξασίνη. Επιπλέον, τα υψηλά ποσοστά αντοχής ενδεχομένως να οφείλονται στις ποσότητες αντιβιοτικών, οι οποίες καταναλώνονται στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία του European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στις Εικόνες 13 και 14, η Ελλάδα προηγείται στην κατανάλωση αντιβιοτικών ανάμεσα στις χώρες της Ευρώπης. Παράλληλα, η χρήση των φθοροκινολονών, κυρίως για αναπνευστικά προβλήματα μπορεί να καταστήσει το *H. pylori* ανθεκτικό στη λεβοφλοξασίνη.



Εικόνα 13: Γεωγραφική κατανομή της κατανάλωσης των αντιβιοτικών στην Ευρώπη (Προσαρμογή από <https://www.ecdc.europa.eu>).



Εικόνα 14: Ποσοστά κατανάλωσης αντιβιοτικών ανά χώρα (Προσαρμογή από <https://www.ecdc.europa.eu>).

Στον Πίνακα 13 συνοψίζονται τα ποσοστά των μεταλλαγών αντικατάστασης βάσης του γονιδίου *gyrA* σε διάφορες χώρες. Συμπερασματικά, τα ποσοστά της παρούσας μελέτης συμφωνούν με τα ποσοστά μεταλλάξεων των υπόλοιπων ευρωπαϊκών χωρών. Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στη Γαλλία, την Αυστρία και το Βέλγιο κατέδειξαν ως συνηθέστερες τις μεταλλάξεις N87K και D91N, αποτελέσματα, τα οποία συμφωνούν και με αυτά της παρούσας μελέτης. Από την άλλη, στην Ασία, τα ποσοστά παρουσίασαν ορισμένες διαφορές. Συγκεκριμένα, στο Βιετνάμ η συνηθέστερη μεταλλαγή για τη θέση 87 ήταν η N87A ενώ για τη θέση 91 η D91N. Παράλληλα, στην Ιαπωνία, το υψηλότερο ποσοστό για τη θέση 87 εμφάνισε η μεταλλαγή N87Kόμως ενώ στη θέση 91 η D91G. Παραπλήσια αποτελέσματα κατέδειξε και η Ταϊβάν, με τη διαφορά ότι στη θέση 91 η μεταλλαγή D91G είχε το ίδιο ποσοστό με τη D91N. Σημειώνεται ότι η Κορέα και η Μαλαισία δεν εμφάνισαν διαφορές με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν στην Ευρώπη, καθώς η συνηθέστερες μεταλλαγές ήταν η N87K και η D91N. Σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αφρική, και πιο συγκεκριμένα στο Κονγκό, βρέθηκε ότι στη θέση 87 κυριαρχεί η μεταλλαγή N87I και στη θέση 91 η μεταλλαγή D91M. Τέλος, σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Κολομβία βρέθηκε ότι η συνηθέστερες μεταλλαγές είναι οι N87I και D91G.

Πίνακας 13: Ποσοστά μεταλλάξεων του γονιδίου *gyrA* σε ασθενείς με ανθεκτικά στελέχη *H. pylori* στη λεβοφλοξασίνη.

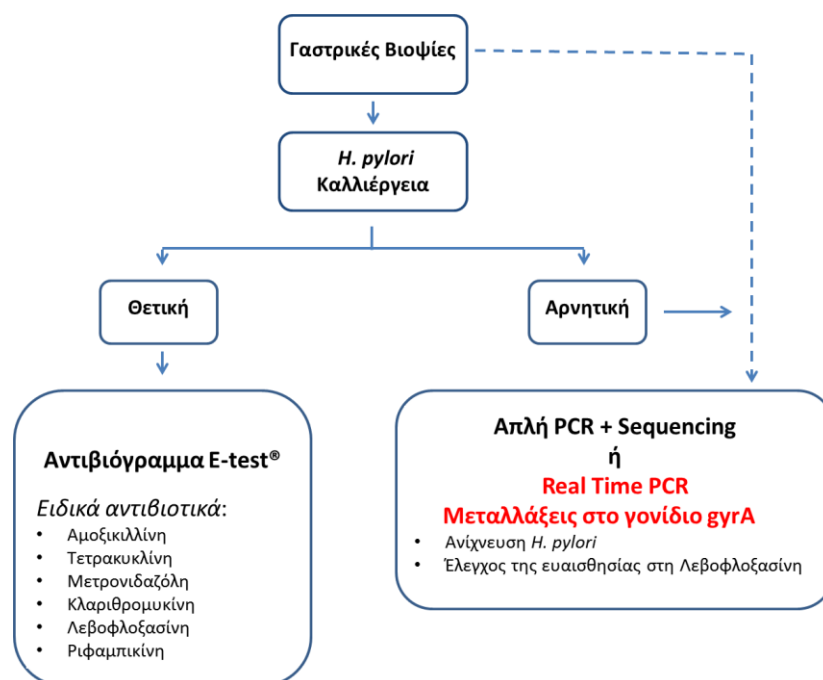
Χώρα	Μετάλλαξη	Ποσοστό	Εύρος MIC (mg/L)	Παραπομπή
Ελλάδα	N87K	45,9%	0,75-32	Παρούσα μελέτη
	N87T	2,7%	32	
	D91N	29,7%	1-32	
	D91Y	5,4%	32	
	D91G	5,4%	32	
Αυστρία	N87K	43%	-	Zollner-Schwetz <i>et al.</i> , 2016
	D91N	33%	-	
	N87K	19%	-	
	-	5%	-	
Γαλλία	T87I	23,7%	4-32	Garcia <i>et al.</i> , 2012
	N87K (C261A)	26,8%	4-32	
	N87K(C261G)	6,2%	2-32	
	A88P	1,0%	2	
	D91N	30,9%	2-32	
	D91G	7.2%	1,5-16	
	D91Y	6.2%	2-16	
	D91H	1%	16	
	-	1%	8	
Βέλγιο	N87K	41%	2-32	Bogaerts <i>et al.</i> , 2005
	N87I	11%	32	
	D91N	19%	4-32	
	D91G	17%	1,5-32	
	D91Y	7%	4-8	
	N87K & D91N	1%	32	
	N87I & D91N	1%	32	
	N87I & D91Y	1%	32	
Μαλαισία	D91Y	11%	32	Teh <i>et al.</i> , 2014
	N87K	33%	4-32	
	D91N	11%	4	
	D91G & V199I	23%	32	
	N87K & V99A	11%	32	
	D91N & V199I	11%	6	

Κορέα	N87K	31,5%		
	N87I	2,2%		
	D91N	22,5%	-	
	D91G	9%	-	
	D91Y	3,4%	-	
	D91A	1,1%	-	
	N87K & D91G	1,1%	-	Lee <i>et al.</i> , 2011
	R130K	4,6%	-	
	A129T	1,1%	-	
	I116T	1,1%	-	
	gyrB S479N	1,1%	-	
	gyrB R484K	1,1%		
	-	20,2%		
Βιετνάμ		51,4%		
	D-91	6%	1.5–32	
	D91N	1%		
	Asp91Tyr	3%		
	D91G	1%		
	D91N & L45P	1%		
	D91N & A55S	1%		
	D91N & A97V	1%		
	D91N & R130K	2%		
	D91Y & L45P	1%		
	D91G & L45P			
	D91G & A55S & G60S	28,6%		Phan <i>et al.</i> , 2014
	N-87	6%		
	N87K	1%	8–32	
	N87K & *L45P	1%		
	N87K & R130K	1%		
	N87K & L45P & R130K			
	N87A & A88N & V65I	15%		
	A55S		-	
	R130K		-	
	-	3%	-	
		3%		
		14%		

Ταϊβάν	N87K	18%	8-32	Hung <i>et al.</i> , 2009
	N87K & H57Y	8%	16	
	N87K & R140K	8%	8	
	D91G	25%	4-8	
	D91N	25%	2-8	
	D91Y	8%	8	
	D91N & A97V	8%	2	
Ιαπωνία	N87I	19%	1-32	Miyachi <i>et al.</i> , 2006
	N87K	34%	1-32	
	N87Y	5%	16	
	D91Y	9%	1-32	
	D91G	13%	1-4	
	D91N	3%	1	
	N87H & D91G	1%	32	
Κονγκό	-	16%	1-32	Ngoyi <i>et al.</i> , 2015
	N87K	6%	-	
	N87I	40%	-	
	N87R	6%	-	
	D91G	6%	-	
	D91M	10%	-	
	D91C	6%	-	
	D91N	10%	-	
	D91Y	6%	-	
Κολομβία	N87H & D91M	10%	-	Trespalcios- Rangél <i>et al.</i> , 2016
	N87I	43,8%	1-32	
	N87K	11,3%	2-16	
	N87Y	1,3%	4	
	D91G	28,8%	2-32	
	D91N	5%	1	
	D91Y	1,3%	2	
	N87Y& D91N	1,3%	1	
	N87Ile & D91G	1,3%	32	
	-	5,9%	1-8	

Οι παρατηρούμενες διαφορές στις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στην παρούσα μελέτη και κατ' επέκταση κυριαρχούν στην Ευρώπη, όπως και στην παρούσα μελέτη, με τις μεταλλάξεις που κυριαρχούν στις υπόλοιπες ηπείρους είναι φυσιολογικές, λόγω του ότι στις υπόλοιπες ηπείρους κυριαρχούν διαφορετικά στελέχη *H. pylori*, επικρατούν διαφορετικές περιβαλλοντικές και κοινωνικοοικονομικές συνθήκες αλλά και τα αντιβιοτικά που χορηγούνται για άλλες παθήσεις είναι διαφορετικά. Όλα αυτά συνηγορούν στο γεγονός ότι το *H. pylori* έχει αναπτύξει διαφορετικές μεταλλάξεις σε διαφορετικές περιοχές, ούτως ώστε να αναπτύξει αντοχή στη λεβοφλοξασίνη.

Τα αποτελέσματα της Real Time PCR που παρατίθενται παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Real Time PCR που είχαν κάνει οι Glocker και Kist (Glocker and Kist, 2004). Δηλαδή, όταν ο συνδυασμός κωδικονίων για τις θέσεις 87 και 91 ήταν: AAC και GAT τότε βρέθηκε και στις δύο περιπτώσεις θερμοκρασία τήξης 47°C, AAT και GGT ήταν 58°C, AAC και GGT ήταν 54°C, AAT και AAT ήταν 52°C, AAG και GAT ήταν επίσης 52°C. Ακόμα βρέθηκαν 3 συνδυασμοί κωδικονίων, οι οποίοι δεν υπήρχαν στο εν λόγω άρθρο. Αυτοί οι συνδυασμοί ήταν διαδοχικά: 87-AAC και 91-TAT, με θερμοκρασία τήξης 44°C 87-AAA και 91-GAT, με θερμοκρασία τήξης 48°C καθώς και 87-AAC και 91-AAT, με θερμοκρασία τήξης 45°C. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη τεχνική απαιτεί περαιτέρω βελτιστοποίηση, έτσι ώστε να εφαρμοστεί στη ρουτίνα διάγνωσης του *H. pylori*. Συμπερασματικά, από όλα τα παραπάνω δεδομένα της μελέτης μας, μπορούμε να προτείνουμε έναν αλγόριθμο για την ανίχνευση του *H. pylori* από βιοπτικό υλικό στο διαγνωστικό τομέα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Διαδικασία ανίχνευσης του *H. pylori* από βιοπτικό υλικό στη διάγνωση.

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

[illegible]

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Algood, H. M. S., & Cover, T. L. (2006). *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4), 597–613. <http://doi.org/10.1128/CMR.00006-06>
- Appelmelk, B. J., Simoons-Smit, I., Negrini, R., Moran, A. P., Aspinall, G. O., Forte, J. G., ... De Graaff, J. (1996). Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infection and Immunity*, 64(6), 2031–2040.
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M. J., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., & Cover, T. L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30), 17771–17777.
- Azuma, T., Ohtani, M., Yamazaki, Y., Higashi, H., & Hatakeyama, M. (2004, June). Meta-analysis of the relationship between CagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*. United States.
- Banatvala, N., Davies, G. R., Abdi, Y., Clements, L., Rampton, D. S., Hardie, J. M., & Feldman, R. A. (1994). High prevalence of *Helicobacter pylori* metronidazole resistance in migrants to east London: relation with previous nitroimidazole exposure and gastroduodenal disease. *Gut*, 35(11), 1562–1566.
- Bayerdorffer, E., Oertel, H., Lehn, N., Kasper, G., Mannes, G. A., Sauerbruch, T., & Stolte, M. (1989). Topographic association between active gastritis and *Campylobacter pylori* colonisation. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), 834–839.
- Benaissa, M., Babin, P., Quellard, N., Pezennec, L., Cenatiempo, Y., & Fauchere, J. L. (1996). Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infection and Immunity*, 64(6), 2331–2335.
- Bina, J., Bains, M., & Hancock, R. E. (2000). Functional expression in *Escherichia coli* and membrane topology of porin HopE, a member of a large family of conserved proteins in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 182(9), 2370–2375.
- Binek, J., Fantin, A. C., & Meyenberger, C. (1999). Attitude to *Helicobacter pylori* infection among Swiss gastroenterologists. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 129(11), 441–445.
- Bode, G., Mauch, F., & Malfertheiner, P. (1993). The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiology and Infection*, 111(3), 483–490.
- Bode, G., Rothenbacher, D., Brenner, H., & Adler, G. (1998). Pets are not a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in young children: results of a population-based study in Southern Germany. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 17(10), 909–912.
- Boncrisiano, M., Paccani, S. R., Barone, S., Olivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., ... Baldari, C. T. (2003). The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), 1887–1897. <http://doi.org/10.1084/jem.20030621>
- Boyanova, L. (2011). Role of *Helicobacter pylori* virulence factors for iron acquisition from gastric epithelial cells of the host and impact on bacterial colonization. *Future Microbiology*, 6(8), 843–846. <http://doi.org/10.2217/fmb.11.75>
- Boyanova, L., Ilieva, J., Gergova, G., & Mitov, I. (2016). Levofloxacin susceptibility testing against *Helicobacter pylori*: evaluation of a modified disk diffusion method compared to E test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(1), 55–56. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.011>
- Breuer, T., Sudhop, T., Hoch, J., Sauerbruch, T., & Malfertheiner, P. (1996). Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 8(1), 47–52.
- Brown, L. M. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22(2), 283–297.

- Calvet, X., Brullet, E., Campo, R., Panades, A., & Pou, J. M. (2000). [Dyspepsia, *Helicobacter pylori* and endoscopy]. *Gastroenterologia y hepatologia*, 23(4), 206–210.
- Calvori, C., Frontali, L., Leoni, L., & Tecce, G. (1965). Effect of rifamycin on protein synthesis. *Nature*, 207(995), 417–418.
- Cen, L., Pan, J., Zhou, B., Yu, C., Li, Y., Chen, W., & Shen, Z. (2018). *Helicobacter Pylori* infection of the gallbladder and the risk of chronic cholecystitis and cholelithiasis: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*, 23(1). <http://doi.org/10.1111/hel.12457>
- Chan, W. Y., Hui, P. K., Leung, K. M., Chow, J., Kwok, F., & Ng, C. S. (1994). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *American Journal of Clinical Pathology*, 102(4), 503–507.
- Cheng, H., Hu, F., Zhang, L., Yang, G., Ma, J., Hu, J., ... Dong, X. (2009). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and identification of risk factors in rural and urban Beijing, China. *Helicobacter*, 14(2), 128–133. <http://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2009.00668.x>
- Cover, T. L., & Blaser, M. J. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10570–10575.
- Cutler, A. F., Havstad, S., Ma, C. K., Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., & Schubert, T. T. (1995). Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 109(1), 136–141.
- Da Re, S., Garnier, F., Guerin, E., Campoy, S., Denis, F., & Ploy, M.-C. (2009). The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Reports*, 10(8), 929–933. <http://doi.org/10.1038/embor.2009.99>
- Davison, H. C., Low, J. C., & Woolhouse, M. E. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*, 8(12), 554–559.
- De Francesco, V., Giorgio, F., Ierardi, E., Zotti, M., Neri, M., Milano, A., ... Zullo, A. (2011). Primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: the Multicentric Italian Clarithromycin Resistance Observational (MICRO) study. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD*, 20(3), 235–239.
- Ducournau, A., Benejat, L., Sifre, E., Bessede, E., Lehours, P., & Megraud, F. (2016). *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(8), 715–718. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.003>
- Ekstrom, A. M., Held, M., Hansson, L. E., Engstrand, L., & Nyren, O. (2001). *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*, 121(4), 784–791.
- El-Omar, E. M., Oien, K., Murray, L. S., El-Nujumi, A., Wirz, A., Gillen, D., ... McColl, K. E. (2000). Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. *Gastroenterology*, 118(1), 22–30.
- Fich, A., Talley, N. J., Shorter, R. G., & Phillips, S. F. (1989, October). Histological evaluation of *Campylobacter pylori* from tissue specimens stored in formaldehyde can be misleading. *Journal of Clinical Gastroenterology*. United States.
- Forman, J. D., Orton, C., Ezzell, G., & Porter, A. T. (1993). Preliminary results of a hyperfractionated dose escalation study for locally advanced adenocarcinoma of the prostate. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 27(3), 203–208.
- Frenck, R. W., & Clemens, J. (2003). *Helicobacter* in the developing world. *Microbes and Infection*, 5(8), 705–713. [http://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00112-6](http://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00112-6)
- Georgopoulos, S. D., Mentis, A. F., Spiliadis, C. A., Tzouveleakis, L. S., Tzelepi, E., Moshopoulos, A., & Skandalis, N. (1996). *Helicobacter pylori* infection in spouses of patients with duodenal ulcers and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut*, 39(5), 634–638.

- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., ... Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12778–12783.
- Gerrits, M. M., de Zoete, M. R., Arents, N. L. A., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2002). 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2996–3000.
- Gerrits, M. M., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J., & Kusters, J. G. (2006). *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis*, 6(11), 699–709. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70627-2](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70627-2)
- Ghotaslou, R., Leylabadlo, H. E., & Asl, Y. M. (2015). Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World J Methodol*, 5(3), 164–174. <http://doi.org/10.5662/wjm.v5.i3.164>
- Gisbert, J. P., & Calvet, X. (2012). Update on non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 5, 23–34. <http://doi.org/10.2147/CEG.S25419>
- Gisbert, J. P., Romano, M., Gravina, A. G., Solis-Munoz, P., Bermejo, F., Molina-Infante, J., ... McNicholl, A. G. (2015). *Helicobacter pylori* second-line rescue therapy with levofloxacin- and bismuth-containing quadruple therapy, after failure of standard triple or non-bismuth quadruple treatments. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(8), 768–775. <http://doi.org/10.1111/apt.13128>
- Goderska, K., Agudo Pena, S., & Alarcon, T. (2018). *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 1–7. <http://doi.org/10.1007/s00253-017-8535-7>
- Granstrom, M., Tindberg, Y., & Blennow, M. (1997). Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), 468–470.
- Grove, D. I., McLeay, R. A., Byron, K. E., & Koutsouridis, G. (2001). Isolation of *Helicobacter pylori* after transport from a regional laboratory of gastric biopsy specimens in saline, Portagerm *pylori* or cultured on chocolate agar. *Pathology*, 33(3), 362–364.
- Handt, L. K., Fox, J. G., Yan, L. L., Shen, Z., Pouch, W. J., Ngai, D., ... Klein, H. J. (1997). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Journal of Clinical Microbiology*, 35(1), 165–168.
- Hatakeyama, M. (2004). Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews. Cancer*, 4(9), 688–694. <http://doi.org/10.1038/nrc1433>
- Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P., & Camara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(2), 247–274. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00247.x>
- Hu, Y., Zhang, M., Lu, B., & Dai, J. (2016). *Helicobacter pylori* and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. *Helicobacter*, 21(5), 349–363. <http://doi.org/10.1111/hel.12299>
- Hulten, K., Enroth, H., Nystrom, T., & Engstrand, L. (1998). Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 282–286.
- Hulten, K., Han, S. W., Enroth, H., Klein, P. D., Opekun, A. R., Gilman, R. H., ... El-Zaatari, F. A. (1996). *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology*, 110(4), 1031–1035.
- Inoue, H., Kazawa, T., Sato, Y., Satodate, H., Sasajima, K., Kudo, S., & Shiokawa, A. (2004). In vivo observation of living cancer cells in the esophagus, stomach, and colon using catheter-type contact endoscope, “Endo-Cytoscopy system”. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 14(3), 589–94, x–xi. <http://doi.org/10.1016/j.giec.2004.03.013>
- Kansau, I., Raymond, J., Bingen, E., Courcoux, P., Kalach, N., Bergeret, M., ... Labigne, A. (1996). Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Research in Microbiology*, 147(8), 661–

- Katsuragi, K., Noda, A., Tachikawa, T., Azuma, A., Mukai, F., Murakami, K., ... Asaka, M. (1998). Highly sensitive urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 3(4), 289–295.
- Kiesslich, R., Goetz, M., Burg, J., Stolte, M., Siegel, E., Maeurer, M. J., ... Neurath, M. F. (2005). Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology*, 128(7), 2119–2123.
- Kim, S., Harum, K., Ito, M., Tanaka, S., Yoshihara, M., & Chayama, K. (2004). Magnifying gastroendoscopy for diagnosis of histologic gastritis in the gastric antrum. *Digestive and Liver Disease : Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 36(4), 286–291.
- Kuipers, E. J., Pena, A. S., van Kamp, G., Uytendaele, A. M., Pals, G., Pels, N. F., ... Meuwissen, S. G. (1993). Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet (London, England)*, 342(8867), 328–331.
- Kuipers, E. J., Perez-Perez, G. I., Meuwissen, S. G., & Blaser, M. J. (1995). *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *Journal of the National Cancer Institute*, 87(23), 1777–1780.
- Kusters, J. G., Gerrits, M. M., Van Strijp, J. A., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and Immunity*, 65(9), 3672–3679.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490. <http://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Kwok, T., Backert, S., Schwarz, H., Berger, J., & Meyer, T. F. (2002). Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infection and Immunity*, 70(4), 2108–2120.
- Lambert, J. R., Lin, S. K., Sievert, W., Nicholson, L., Schembri, M., & Guest, C. (1995). High prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *The American Journal of Gastroenterology*, 90(12), 2167–2171.
- Langenberg, W., Rauws, E. A., Oudbier, J. H., & Tytgat, G. N. (1990). Patient-to-patient transmission of *Campylobacter pylori* infection by fiberoptic gastroduodenoscopy and biopsy. *The Journal of Infectious Diseases*, 161(3), 507–511.
- Lepper, E. R., Nooter, K., Verweij, J., Acharya, M. R., Figg, W. D., & Sparreboom, A. (2005). Mechanisms of resistance to anticancer drugs: the role of the polymorphic ABC transporters ABCB1 and ABCG2. *Pharmacogenomics*, 6(2), 115–138. <http://doi.org/10.1517/14622416.6.2.115>
- Leung, W. K., Siu, K. L., Kwok, C. K., Chan, S. Y., Sung, R., & Sung, J. J. (1999). Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission. *The American Journal of Gastroenterology*, 94(10), 2881–2884. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01431.x>
- Leunk, R. D., Johnson, P. T., David, B. C., Kraft, W. G., & Morgan, D. R. (1988). Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 26(2), 93–99. <http://doi.org/10.1099/00222615-26-2-93>
- Lin, S. K., Lambert, J. R., Schembri, M. A., Nicholson, L., & Korman, M. G. (1994). *Helicobacter pylori* prevalence in endoscopy and medical staff. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 9(4), 319–324.
- Luzza, F., Maletta, M., Imeneo, M., Marcheggiano, A., Iannoni, C., Biancone, L., & Pallone, F. (1995). Salivary-specific immunoglobulin G in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. *The American Journal of Gastroenterology*, 90(10), 1820–1823.
- Magalhaes, A., Ismail, M. N., & Reis, C. A. (2010, June). Sweet receptors mediate the adhesion of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*: glycoproteomic strategies. *Expert Review of Proteomics*. England. <http://doi.org/10.1586/epr.10.18>
- Malaty, H. M., Engstrand, L., Pedersen, N. L., & Graham, D. Y. (1994). *Helicobacter pylori*

- infection: genetic and environmental influences. A study of twins. *Annals of Internal Medicine*, 120(12), 982–986.
- Malaty, H. M., & Graham, D. Y. (1994). Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 35(6), 742–745.
- Malfertheiner, M., Malfertheiner, P., Costa, S. D., Pfeifer, M., Ernst, W., Seelbach-Gobel, B., & Fill Malfertheiner, S. (2015). Extraesophageal symptoms of gastroesophageal reflux disease during pregnancy. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 53(9), 1080–1083. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1399453>
- Malfertheiner, P., Dent, J., Zeijlon, L., Sipponen, P., Veldhuyzen Van Zanten, S. J. O., Burman, C.-F., ... Lonovics, J. (2002). Impact of *Helicobacter pylori* eradication on heartburn in patients with gastric or duodenal ulcer disease -- results from a randomized trial programme. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(8), 1431–1442.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T. R., Bazzoli, F., ... Kuipers, E. J. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61(5), 646–664. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302084>
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C. A., Gisbert, J. P., Kuipers, E. J., Axon, A. T., ... El-Omar, E. M. (2017). Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*, 66(1), 6–30. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bell, D., Bianchi Porro, G., Deltenre, M., ... Rauws, E. (1997). Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter Pylori* Study Group (EHPSG). *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 9(1), 1–2.
- Marshall, B. J. (2001). One Hundred Years of Discovery and Rediscovery of *Helicobacter pylori* and Its Association with Peptic Ulcer Disease. In H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Eds.). Washington (DC).
- Marshall, B. J., Barrett, L. J., Prakash, C., McCallum, R. W., & Guerrant, R. L. (1990). Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, 99(3), 697–702.
- Martinez-Gonzalez, B., Eleftheriadis, A., Karayiannis, Y., Psarrakos, P., Georgopoulos, S., Michopoulos, S., ... Mentis, A. F. (2017). Detection of *Helicobacter pylori* levofloxacin susceptibility by molecular methods in gastric biopsies from Greek adult patients. *HELICOBACTER*, 22(1, SI).
- Martinez-Gonzalez, B., Psarrakos, P., Georgopoulos, S., Michopoulos, S., Mimidis, K., Kasapidis, P., ... Mentis, A. F. (2015). HIGH INCIDENCE OF *HELICOBACTER PYLORI* CLARITHROMYCIN RESISTANCE IN GREECE. A THREE-YEAR MULTICENTER LABORATORY SURVEILLANCE STUDY. *HELICOBACTER*, 20(1, SI), 100.
- McCallion, W. A., Murray, L. J., Bailie, A. G., Dalzell, A. M., O'Reilly, D. P., & Bamford, K. B. (1996). *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. *Gut*, 39(1), 18–21.
- McNulty, C. A., & Watson, D. M. (1984, May). Spiral bacteria of the gastric antrum. *Lancet (London, England)*. England.
- McNulty, C. A., & Wise, R. (1985, June). Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *Lancet (London, England)*. England.
- Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A. M., ... Glupczynski, Y. (2013). *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, 62(1), 34–42. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302254>
- Megraud, F., & Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 280–322. <http://doi.org/10.1128/CMR.00033-06>

- Megraud, F., pascale, T., Lamouliatte, H., & Boyanova, L. (1991). Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(5), 869–872.
- Meunier, O., Walter, P., Chamouard, P., Piemont, Y., & Monteil, H. (1997). [Isolation of *Helicobacter pylori*: necessity of control of transport conditions]. *Pathologie-biologie*, 45(1), 82–85.
- Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S., Rieder, G., Suzuki, M., Nagai, T., ... Sasakawa, C. (2007). *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host & Microbe*, 2(4), 250–263. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.005>
- Mitchell, H. M., Li, Y. Y., Hu, P. J., Liu, Q., Chen, M., Du, G. G., ... Hazell, S. L. (1992). Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern china: Identification of early childhood as the critical period for acquisition. *Journal of Infectious Diseases*, 166(1), 149–153. <http://doi.org/10.1093/infdis/166.1.149>
- Moran, A. P. (1997). Structure and conserved characteristics of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *The Journal of Infectious Diseases*, 176 Suppl, S115–21.
- Mueller, D., Tegtmeyer, N., Brandt, S., Yamaoka, Y., De Poire, E., Sgouras, D., ... Backert, S. (2012). c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1553–1566. <http://doi.org/10.1172/JCI61143>
- Muotiala, A., Helander, I. M., Pyhala, L., Kosunen, T. U., & Moran, A. P. (1992). Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 60(4), 1714–1716.
- Nishizawa, T., & Suzuki, H. (2014). Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1(19), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>
- Ohkusa, T., Fujiki, K., Takashimizu, I., Kumagai, J., Tanizawa, T., & Eishi, Y. (2000). Endoscopic and histological comparison of nonulcer dyspepsia with and without *Helicobacter pylori* infection evaluated by the modified Sydney system. *American Journal of Gastroenterology*, 95(9), 2195–2199. [http://doi.org/10.1016/S0002-9270\(00\)01094-7](http://doi.org/10.1016/S0002-9270(00)01094-7)
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., ... Hatakeyama, M. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), 1003–1008. <http://doi.org/10.1073/pnas.0711183105>
- Oldani, A., Cormont, M., Hofman, V., Chiozzi, V., Oregioni, O., Canonici, A., ... Boquet, P. (2009). *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000603. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000603>
- Owen, R. J., On, S. L., & Costas, M. (1989). The effect of cooling rate, freeze-drying suspending fluid and culture age on the preservation of *Campylobacter pylori*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 66(4), 331–337.
- Panayotopoulou, E. G., Sgouras, D. N., Papadakis, K., Kalliaropoulos, A., Papatheodoridis, G., Mentis, A. F., & Archimandritis, A. J. (2007). Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 488–495. <http://doi.org/10.1128/JCM.01616-06>
- Papadakis, K. S., Sougleri, I. S., Mentis, A. F., Hatziloukas, E., & Sgouras, D. N. (2013). Presence of terminal EPIYA phosphorylation motifs in *Helicobacter pylori* CagA contributes to IL-8 secretion, irrespective of the number of repeats. *PloS One*, 8(2), e56291. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056291>
- Papastergiou, V., Georgopoulos, S. D., & Karatapanis, S. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Past, present and future. *World Journal of*

- Parija, S. C., Dhodapkar, R., Elangovan, S., & Chaya, D. R. (2009). A comparative study of blood smear, QBC and antigen detection for diagnosis of malaria. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 52(2), 200–202.
- Parkin, E. T., Trew, A., Christie, G., Faller, A., Mayer, R., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2002). Structure-activity relationship of hydroxamate-based inhibitors on the secretases that cleave the amyloid precursor protein, angiotensin converting enzyme, CD23, and pro-tumor necrosis factor-alpha. *Biochemistry*, 41(15), 4972–4981.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N., & Vogelman, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40(3), 297–301.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A. B., Warnke, R. A., Jellum, E., ... Friedman, G. D. (1994). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 330(18), 1267–1271. <http://doi.org/10.1056/NEJM199405053301803>
- Parsonnet, J., Shmueli, H., & Haggerty, T. (1999). Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, 282(23), 2240–2245.
- Patton, T., Barrett, J., Brennan, J., & Moran, N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 84–95. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.007>
- Perri, F., Pastore, M., Clemente, R., Festa, V., Quitadamo, M., Niro, G., ... Andriulli, A. (1998). *Helicobacter pylori* infection may undergo spontaneous eradication in children: a 2-year follow-up study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27(2), 181–183.
- Phillips, M. (2000). John Lykoudis and peptic ulcer disease. *The Lancet*, 355(9198), 150. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)72070-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)72070-5)
- Redlinger, T., O'Rourke, K., & Goodman, K. J. (1999). Age distribution of *Helicobacter pylori* seroprevalence among young children in a United States/Mexico border community: evidence for transitory infection. *American Journal of Epidemiology*, 150(3), 225–230.
- Rigas, B., Feretis, C., & Papavassiliou, E. D. (1999). John Lykoudis: An unappreciated discoverer of the cause and treatment of peptic ulcer disease. *Lancet*, 354(9190), 1634–1635. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)06034-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)06034-1)
- Rudelli, A., Vialette, G., Brazier, F., Seurat, P. L., Capron, D., & Dupas, J. L. (1996). [*Helicobacter pylori* and gastroduodenal lesions in 547 symptomatic young adults]. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 20(4), 367–373.
- Salih, B. A., Bolek, B. K., & Arian, S. (2010). DNA sequence analysis of *cagA* 3' motifs of *Helicobacter pylori* strains from patients with peptic ulcer diseases. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 2), 144–148. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.014894-0>
- Sasaki, K., Tajiri, Y., Sata, M., Fujii, Y., Matsubara, F., Zhao, M., ... Tanikawa, K. (1999). *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31(3), 275–279.
- Selgrad, M., Tammer, I., Langner, C., Bornschein, J., Meissle, J., Kandulski, A., ... Malfertheiner, P. (2014). Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 16245–16251. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.16245>
- Shames, B., Krajden, S., Fuksa, M., Babida, C., & Penner, J. L. (1989). Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(12), 2849–2850.
- Shen, Z., Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Foltz, C. J., Yan, L., ... Perry, L. (1997). *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 627–

634. <http://doi.org/10.1099/00207713-47-3-627>
- Smith, J. G., Li, W., & Rosson, R. S. (2009). Prevalence, clinical and endoscopic predictors of *Helicobacter pylori* infection in an urban population. *Connecticut Medicine*, 73(3), 133–137.
- Spengler, A., Gross, A., & Kaltwasser, H. (1992). Successful freeze storage and lyophilisation for preservation of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Pathology*, 45(8), 737.
- Suerbaum, S., & Achtman, M. (2004). *Helicobacter pylori*: recombination, population structure and human migrations. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 294(2–3), 133–139. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.014>
- Sugano, K., Tack, J., Kuipers, E. J., Graham, D. Y., El-Omar, E. M., Miura, S., ... Malfertheiner, P. (2015). Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut*, 64(9), 1353–1367. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309252>
- Suzuki, A., Kobayashi, M., Matsuda, K., Matsumoto, T., Kawakubo, M., Kumazawa, S., ... Ota, H. (2010). Induction of high endothelial venule-like vessels expressing GlcNAc6ST-1-mediated L-selectin ligand carbohydrate and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) in a mouse model of “*Candidatus Helicobacter heilmannii*”-induced gastritis and gastr. *Helicobacter*, 15(6), 538–548. <http://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2010.00801.x>
- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., ... Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), 539–547. <http://doi.org/10.1038/41483>
- Tseng, Y.-S., Wu, D.-C., Chang, C.-Y., Kuo, C.-H., Yang, Y.-C., Jan, C.-M., ... Chang, L.-L. (2009). Amoxicillin resistance with beta-lactamase production in *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(9), 807–812. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02166.x>
- Tsugawa, H., Suzuki, H., Matsuzaki, J., Hirata, K., & Hibi, T. (2012). FecA1, a bacterial iron transporter, determines the survival of *Helicobacter pylori* in the stomach. *Free Radical Biology & Medicine*, 52(6), 1003–1010. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.011>
- Tytgat, G. N. (1995a). Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 9 Suppl 2, 105–110.
- Tytgat, G. N. (1995b). No *Helicobacter pylori*, no *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 9 Suppl 1, 39–42.
- Unemo, M., Aspholm-Hurtig, M., Ilver, D., Bergstrom, J., Boren, T., Danielsson, D., & Teneberg, S. (2005). The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15390–15397. <http://doi.org/10.1074/jbc.M412725200>
- Vaira, D., Holton, J., Menegatti, M., Gatta, L., Ricci, C., Ali, A., ... Miglioli, M. (1998). Routes of transmission of *Helicobacter pylori* infection. *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 30 Suppl 3, S279-85.
- Vaira, D., Malfertheiner, P., Megraud, F., & Axon, A. T. (1999, November). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by HpSA test. European *Helicobacter pylori* HpSA Study Group. *Lancet (London, England)*. England.
- van Doorn, N. E., van Rees, E. P., Namavar, F., & de Graaff, J. (1998). Local cellular immune response in the acute phase of gastritis in mice induced chemically and by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 47(10), 863–870. <http://doi.org/10.1099/00222615-47-10-863>
- Varoli, O., Landini, M. P., LaPlaca, M., Tucci, A., Corinaldesi, R., Paparo, G. F., ... Barbara, L. (1991, February). Presence of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *The American Journal of Gastroenterology*. United States.
- Veldhuyzen van Zanten, S. J., Talley, N. J., Bytzer, P., Klein, K. B., Whorwell, P. J., & Zinsmeister, A. R. (1999). Design of treatment trials for functional gastrointestinal disorders. *Gut*, 45 Suppl 2, II69-77.
- Woodward, M., Morrison, C., & McColl, K. (2000). An investigation into factors associated

- with *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Clinical Epidemiology*, 53(2), 175–181.
[http://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00171-7](http://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00171-7)
- Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010, October). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*.
<http://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 7(11), 629–641.
<http://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.154>
- Yamaoka, Y., Kato, M., & Asaka, M. (2008). Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*, 47(12), 1077–1083.
- Yamaoka, Y., Kikuchi, S., el-Zimaity, H. M. T., Gutierrez, O., Osato, M. S., & Graham, D. Y. (2002). Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 123(2), 414–424.
- Yamaoka, Y., Kudo, T., Lu, H., Casola, A., Brasier, A. R., & Graham, D. Y. (2004). Role of interferon-stimulated responsive element-like element in interleukin-8 promoter in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 126(4), 1030–1043.
- Yamaoka, Y., Osato, M. S., Sepulveda, A. R., Gutierrez, O., Figura, N., Kim, J. G., ... Graham, D. Y. (2000). Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori*: separation of *H. pylori* from East Asian and non-Asian countries. *Epidemiology and Infection*, 124(1), 91–96.
- Zagari, R. M., Bazzoli, F., Pozzato, P., Fossi, S., De Luca, L., Nicolini, G., ... Roda, E. (1999). Review article: non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 31(5), 408–415.