

Kamila Malinowska-Loba

Ocena udziału *Helicobacter pylori* oraz wirusa Epsteina-Barr (EBV)
w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka -studium
mikrobiologiczne

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Praca realizowana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Zakładu: dr hab. Tomasz M. Karpiński

Promotor: dr hab. Tomasz M. Karpiński

Poznań, 2019

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	4
I. WSTĘP	6
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	6
1.1.1. Charakterystyka <i>Helicobacter pylori</i>	6
1.1.2. Epidemiologia <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.1.3. Czynniki wirulencji <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.1.4. Chorobotwórczość <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.1.5. Diagnostyka zakażeń <i>Helicobacter pylori</i>	13
1.1.6. Leczenie zakażeń <i>Helicobacter pylori</i>	15
1.2. Wirus Epsteina-Barr (EBV)	19
1.2.1. Cykl lityczny	20
1.2.2. Cykl lizogenny	20
1.2.3. Chorobotwórczość	22
1.2.4. Właściwości onkogenne	23
1.2.5. Diagnostyka laboratoryjna	24
II. CEL PRACY	26
III. MATERIAŁY I METODY	27
3.1. Grupa badawcza	28
3.2. Przygotowanie materiału do badań mikrobiologicznych i histopatologicznych	29
3.2.1. Przygotowanie materiału do badań bakteriologicznych	29
3.2.2. Przygotowanie preparatów do badań histopatologicznych	29
3.3. Badania mikrobiologiczne	32
3.3.1. Hodowla <i>Helicobacter pylori</i>	32
3.3.2. Oznaczanie lekowrażliwości <i>Helicobacter pylori</i>	34
3.4. Izolacja DNA z biopłatów	37
3.4.1. Oznaczanie stężenia i czystości DNA w badanych próbkach	38
3.4.2. Ocena produktów PCR	39
3.5. Badania genetyczne <i>Helicobacter pylori</i>	40
3.5.1. Wykrywanie genu <i>ureA</i>	40

3.5.2. Wykrywanie genu <i>cagA</i>	41
3.6. Badania genetyczne wirusa Epsteina-Barr.....	42
3.7. Analiza statystyczna	42
IV. WYNIKI	43
4.1. Analiza częstości występowania genu <i>ureA</i>	43
4.2. Analiza częstości występowania genu <i>cagA</i>	45
4.3. Analiza częstości występowania genu <i>EBNA-1</i>	47
4.4. Współwystępowanie genu <i>ureA</i> i genu <i>EBNA-1</i> wirusa EBV wśród badanych grup	49
4.5. Ocena lekowrażliwości <i>Helicobacter pylori</i>	51
V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	56
VI. WNIOSKI	64
VII. STRESZCZENIE	65
VIII. SUMMARY	68
IX. PIŚMIENNICTWO	71
X. WYKAZ TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII.....	85
XI. ZAŁĄCZNIK	88

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BL chłoniak Burkitta (ang. *Burkitt's lymphoma*)

CagA białko związane z cytotoksyną (ang. *cytotoxin associated gene A protein*)

cagA gen kodujący białko cagA (ang. *cytotoxin-associated gene A*)

cag-PAI wyspa patogenności (ang. *cag pathogenicity island*)

EA antygen wczesny (ang. *early antigen*)

EBERs krótkie niekodujące odcinki RNA (ang. *Epstein–Barr virus encoded small RNA*)

EBNA antygeny jądrowe (ang. *Epstein-Barr nuclear antigens*)

EIA test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme immunoassay*)

ELISA test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme linked immunosorbent assay*)

EUCAST Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

GC rak żołądka (ang. *gastric carcinoma*)

IARC Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*)

ICAM– 1 cząsteczka adhezji międzykomórkowej (ang. *intercellular adhesion molecule*)

IL interleukina (ang. *interleukin*)

IPP inhibitor pompy protonowej (ang. *proton pump inhibitor*)

LMP białko błonowe charakterystyczne dla fazy latentnej (ang. *latent membrane protein*)

MALT tkanka limfatyczna błon śluzowych (ang. *mucosa membrane associated lymphoid tissue*)

MAP kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

MIC minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustroju (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*)

NF- κ B czynnik transkrypcyjny (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NPC rak jamy nosowo-gardłowej (ang. *nasopharyngeal carcinoma*)

NSAID niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)

PBPs białka wiążące penicyliny (ang. *penicillin binding proteins*)

PTDL potransplantacyjna choroba limfoproliferacyjna (ang. *post-transplant lymphoproliferative disorders*)

SHP-2 domeny fosfataz tyrozynowych (ang. *protein tyrosine phosphatase*)

TNF α czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*)

TFSS układ sekrecji typu IV (ang. *type four secretion system*)

UBT ureazowy test oddechowy (ang. *urea breath test*)

VacA cytotoksyna wakuolizująca (ang. *vacuolating cytotoxin A*)

vacA gen kodujący cytotoksynę wakuolizującą (ang. *vacuolating cytotoxin A gene*)

VCA antygen kapsydu (ang. *viral capsid antigen*)

WHO Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

ZE zespół Zollingera-Ellisona (ang. *Zollinger–Ellison syndrome*)

I. WSTĘP

1.1. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

W roku 1896 profesor medycyny Uniwersytetu Jagiellońskiego - Walery Jaworski po raz pierwszy opisał obecność bakterii spiralnych w popłuczynach treści żołądkowych, pobranych od pacjentów z chorobami żołądka. Nazwał je *Vibrio rugula* i zasugerował ich rolę w etiopatogenezie chorób żołądka [86].

Robin Warren i Barry Marshall pod koniec lat 70-tych XX wieku rozpoczęli badania nad próbkami bioptatów błony śluzowej żołądka pobranymi od pacjentów podczas gastroskopii. Zauważyli korelację między występowaniem drobnoustrojów spiralnych a zmianami histopatologicznymi w błonie śluzowej żołądka [105,106]. Przełomowy w gastroenterologii okazał się rok 1982, kiedy powyższym badaczom udało się po raz pierwszy wyhodować czyste kolonie bakterii *Helicobacter pylori*. Pierwotnie patogen ten otrzymał nazwę *Campylobacter pylori*. Aby potwierdzić jego rolę jako czynnika etiologicznego nieżyty żołądka B. Marshall wypił zawiesinę bakterii. Rozwinęło się u niego ostre zapalenie żołądka, które zostało potwierdzone endoskopowo i histopatologicznie. Po zastosowaniu terapii antybiotykowej objawy ustąpiły [88,105,106].

W roku 1989 na podstawie badań, które pozwoliły określić różnice biochemiczne, genetyczne oraz metaboliczne pomiędzy bakterią *Campylobacter pylori*, a innymi bakteriami tego rodzaju, utworzono nowy rodzaj - *Helicobacter* [73]. W 2005 roku Warren i Marshall otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za odkrycie bakterii *Helicobacter pylori* i potwierdzenie jej roli w patogenezie zapalenia żołądka i choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy [21,74].

1.1.1. Charakterystyka *Helicobacter pylori*

Bakterie *Helicobacter* posiadają następującą klasyfikację systematyczną, zgodnie z Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [20]:

Klasa: *Epsilonproteobacteria*

Rząd: *Campylobacterales*

Rodzina: *Helicobacteraceae*

Rodzaj: *Helicobacter*

Rodzaj *Helicobacter* obecnie zawiera 26 gatunków bakterii, spośród nich najważniejsze znaczenie kliniczne ma *Helicobacter pylori*. Ta spiralna, Gram-ujemna, mikroaerofilna pałeczka, posiada wymiary od 0,5-1 µm szerokości i 2,5-5 µm długości, jest katalazo- i oksydazo-dodatnia. Dzięki obecności rzęsek (4-6), które ułożone są biegunowo wykazuje zdolność ruchu [61,127,129]. Sekwencja genomu *H. pylori* została poznana w 1997 roku, podczas badań prowadzonych w The Institute for Genomic Research w USA. Szczep oznaczono symbolem 26695, wyizolowany został od pacjenta z nieżytem żołądka. Genom ma postać dwuniciowej kolistej cząsteczki DNA, o zawartości guaniny i cytozyny (G+C) 39% [4,6,59,68].

1.1.2. Epidemiologia *Helicobacter pylori*

Zakażenie *Helicobacter pylori* dotyczy 50% populacji ludzkiej, patogen ten należy do najczęstszych bakterii chorobotwórczych dla człowieka. Odsetek infekcji w krajach rozwijających się jest znacznie wyższy (70-90%), aniżeli w krajach rozwiniętych (20-40%) [22,61]. Różnice te spowodowane są przede wszystkim czynnikami ryzyka nabycia zakażenia, do których zalicza się: niski status socjoekonomiczny, duże zagęszczenie ludzi w mieszkaniach, złe warunki sanitarne, wiek dziecięcy [23]. Według danych Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii z roku 2004 zakażenie dotyczyło 84% dorosłych i 32% dzieci do 18 roku życia [12].

Rezerwuarem bakterii *H. pylori* jest zakażony człowiek, przypuszcza się, że do zakażenia dochodzi na drodze oralno-oralnej, fekalno-oralnej i gastro-oralnej. Badania epidemiologiczne sugerują, że istnieje możliwość przenoszenia tej bakterii za pośrednictwem wody pitnej oraz zakażonej żywności [43,86,92].

1.1.3. Czynniki wirulencji *Helicobacter pylori*

Głównymi czynnikami wirulencji *Helicobacter pylori*, które umożliwiają kolonizację oraz uszkodzenie błony śluzowej żołądka są: ureaza, wyspa patogenności, cytotoksyna wakuolizująca, rzęski i lipopolisacharyd [122,124].

Jednym z najważniejszych czynników zjadliwości jest ureaza, która hydrolizuje cząsteczki mocznika, w wyniku czego powstaje dwutlenek węgla i amoniak. Produkcja dużych ilości tego enzymu umożliwia patogenowi przetrwanie w środowisku kwaśnym żołądka. Powstający w reakcji amoniak doprowadza do neutralizacji soku żołądkowego,

co w konsekwencji pozwala bakterii na sforsowanie warstwy śluzu i dotarcie do komórek nabłonka. W wyniku kontaktu komórek bakteryjnych z neutrofilami uruchomiony zostaje tlenowy mechanizm zabijania drobnoustrojów, w wyniku czego powstaje kwas podchlorawy, który łącząc się z amoniakiem tworzy toksyczną monochloraminę. Odpowiedzialna jest ona za ubytki w błonie śluzowej. Potwierdzony również został jej mutageny wpływ na DNA komórek eukariotycznych. Dlatego przyjmuje się, że jest ona istotnym czynnikiem doprowadzającym do rozwoju nowotworów u osób z przewlekłą infekcją *H. pylori* [2,24,125].

Wyspa patogenności (ang. *cag pathogenicity island*, *cag-PAI*) występująca w genomie *H. pylori*, to obszar DNA o długości 40 kbp nabyty drogą transferu horyzontalnego. Zawiera około 40 genów, które zostały podzielone na dwa segmenty: I i II. Najważniejsze z produktów tych genów to: białka odpowiedzialne za budowanie układu sekrecji typu IV TFSS (ang. *type four secretion system*), który odpowiedzialny jest za przekazywanie czynników efektorowych do wnętrza komórek gospodarza oraz białko CagA (ang. *cytotoxin-associated gene A protein*) - produkt genu *cagA* (ang. *cytotoxin-associated gene A*) [2,52,82,104].

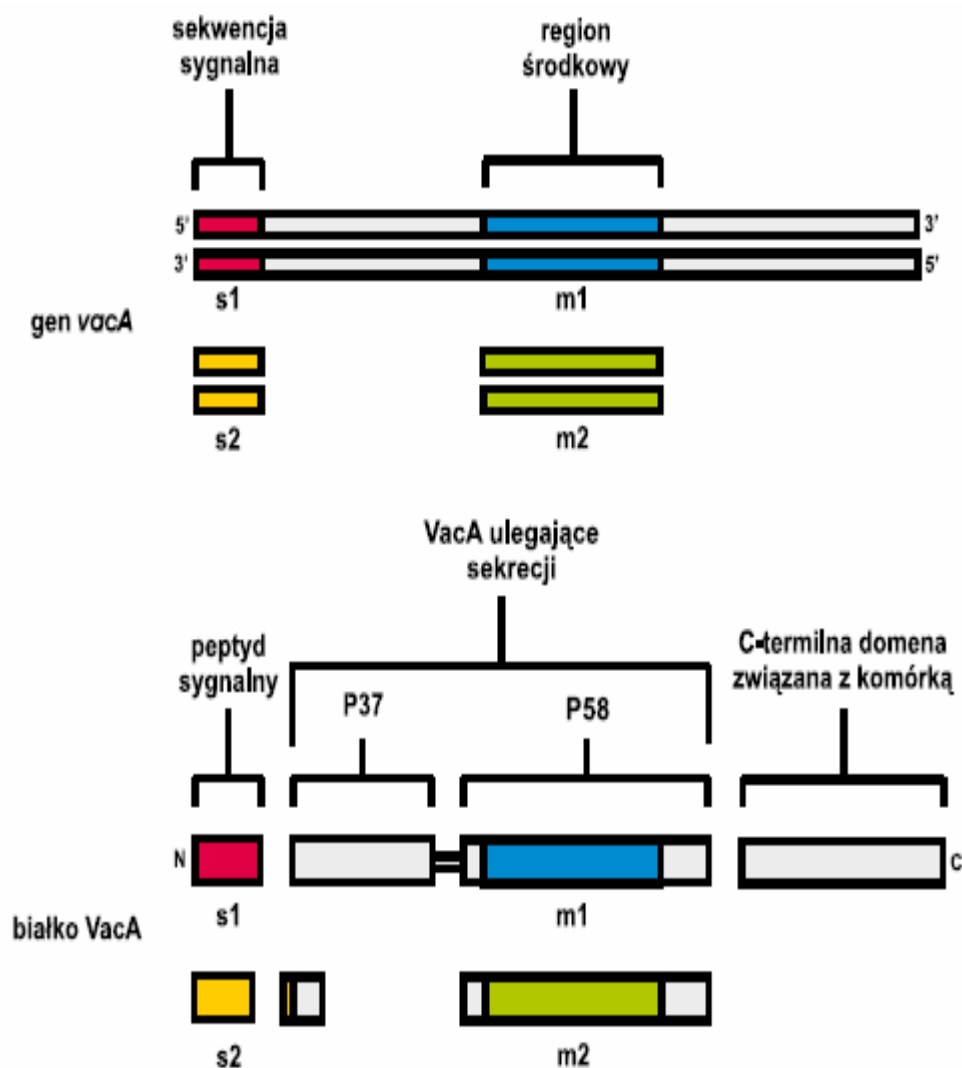
Masa cząsteczkowa białka CagA wynosi 128-146 kDa, jest ono głównym antygenem zlokalizowanym na powierzchni komórki bakterii. Charakteryzuje się silną immunogennością, odpowiedzialne jest za produkcję przeciwciał anty-CagA, świadczących o infekcji cytotoksycznymi szczepami CagA+. Białko to uznawane jest za marker wirulencji szczepu. Gen *cagA* występuje w genomach około 60% szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów [34,36,71,118].

W komórkach nabłonka białko CagA ulega fosforylacji przez kinazy tyrozynowe, główny motyw fosforylacji EPIYA Glu-Pro-Tyr-Ala jest zlokalizowany na C-terminalnym końcu białka CagA i występuje w różnej liczbie powtórzeń. Forma ufosforylowana wiąże się z eukariotycznymi białkami zawierającymi domeny fosfataz tyrozynowych (ang. *protein tyrosine phosphatase*, SHP-2). Następnie dochodzi do uruchomienia przekazywania sygnału na szlaku kinazy MAP (ang. *mitogen-activated protein kinase*), czego efektem jest nieprawidłowa proliferacja komórek nabłonkowych żołądka, przegrupowanie cytoszkieletu aktynowego komórki i pojawienie się zmian charakterystycznych w morfologii komórki tzw. fenotyp *humming-bird* [64,114,155]. W procesie niezależnym od fosforylacji białko CagA w komórkach gospodarza ulega

homodimeryzacji, która warunkuje interakcję między ufosforylowanym CagA i SHP-2. Homodimeryzacja powoduje deregulację aktywności β -kateniny, odpowiedzialnej za adhezję międzykomórkową [35,83,95,90,159].

Doświadczenia na modelu zwierzęcym (mongolskie myszokoczki - zakażone *H. pylori*) wykazały korelację między interakcją komórek nabłonkowych z CagA *H. pylori*, a rozwojem nowotworu przewodu pokarmowego, udowadniając tym samym onkogenne znaczenie tego białka. W badaniach na transgenicznym myszach udowodniono istnienie dwóch rodzajów białka CagA: typu dzikiego oraz typu zmutowanego, które nie ulegało procesowi fosforylacji. U zwierząt z typem dzikim obserwowano zmiany w fenotypie komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego, prowadzące do rozwoju hiperplazji i zmian nowotworowych. Natomiast u zwierząt produkujących zmutowane białko CagA, nie zaobserwowano takich zmian, tym samym potwierdziły się przypuszczenia o onkogenym charakterze białka CagA [79,135,141].

Kolejnym czynnikiem wirulencji jest cytotoksyna wakuolizująca (ang. *vacuolating cytotoxin A*, VacA) oligomeryczne białko o masie 88-95 kDa. Produkowane jest przez gen *vacA* (ang. *vacuolating cytotoxin A gene*), który wykrywany jest w genomach praktycznie wszystkich izolowanych szczepów, jednak tylko połowa z nich wykazuje aktywność cytotoksyczną *in vitro* [27,35,122,162 174]. Przyczyną tych różnic jest polimorfizm oraz mozaikowość genu *vacA*. Dotyczą one przede wszystkim dwóch regionów: sekwencji sygnałnej (allel s, ang. *signal sequence*) oraz odcinka części środkowej genu (allel m, ang. *middle region*). Dotychczas opisano występowanie allelu s (s1a, s1b, s2) oraz dwóch typów allelu m (m1 i m2). Szczepy o genotypie s1/m1 charakteryzują się *in vitro* najwyższym poziomem cytotoksyczności, natomiast szczepy s2/m2 praktycznie nie wykazują aktywności wakuolizacyjnej. Wykazano również różnicę w poziomie transkrypcji genu *vacA*. Wśród szczepów s2/m2 była ona około 30-razy niższa aniżeli w szczepach s1/m1 (rycina 1) [34,73,89,162].



Ryc. 1. Polimorfizm genu *vacA* oraz budowa białka *VacA* [73].

Cytotoksyna wakuolizująca tworząc pory w błonie komórkowej żołądka, zwiększa jej przepuszczalność dla mocznika i innych substancji organicznych, które są niezbędne dla wzrostu *H. pylori*, wytwarzając w ten sposób korzystne warunki dla wydajniejszej kolonizacji. Toksyna *VacA* wpływa na odpowiedź immunologiczną, blokuje dojrzewanie fagosomów, hamuje prezentację antygenów przez limfocyty B oraz aktywację i proliferację limfocytów T. Wpływa również modulująco na odpowiedź typu Th1 [85,154, 158].

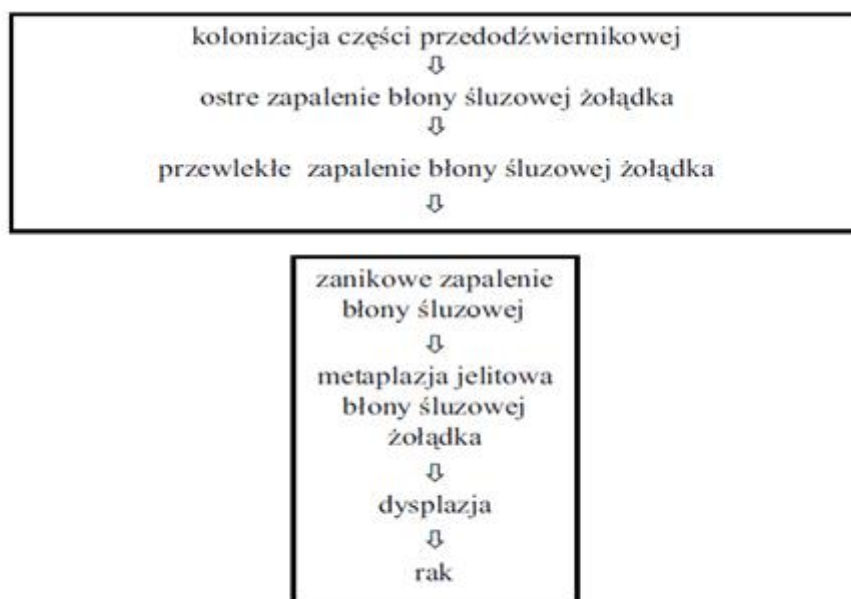
Istotną rolę w ruchu bakterii *H. pylori* spełniają rzęski. Każda z nich zbudowana jest z dwóch rodzajów białek (flagelin) – FlaA (53 kDa) i FlaB (54 kDa). Oba białka zapewniają pełną aktywność ruchową bakterii. Dowiedziono, że mutacje w genie kodującym jedną flagelinę powodują osłabienie ruchu, natomiast mutacje w obu genach

skutkują utratą ruchliwości szczepu [59,73]. Produkowane antyoksydanty (katalaza, dysmutaza nadadtlenkowa) przez szczepy *H. pylori* neutralizują wolne rodniki, umożliwiając bakterii przezwyciężyć działanie antybakteryjne neutrofilii. Lipopolisacharyd odpowiedzialny jest za aktywację monocytów, co wiąże się z uwalnianiem cytokin: interleukiny-6 (ang. *interleukine 6*, IL-6), interleukiny-8 (ang. *interleukine 8*, IL-8) i czynnika martwicy nowotworu alfa (ang. *tumor necrosis factor α*, TNFα) [100,103].

1.1.4. Chorobotwórczość *Helicobacter pylori*

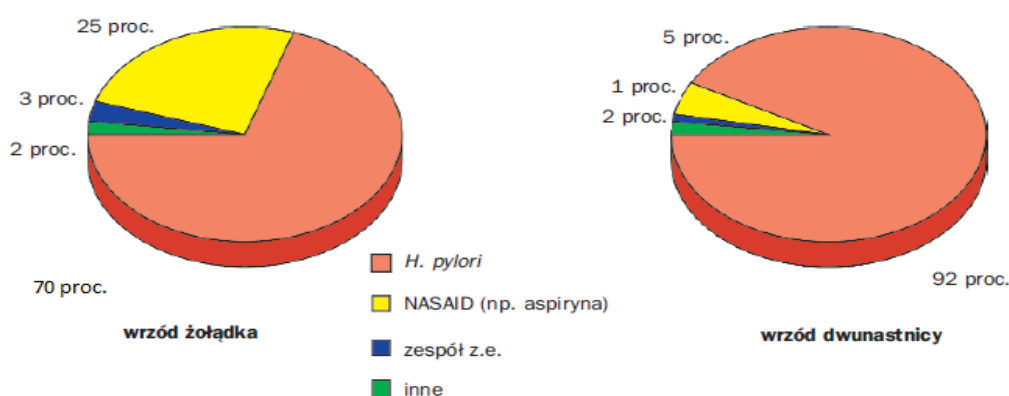
Helicobacter pylori odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego. W większości przypadków zakażenie przebiega bezobjawowo. Jedynie 10-20% zakażeń jest manifestowanych klinicznie. Patogen ten jest czynnikiem etiologicznym przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, chłoniaka żołądka typu MALT (ang. *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) oraz raka żołądka [9,98].

Następstwa zakażenia *H. pylori* w obrębie żołądka i dwunastnicy związane są z szeregiem zmian histologicznych, które występują w błonie śluzowej, a określone zostały jako „kaskada Correa” (rycina 2) [33,85,156].



Ryc. 2. Następstwa zakażenia *Helicobacter pylori* [33].

Zaburzenia równowagi pomiędzy ochronnymi mechanizmami błony śluzowej, a wydzielaniem kwasu solnego i pepsyny prowadzą do ubytków w błonie śluzowej oraz tworzenia wrzodów trawiennych. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do samoistnego gojenia, nawrotowość, jak również rytmika dobową dolegliwości, które najczęściej pojawiają się po posiłkach i w godzinach nocnych. *H. pylori* jest przyczyną około 70% wrzodów żołądka, jak również 92% przypadków wrzodów dwunastnicy. Do innych czynników predysponujących do rozwoju wrzodu zalicza się: stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (ang. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID), refluks żołądkowy, jak również zespół Zollingera-Ellisona (ang. *Zollinger-Ellison syndrome*, ZE) (rycina 3) [85,87].



Ryc. 3. Etiologia występowania wrzodów żołądka i dwunastnicy [85].

Międzynarodowa Agencja do Badań nad Rakiem (ang. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) przy Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) w 1994 roku uznała, że *H. pylori* należy zdefiniować jako karcynogen I klasy - czynnik chorobotwórczy o udowodnionym działaniu rakotwórczym. Zgodnie z klasyfikacją Laurena patogen ten powiązany jest ze wzrostem ryzyka rozwoju raka żołądka zarówno typu jelitowego, jak również typu rozlanego [55,70].

Metaplasja jelitowa błony śluzowej żołądka, określana jest jako stan przedrakowy. W śluzówce żołądka pojawiają się ogniska o cechach nabłonka jelitowego, które mogą przekształcać się w komórki nowotworowe. Procesowi kancerogenezy sprzyjają czynniki: środowiskowe (wczesne zakażenie bakterią, palenie tytoniu), dietetyczne (dieta uboga w owoce i warzywa, obfitująca w sól i alkohol),

genetyczne (polimorfizm wśród genów odpowiedzialnych za kodowanie cytokin) oraz wirulencja szczepu *H. pylori* [69,97,99].

H. pylori poprzez indukcję odpowiedzi immunologicznej prowadzi do transformacji nowotworowej. Wśród pacjentów u których izolowano szczepy *cagA*⁺ obserwuje się zwiększone wydzielanie prozapalnych cytokin: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α . Dochodzi również do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-k β (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), co przyczynia się do głębokich zmian morfologicznych w komórkach nabłonka żołądka. Również zmniejszone wydzielanie kwasu solnego (hipochlorhydria), obserwowane w długotrwałej infekcji *H. pylori*, pozwala na kolonizację żołądka innymi bakteriami, które redukują azotany zawarte w pożywieniu do azotynów, w wyniku czego powstają rakotwórcze nitrozaminy [58,83,151].

W badaniach udowodniono, że eradykacja *H. pylori* może prowadzić do zmniejszenia zachorowalności na raka żołądka w skutek regresji metaplazji jelitowej. Czynniki ryzyka predysponujące do rozwoju raka żołądka to: krewni pierwszego stopnia chorzy na raka żołądka, zapalenie obejmujące cały żołądek bądź trzon, stosowanie leków hamujących wydzielanie kwasu solnego, zmiany zanikowe w błonie śluzowej żołądka. Jednocześnie powyższe czynniki zgodnie z konsensusem z Maastricht IV/Florencja były wskazaniem do eradykacji *H. pylori*, w celu zapobiegania rozwojowi raka żołądka [54,97,102]. Najnowsze wytyczne z roku 2017 z Maastricht V/Florencja jednoznacznie wskazują, że rozpoznane zakażenie *H. pylori* uznawane jest za wysoce zakaźną chorobę, która wymaga leczenia w każdym przypadku. Tym samym w chwili obecnej nie podaje się wskazań do leczenia. Definiowane są natomiast wskazania do przeprowadzenia diagnostyki w kierunku *H. pylori* w celu wykrycia zakażenia. Jednym z nich jest dyspepsja [101].

1.1.5. Diagnostyka zakażeń *Helicobacter pylori*

W diagnostyce zakażeń wywoływanych przez *H. pylori* stosuje się metody: inwazyjne i nieinwazyjne. Do pierwszej grupy zalicza się badania, dla których niezbędne jest pobranie wycinka błony śluzowej podczas badania endoskopowego. Następnie wykonać można test ureazowy, badanie histopatologiczne, hodowlę oraz wykrywanie DNA i RNA za pomocą metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Do metod nieinwazyjnych zalicza się: ureazowy test oddechowy (ang. *Urea Breath Test*, UBT), badania serologiczne, wykrywanie DNA i RNA techniką PCR w ślinie i kale [128,147].

Najczęściej podczas gastrokopii pobiera się dwa wycinki z okolicy przedodźwiernikowej i dwa z okolicy trzonu żołądka. Szybki test ureazowy oparty jest na aktywności ureazy - enzymu produkowanego przez *H. pylori*, który rozkłada mocznik do amoniaku. Pobrany wycinek umieszcza się w podłożu zawierającym mocznik oraz wskaźnik pH - czerwień fenolowa. Wynik dodatni to zmiana zabarwienia z żółtego na czerwony, który otrzymuje się w ciągu 1-2 godzin. Ten rodzaj testu nie jest zalecany do oceny skuteczności eradykacji zakażenia *H. pylori*. Test charakteryzuje się swoistością około 95%, czułością wynoszącą 85-95% [39,101,143].

Badanie histopatologiczne pozwala na ocenę stopnia, rodzaju oraz zasięgu zapalenia błony śluzowej żołądka. Do badania obecności *H. pylori* stosuje się srebrzenie metodą Warthina-Starry'ego i barwienie metodą Giemsy. Aktualne wytyczne zalecają stosowanie dwóch barwień: hematoksyliną i eozyną (H&E) – celem uwidocznienia komórek zapalnych oraz Giemsy lub Genty – pozwalające wykryć *H. pylori*. Czułość i swoistość badania histopatologicznego wynoszą 50-90%. Jednakże, niejednolita kolonizacja, pole, liczba i rozmiar biopsji mają wpływ na dokładność diagnostyczną i mogą powodować błędy diagnostyczne [39,84,134].

Hodowlę mikrobiologiczną *H. pylori* z pobranych wycinków należy założyć jak najszybciej ze względu na wrażliwość bakterii poza środowiskiem organizmu. Prowadzi się ją w 37°C, w warunkach mikroaerofilnych (mieszanina 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Metoda ta charakteryzuje się 100% swoistością, czułość jest niższa (70-80%). Przyczyną tego może być niewystarczająca ilość materiału biopsyjnego, nieodpowiedni transport wycinka, stosowanie leków przez pacjenta [39,84,134].

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) jest szeroko stosowana w diagnostyce *H. pylori*. Pozwala na wykrycie DNA bakterii w wycinkach z żołądka, ślinie lub kale. Starterami reakcji są fragmenty DNA *H. pylori*: komplementarne dla genu ureazy, *cagA* lub *vacA*. Zaletą metody PCR jest jej wysoka czułość i swoistość (95-100%) oraz krótki czas oczekiwania na wynik. Jednak wadami metod molekularnych są ich drogie procedury [14,77,94].

Podstawową metodą diagnostyki nieinwazyjnej jest ureazowy test oddechowy (UBT), oparty na aktywności ureazy. Obecność tego enzymu w żołądku świadczy o czynnym zakażeniu *H. pylori*. Pacjentowi podaje się roztwór mocznika znakowany izotopem węgla (^{13}C lub ^{14}C). Mocznik jest rozkładany w obecności ureazy bakteryjnej do NH_3 i CO_2 , który jest adsorbowany przez błonę śluzową żołądka do naczyń krwionośnych, a wraz z krwią transportowany do płuc. W wydychanym powietrzu, które zbierane jest do specjalnego woreczka, oznacza się procentową zawartość CO_2 . Pomiar znakowanego $^{13}\text{CO}_2$ dokonywany jest na podstawie oznaczeń z użyciem spektrofotometrii masowej, a $^{14}\text{CO}_2$ na podstawie oceny aktywności promieniotwórczej. Czulość i swoistość tego testu wynoszą 90-100% [128,132,134]. W ramach strategii „zbadaj i lecz” UBT zgodnie z konsensusem z Maastricht V/ Florencja jest najbardziej zalecaną i najlepiej przebadaną metodą nieinwazyjną do oceny skuteczności terapii eradykacyjnej [101]. W badaniach serologicznych stosuje się testy ELISA, które pozwalają ocenić poziom przeciwciał klasy IgA i IgG przeciwko *H. pylori* w surowicy pacjenta. Metody serologiczne charakteryzują się wysoką czulością (94%) i swoistością (88%) [37,116,128,132]. Kolejną metodą nieinwazyjną jest wykrywanie obecności antygenów bakteryjnych w kale. Test immunoenzymatyczny (EIA) pozwala na ocenę obecności antygenów przy pomocy poliklonalnych bądź monoklonalnych przeciwciał przy udziale reakcji peroksydazowej. Wysoki poziom antygenów *H. pylori* w kale może wskazywać na aktualne zakażenia tymi bakteriami. Testy te znajdują zastosowanie we wstępnej diagnostyce oraz do monitorowania skuteczności eradykacji w 4-6 tygodniu po zakończeniu leczenia. Czulość i swoistość tej metody wynoszą około 90% [128,132,134].

1.1.6. Leczenie zakażeń *Helicobacter pylori*

Zmniejszający się w ostatnich latach odsetek eradykacji zakażeń wywoływanych przez *H. pylori* oraz poważne skutki zakażenia, wymuszają potrzebę wprowadzania skuteczniejszych metod leczenia. Ostatnie wytyczne w Polsce opublikowane zostały w 2014 roku, Polskie Towarzystwo Gastroenterologii powołało zespół, którego celem było zaktualizowanie schematów leczenia zakażeń wywoływanych przez *H. pylori*. Istotnym przewodnikiem są również zasady europejskie opublikowane w 2017 roku, znane jako konsensus Maastricht V/Florencja [48,49,100,101].

Leczenie eradykacyjne prowadzi się u osób z potwierdzoną infekcją *H. pylori*. Najczęściej pierwsza z kuracji wprowadzana jest empirycznie. Wytyczne z roku 2014 uznały za najskuteczniejszy schemat leczenia terapię, która obejmowała lek zmniejszający wydzielanie żołądkowe- inhibitor pompy protonowej (ang. *proton pump inhibitor*, IPP), połączony z amoksycyliną i metronidazolem [48].

Rozwój lekooporności szczepów na klarytromycynę spowodował, że lek ten nie powinien być stosowany jako antybiotyk pierwszego rzutu. Wieloośrodkowe badania z lat 2008-2009 przeprowadzone w Europie wykazały, że Polska zalicza się do krajów, w których oporność na klarytromycynę przekracza 20%. W związku z tym konsensus Maastricht V/Florencja zaleca stosowanie terapii poczwórnej z bizmutem albo terapii sekwencyjnej. Alternatywą jest również terapia potrójna bez klarytromycyny, zawierająca amoksycylinę i metronidazol [56,101,107,111,153].

Inhibitor pompy protonowej odpowiedzialny jest za zahamowanie wydzielania kwasu solnego, poprzez zablokowanie pompy wodorowo - potasowej w komórkach okładzinowych żołądka. Skutkiem tego jest podwyższenie pH w żołądku, dzięki czemu zwiększona zostaje skuteczność działania antybiotyków, jak również wpływa to korzystnie na proces gojenia wrzodów [10,140]. Przykładami leków są: omeprazol, pantoprazol, esomeprazol, lanzoprazol, rabeprazol.

Podstawowym antybiotykiem w terapii jest amoksycylina. Mechanizm działania tej półsyntetycznej penicyliny, polega na blokowaniu biosyntezy ściany komórkowej, poprzez łączenie się z karboksypeptydazami i transpeptydazami (ang. *penicillin binding proteins*, PBPs). W eradykacji *H. pylori* zastosowanie znajduje terapia, która wykorzystuje połączenie amoksycyliny z klarytromycyną lub metronidazolem [49]. Klarytromycyna należy do antybiotyków makrolidowych, hamuje syntezę białek w komórkach bakterii poprzez odwracalne wiązanie z podjednostką 50S rybosomów. Mechanizm działania tetracykliny polega na blokowaniu biosyntezy białek, na skutek wiązania antybiotyku z bakteryjną podjednostką rybosomu 30S. Tetracyklina należy do antybiotyków bakteriostatycznych o szerokim spektrum działania, wykazuje również właściwości przeciwzapalne [49]. Wśród nowych leków stosowanych w eradykacji *H. pylori* wykorzystuje się lewofloksacynę i ryfabutyne. Pierwszy z nich należy do fluorochinolonów i wykazuje szerokie spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Mechanizm działania lewofloksacyny polega na blokowaniu replikacji DNA bakterii w skutek zahamowania aktywności topoizomerazy II i IV. Czynnikiem ograniczającym stosowanie ryfabutyiny jest jej mielotoksyczność (leukopenia i trombocytopenia) [44,45]. Metronidazol wykorzystywany w terapii zakażeń *H. pylori* jest pochodną nitroimidazolu, wykazuje działanie pierwotniakobójcze oraz bakterioobójcze względem bakterii beztlenowych. Mechanizm działania opiera się na redukcji grup nitrowych, w wyniku czego powstają pochodne cytotoksyczne. Zredukowany lek wpływa na drobnoustrojowe DNA, co skutkuje przerwaniem nici DNA i śmiercią komórki. Sole bizmutu wykazują właściwości cytoprotekcyjne, wpływają korzystnie na gojenie błony śluzowej [49,50]. Stosowanie probiotyków, w skład których wchodzi szczepy *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* podczas leczenia antybiotykami zwiększa odsetek eradykacji, powoduje też zmniejszenie częstości występowania działań niepożądanych, głównie w skutek zmniejszenia częstości występowania biegunki. Wykazano również korzystne działanie drożdżaków *Saccharomyces boulardii* [101,145]. Występuje wiele schematów leczenia eradykacyjnego (dawki leków i okresy ich stosowania). Standardowa terapia potrójna przedstawiona została w tabeli 1.

Tab. 1. Leczenie zakażeń *H. pylori* - terapia potrójna [101].

Leczenie pierwszego rzutu - wszystkie leki przez 14 dni		
	Dawkowanie u dorosłych	Dawkowanie u dzieci
Amoksycyлина	1,0 g 2x dziennie	50 mg/kg/dobę w 2 dawkach
Metronidazol	0,5 g 3x dziennie	20 mg/kg/dobę w 3 dawkach
IPP	20 mg 2x dziennie	1 mg/kg/dobę w 2 dawkach

W tabeli 2 przedstawiono terapię poczwórną, natomiast w tabeli 3 zaprezentowano sekwencyjną [101].

Tab. 2. Leczenie zakażeń *H. pylori* - terapia poczwórna [101].

Leczenie pierwszego rzutu . Wszystkie leki przez 14 dni		
	Dawkowanie u dorosłych	Dawkowanie u dzieci
Cytrynian bizmutu	400 mg 2x dziennie	8 mg/kg/dobę
Tetracyklina (u dzieci >12r.ż)	0,5 g 4x dziennie	50 mg/kg/dobę w 2 dawkach
Metronidazol	0,5 g 3x dziennie	20 mg/kg/dobę w 3 dawkach
IPP	20 mg 2x dziennie	1 mg/kg/dobę w 2 dawkach

Tab. 3. Leczenie zakażeń *H. pylori* - terapia sekwencyjna [101].

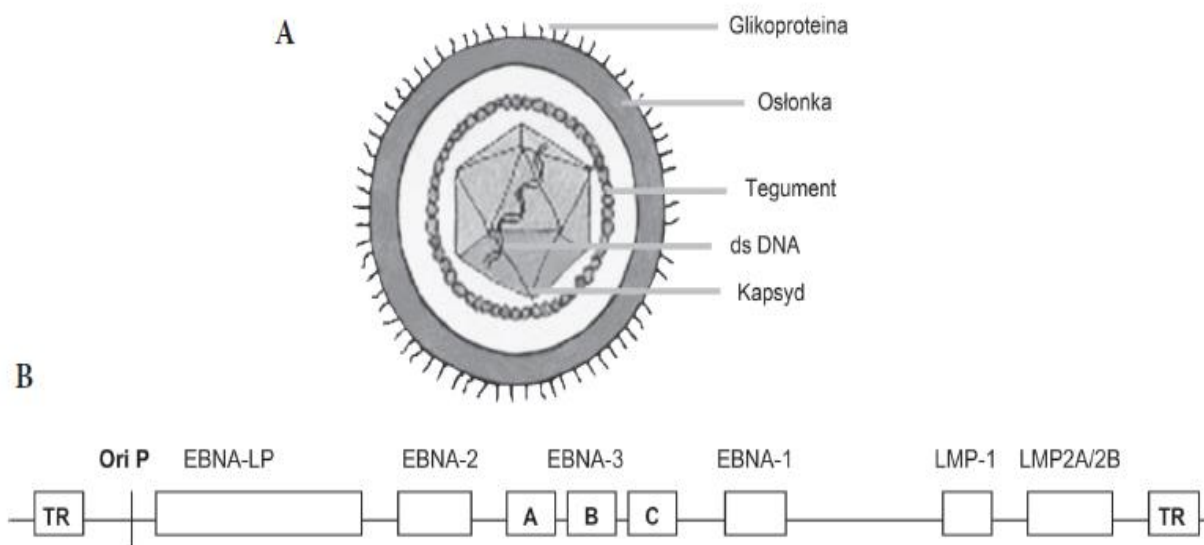
Terapia sekwencyjna		
	Dawkowanie u dorosłych	Dawkowanie u dzieci
Pierwsze 5-7 dni:		
Amoksycylina	1,0 g 2x dziennie	50 mg/kg/dobę w 2 dawkach
IPP	20 mg 2x dziennie	1 mg/kg/dobę w 2 dawkach
Przez kolejne 5-7 dni:		
Klarytromycyna	0,5 g 2x dziennie	20 mg/kg/dobę w 2 dawkach
Metronidazol	0,5 g 3x dziennie	20 mg/kg/dobę w 3 dawkach
IPP	20 mg 2x dziennie	1 mg/kg/dobę w 2 dawkach

W leczeniu stosowana jest również terapia potrójna, w której skład wchodzi IPP, amoksycylina, fluorochinolon, najczęściej lewofloksacyna, bądź terapią poczwórna zawierająca wyżej wymienione leki wraz z bizmutem [101].

W przypadku dwukrotnego leczenia, które nie przyniosło skutecznej eradykacji *H. pylori* przed wdrożeniem kolejnego leczenia wskazane jest wykonanie oznaczenia lekowrażliwości lub zastosowanie badań molekularnych celem określenia genotypu pod kątem oporności [101].

1.2. Wirus Epsteina-Barr (EBV)

Wirus Epsteina-Barr (EBV), nazywany jest również herpeswirusem 4 (HHV-4) należy do podrodziny *Gammaherpesvirinae*, rodziny *Herpesviridae*. Zbudowany jest z toroidalnego rdzenia, w którym zawarty jest dwuniciowy DNA, średnica wirusa wynosi około 100 nm. Ikosahedralny kapsyd składa się z 162 kapsomerów. Otaczający go tegument zawiera warstwę podwójną lipidów z glikoproteinami, zaangażowany jest w fuzję i wnikanie materiału genetycznego do komórek zainfekowanych. Genom wirusa w komórce zakażonej występuje w formie kolistego episomu w fazie latentnej, natomiast forma liniowa DNA związana jest z fazą lityczną wirusa. Charakterystyczny dla EBV jest tropizm do limfocytów B, jak również komórek nabłonkowych ucha i nosogardła. W adsorpcji wirusa biorą udział białka otoczki gp350/220, które zapewniają przyłączenie EBV do cząsteczki CD21. Niezbędne są również białka kompleksu gH/GL i gp42, odpowiedzialne za przyłączanie wirusa do koreceptora [15,38,152].



Ryc. 4. A- budowa wirusa Epsteina-Barr, B- schemat budowy genomu wirusa Epsteina-Barr [166].

W badaniach udowodniono istnienie dwóch typów wirusa Epsteina-Barr: typ A i typ B. Posiadają one różną sekwencję genu antygeny jądrowego EBNA-2 oraz charakteryzują się odmiennymi obszarami występowania. Typ A (EBV1) występuje zdecydowanie częściej na świecie i odpowiedzialny jest za większość infekcji w Zachodniej Europie, natomiast typ B (EBV2) dominuje w krajach Afryki

Równikowej. Charakterystyczna dla EBV jest transformacja powodująca immortalizację limfocytów B, w wyniku czego powstają limfoblastoidalne linie komórkowe [46,62,81,149].

1.2.1. Cykl lityczny

Podczas początkowej fazy infekcji w zainfekowanej komórce produkowane są wiriony potomne, celem maksymalnego rozszerzenia obszaru infekcji limfocytów B oraz zakażenia kolejnych osób na skutek kontaktu ze śliną osoby zakażonej [32]. Pierwotna infekcja zazwyczaj przebiega bezobjawowo lub w postaci mononukleozy zakaźnej, zespołu przewlekłego zmęczenia, bądź X-zależnego zespołu limfoproliferacyjnego [15,136]. Jako jedno z pierwszych białek w cyklu litycznym pojawia się białko Z, nazywane białkiem ZEBRA, będące produktem genu *BZLF1*. Uważane jest za bezpośredni aktywator transkrypcji genów w cyklu litycznym. Blokuje ono również aktywację ekspresji MHC klasy I, za której aktywację jest odpowiedzialne białko LMP-1. Reaktywacja cyklu litycznego obserwowana jest podczas spadku odporności gospodarza. Odpowiedzialne za to może być: leczenie immunosupresyjne, cytokiny, czynnik wzrostu nowotworu, hormony steroidowe. Wśród pacjentów po zabiegach transplantacyjnych leczenie immunosupresyjne może prowadzić do rozwoju potransplantacyjnej choroby limfoproliferacyjnej (ang. *post-transplant lymphoproliferative disorders*, PTDL) [15,130,136].

1.2.2. Cykl lizogeny

Po ekspozycji wirus Epsteina-Barr wchodzi w stan lizogeny, nazywany również latencją. Wirus wytwarza szereg mechanizmów pozwalających na utrzymanie zakażenia w komórkach gospodarza. Genom wirusa ulega przemianie w formę episomalną, replikuje się, a następnie przekazywany jest do komórek potomnych gospodarza. Cechą charakterystyczną dla cyklu latentnego jest ograniczenie syntezy białek wirusowych. Zmniejszenie liczby antygenów ma na celu uniknięcie eliminacji przez układ immunologiczny. Podczas cyklu latentnego produkowany jest antygen jądrowy (ang. *Epstein-Barr nuclear antigen*, EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C), białko membranowe (ang. *latent membrane protein*, LMP-1, -2A, -2B) oraz krótkie niekodujące odcinki RNA (ang. *Epstein-Barr virus encoded small RNA*, EBER-1,-2)

[5,119]. W zależności od ekspresji antygenów wyróżniono do tej pory cztery typy latencji. Pierwszy z nich - typ 0- charakteryzuje się brakiem ekspresji antygenów. Typ I latencji charakterystyczny dla chłoniaka Burkitta związany jest z ekspresją EBNA-1 i EBERs. W typie II w chłoniaku Hodgkina, raku nosogardzieli, raku żołądka oraz chłoniaku T-komórkowym ekspresji ulegają EBNA-1, EBERs oraz LMP-1 i LMP-2. Cykl latentny typu III jest najbardziej immunogeny, ekspresji ulegają geny antygenów jądrowych, LMP-1, LMP-2A, LMP-2B oraz EBER-1, EBER-2. Choroby limfoproliferacyjne związane z immunosupresją wykazują typ III latencji [63,65].

1.2.2.1. Charakterystyka białek EBV

EBNA-1 jest fosfoproteina, odpowiedzialną za utrzymanie genomu EBV w zainfekowanych komórkach w postaci episomu, co zapobiega degradacji wirusa. Białko to pełni również funkcję aktywatora transkrypcji, a także przyczynia się do zwiększenia ekspresji LMP-1 prowadząc do rozwoju nowotworu [81].

Kolejne z białek EBNA-2 jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym, odpowiedzialnym za koordynację ekspresji genów w typie III latencji. EBNA-2 wspólnie z EBNA-LP (ang. *Epstein-Barr Nuclear Antigen- Leader Protein*) powoduje wzmocnienie ekspresji receptorów CD23, jak również wprowadza spoczynkowe limfocyty B w fazę G1 cyklu komórkowego, na skutek inaktywacji białka p53. Za indukcję procesu uniesmiertelniania limfocytów B odpowiedzialne są białka EBNA-3A, -3B, -3C [81,112,126].

Latentne białko błonowe będące produktem genu *BLNF1* o wielkości 62 kDa, zbudowane jest z trzech domen. Pierwszy z segmentów: N-koniec odpowiada za przyłączanie ubikwityny, w skład drugiego wchodzi sześć hydrofobowych pętli, które odpowiadają za oligomeryzację i agregację. Trzeci segment długi C-koniec dzieli się na regiony aktywujące - CTAR (ang. *C-terminal activating regions*), niezbędne do transformacji limfocytów B. Właśnie w tych komórkach udowodniono zmiany fenotypowe powodowane przez LMP-1 i wykazano zwiększenie stężenia cytokin: interleukiny 6, 8 i 10 [28,31]. LMP-1 odpowiada również za ochronę zainfekowanych limfocytów przed apoptozą w wyniku zwiększania ekspresji antyapoptotycznych genów m.in. *Bcl-2*, *A20*, *Mcl-1*. Stwierdza się również związek LMP-1 z onkogenezą, ponieważ białko to posiada zdolność rearanżacji genów komórkowych [119,139,141].

Dotychczas opisano także istnienie dwóch białek hydrofobowych integralnych z błoną komórkową, kodowanych przez gen *LMP-2*: białka *LMP-1* i *LMP-2*. Ich ekspresja w komórkach epitelialnych powoduje wzrost zdolności wirusów do rozprzestrzeniania się oraz migracji w matriks międzykomórkową. Białko *LMP-2* odpowiedzialne jest za utrzymanie w latencji i modyfikacji komórek B, poprzez hamowanie wydzielania interleukiny-6 [3,119,133].

EBERs (*EBER-1* i *EBER-2*) będące krótkimi niekodującymi odcinkami RNA, odpowiadają za regulację transkrypcji i przekazywanie informacji. Odpowiedzialne są również za indukcję ekspresji antyapoptotycznego genu *Bcl-2* i interleukiny-10. Wysoki poziom ekspresji EBERs obserwowany jest u pacjentów z rakiem nosogardzieli, chłoniakiem Burkitta i Hodgkina [15,144,146].

1.2.3. Chorobotwórczość

Wirus Epsteina-Barr jest patogenem powszechnie występującym w populacji ludzkiej. Szacuje się, że 90-95% dorosłych jest zakażonych tym patogenem [112]. Do zakażenia dochodzi głównie drogą kropelkową, jednak istnieje możliwość zakażenia w skutek przetoczenia preparatów krwiopochodnych, jak również w wyniku przeszczepów. Udowodniono, że EBV stanowi czynnik przyczynowy rozmaitych chorób na różnych obszarach geograficznych [40,66]. W strefie umiarkowanej zachodniej i wschodniej półkuli wywołuje mononukleozę zakaźną. Rocznie w Polsce rejestruje się około 700 przypadków. Poprzez komórki nabłonka jamy nosogardłowej wirus infekuje limfocyty. Okres wylęgania mononukleozy wynosi od 4 do 6 tygodni. Do objawów prodromalnych należą zmęczenie, złe samopoczucie, spadek aktywności fizycznej. Charakterystyczna triada objawów to: gorączka, ból gardła, niebolesne powiększenie węzłów chłonnych, zwłaszcza szyjnych [15,38]. W badaniach laboratoryjnych stwierdza się leukocytozę (10-20 G/l), w rozmazie krwi obwodowej limfocyty stanowią 50-70%, wśród nich wyróżnia się limfocyty atypowe z obfitą cytoplazmą, luźną chromatyną i nieregularnym jądrem [5,66].

Pierwszym nowotworem powiązaniem z zakażeniem EBV był chłoniak Burkitta (ang. *Burkitt's lymphoma*, BL). W roku 1964 Michael Antony Epstein i Yvonne Barr przy użyciu mikroskopu elektronowego potwierdzili obecność cząstek wirusa w preparatach tkankowych BL [15,16]. Nowotwór ten występuje w trzech postaciach:

endemicznej, sporadycznej oraz u osób zakażonych HIV. Obecnie stwierdza się DNA EBV w ponad 95% przypadkach endemicznych BL i w 15-30% przypadków sporadycznych. Wśród osób HIV pozytywnych obecność wirusa ocenia się na poziomie 40-50% [137,141,146]. BL jest złośliwym nowotworem, najczęściej przyjmuje postać guza żuchwy lub oczodołu. Histologicznie obserwuje się proliferujące limfocyty B o średnicy 10-25µm, z zasadofilną cytoplazmą, zawierającą okrągłe bądź owalne jądra z licznymi jąderkami. W rozwoju postaci endemicznej za kofaktor odpowiedzialny za supresję limfocytów B podejrzewa się zakażenie zarodźcem malarii. Rozwojowi BL niezależnie od postaci sprzyja swoista translokacja chromosomalna długiego ramienia chromosomu 8, który niesie protoonkogen *c-myc*. Na skutek tego dochodzi do ciągłej ekspresji białka c-MYC, odpowiedzialnego za dojrzewanie i proliferację komórek, jak również przejście w cyklu komórkowym z fazy G1 do S [126,130].

Udowodniono również powiązanie EBV z endemicznie występującym rakiem jamy nosowo-gardłowej (ang. *nasopharyngeal carcinoma*, NPC). W 1970 r. potwierdzono obecność DNA wirusa w komórkach nowotworowych za pomocą hybrydyzacji. Zachorowania najczęściej odnotowuje się w południowo-wschodniej Azji: Chinach, Wietnamie, Filipinach. Jako główne czynniki etiologiczne odpowiedzialne za rozwój NPC wymienia się: predyspozycje genetyczną - haplotyp HLA A2-B46, kancerogeny chemiczne - nitrozaminy, olej tungowy oraz infekcje EBV [3,76,146].

W badaniach stwierdzono powiązania pomiędzy infekcją EBV a rakiem żołądka (ang. *gastric carcinoma*, GC). W gruczolakorakach obecność genomu EBV wynosi 5-25%, obserwowany jest również nowy typ latencji związany z wytwarzaniem BARF-1, proteiny, która wykazuje homologię z cząsteczką adhezji międzykomórkowej (ang. *intercellular adhesion molecule*, ICAM-1) oraz brakiem białka LMP-1. W powyżej 95% przypadków u pacjentów z rakiem limfatyczno-nabłonkowy stwierdza się obecność genomu EBV [3,25,26,75,76].

1.2.4. Właściwości onkogenne

Charakterystyczne dla wirusa Epsteina-Barr jest kodowanie białek, które wykazują homologię do komórek gospodarza, oddziałują z cząsteczkami antyapoptycznymi, cytokinami oraz transduktorami sygnałów w komórce. Pozwala

to na promowanie zakażenia, immortalizację oraz transformację nowotworową zakażonej komórki. Wirus Epsteina-Barr spełnia wszystkie warunki, które pozwalają na uznanie go za czynnik etiologiczny nowotworu. Mianowicie istnieje związek epidemiologiczny między występowaniem wirusa i nowotworu. Wirus musi zostać wyizolowany z tkanki nowotworowej i posiadać zdolność do transformacji *in vitro* oraz należy stwierdzić obecność antygeny lub genomu wirusa w komórkach nowotworu [26,75].

1.2.5. Diagnostyka laboratoryjna

Identyfikacja zakażenia wirusem Epsteina-Barr dokonywana jest za pomocą szerokiego panelu badań serologicznych. Klasyczne testy serologiczne opierają się na aglutynacji erytrocytów baranich, bydłęcych bądź końskich w obecności przeciwciał heterofilnych. Pierwszym z zastosowanych testów tego typu był test Paula-Bunnella-Davidsohna, który wykorzystywał baranie krwinki czerwone. Obecnie używa się krwinek końskich (test Monospot), gdyż charakteryzują się one większą czułością (85%) i prawie 100% swoistością [13,15,130].

Swoiste testy serologiczne pozwalają na określenie miana przeciwciał swoistych przeciwko antygenom EBV. Obecnie wykorzystuje się głównie metody immunoenzymatyczne (ELISA). Znaczenie diagnostyczne mają przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi kapsydu EBV (ang. *viral capsid antigen*, VCA), antygenowi wczesnemu (ang. *early antigen*, EA) oraz antygenowi jądrowemu (ang. *Epstein-Barr nuclear antigen* – EBNA). Jako pierwsze w przebiegu infekcji pojawiają się przeciwciała IgM skierowane przeciwko VCA, najwyższe miano przeciwciał występuje po 2-3 tygodniach od zakażenia i utrzymuje się do 3-4 miesięcy. Pojawiające się po tym okresie przeciwciała IgG przeciwko VCA wykrywane są przez całe życie u pacjenta zakażonego wirusem Epsteina-Barr. Przeciwciała klasy IgG przeciwko EA świadczą o replikacji wirusa, pomiędzy 3-4 tygodniem a 3-4 miesiącem od zakażenia, w późniejszym czasie zanikają. Przeciwciała przeciwko EBNA charakterystyczne są dla późnej fazy infekcji i utrzymują się przez całe życie. W diagnostyce serologicznej zakażeń EBV przydatny jest również pomiar awidności przeciwciał VCA IgM i EA IgG, umożliwiający odróżnienie infekcji pierwotnej od wtórnej [15,66,76].

Wykorzystanie metod immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych umożliwia detekcję oraz określenie lokalizacji antygenów EBV w zainfekowanych komórkach. Za pomocą powyższych metod najczęściej wykrywane jest białko Z, LMP i EBNA-2. Wykazanie ekspresji wirusowej za pomocą przeciwciał monoklonalnych przeciwko białkom LMP i EBNA-2 stosuje się w PTDLs, chłoniaku Hodgkina i raku jamy nosowo-gardłowej [126].

Wśród metod biologii molekularnej do jakościowego oraz ilościowego oznaczania DNA EBV stosuje się metodę PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (Real Time PCR), który charakteryzuje się wysoką czułością i swoistością [28].

II. CEL PRACY

Choroba wrzodowa żołądka może prowadzić do raka żołądka, charakteryzującego się wysoką śmiertelnością. Poznanie czynników odpowiedzialnych za jej rozwój umożliwia podejmowanie racjonalnej profilaktyki, wczesnego rozpoznania i leczenia. Celem pracy było zanalizowanie występowania zakażenia *Helicobacter pylori* i wirusa Epsteina-Barr wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem, chorobą wrzodową i rakiem żołądka. Zmniejszający się odsetek eradykacji zakażeń wywoływanych przez *Helicobacter pylori* wymusza potrzebę wprowadzenia skuteczniejszych metod leczenia.

Dla realizacji powyższego celu przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Ocena częstości występowania *Helicobacter pylori* i wirusa Epsteina-Barr w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.
2. Analiza wybranych czynników zjadliwości *Helicobacter pylori*.
3. Charakterystyka wzoru wrażliwości izolowanych szczepów *Helicobacter pylori*.

III. MATERIAŁY I METODY

Na wykonywanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu - orzeczenie Komisji Bioetycznej nr 499/15 z dnia 06.05.2015r. (załącznik). Wzór karty informacyjnej dla pacjentów objętych badaniami przedstawia rycina 5.

INFORMACJA DLA PACJENTA

Dotyczy projektu naukowego prowadzonego
przez Katedrę i Klinikę Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób
Wewnętrznych
oraz Katedrę i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
pt.: „Mikrobiologiczne czynniki ryzyka choroby wrzodowej żołądka”.

Choroba wrzodowa żołądka może prowadzić do raka żołądka, charakteryzującego się wysoką śmiertelnością.

Brak znajomości czynników wywołujących chorobę wrzodową żołądka uniemożliwia podejmowanie racjonalnej profilaktyki, wczesnego rozpoznania i leczenia.

Celem prowadzonych badań kliniczno-mikrobiologicznych jest określenie czynników mogących wpływać na powstawanie choroby oraz pomagać we wczesnej diagnostyce i leczeniu choroby wrzodowej żołądka.

Badania te nie noszą znamion eksperymentu ani doświadczeń na chorym, gdyż są prowadzone na resztkowym materiale pobieranym do koniecznej diagnostyki klinicznej i bakteriologicznej choroby.

Dlatego zwracamy się z prośbą o wyrażenie zgody na wykorzystanie materiału resztkowego do badań naukowych.

Ryc. 5. Wzór karty informacyjnej dla pacjentów.

3.1. Grupa badawcza

Prospektywnymi badaniami objęto 65 pacjentów hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badania prowadzono w latach 2013-2015. Pobrane podczas gastroskopii wycinki z trzonu i antrum żołądka, zostały wykorzystane do przygotowania preparatów histologicznych na podstawie oceny, których postawiono rozpoznania kliniczne. Kryteria diagnostyczne zastosowane w prowadzonych badaniach obejmowały: test ureazowy, hodowlę mikrobiologiczną, badania PCR.

Kryterium włączającym do badania był obraz kliniczny choroby, dolegliwości dyspeptyczne, bóle brzucha, wymioty, zgaga, nudności oraz spadek masy ciała, rozpoznanie histopatologiczne przewlekłej choroby żołądka, choroby wrzodowej żołądka lub raka żołądka- gruczolakoraka. Natomiast kryterium wykluczającym był wiek poniżej 18 lat oraz inne rozpoznanie histopatologiczne aniżeli powyższe.

Badana populacja obejmowała trzy grupy pacjentów:

Grupa 1 obejmowała 30 pacjentów w wieku 24-76 lat; średnia wieku: $49,3 \pm 15,6$

(13 kobiet - średnia wieku: $51,5 \pm 15,6$; 17 mężczyzn - średnia wieku $48,4 \pm 15,3$)
z przewlekłym zapaleniem żołądka

Grupa 2 obejmowała 15 pacjentów w wieku 55-78 lat; średnia wieku: $61,9 \pm 10,1$

(8 kobiet - średnia wieku: $60,7 \pm 11,3$; 7 mężczyzn - średnia wieku $63,2 \pm 8,3$)
z chorobą wrzodową żołądka

Grupa 3 obejmowała 20 pacjentów w wieku 48-68 lat; średnia wieku: $58,4 \pm 6,3$

(12 kobiet średnia wieku: $58,5 \pm 6,9$; 8 mężczyzn średnia wieku $58,3 \pm 5,5$)
z rakiem żołądka- gruczolakorakiem

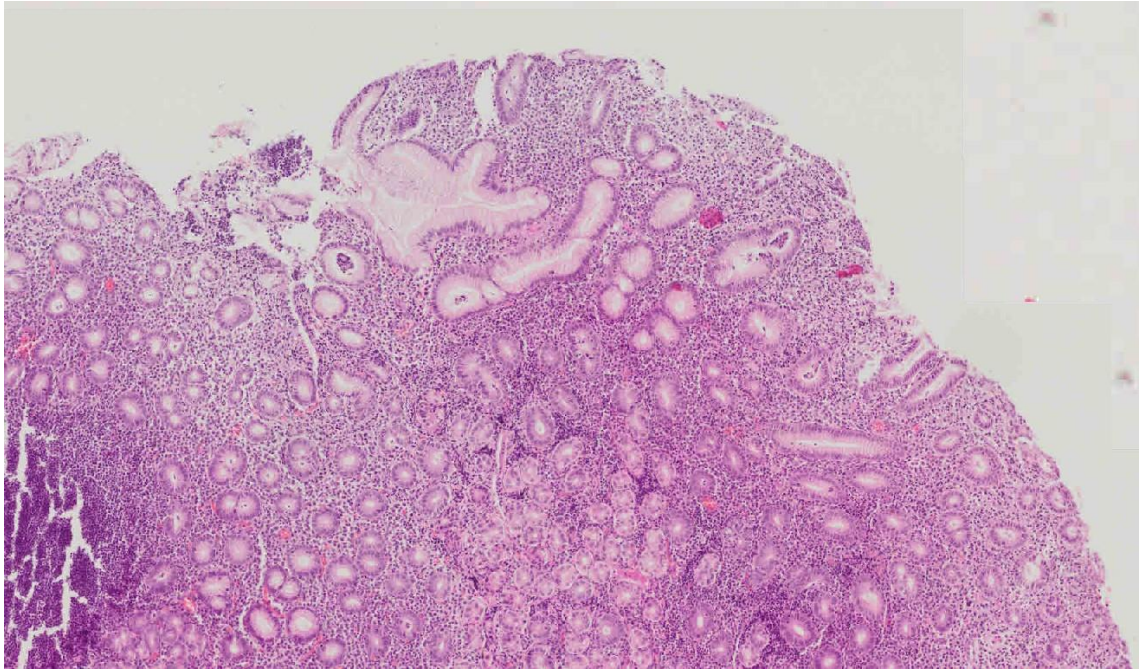
3.2. Przygotowanie materiału do badań mikrobiologicznych i histopatologicznych

3.2.1. Przygotowanie materiału do badań bakteriologicznych

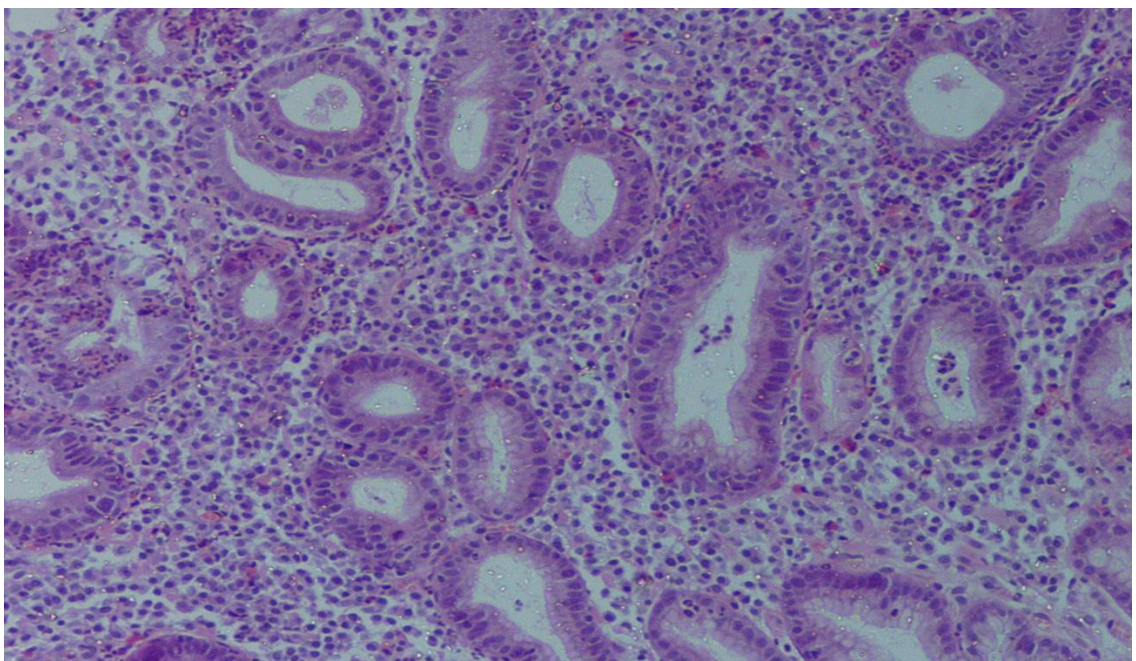
Chorych poddano badaniu endoskopowemu górnego odcinka przewodu pokarmowego, które wykonywane było w Katedrze i Klinice Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Pobierano biopaty błony śluzowej żołądka z okolic antrum oraz trzonu, z których następnie wykonywano szybki test ureazowy oraz przeprowadzano badanie mikrobiologiczne i histopatologiczne. W celu stwierdzenia obecności *Helicobacter pylori* w badanym materiale pobrane biopaty (po dwa z antrum i trzonu) przekazywano w podłożu transportowym Portagerm pylori (PORT-PYL, bioMérieux, Polska Sp. z o.o.) do Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.2.2. Przygotowanie preparatów do badań histopatologicznych

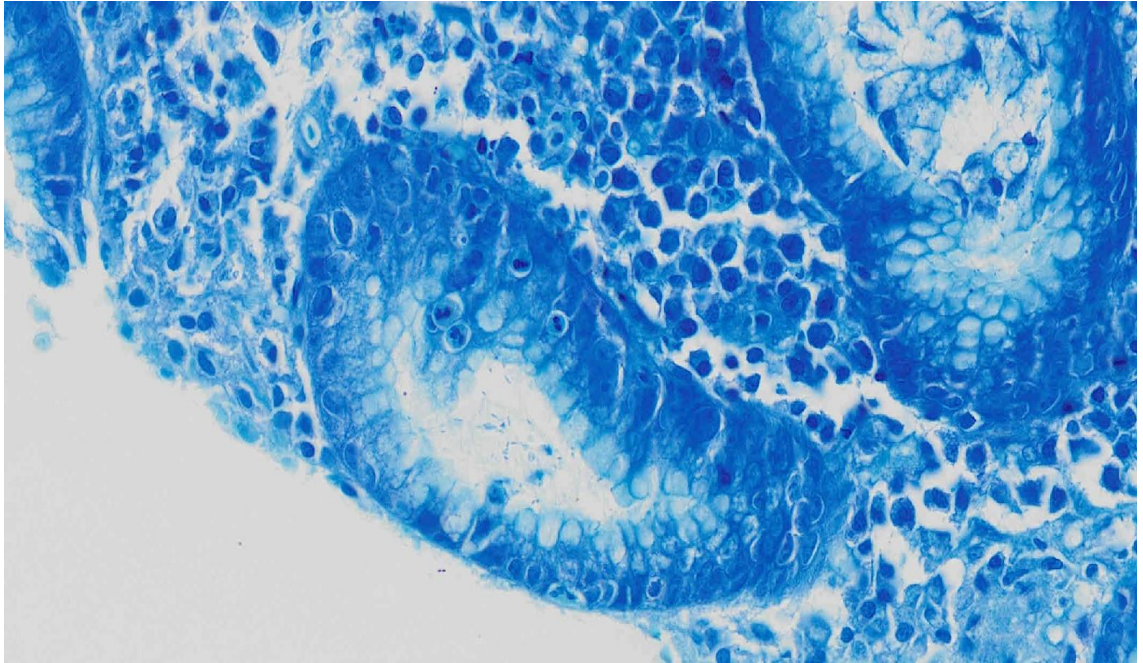
Badania były wykonywane w Katedrze Patomorfologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu pod kierownictwem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego. Pobrane biopaty utrwalano przez 3 dni w roztworze 10% formaliny, następnie przygotowywano preparaty, które barwiono hematoksyliną i eozyną. W celu oceny obecności *H. pylori* stosowano barwienie Giemsy. Oceny mikroskopowej zapalenia błony śluzowej żołądka dokonywano zgodnie z klasyfikacją Sydney, natomiast raka żołądka wg Laurena. Obrazy mikroskopowe pochodzące od pacjentów z badanych grup przedstawiono na fotografiach 1-4.



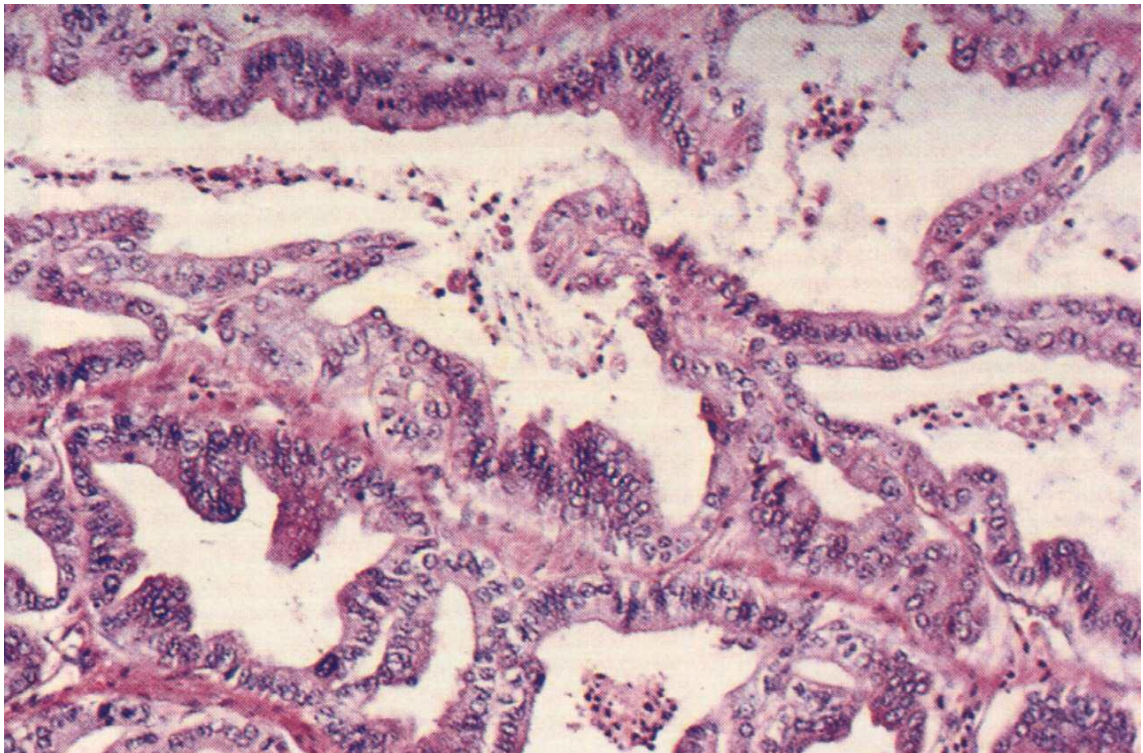
Fot. 1. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka - *Gastritis chronica activa* (barwienie H+E, pow. 40x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego .



Fot. 2. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka - *Gastritis chronica activa* (barwienie H+E, pow. 100x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego .



Fot. 3. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka - Gastritis chronica activa (barwienie metodą Giemsy pow. 200x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego.



Fot. 4. Rak żołądka – Adenocarcinoma tubulare G1 (barwienie H+E, pow. 200x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego.

3.3. Badania mikrobiologiczne

3.3.1. Hodowla *Helicobacter pylori*

Materiał do badań stanowiły wycinki pobrane z trzonu i antrum żołądka podczas gastroskopii. Hodowlę zakładano na podłożach selektywnych dla *H. pylori*. Pierwsze z nich stanowił agar Columbia z 7% krwią baranią, zawierający:

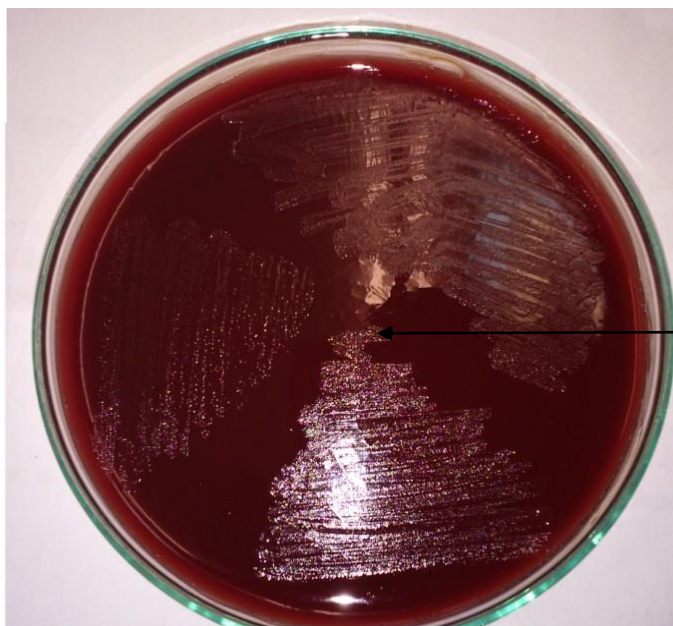
- bio-Polytone 10,0 g
- bio-Lysat 10,0 g
- bio-Myotone 3,0 g
- skrobia kukurydziana 1,0 g
- chlorek sodu 5,0 g
- agar 13,5 g

Rozpuszczano 42,5 g proszku w 1000 ml wody destylowanej, następnie gotowano przez 1 minutę. Poddawano sterylizacji w autoklawie w 118°C przez 15 minut. Do schłodzonego do 50°C podłoża dodawano krew baranią w ilości 25 ml krwi na 500 ml podłoża podstawowego i rozlewano na płytki Petriego.

Drugie podłoże wykorzystywane w hodowli to agar Columbia z 7% krwią baranią z suplementem antybiotyków *H. pylori Selective Supplement (Dent)* firmy OXOID, zawierającym chlorowodorek wankomycyny, cefulodynę sodu, trimetoprim oraz amfoterycynę B.

Rozpuszczano 42,5 g proszku w 1000 ml wody destylowanej, następnie gotowano przez 1 minutę. Poddawano sterylizacji w autoklawie w 118°C przez 15 minut. Do schłodzonego do 50°C podłoża dodawano krew baranią w ilości 25 ml krwi na 500 ml podłoża podstawowego oraz 2 ml *Selective Supplement (Dent)* i rozlewano na płytki Petriego.

Hodowlę prowadzono w cieplarni w temperaturze 37°C przez 5-7 dni w warunkach mikroaerofilnych, uzyskiwanych za pomocą GENbox (BioMerieux). Po upływie 4-5 dni obserwowano wyrosłe kolonie na podłożu z suplementem i bez suplementu (fotografia 5).



Fot. 5. Wzrost *H. pylori* na podłożu Columbia agar 7% z dodatkiem antybiotyków.

W przypadku kolonii, które wyglądem sugerowały obecność *H. pylori*, jak również wykazywały dodatni test w kierunku oksydazy oraz katalazy, przesiewano na podłoże selektywne agar Columbia z 7% krwią baranią z suplementem antybiotyków. Następnie hodowlę prowadzono przez kolejne trzy dni. Jeśli na obu podłożach po 4-5 dniach nie obserwowano wzrostu kolonii, przedłużano hodowlę do 10 dni, obserwując codziennie ewentualny wzrost kolonii. W przypadku wyhodowanych szczepów kolonie oceniano na podstawie wyglądu makroskopowo, jak również oceniano czy badany szczep daje pozytywny wynik testu ureazowego. Wykonywano również barwienie metodą Grama w celu obserwacji Gram - ujemnych spiralnych drobnoustrojów. Identyfikację *H. pylori* potwierdzano metodą molekularną PCR wykrywając gen *ureA*, opisaną w rozdziale 3.5.1.

Wyrosłe szczepy *H. pylori* przesiewano ponownie na podłoże Columbia z 7% krwią baranią i dodatkiem antybiotyków, celem namnożenia. Hodowlę prowadzono przez 3 dni w warunkach mikroaerofilnych w 37°C. Następnie zbierano jałową wymazówką wszystkie kolonie z powierzchni podłoża i zawieszano w podłożu płynnym - bulionie Schaedler Anaerobe Broth 1 ml z dodatkiem 10% glicerolu, 10% surowicy płodowej bydlęcej. Tak przygotowane próbki zamrażano w temperaturze - 80°C.

3.3.2. Oznaczanie lekowrażliwości *Helicobacter pylori*

Dla wszystkich szczepów wyizolowanych z pobranych biopłatów oznaczono lekowrażliwość. Zastosowano metodę ilościową z wykorzystaniem E-testów- plastikowe paski wysycone antybiotykiem w gradiencie stężeń. Za ich pomocą wyznaczono minimalne stężenie leku (mg/L), które hamowało wzrost drobnoustroju (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC).

W badaniach oznaczono wartości MIC dla 5 antybiotyków/chemioterapeutyków: amoksycyliny, lewofloksacyny, klarytromycyny, metronidazolu i tetracykliny.

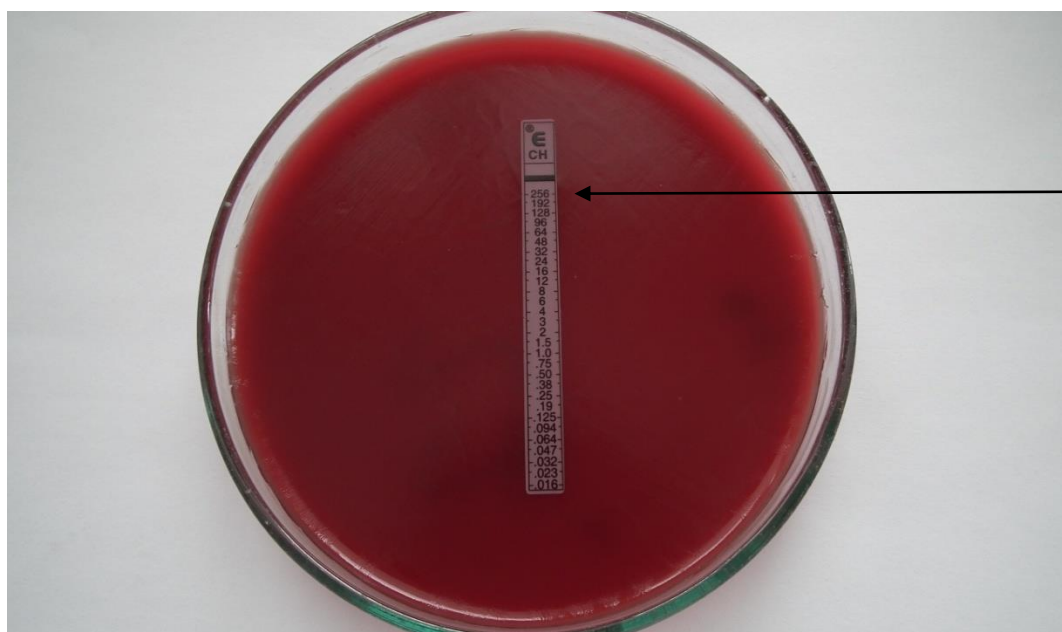
Wyhodowane szczepy na podłożu Columbia z 7% krwią baranią i dodatkiem antybiotyków, namnażano do antybiogramu. W tym celu przesiewano kolonie *H. pylori* na całą powierzchnię płytki Columbia z 7% krwią baranią i dodatkiem antybiotyków, hodowano w cieplarni w temperaturze 37°C w warunkach mikroaerofilnych przez okres 3 dni. Następnie przygotowywano zawiesinę bakterii. Zbierano jałową wymazówkę kolonie z powierzchni agaru, zawieszano je w roztworze 0,85% NaCl celem uzyskania zawiesiny o gęstości 4 w skali McFarland'a. Odpowiednią gęstość mierzono za pomocą densytometru Densimat (BioMerieux).

W ten sposób przygotowaną zawiesinę za pomocą jałowej wymazówki rozprowadzano na podłożu Columbia z 7% krwią baranią i dodatkiem antybiotyków, w trzech kierunkach celem równomiernego pokrycia zawiesiną całej powierzchni agaru. Przed nałożeniem E-testów płytki pozostawiano na 15 minut do wyschnięcia.

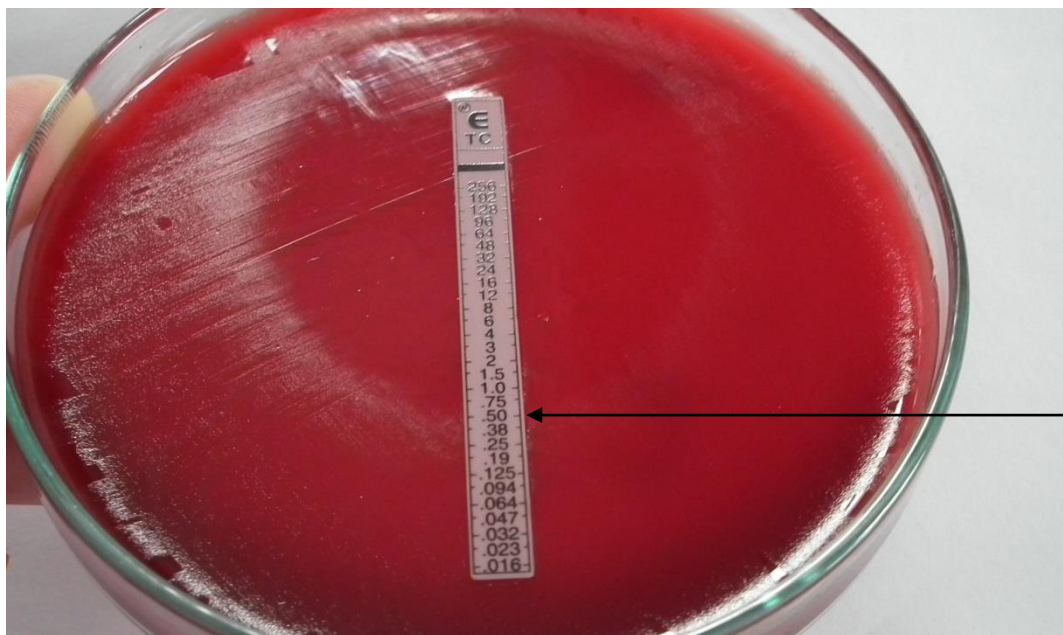
Przy użyciu jałowej pęsety na suchą powierzchnię agaru nakładano paski zawierające antybiotyki/chemioterapeutyki. Płytki inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C w warunkach mikroaerofilnych przez 3 dni. Następnie odczytywano wartość MIC dla danego antybiotyku/chemioterapeutyku czyli miejsce zahamowania wzrostu koloni przy odpowiednim ze stężeń na pasku. W celu zakwalifikowania szczepów jako wrażliwych/opornych przyjęto wartości graniczne MIC zgodnie z wytycznymi Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST), wersja 8.0, obowiązująca od 01.01.2018r. (tabela 4). Na fotografiach 6-8 przedstawiono wartości MIC dla szczepu nr 19.

Tab. 4. Wartości graniczne antybiotyków/chemioterapeutyków wg EUCAST dla *H. pylori*.

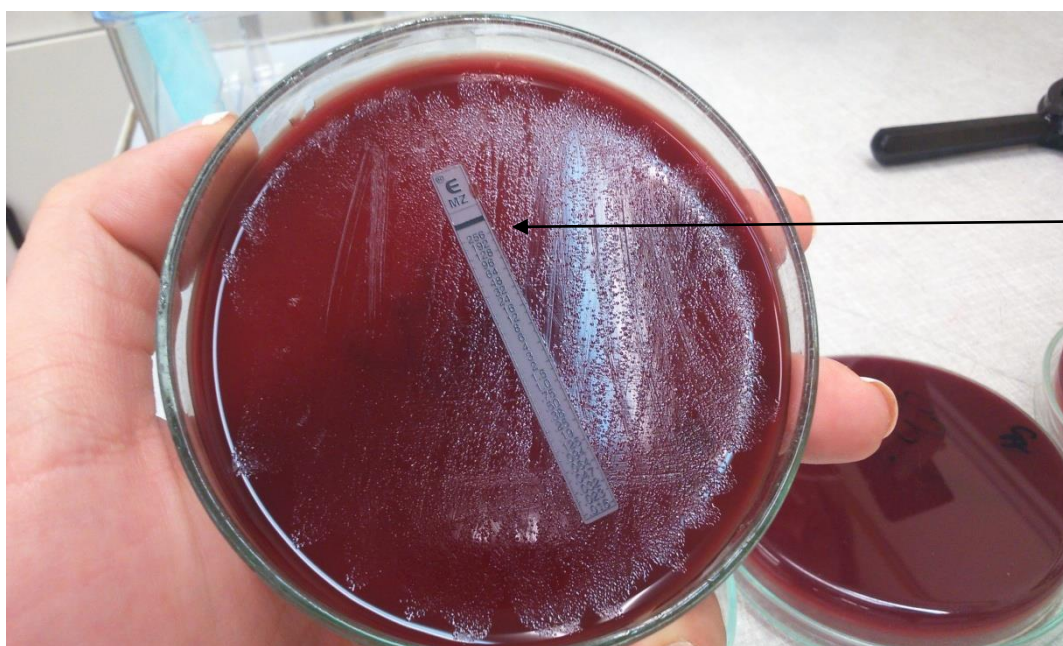
Antybiotyk/ Chemioterapeutyk	Wrażliwy MIC (mg/L)	Oporny MIC (mg/L)
Amoksycylina	$\leq 0,125$	$> 0,125$
Lewofloksacyna	≤ 1	> 1
Klarytromycyna	$\leq 0,25$	$> 0,5$
Metronidazol	≤ 8	> 8
Tetracyklina	≤ 1	> 1



Fot. 6. Ocena wrażliwości za pomocą E-testu szczepu *H. pylori* nr 19 na klarytromycynę, MIC > 256 mg/l.



*Fot. 7. Ocena wrażliwości za pomocą E-testu szczepu *H. pylori* nr 19 na tetracyklinę, MIC = 0,5 mg/l.*



*Fot. 8. Ocena wrażliwości za pomocą E-testu szczepu *H. pylori* nr 19 na metronidazol, MIC >256 mg/l.*

3.4. Izolacja DNA z bioptatów

Bioptaty pobrane w czasie gastroskopii po posiewie na podłoże Columbia z 7% krwią baranią oraz Columbia z 7% krwią baranią z dodatkiem suplementu antybiotyków umieszczano w probówkach eppendorfa o pojemności 2 ml. Za pomocą skalpela wycinki rozcinano. Do izolacji DNA bakteryjnego wykorzystano zestaw Swab A&A BIOTECHNOLOGY. Protokół izolacji DNA:

- Przygotowane wycinki w eppendorfówkach zalewano 0,7 ml roztworu lizującego, dodawano 20 μ l Proteinazy K
- Zawartość probówki mieszano, następnie inkubowano w 37°C, przez minimum 20 minut, od czasu do czasu wotreksowano
- Wykorzystano kolumnę do oczyszczania DNA, na którą naniesiono zawartość probówek
- Wirowano 1 minutę przy 10-15 tys. RPM
- Przeniesiono kolumnę do nowej probówki, dodano 0,5 ml roztworu płuczającego A1
- Wirowano 1 minutę przy 10-15 tys. RPM
- Przeniesiono kolumnę do nowej probówki, dodano 0,5 ml roztworu płuczającego A1
- Wirowano 2 minuty przy 10-15 tys. RPM
- Następnie kolumnę umieszczano w eppendorfówce, dodano 150 μ l buforu elucyjnego, który uprzednio został ogrzany do 75°C
- Inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej
- Wirowano 1 minutę przy 10-15 tys. RPM
- Usunięto mikrokolumnę
- Zawartość probówki, w której znajdowało się oczyszczone DNA bakteryjne przechowywano w lodówce aż do czasu dalszych analiz molekularnych

3.4.1. Oznaczanie stężenia i czystości DNA w badanych próbkach

W celu oceny stężenia i czystości DNA została wykorzystana metoda spektrofotometryczna. Pomiaru dokonano za pomocą aparatu BioPhotometer plus (Eppendorf) w Katedrze i Zakładzie Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Zakres wartości odczytu aparatu wynosi 230-340 nm. Pomiaru wykonywane były przy długości fal 260, 280 i 320 nm. Analizy dokonano wobec próby ślepej, którą była jałowa woda.

3.4.1.1. Oznaczanie stężenia DNA w badanych próbkach

Absorbancja przy 260 nm jest równa 1 dla dwuniciowego DNA o stężeniu 50 µg/ml. Stężenie kwasu nukleinowego w próbce zostało zmierzone zgodnie ze wzorem:

$$\text{stężenie DNA (}\mu\text{g/ml)} = (A_{260} - A_{320}) * 50$$

Wartość absorbancji mierzonej przy długości 320 nm należy odjąć od mierzonej przy 260 nm w celu uwzględnienia wartości tła.

3.4.1.2. Oznaczanie czystości DNA w badanych próbkach

Stosunek wartości absorpcji A_{260} do A_{280} jest wskaźnikiem zanieczyszczenia kwasów nukleinowych białkami. Wartość współczynnika A_{260}/A_{280} wynosząca między 1,8 a 2,0 świadczy, że preparaty są wystarczająco oczyszczone. Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów obliczony został iloraz absorbancji A_{260}/A_{280} .

3.4.2. Ocena produktów PCR

Podczas reakcji PCR w celu ograniczenia liczby błędów stosowano kontrolę negatywną, jak i pozytywną. Kontrola negatywna (ujemna) reakcji PCR to próbka, która nie zawiera w swoim składzie DNA matrycowego, tylko analogiczną objętość wody destylowanej w stosunku do DNA obecnego w próbce dodatniej. Kontrola pozytywna (dodatnia) to próbka zawierająca w swoim składzie DNA kontrolne właściwej matrycy, która po amplifikacji daje specyficzny produkt reakcji.

Po zakończonej amplifikacji produkty reakcji PCR rozdzielano za pomocą elektroforezy w 2% żelu. Zastosowano 1 g agarozy, który rozpuszczano na gorąco w 50 ml buforu 1x stężonego buforu TBE. Po wystygnięciu dodano 2,5 μ l bromku etydyny. W ten sposób przygotowany roztwór wylewano do wanienki, w której znajdowały grzebienie, pozostawiano na czas 1 godziny, a po stężeniu i usieciowaniu żelu umieszczano go w zestawie do elektroforezy, który był wypełniony buforem TBE. Do kieszonek nakładano 4 μ l produktów amplifikacji i 2 μ l 2x stężonego buforu obciążającego. Dodatkowo oprócz próbek badanych, kontroli ujemnej i dodatniej na żel nałożono również marker wielkości. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 60 V przez 60 minut. Po zakończonej elektroforezie rozdział produktów reakcji PCR obserwowano w transluminatorze w świetle UV.

Wielkości uzyskanych produktów została oceniona względem markera wielkości DNA M 100-1000 bp.

3.5. Badania genetyczne *Helicobacter pylori*

3.5.1. Wykrywanie genu *ureA*

Do wykrywania genu *ureA* zastosowano zestaw diagnostyczny PCR - *Helicobacter pylori* (Blirt - DNA Gdańsk). Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosi 315 par zasad. Do 2 µl oczyszczonego DNA dodawano 48 µl przygotowanej mieszaniny reakcyjnej:

- 42 µl Master Mix *ureA*
- 5 µl Mieszaniny dNTPs
- 1 µl Polimerazy DNA TagNova

Uzyskaną mieszaninę umieszczano w termocyklerze Mastercycler proS gradient (Eppendorf), liczba cykli wynosiła 40. Warunki amplifikacji przedstawia tabela 5.

Tab. 5. Warunki amplifikacji wykrywania genu *ureA*.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (minuty)
Wstępna denaturacja	94	3
Denaturacja	94	1
Dołączanie primerów	65	1
Elongacja	72	0,5
Wydłużanie końcowe	72	2

3.5.2. Wykrywanie genu *cagA*

Do wykrywania genu *cagA* zastosowano zestaw diagnostyczny PCR-*Helicobacter pylori* CAG (Blirt - DNA Gdańsk). Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosi 455 par zasad. Do 2 μ l oczyszczonego DNA dodawano 48 μ l przygotowanej mieszaniny reakcyjnej:

- 42 μ l Master Mix *cagA*
- 5 μ l Mieszaniny dNTPs
- 1 μ l Polimerazy DNA TagNova

Uzyskaną mieszaninę umieszczano w termocyklerze Mastercycler proS gradient (Eppendorf), liczba cykli wynosiła 35. Warunki amplifikacji przedstawia tabela 6.

Tab. 6. Warunki amplifikacji wykrywania genu *cagA*.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (minuty)
Wstępna denaturacja	94	2
Denaturacja	94	0,5
Dołączanie primerów	59	1
Elongacja	72	1
Wydłużanie końcowe	72	2

3.6. Badania genetyczne wirusa Epsteina-Barr

Do wykrywania genu *EBNA-1* w badanych próbkach zastosowano zestaw Seeplex[®] Meningitis-V2 ACE Detection (v2.0). Do oznaczeń wykorzystano DNA uzyskane zgodnie z procedurami przedstawionymi powyżej. Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosi 400 par zasad. Do 5 μ l oczyszczonego DNA dodawano 15 μ l przygotowanej mieszaniny reakcyjnej:

- 2 μ l 10x MV2 ACE PM
- 3 μ l 8-MOP
- 10 μ l 2x Multiplex Master Mix

Uzyskaną mieszaninę umieszczano w termocyklerze Mastercycler proS gradient (Eppendorf), liczba cykli wynosiła 40. Warunki amplifikacji przedstawia tabela 7.

Tab. 7. Warunki amplifikacji wykrywania genu *EBNA-1*.

Etap	Temperatura (°C)	Czas (minuty)
Wstępna denaturacja	94	15
Denaturacja	94	0,5
Dołączanie primerów	63	1,5
Elongacja	72	1,5
Wydłużanie końcowe	72	10

3.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 10 (StatSoft, USA) w Katedrze Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu dzięki uprzejmości dr Izabeli Miechowicz. W analizie statystycznej zastosowano testy: test niezależności χ^2 dla grup o liczebności powyżej 5, natomiast w przypadku mniejszych zastosowano test Fishera-Freemana-Haltona. Istotność statyczną przyjęto dla różnic z wartością współczynnika $p < 0,05$, istotne różnice weryfikowano uwzględniając poprawkę Bonferroniego $\alpha = 0,05/3 = 0,0167$.

IV. WYNIKI

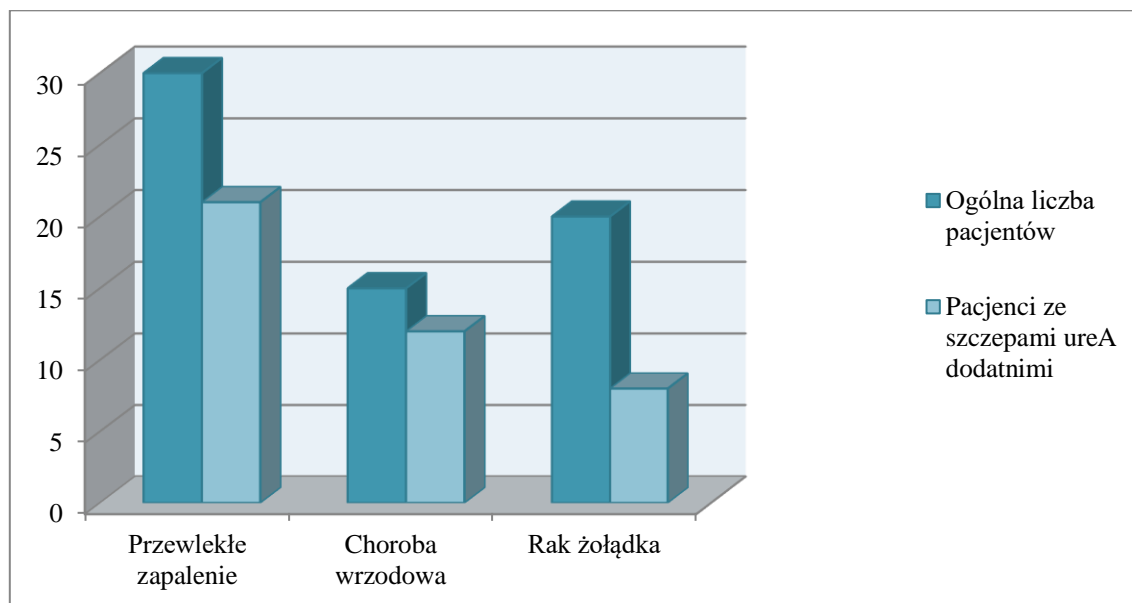
4.1. Analiza częstości występowania genu *ureA*

Spośród 30 chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka gen *ureA* stwierdzono w 21 (70%) biopatach. Wśród 15 pacjentów z chorobą wrzodową gen ten wykryto w 12 (80%), natomiast wśród 20 chorych z rakiem żołądka w 8 (40%) wycinkach. Analizę obecności genu *ureA* przedstawiono w tabeli 8 oraz na rycinach 6 i 7.

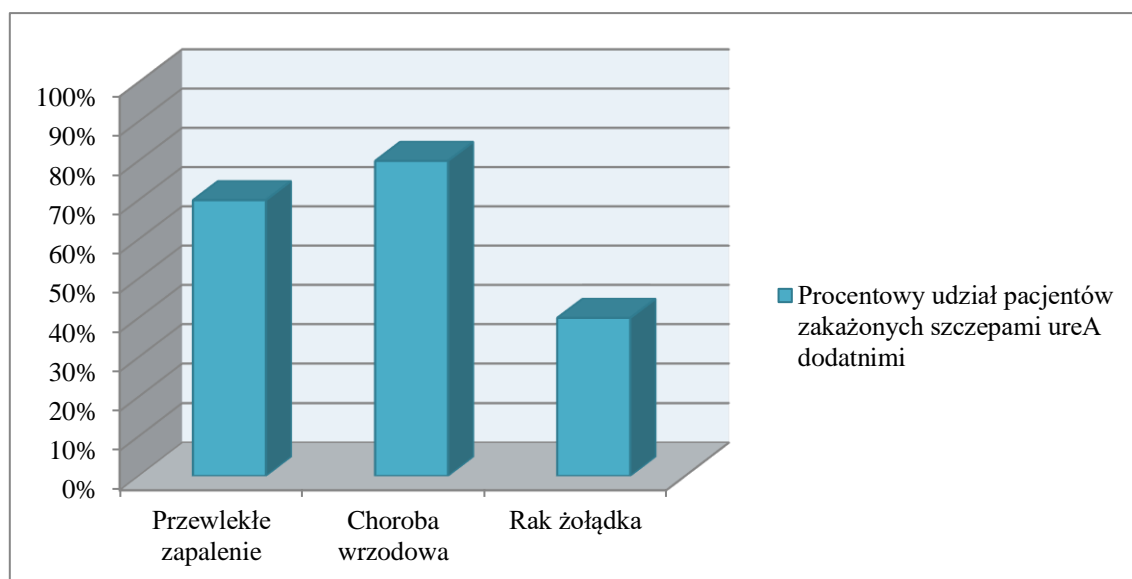
Tab. 8. Ocena częstości występowania genu *ureA* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Rozpoznanie	Oznaczenie obecności genu <i>ureA</i>		$p = 0.03283^*$ <i>test niezależności χ^2</i>
	Dodatnie (+) Liczba (%)	Ujemne (-) Liczba (%)	
Przewlekłe zapalenie żołądka (GC)	21 (70%)	9 (30%)	GC vs. UD $p=0.7222$ GC vs. AC $p=0.0451$ UD vs. AC $p=0.0369$
Choroba wrzodowa żołądka (UD)	12 (80%)	3 (20%)	
Rak żołądka (AC)	8 (40%)	12 (60%)	

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że pomiędzy badanymi grupami GC vs. UD vs. AC występują istotne statystycznie różnice ($p=0.03283^*$). Dodatkowo zastosowano poprawkę Bonferroniego, zmniejszającą poziom istotności $\alpha=0,05/3=0,0167$. Otrzymane wyniki wprawdzie nie osiągnęły obniżonego poziomu istotności, były bliskie istotności statystycznej. W przypadku grup GC vs. AC $p=0.0451$ oraz UD vs. AC $p=0.0369$, co może świadczyć o występowaniu różnic w ilościach osób z dodatnim szczepem pomiędzy grupami.



Ryc. 6. Ilościowy udział występowania genu ureA wśród badanych grup.



Ryc. 7. Procentowy udział występowania genu ureA wśród badanych grup.

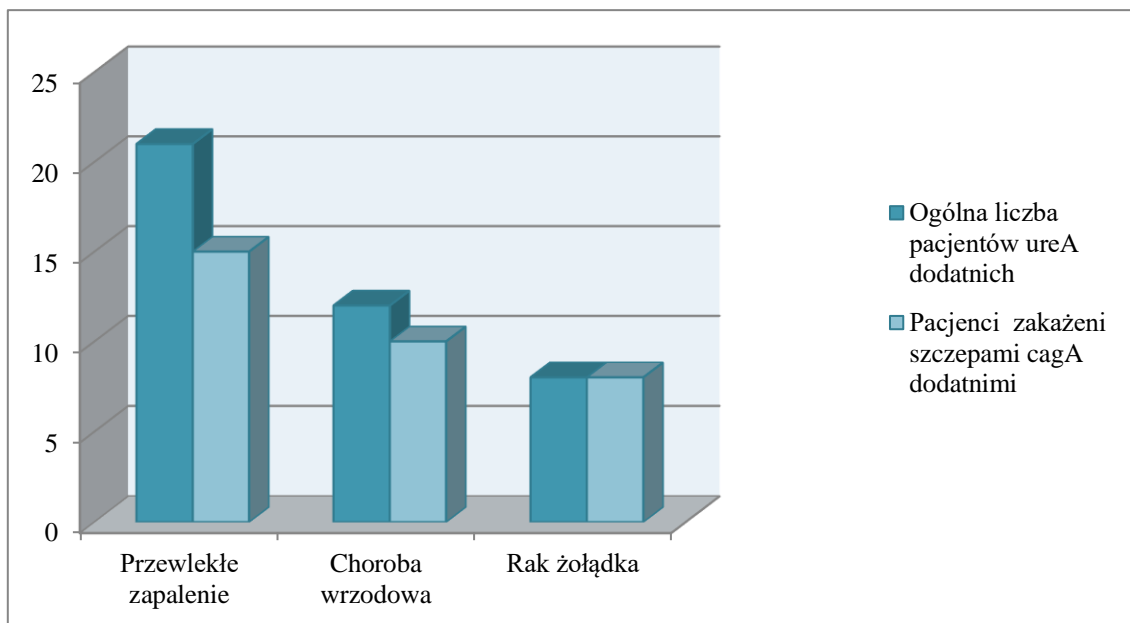
4.2. Analiza częstości występowania genu *cagA*

Występowanie genu *cagA* stwierdzono u 15 (71%) szczepów *Helicobacter pylori* wyizolowanych od chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka. W szczepach *H. pylori* od pacjentów z chorobą wrzodową gen *cagA* stwierdzono w 10 (83%) przypadkach, natomiast wśród szczepów od chorych z rakiem żołądka w 8 (100%) przypadkach. Analizę obecności genu *cagA* przedstawiono w tabeli 9 oraz na rycinach 8 i 9.

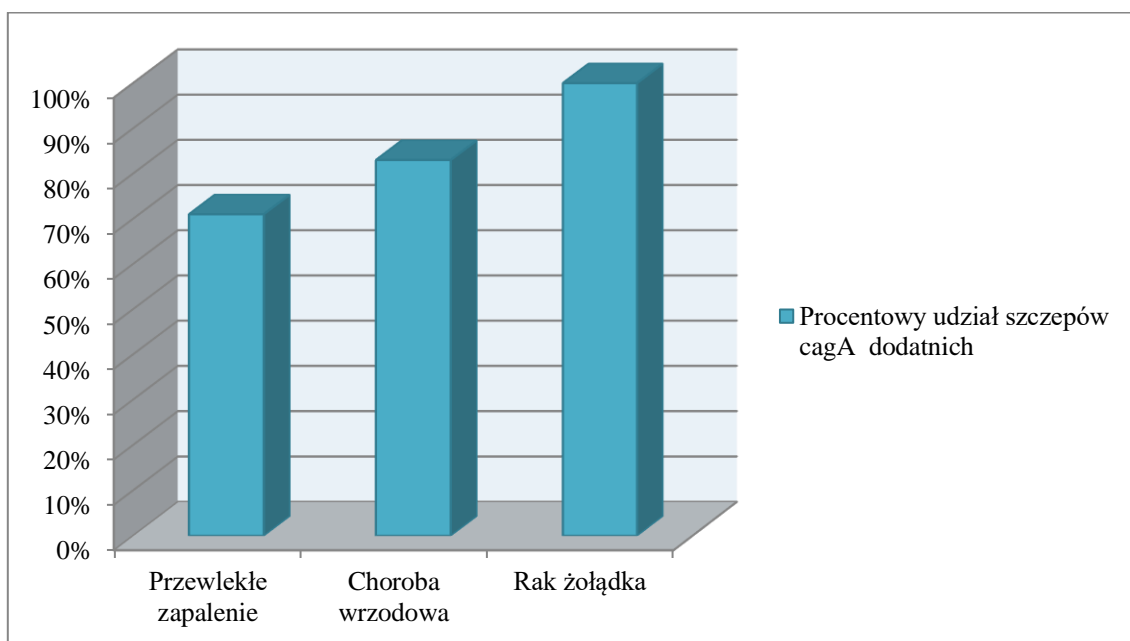
Tab. 9. Ocena częstości występowania genu *cagA* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Rozpoznanie	Oznaczenia genu <i>cagA</i>		<i>p</i> =0.2542 (test Fishera-Freemana-Haltona)
	Dodatnie (+) Liczba (%)	Ujemne (-) Liczba (%)	
Przewlekłe zapalenie żołądka (GC)	15 (71%)	6 (29%)	GC vs. UD <i>p</i> =0.6776 GC vs. AC <i>p</i> =0.1477 UD vs. AC <i>p</i> =0.4947
Choroba wrzodowa żołądka (UD)	10 (83%)	2 (17%)	
Rak żołądka (AC)	8 (100%)	0 (0%)	

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że wartości w obrębie poszczególnych grup GC vs. UD vs. AC nie różniły się istotnie statystycznie (*p*=0,2542).



Ryc. 8. Ilościowy udział występowania genu *cagA* wśród badanych grup.



Ryc. 9. Procentowy udział występowania genu *cagA* wśród badanych grup.

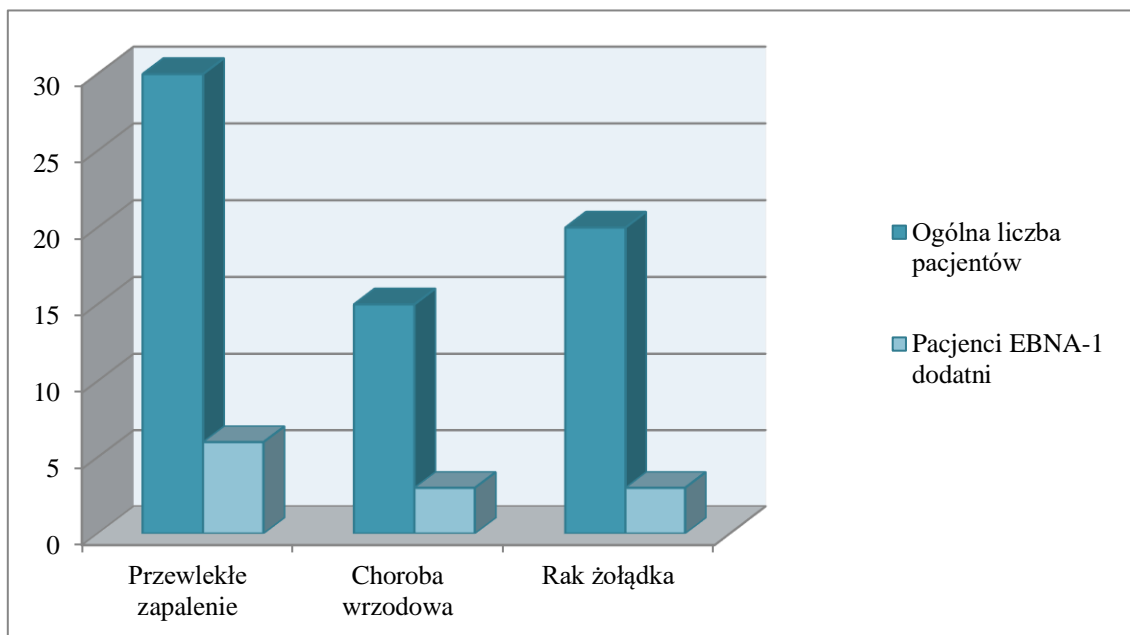
4.3. Analiza częstości występowania genu *EBNA-1*

Spośród 30 pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka występowanie genu *EBNA-1* wirusa Epsteina-Barr stwierdzono u 6 (20%), wśród 15 pacjentów z chorobą wrzodową gen *EBNA-1* wirusa EBV wykryto u 2 (13%), natomiast wśród chorych z rakiem żołądka u 3 (15%) pacjentów. Analizę obecności genu *EBNA-1* przedstawiono na rycinach w tabeli 10 oraz na rycinach 10 i 11.

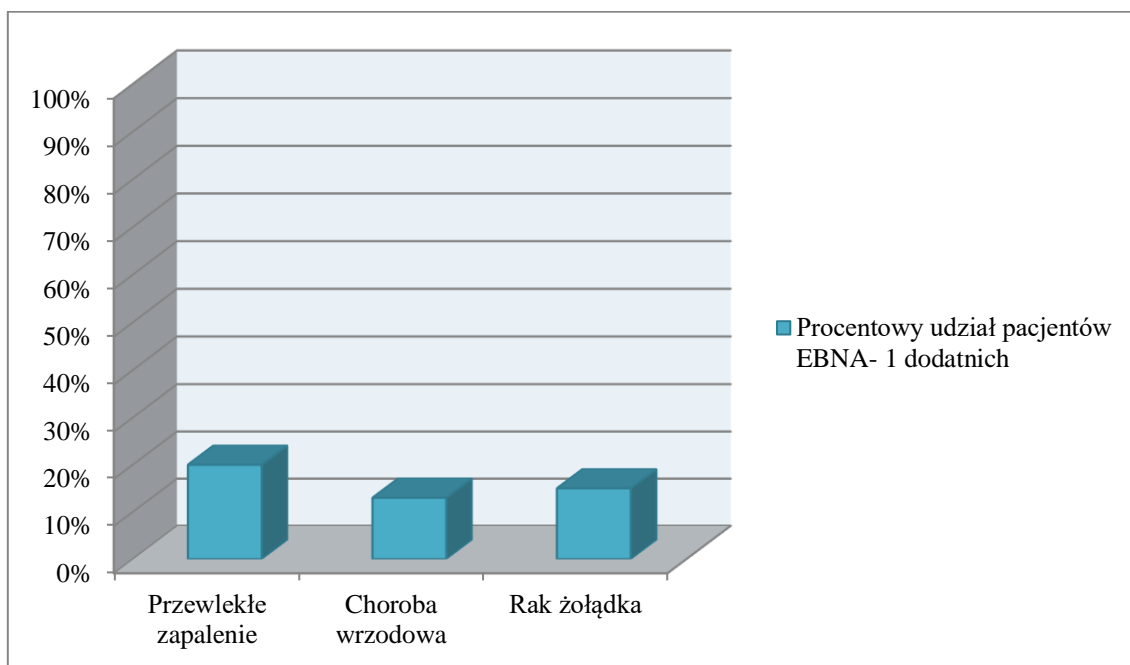
Tab. 10. Ocena częstości występowania genu *EBNA-1* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Rozpoznanie	Oznaczenia genu <i>EBNA-1</i>		<i>p</i> = 0.8364 <i>test Fishera-Freemana-Haltona</i>
	Dodatnie (+) Liczba (%)	Ujemne (-) Liczba (%)	
Przewlekłe zapalenie żołądka (GC)	6 (20%)	24 (80%)	GC vs. UD <i>p</i> =0.6992
Choroba wrzodowa żołądka (UD)	2 (13%)	13 (87%)	GC vs. AC <i>p</i> =0.7244 UD vs. AC <i>p</i> <1
Rak żołądka (AC)	3 (15%)	17 (85%)	

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że wartości w obrębie poszczególnych grup GC vs. UD vs. AC nie różniły się istotnie statystycznie ($p=0,8364$).



Ryc. 10. Ilościowy udział występowania genu EBNA-1 wśród badanych grup.



Ryc. 11. Procentowy udział występowania genu EBNA-1 wśród badanych grup.

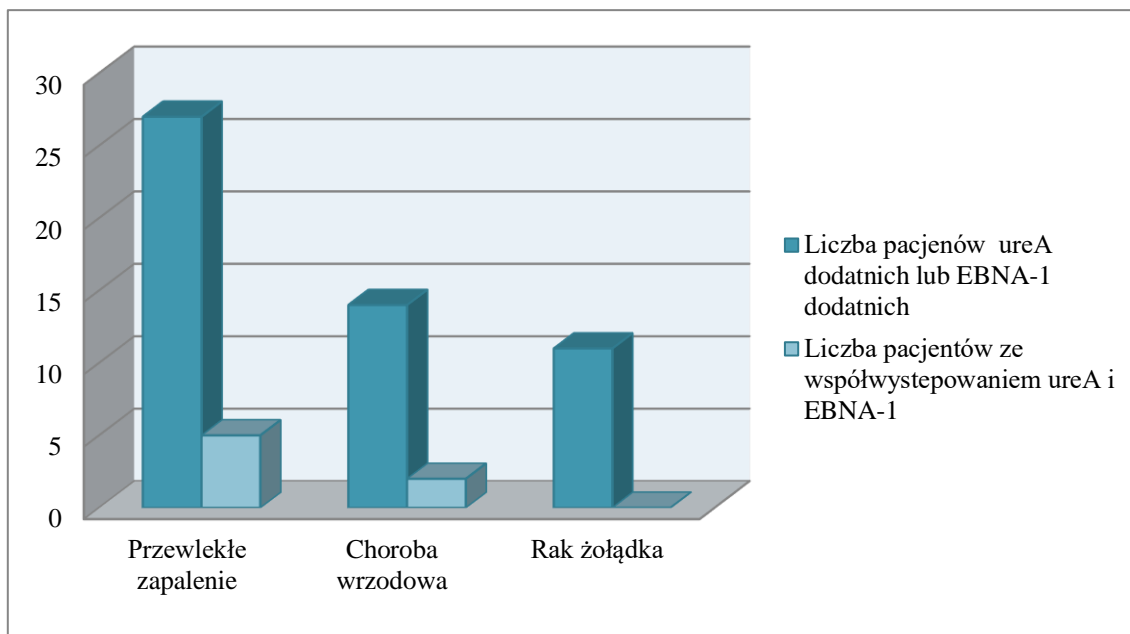
4.4. Współwystępowanie genu *ureA* i genu *EBNA-1* wirusa EBV wśród badanych grup

Wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem stwierdzono współwystępowanie genu *ureA* i genu *EBNA-1* u 5 pacjentów spośród 27 badanych, co stanowiło 18,5%. Natomiast w grupie chorych z chorobą wrzodową u 2 badanych spośród 14 chorych stwierdzono występowanie obu czynników, stanowiło to 14,3%. W grupie pacjentów z rakiem żołądka u żadnego z badanych nie stwierdzono współwystępowania obu czynników etiologicznych. Analizę współwystępowania genu *ureA* i genu *EBNA-1* przedstawiono na rycinach w tabeli 11 oraz na rycinach 12 i 13.

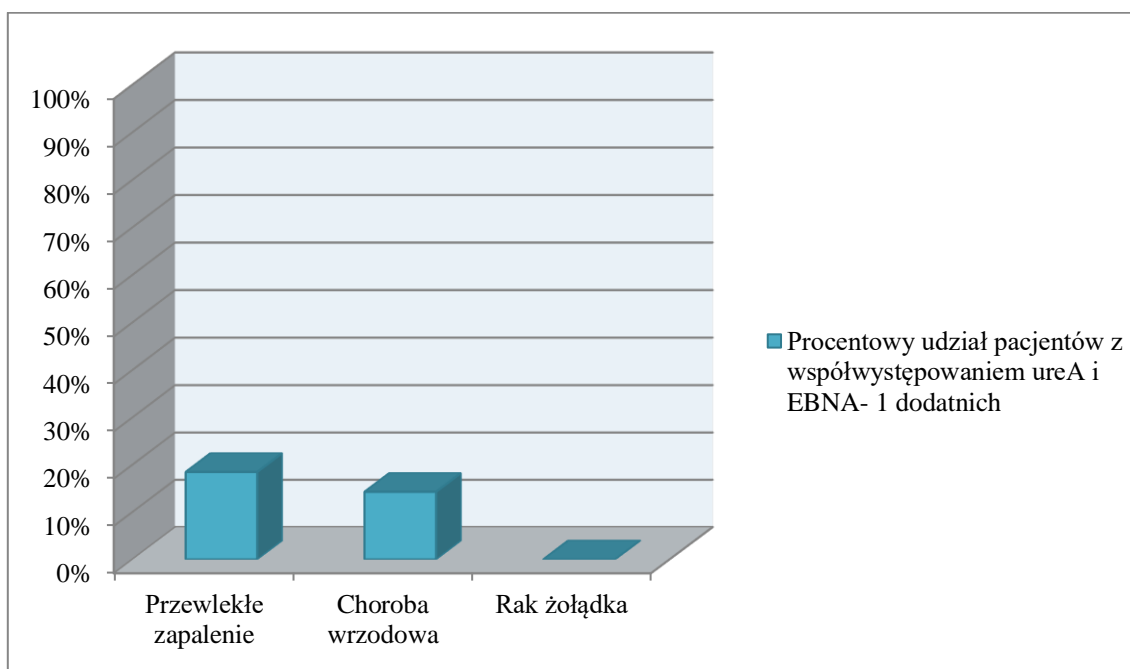
Tab. 11. Ocena częstości współwystępowania genu *ureA* i genu *EBNA-1* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Rozpoznanie	Liczba pacjentów <i>ureA</i> lub <i>EBNA-1</i> dodatnich	Liczba pacjentów <i>ureA</i> i <i>EBNA-1</i> dodatnich	$p = 0.4787$ <i>test Fishera-Freemanna-Haltona</i>
Przewlekłe zapalenie żołądka (GC)	27	5	GC vs. UD $p < 1$ GC vs. AC $p = 0.3057$ UD vs. AC $p = 0.4986$
Choroba wrzodowa żołądka (UD)	14	2	
Rak żołądka (AC)	11	0	

Analizując uzyskane wyniki stwierdzono, że wartości w obrębie poszczególnych grup GC vs. UD vs. AC nie różniły się istotnie statystycznie ($p = 0,4787$).



Ryc. 12. Współwystępowanie genu *ureA* i genu *EBNA-1* wśród badanych grup.



Ryc. 13. Procentowy udział współwystępowania genu *ureA* i genu *EBNA-1* wśród badanych grup.

4.5. Ocena lekowrażliwości *Helicobacter pylori*

Oznaczenie lekowrażliwości na amoksycylinę, lewofloksacyne, klarytromycynę, metronidazol oraz tetracyklinę wykonano u szczepów *H. pylori* wyizolowanych od 41 pacjentów (27 kobiet, 14 mężczyzn) w wieku $49 \pm 8,2$ lat. Wśród badanych u 21 pacjentów rozpoznano przewlekłe zapalenia żołądka, u 12 chorobę wrzodową żołądka, natomiast u 8 pacjentów raka żołądka. Wyniki lekowrażliwości badanych szczepów zaprezentowano w tabeli 12.

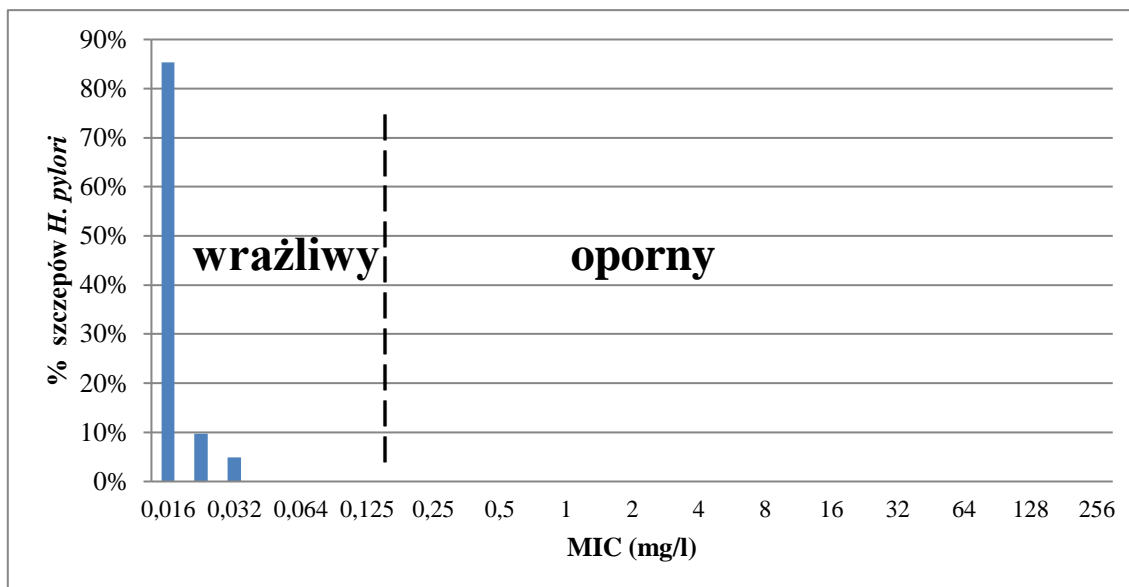
Tab. 12. Lekowrażliwość badanych szczepów *H. pylori*.

Lek	Szczepy wrażliwe liczba (%)	Szczepy odporne liczba (%)
AMC	41 (100%)	0 (0%)
LEV	35 (85%)	6 (15%)
CLR	27 (66%)	14 (34%)
MTZ	6 (15%)	35 (85%)
TC	35 (85%)	6 (15%)

AMC- amoksycylina, LEV- lewofloksacyna, CLR- klarytromycyna, MTZ- metronidazol, TC- tetracyklina

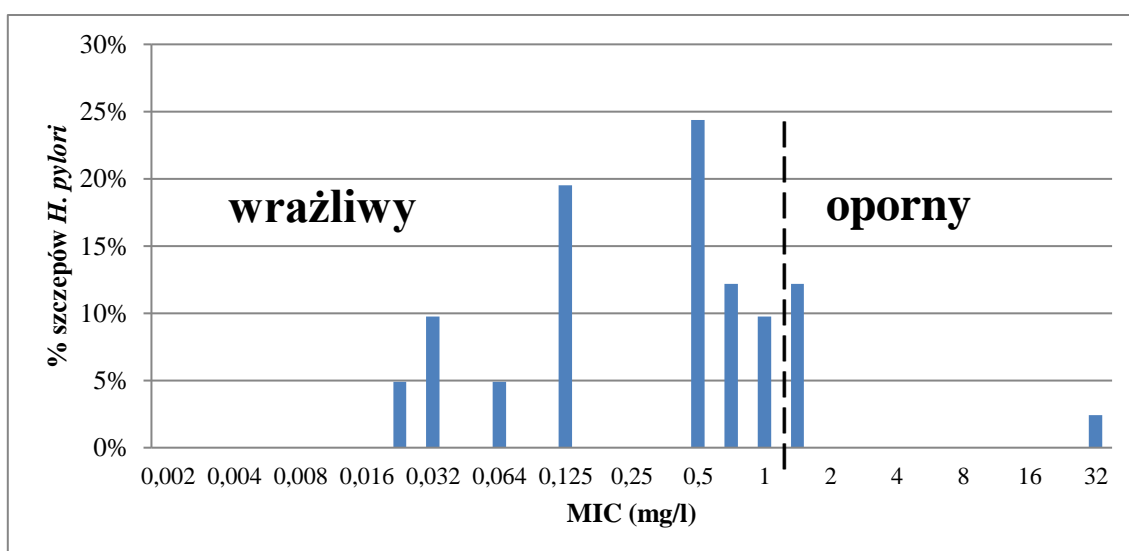
Na wykresach dla badanych szczepów *H. pylori* przedstawiono rozkład wartości MIC amoksycyliny, lewofloksacyny, klarytromycyny, metronidazolu i tetracykliny.

Spośród badanych szczepów wszystkie wykazywały wrażliwość na amoksycylinę. Dla 35 szczepów (85%) MIC amoksycyliny wynosił $\leq 0,016$ mg/l, natomiast dla pozostałych 6 szczepów wartości MIC były wyższe, w zakresie 0,023 do 0,032 mg/l (rycina 14).



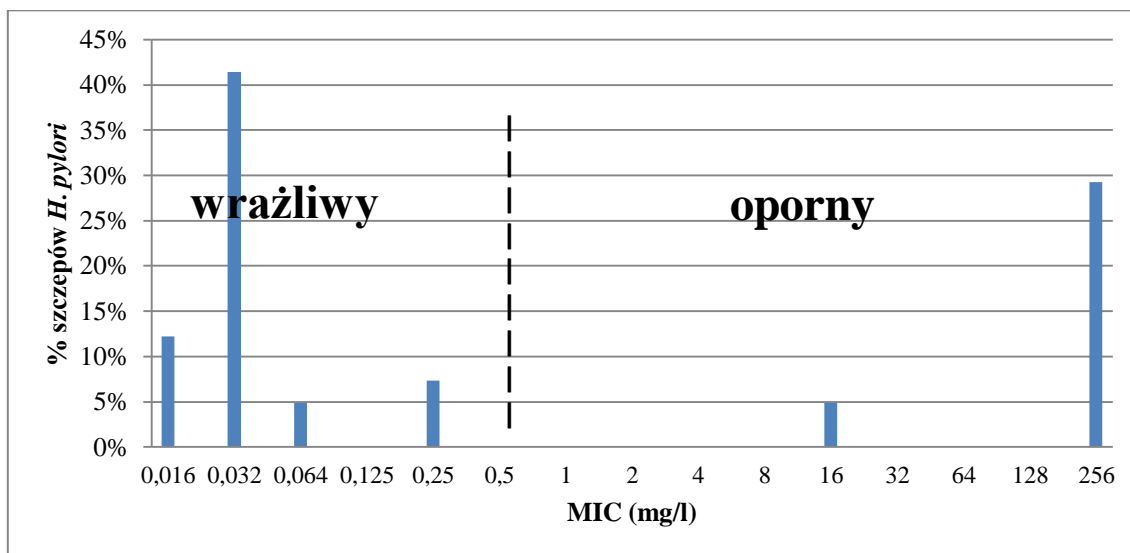
Ryc. 14. Aktywność amoksyliny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 0,125 mg/l dla szczepów opornych).

Wśród badanych szczepów 6 (14%) charakteryzowało się opornością na lewofloksacynę. Wartości MIC dla pięciu z tych szczepów wynosiły 1,5 mg/l, jednego >32 mg/l. Dla szczepów wrażliwych wartości MIC wynosiły najczęściej 0,125 i 0,5 mg/l, odpowiednio 20 i 24 % (rycina 15).



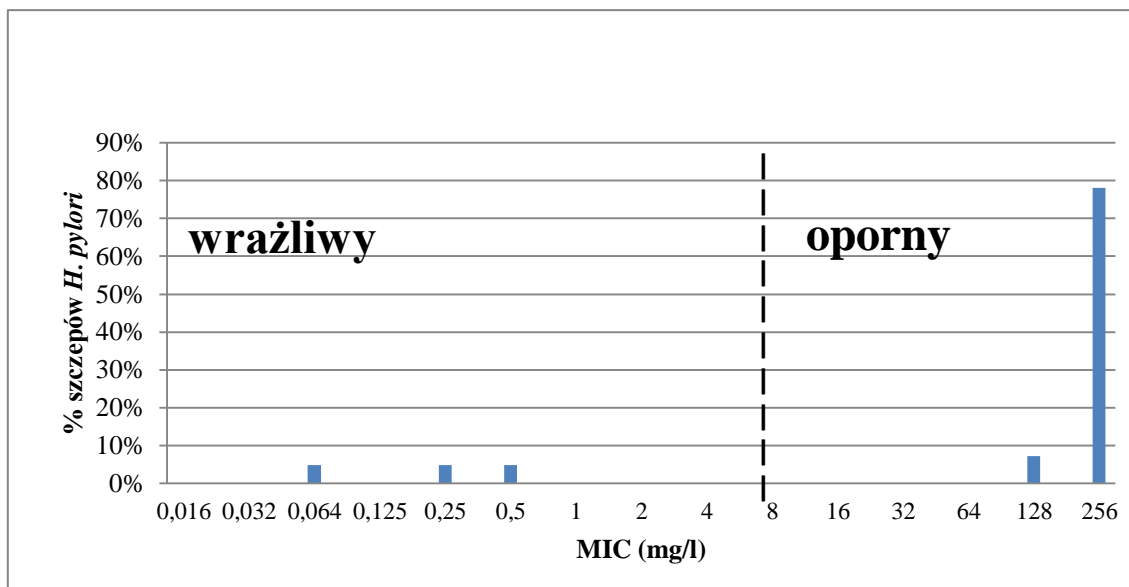
Ryc. 15. Aktywność lewofloksacyny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).

Oporność na klarytromycynę stwierdzono u 34% wyizolowanych szczepów. Dla większości z nich MIC wyniósł > 256 mg/l. Spośród szczepów wrażliwych dla większości wartość MIC wyniosła 0,032 mg/l (rycina 16).



Ryc. 16. Aktywność klarytromycyny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC $> 0,5$ mg/l dla szczepów opornych).

Szczepy odporne na metronidazol stanowiły 85%. Wartość MIC > 256 mg/l stwierdzono aż u 78% spośród badanych. Wykazano różnice w oporności w zależności od płci, wśród mężczyzn wykazano oporność u 71%, natomiast wśród kobiet u 93%. (rycina 17, tabela 13).



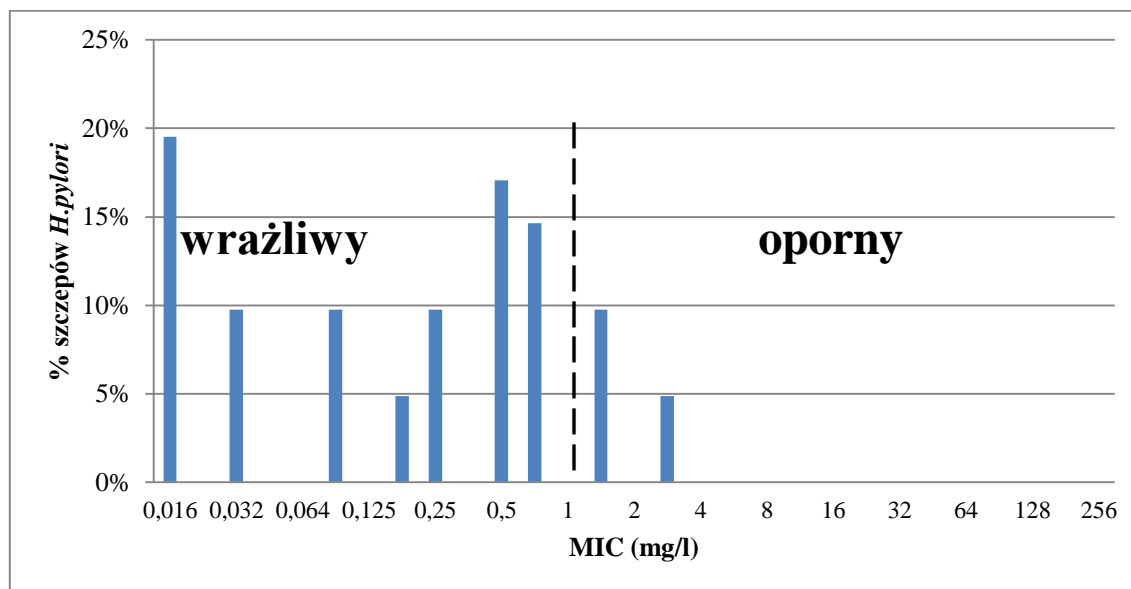
Ryc. 17. Aktywność metronidazolu względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 8 mg/l dla szczepów opornych).

Tab. 13. Zależność pomiędzy płcią, a częstością występowania oporności *H. pylori* na metronidazol.

	Grupa kobiet n=27 (%)	Grupa mężczyzn n=14 (%)	p*
Wrażliwość <i>H. pylori</i> na MTZ n= 6	2 (7%)	4 (29%)	> 0,05
Oporność <i>H. pylori</i> na MTZ n=35	25 (93%)	10 (71%)	> 0,05

Oporność szczepów *H. pylori* na klarytromycynę i metronidazol stwierdzono u 10 (24%) pacjentów.

Odsetek szczepów *H. pylori* opornych na tetracyklinę wyniósł 15%. U 4 pacjentów stwierdzono oporność przy wartości MIC 1,5 mg/l, dla pozostałych dwóch oporność MIC 3 mg/l. Dla szczepów wrażliwych wartości MIC były bardzo rozbieżne, od 0,016 mg/l do 0,75 mg/l (rycina 18).



Ryc. 18. Aktywność tetracykliny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).

Spośród wszystkich badanych pacjentów, u dwóch (5%) wyhodowane szczepy *H. pylori* charakteryzowały się wrażliwością na wszystkie badane antybiotyki.

V. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach, oceniono udział *Helicobacter pylori* i wirusa Epsteina-Barr w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka. Badania wykonywano u chorych, którzy zgłaszali się do gastroenterologa z objawami dyspepsji, bólów brzucha, wymiotów, zgagi, nudności oraz spadku masy ciała. Podczas gastroskopii pobierano od pacjentów po dwa wycinki z trzonu i antrum żołądka, niezbędne do dalszych badań klinicznych. Z bioptatów przygotowywano preparaty histopatologiczne i wykonywano badania mikrobiologiczne.

Zakażenie *Helicobacter pylori* i wirusem Epsteina-Barr bardzo często nabywane jest już w dzieciństwie. Oba patogeny działając synergistycznie przyczyniają się do zwiększenia zmian w błonie śluzowej żołądka. Wśród badanych pacjentów w przeprowadzonych przeze mnie badaniach u 46% zdiagnozowano przewlekłe zapalenie żołądka, u 23% chorobę wrzodową żołądka, a u 31% raka żołądka. Whitney i wsp. w swoich badaniach donoszą, że brak zmian w błonie śluzowej w obrazie endoskopowym, nie wyklucza występowania zmian patologicznych, które muszą zostać potwierdzone poprzez biopsję i ocenę histopatologiczną [160].

EBV odpowiedzialny jest za rozwój wielu nowotworów u ludzi, w tym również raków żołądka, które mają niejednokrotnie charakterystyczny obraz histopatologiczny. Obok nacieku nowotworu pojawia się naciek limfocytarny, dlatego raki te mogą być nazywane „*lymphoepithelioma-like carcinoma*” [40,141]. Nakamura i wsp. w badaniach nad rakami tego typu wykazali obecność wirusa EBV w ponad 80% przypadków. Badaniami objęli oni również pacjentów ze zdiagnozowanymi gruczolakorakami, w ich przypadku w 6-9% wykazano obecność wirusa [113]. Dokładny mechanizm działania karcinogennego wirusa EBV na błonę śluzową nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony. Przypuszcza się, że w limfatyczno-nabłonkowym raku żołądka dochodzi do rozsiewu komórek wirusa z nosogardzieli do żołądka [40,113,141]. W badaniach własnych wykazano obecność genu *EBNA-1* wirusa Epsteina-Barr u 20% pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka, u 13% z chorobą wrzodową, natomiast wśród chorych z rakiem żołądka u 15% pacjentów.

Uzyskane wyniki mogą wskazywać, że EBV jest prekursorem zmian zapalnych w błonie śluzowej żołądka, zarówno poprzez onkogeny wpływ na zainfekowane komórki oraz jako induktor stanu zapalnego. Badania własne są zgodne z danymi otrzymanymi przez Hoshikawe i wsp., którzy wykazali obecność DNA wirusa u 14% pacjentów z rakiem żołądka [67]. Dotychczas zaobserwowano regionalne różnice w częstości występowania raka żołądka związanego z wirusem Epsteina-Barr. Najwyższy odsetek stwierdzono w USA i Niemczech (16-18%), najniższy natomiast w Chinach (4,3%) [25,146]

Przypuszcza się, że mechanizmy wpływu EBV i *H. pylori* na błonę śluzową żołądka odbywają się poprzez indukcję odpowiedzi zapalnej, powodującej destrukcję błony śluzowej. W pracach kilku zespołów z ostatnich lat zaobserwowano również interakcję pomiędzy powyższymi patogenami. Aktywują wspólnie ważne szlaki sygnałowe, zwiększając przeżycie komórek i proliferację podczas transformacji nowotworowej. Cykl lityczny EBV oraz ekspresja białka Z, które odpowiedzialne jest za ekspresję regulatorów cyklu komórkowego, indukowane są przez kinazę białkową C, której znanym aktywatorem jest onkogenne białko CagA [19,93,142].

W przeprowadzonych badaniach gen *ureA H. pylori* stwierdzono u 70% chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka, u 80% z chorobą wrzodową i 40% chorych z rakiem żołądka. Doniesienia europejskie określają częstość występowania *H. pylori* od 15 do 86%. Różnice te mogą wynikać z kępkowego występowania bakterii w żołądku. Nierównomierne rozmieszczenie *H. pylori* jak również możliwość przybierania formy nieaktywnej (kępkowej) przez bakterie przyczyniają się do wskazanych różnic [157,161,165].

W tabeli 14 zaprezentowano wyniki badań kilku autorów na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat względem zakażeń *Helicobacter pylori* w populacji Polski wśród grup kontrolnych.

Tab. 14. Częstość występowania *H. pylori* wśród grup kontrolnych

L.p.	Liczba badanych	% zakażonych <i>Helicobacter pylori</i>	Wiek	Piśmiennictwo
1.	3307	84% (2784)	36±12,4	96
2.	40	18,4% (7)	33,8 ± 18,2	120
3.	298	16.4%(49)	13.3±3.3	30
4.	49	16.3%(8)	4-19	51
5.	30	67 % (20)	35-60	29
6.	79	38% (30)	45-67	123
7.	79	39.2% (31)	45-67	123
8.	100	39% (39)	40.9 ±9.2	91

Badania prowadzone przez Ostrowskiego i wsp. w 2016 r., gdzie wśród badanych przeprowadzono test serologiczny Diago-Hp (Diagnosis, Polska, który wykrywa specyficzne przeciwciała klasy IgG przeciwko antygenom *H. pylori* producent deklaruje czułości 96,2% i swoistości 100%. Zakażenie stwierdzono wśród 18,4 % badanych [120]. Łukasiewicz i wsp. w latach 2002-2003 poddali badaniom grupę 6565 osób wśród nich było 3307 dorosłych (50.37%) i 3258 dzieci. (49.63%). Metodą ELISA oznaczono poziomy przeciwciał IgG, wyniki dodatnie otrzymano u 3827 badanych (58.29%), w tym 1043 dzieci (32.01%) i 2784 dorosłych (84.19%). [96]. W roku 2003 w publikacji Chmiel wraz współautorami zaprezentowała grupę kontrolną złożoną z 30 badanych, wyniki dodanie oznaczanych poziomów IgG uzyskano u 67% (20 badanych) [29]. W latach 2010-2012 Chobot i wsp. poddali badaniom 298 osób w wieku 13.3±3.3, przy pomocy testu oddechowego wykazali zakażenie u 49 pacjentów (16.4%) [30]. Zbliżone wyniki w roku 2014 zaprezentował Drzymała i współ, stosując również test oddechowy wykazano 16.3% zakażonych w badanej grupie kontrolnej, która wynosiła 49 osób [51]. Prezentowane przez Palkę i wsp. badania w grupie kontrolnej składającej się z 79 badanych, wykazały wyniki dodatnie testu oddechowego u 38%, a metodą ELISA u 39.2 % [123]. Wyniki badań zaprezentowano w tabeli 15.

Tab. 15. Zestawienie pacjentów badanych z grupami kontrolnymi [29,30,51,91,96,120,123].

	Ogólna liczba pacjentów	Pacjenci zakażeni <i>Helicobacter pylori</i> (%)
Grupa kontrolna	3982	39.8
Przewlekłe zapalenie żołądka	30	70
Choroba wrzodowa żołądka	15	80
Rak żołądka	20	40

Ważnym markerem zjadliwości jest wyspa patogenności *cagA*, która zawiera m.in. gen *cagA*. Wśród chorych zakażonych *H. pylori*, posiadającym powyższy gen obserwuje się bardziej nasilone zmiany zapalne w obrębie błony śluzowej. Wyróżniamy szczepy typu I, które charakteryzują się wysoką wirulencją i odpowiedzialne są za wywoływanie choroby wrzodowej i raków żołądka: fenotyp CagA(+). Natomiast typ II o fenotypie CagA(-) obserwowany jest w przypadku bezobjawowych zakażeń i zapaleń błony śluzowej żołądka [8,47,148,163].

W przeprowadzonych badaniach występowanie genu *cagA* stwierdzono u 15 (71%) szczepów *Helicobacter pylori* wyizolowanych od chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka. W szczepach *H. pylori* od pacjentów z chorobą wrzodową stwierdzono gen *cagA* w 10 (83%) przypadkach, natomiast wśród szczepów od chorych z rakiem żołądka w 8 (100%) przypadkach.

Zgodnie z dobrze dziś udokumentowanym paradygmatem Correa (rycina 2) u pacjentów z infekcją *H. pylori* rozwój raka żołądka to proces wieloetapowy, który jest determinowany postępującym uszkodzeniem błony śluzowej żołądka. [33,106,108,110]. W sekwencji zdarzeń tego procesu, indukowanego przez *H. pylori*, krytycznym momentem jest przejście przewlekłego aktywnego zapalenia nieatroficznego w zapalenie atroficzne z metaplastyczną jelitową. Konsekwencją zmian metaplastycznych może być dysplazja prowadząca do rozwoju raka żołądka. Jednakże ten wieloetapowy proces jest powolny oraz związany z długoterminową obecnością patogenu. Dlatego ryzyko rozwoju raka żołądka wśród pacjentów zakażonych *H. pylori* w krajach Europy Zachodniej jest niskie i oceniane na poziomie 1-2%. Zasadnicze znaczenie w rozwoju

zmian chorobowych wywoływanych przez *H. pylori* odgrywają jego czynniki wirulencji, głównie CagA i VacA. Możliwe jest zatem, że aktywność genów odpowiedzialnych za kodowanie tychże toksyn warunkuje określoną chorobotwórczość [7,35,41,42,92].

Leczenie schorzeń żołądka i dwunastnicy związanych z zakażeniem *H. pylori* wymaga stosowania antybiotyków i chemioterapeutyków. Narastająca oporność bakterii wymusza konieczność określenia wrażliwości wyizolowanych szczepów na wykorzystywane w terapii leki.

Jednym z celów badań w prezentowanej pracy doktorskiej była ocena lekowrażliwości szczepów *H. pylori* względem antybiotyków i chemioterapeutyków, rekomendowanych w leczeniu zakażeń wywoływanych tym patogenem. Wyniki badań dotyczą populacji dorosłych.

Podstawowym antybiotykiem wykorzystywanym w terapii jest amoksycylina, wszystkie spośród badanych w pracy szczepów były wrażliwe na powyższy lek. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia europejskich badaczy, którzy dokumentowali wrażliwość szczepów *H. pylori* na amoksycylinę na poziomie 0,9% [117]. Jednakże w wielu krajach m.in. Korea Południowa, Brazylia notuje się bardzo wysoki odsetek szczepów opornych, odpowiednio wynoszący 18,5% i 38% [17,18,49, 60].

Odsetek opornych szczepów *H. pylori* względem klarytromycyny w niniejszej pracy wyniósł 34%. W ostatnich latach obserwuje się znaczący wzrost oporność na ten antybiotyk. W badaniach przeprowadzonych w zachodniej Polsce mających na celu porównanie lekowrażliwości *H. pylori* na przestrzeni ostatnich 15 lat, w latach 1998/1999 wykazano oporność u 22% szczepów, natomiast wyniki z lat 2013/2014 prezentują brak wrażliwości aż u 31% szczepów [80]. Megraud i wsp. oceniając wrażliwość szczepów *H. pylori* izolowanych od populacji europejskiej wykazał średnią wrażliwość na poziomie 17,5%, badania te prowadzone były w latach 2008-2009 [109]. Zaobserwowano w nich również wysokie dysproporcje pomiędzy poszczególnymi krajami europejskimi, najwyższą oporność wykazano w Grecji (42%), najniższą w Holandii - rzędu 6% [78,150].

Nowa generacja makrolidów w populacji dorosłych stosowana jest do leczenia zakażeń wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Mycoplasma* i *Chlamydia*, wzrastająca częstość tych infekcji, a co za tym idzie stosowanie makrolidów, również uznawane jest za przyczynę wzrastającej lekooporności wśród szczepów *H. pylori*. Również wśród dzieci obserwuje się wysoką oporność szczepów *H. pylori* na klarytromycynę. Wiąże się to z szerokim stosowaniem przez lekarzy pediatrów makrolidów w leczeniu schorzeń układu oddechowego [49,72,110]. Konsensus z Maastricht/Florencji V z 2017 roku, zaleca: zaniechanie terapii potrójnej z klarytromycyną, bez wcześniejszej oceny antybiogramu, jeżeli oporność wynosi 15-20%. Natomiast w krajach, w których oporność jest >20% w pierwszym rzucie leczenia należy zastosować terapię poczwórną z bizmutem lub sekwencyjną [102].

Lekiem od niedawna wykorzystywanym w terapii zakażeń *H. pylori* jest lewofloksacyna, która należy do III generacji fluorochinolonów. Uzyskane wyniki w niniejszej pracy wykazywały wrażliwość na lewofloksacynę u 85% badanych szczepów. W badaniach prowadzonych przez Nista i wsp. stosowanie lewofloksacyny w pierwszym rzucie terapii, wykazywało wysokie odsetki eradykacji [115]. Niemniej jednak w ostatnich latach obserwuje się tendencję do wzrostu oporności szczepów *H. pylori* na lewofloksacynę. Związane to może być z szerokim stosowaniem fluorochinolonów w leczeniu innych zakażeń [138,164]. W roku 2009 w Europie najwyższą oporność na lewofloksacynę Megraud i wsp. odnotowali w Belgii (27%), Węgrzech i Portugalii, odpowiednio 27% i 26%. W Polsce odsetek ten wyniósł 9% [110].

W badaniach przeprowadzonych w Holandii wykazano oporność u 4,7% szczepów *H. pylori* na trowafloksacynę, zanim lek ten został wprowadzony na rynek. Wskazuje to na oporność krzyżową między antybiotykami z tej grupy [44].

U 85% badanych szczepów *H. pylori* wykazano oporność na metronidazol, aż 78% szczepów wykazywało MIC >256 mg/l. W ostatnich latach zaobserwowano drastyczny wzrost oporności na metronidazol [80]. Boyanova i wsp. wykazali, że w krajach rozwijających oporność wynosiła 50-80% [17]. W latach 2000-2010 oporność na metronidazol w krajach europejskich wahała się 20-43,8% [128,131].

Gerrits podaje jako przyczynę wysokiej oporności szczepów *H. pylori* na metronidazol wykorzystanie tego leku nie tylko w celu eradykacji zakażeń przewodu pokarmowego. Mianowicie stosowany jest w ginekologii, stomatologii, jak również do leczenia zakażeń pasożytniczych [57]. W badaniach populacji Alaski stwierdzono wyższy odsetek oporność na metronidazol wśród kobiet [23,106]. Jako przyczynę oporności po wcześniejszych terapiach z zastosowaniem metronidazolu Owen i wsp. podają selekcję szczepów *in vivo*, która następuje podczas leczenia [121].

Jednakże w badaniach udowodniono, że oporność na metronidazol nie jest głównym czynnikiem niepowodzeń w terapii, rolę tę przypisuje się oporności na klarytromycynę. W prowadzonej metaanalizie Fischbach i Evans wykazali, że zmniejszenie skuteczności eradykacji *H. pylori* do 66% w przypadku oporności na klarytromycynę, przy oporności na metronidazol o 14%. Badania te dotyczyły terapii trójlekowej stosowanej w pierwszym rzucie [53]. Megraud również podaje, że czynnikiem istotnie obniżającym wskaźnik skutecznej eradykacji jest oporność na oba powyższe antybiotyki [111]. W zaistniałej sytuacji europejskie wytyczne sugerują przedłużenie terapii pierwszego rzutu do 14 dni [100,150]. W przeprowadzonych przez mnie badaniach oporność na oba antybiotyki wykazano u 10 szczepów, co stanowi 24% badanych szczepów.

Kolejnym lekiem wykorzystywanym w leczeniu zakażeń *H. pylori* jest tetracyklina. W przeprowadzonych badaniach uzyskano oporność u 6 (15%) szczepów *H. pylori*. Do interpretacji wartości MIC stosowano kryteria EUCAST, jeżeli zastosowałoby kryteria CLSI żaden z otrzymanych szczepów nie wykazywałby oporności. To właśnie może być różnicą pomiędzy danymi uzyskanymi przez Mégraud, które prezentują w Europie bardzo niską oporność szczepów *H. pylori* na tetracyklinę lub jej całkowity brak, względem których zastosowano kryteria CLSI [107,109].

Skuteczność eradykacji uzależniona jest od właściwego doboru antybiotyków, przestrzegania przez pacjentów zaleceń lekarza, dotyczących dawki leku i czasu ich stosowania. Badania prowadzone przez Barona i wsp. we Włoszech uzasadniały stosowanie w leczeniu terapii sekwencyjnej, ponieważ sukces terapeutyczny osiągnięto na poziomie 91% pacjentów [11]. Podobne wyniki w Polsce badając populację dzieci otrzymali Albrecht i wsp. – 87 % wyleczonych pacjentów [1]. Duże nadzieje wiąże się również z wprowadzeniem szczepionki przeciwko *H. pylori*. Podjęto już pierwsze

próby immunizacji wśród ludzi, otrzymane efekty wypadły korzystnie. Działania niepożądane miejscowe oraz uogólnione po podanych iniekcjach były łagodne. Poddawano rekombinowaną szczepionkę zawierającą antygeny CagA, VacA i NAP (ang. *nukleoid associated proteins*). W 86% przypadków zaobserwowano wzrost badanych przeciwciał w klasie IgG. Niezbędne są jednak kolejne badania kliniczne [48,99,117]. Nie należy również zapominać o właściwej profilaktyce zakażeń.

VI. WNIOSKI

1. U chorych z rakiem żołądka występowanie genu *ureA H. pylori* jest istotnie częstsze niż u pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka lub chorobą wrzodową.
2. U większości pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka, chorobą wrzodową i rakiem żołądka występuje gen *cagA H. pylori*.
3. Częstość występowania genu *EBNA-1* wirusa EBV u pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka, chorobą wrzodową i rakiem żołądka nie różni się istotnie pomiędzy grupami.
4. Wysoka oporność badanych szczepów *Helicobacter pylori* na metronidazol (85%) i klarytromycynę (34%) skłania do zastąpienia leczenia empirycznego leczeniem celowanym.

VII. STRESZCZENIE

Wstęp

Helicobacter pylori został sklasyfikowany jako karcynogen grupy I, zakażenie tym patogenem dotyczy powyżej 50% populacji. Wśród licznych badań wykazano, że *H.pylori* na skutek indukcji odpowiedzi immunologicznej w wyniku uwalniania cytokin prozapalnych prowadzi do transformacji nowotworowej. Onkogenny potencjał stwierdzono również w przypadku wirusa Epsteina-Barr, w etiopatogenezie raka żołądka biorą udział białka wirusa m.in. EBNA-1, LMP-1, odpowiedzialne za hamowanie apoptozy i aktywację ekspresji onkogenów.

Cel pracy

Ocena częstości występowania *Helicobacter pylori* i wirusa Epsteina-Barr w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka. Analiza wybranych czynników zjadliwości *Helicobacter pylori* oraz charakterystyka wzoru wrażliwości izolowanych szczepów *Helicobacter pylori*.

Materiały i metody

Badaniami objęto grupę 65 osób, obojga płci, którzy zgłaszali się do Katedry i Kliniki Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób Wewnętrznych UMP. Pobrane podczas gastroskopii wycinki z trzonu i antrum żołądka, zostały wykorzystane do przygotowania preparatów histologicznych na podstawie oceny, których zgodnie z klasyfikacją Sydney postawiono rozpoznania kliniczne. Stwierdzono: 30 (46%) przypadków przewlekłego zapalenia żołądka (grupa 1), 15 przypadków (23%) choroby wrzodowej żołądka (grupa 2) oraz 20 (31%) przypadków raka żołądka (grupa 3). Grupa 1 obejmowała 30 chorych: 13 kobiet i 17 mężczyzn w wieku 24-76 lat. Grupa 2 obejmowała 15 chorych: 8 kobiet i 7 mężczyzn w wieku 55-78 lat. Grupa 3 obejmowała 20 chorych: 12 kobiet i 8 mężczyzn w wieku 48-68 lat. Z pobranych bioptatów zakładano hodowlę na podłożu Columbia agar z 7% krwią baranią, wyhodowane kolonie identyfikowano przy pomocy testu urazowego oraz barwienia metodą Grama, jak również wykonywano oznaczanie lekowrażliwości przy pomocy metody E-test. Równocześnie z bioptatów izolowano materiał genetyczny służący do badań genetycznych techniką PCR: oznaczanie genu *ureA*, genu *cagA* i genu *EBNA-1* wirusa EBV.

Wyniki

Spośród 30 chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka gen *ureA* stwierdzono u 21 (70%) osób, w grupie 15 pacjentów z chorobą wrzodową gen ten wykryto u 12 (80%), natomiast wśród chorych z rakiem żołądka u 8 (40%) pacjentów. Występowanie genu *cagA* stwierdzono u 15 (71%) szczepów *Helicobacter pylori* wyizolowanych od chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka. W szczepach *H. pylori* od pacjentów z chorobą wrzodową gen *cagA* stwierdzono w 10 (83%) przypadkach, natomiast wśród szczepów od chorych z rakiem żołądka w 8 (100%) przypadkach. W grupie 30 badanych pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka częstość występowania genu wirusa Epsteina-Barr stwierdzono u 6 (20%), spośród 15 pacjentów z chorobą wrzodową DNA wirusa wykryto u 2 (13%) osób, natomiast wśród chorych z rakiem żołądka u 3 (15%) pacjentów.

Współwystępowanie genu *ureA* i genu *EBNA-1* u pacjentów z przewlekłym zapaleniem stwierdzono u 5 z nich spośród 27 badanych, co stanowiło 18,5%. Natomiast w grupie chorych z chorobą wrzodową u 2 badanych spośród 14 chorych stwierdzono występowanie obu czynników, co stanowiło 14,3%. W grupie pacjentów z rakiem żołądka u żadnego z badanych nie stwierdzono współwystępowania obu czynników etiologicznych. Wszystkie szczepy *H.pylori* wykazywały wrażliwość na amoksyycylinę, 85% badanych szczepów charakteryzowało się wrażliwością na lewofloksacynę i tetracyklinę. Odnotowano wysoki stopień oporności na metronidazol-85% i klarytromycynę- 34% wśród badanych szczepów. Oporność szczepów *H. pylori* na oba antybiotyki: klarytromycynę i metronidazol stwierdzono u 10 (24%) pacjentów. U dwóch pacjentów (5%) wyhodowane szczepy *H. pylori* charakteryzowały się wrażliwością na wszystkie badane antybiotyki.

Wnioski

U chorych z rakiem żołądka występowanie genu *ureA* *H. pylori* jest istotnie częstsze niż u pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka lub chorobą wrzodową. U większości pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka, chorobą wrzodową i rakiem żołądka występuje gen *cagA* *H. pylori*. Częstość występowania genu *EBNA-1* wirusa EBV u pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka, chorobą wrzodową i rakiem żołądka nie różni się istotnie pomiędzy grupami. Wysoka oporność badanych

szczepów *Helicobacter pylori* na metronidazol (85%) i klarytromycynę (34%) skłania do zastąpienia leczenia empirycznego leczeniem celowanym.

VIII. SUMMARY

The evaluation of the role of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus (EBV) in chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer – a microbiological case study.

INTRODUCTION

Helicobacter pylori has been classified as group 1 carcinogen. The infection with this pathogen affects more than 50% of the population. Numerous studies have demonstrated that *H. pylori* leads to neoplastic transformation resulting from the induction of an immune response as a consequence of the release of proinflammatory cytokines. Epstein-Barr virus was also identified to have the oncogenic potential. Viral proteins, such as EBNA-2 and LMP-1, which are responsible for inhibiting apoptosis and activating the expression of oncogenes, are involved in the etiopathogenesis of gastric cancer.

AIM OF THE STUDY

To evaluate of Epstein-Barr virus and *Helicobacter pylori* in chronic gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. The assessment of the selected *Helicobacter pylori* virulence factors and the sensitivity pattern of isolated *Helicobacter pylori* strains.

MATERIAL AND METHODS

The research involved a group of 65 people, of both sexes, who reported to the University and Clinical Department of Gastroenterology, Human Nutrition and Internal Medicine of the Karol Marcinkowski Medical University in Poznan. The gastroscopy specimens collected from the body and antrum were used to prepare histological preparations, the assessment of which was the basis for making clinical diagnosis according to the Sydney classification. The results were as follows: 30 (46%) cases of chronic gastritis (group 1), 15 (23%) cases of gastric ulcer (group 2) and 20 (31%) cases of gastric cancer (group 3). Group 1 included 30 patients: 13 women and 17 men aged 24-76 years old. Group 2 included 15 patients: 8 women and 7 men aged 55-78 years old. Group 3 included 20 patients: 12 women and 8 men aged 48-68 years old. The biopsy specimens were cultured on Columbia agar with 7% sheep blood; the resultant

colonies were identified by the urease test and Gram staining; drug resistance testing was also performed using the E-test method. At the same time, the genetic material for PCR testing was isolated from the biopsy specimens in order to determine *ureA* gene, *cagA* gene and EBV virus DNA.

RESULTS

Among 30 patients with chronic gastritis, *ureA* gene was detected in 21 (70%) individuals, among 15 patients with peptic ulcer disease, the gene was identified in 12 (80%) people, whereas among patients with gastric cancer it was found in 8 (40%) cases. The *cagA* gene was detected in 15 (71%) *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with chronic gastritis. The *cagA* gene was found in 10 (83%) patients with peptic ulcer disease and in 8 (100%) patients with gastric cancer. In the group of 30 patients with chronic gastritis, the incidence of Epstein-Barr virus was 6 (20%), among 15 patients with peptic ulcer, the virus DNA was detected in 2 (13%) persons, while in patients with gastric cancer in 3 (15%) individuals.

The *ureA* gene coexisted with the EBV virus in 5 out of 27 patients with chronic gastritis, which was 18.5%. However, in the group of patients with peptic ulcer disease, both factors were detected in 2 out of the 14 patients, which was 14.3%. In the group of patients with gastric cancer, the coexistence of both etiological factors was not reported. All *H. pylori* strains were susceptible to amoxicillin, 85% of the strains were sensitive to levofloxacin and tetracycline. The strains were highly resistant to metronidazole-85% and clarithromycin-34%. The resistance of *H. pylori* strains to both antibiotics: clarithromycin and metronidazole was demonstrated in 10 (24%) patients. In two patients (5%), the *H. pylori* strains were sensitive to all antibiotics tested.

CONCLUSION

In patients with stomach cancer occurrence of *H. pylori ureA* gene is significantly more frequent than in patients with chronic gastritis or peptic ulcer. In most patients with chronic gastritis, peptic ulcer and stomach cancer *H. pylori cagA* gene is occurrence.

Frequency of occurrence of EBV virus EBNA-1 gene in patients with chronic gastritis, peptic ulcer disease and stomach cancer does not differ significantly between groups. High metronidazole (85%) and clarithromycin (34%) resistance of examined strains of *Helicobacter pylori* suggests replacement of empiric treatment with targeted treatment.

IX. PIŚMIENICTWO

1. Albrecht P., Kotowska M., Szajewska H.: Sequential therapy compared with standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in children: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Pediatr.* 2011;159(1):45-9.
2. Al-Ghoul L., Wessler S., Hundertmark T., Krüger S. et al. Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322(3):860-866.
3. Allen M.D., Young L.S., Dawson C.W. The Epstein-Barr virus-encoded LMP2A and LMP2B proteins promote epithelial cell spreading and motility. *J. Virol.* 2005; 79:1789–1802.
4. Alm R.A., Ling L.S., Moir D.T., King B.L. et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 1999; 397(6715): 176-180.
5. Altmann M., Pich D., Ruiss R., Wang J., Sugden B., Hammer-Schmidt W.: Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2006;103: 14188–14193.
6. Amieva M.R., Vogelmann R., Covacci A., Tompkins L.S. et al. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science.* 2003; 300(5624):1430-1434. and systemic diseases. *Gut.* 2002; 50: 273-283.
7. Argent R.H., Thomas R.J., Letley D.P., Rittig M.G. et al. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *J Med Microbiol.* 2008; 57(2):145-150.
8. Atherton J.C., Peek R.M., Tham K.T., Cover L.T., Blaser M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin genes of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997;112:92-99.
9. Avilés-Jiménez F., Reyes-Leon A., Nieto-Patlán E., Hansen L.M. et al. In vivo expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in patients with gastritis, ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun.* 2012; 80(2):594-601.
10. Bago J., Halle Z.B., Strinić D. et al. The impact of primary antibiotic resistance on the efficacy of ranitidine bismuth citrate- vs. omeprazole-based one-week triple therapies in *H. pylori* eradication—a randomised controlled trial. *Wien Klin Wochenschr.* 2002; 114: 448–53.

11. Baron E.J., Miller J., Weinstein M, i wsp.: A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clin Infect Dis* 2013;57:e22-e121.
12. Bartnik W., Celińska-Cedro D., Dzieniszewski J., Łaszewicz W. et al. Wytyczne Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii dotyczące diagnostyki i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori*. *Med. Prakt.* 2014; 5: 46–60.
13. Beer M.H., Berkow R. *The Merc Manual, Podręcznik Diagnostyki i Terapii*. Urban & Partner, Wrocław 2001: 2755-2759.
14. Bielański W. Diagnostyka zakażeń *Helicobacter pylori*. *Medycyna po dyplomie*. 2006; 6: 44–49.
15. Bienias J., Krzemień S., Mazurek U. Charakterystyka wirusa Epsteina Barr – aspekty epidemiologiczne, biomolekularne i transplantologiczne. *Postępy Mikrobiol.* 2007; 46: 153–165.
16. Bocian J., Januszkiewicz-Lewandowska D. Zakażenia EBV – cykl życiowy, metody diagnostyki, chorobotwórczość. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2011;65:286-298.
17. Boyanova L., Gergova G., Nikolov R., Davidkov L. et al.. Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 60(4):409-415.
18. Boyanova L., Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(1):59-70.
19. Brandt S., Wessler S., Hartig R., Backert S. *Helicobacter pylori* activates protein kinase C delta to control Raf in MAP kinase signalling: role in AGS epithelial cell scattering and elongation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009;66:874–892.
20. Brenner D. J., Krieg N.R., Staley J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Second Edition, Springer 2005, USA.
21. Brown L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000; 22(2): 283-297.

22. Bruce M.G., Bruden D.L., McMahon B.J. et al. Alaska sentinel surveillance for antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Alaska native persons, 1999-2003. *Helicobacter*. 2006; 11: 581–588.
23. Bruce M.G., Maaroos H.I. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2008; 13(1): 1-6.
24. Bukanov N.O., Berg D.E. Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol Microbiol*. 1994; 11(3): 509-523.
25. Camargo M.C., Murphy G., Koriyama C., Pfeiffer R.M. et al. Determinants of Epstein–Barr virus–positive gastric cancer: An international pooled analysis. *Br. J.Cancer*. 2011;105:38–43.
26. Carbone A., Gloghini A., Dotti P. EBV-associated lymphoproliferative disorders classification and treatment. *Onkologist*. 2008; 13: 577-585.
27. Censini S., Lange C., Xiang Z. et al. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996; 93: 14648-14653.
28. Chan K., Ng M.H., Seto W.H., Peiris J.S.M. Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in Sera of Patients with Primary EBV Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(11): 4152-4154.
29. Chmiela M., Kowalewicz-Kulbat M., Miszczak A., et.al. A link between *Helicobacter pylori* and/or *Chlamydia* spp. infections and atherosclerosis. *Pathogens and disease*. 2003;36(3):187-192.
30. Chobot A., Bąk-Drabik K., Skała-Zamorowska E. et. Al. *Helicobacter pylori* Infection in Type 1 Diabetes Children and Adolescents Using 13C Urea Breath Test. *Polish Journal of Microbiology*. 2014; 63(1): 63–67.
31. Coffin W.F., Erickson K.D., Hoedt-Miller M., Martin J.M. The cytoplasmic amino-terminus of the latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxyterminus and transmembrane domain. *Oncogene*. 2001;20:5313–5330.
32. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000; 343: 481–492.
33. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*. 1992; 52(24):6735-6740.

34. Cover T.L. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 1996;20: 241-246.
35. Cover T.L., Blanke S.R. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nat Rev Microbiol. 2005; 3(4):320-332.
36. Cover T.L., Glupczynski Y., Lage A.P., Burette A. et al. Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. J Clin Microbiol. 1995;33(6): 1496-1500.
37. Crabtree J.E., Taylor J.D., Wyatt J.I., Heatley R.V. et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. Lancet. 1991; 338(8763):332-335.
38. Crawford D.H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. Philos. Trans. 2001;356;461-473.
39. Cutler A.F., Havstad S., Ma C.K. et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. 1995; 109: 136-141.
40. Czopek J., Stojak M., Sinczak A., Popiela T. et al. EBV- positive gastric carcinomas in Poland. Pol J Pathol. 2003; 54(2) : 121-126.
41. De Bernard M., Cappon A., Del Giudice G., Rappuoli R., Montecucco C. The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Int J Med Microbiol. 2004; 293: 589-597.
42. De Bernard M., Josenhans C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2014; 19(1)1:11-18.
43. De Schryver A., Van Winckel M., Cornelis K., Moens G., Devlies G. et al *Helicobacter pylori* infection: further evidence for the role of feco-oral transmission. Helicobacter .2006; 11(6): 523-528.
44. Debets-Ossenkopp Y.J., Herscheid A.J., Pot R.G., Kuipers E.J. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. J Antimicrob Chemother. 1999; 43: 511–518.
45. Di Mario F., Cavallaro L.G., Scarpignato C. ‘Rescue’ therapies for the management of *Helicobacter pylori* infection. Dig Dis. 2006; 24: 113-130.
46. Dobrzańska J. Sawczuk-Chabin J. Warzocha K. Rola wirusów w etiopatogenezie chłoniaków nieziarnicznych. Onkologia w Praktyce Klinicznej. 2006;2:65-72.
47. Dumm D.E., Cohen H., Blaser M.J. *Helicobacter pylori*. Clin. Microbiol. Rev. 1997;10:720-741.

48. Bartnik W., Celińska-Cedro D., Dzieńiszewski J. et al. Wytyczne Polskiego towarzystwa gastroenterologii dotyczące diagnostyki i leczenia zakażenia *Helicobacter pylori*. *Gastroenterologia praktyczna*. 2014;2:33-41.
49. Dzierżanowska D. *Antybiotykoterapia praktyczna*. α-Medica Press, Bielsko-Biała, 2008.
50. Dzierżanowska-Fangrat K., Rożynek E., Celińska-Cedro D. i wsp.: Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicenter study. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26:230–234.
51. Drzymała S., Stawińska-Witoszyńska B., Mądry E. et al., The fecal test vs. the urea breath test S. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2014; 18: 2343-2348.
52. El-Etr S.H., Mueller A., Tompkins L.S., Falkow S., Merrell D.S. Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *J. Infect. Dis.* 2004;190:1516–1523.
53. Fischbach L., Evans E.L. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 26: 343-57.
54. Fock K.M., Talley N., Moayyedi P. et al. Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 23: 351–365.
55. Fox J.G. The non-H. pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal
56. Fuccio L., Minardi M.E., Zagari R.M. et al. Meta-analysis: duration of first-line proton-pump inhibitor based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Ann. Intern. Med.* 2007; 147: 553–562.
57. Gerrits M.M., van der Wouden E.J., Bax D.A., van Zwet A.A. et al. Role of the rdxA and frxA genes in oxygen-dependent metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 2004; 53(11): 1123-1128.
58. Gocki J., Bartuzi Z., Dziedziczko A. Geny cytotoksyczności *Helicobacter pylori*. *Annales*.2003; 17(2):65-70.
59. Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K. Analiza czynników wirulencji *Helicobacter pylori* w świetle genomiki. *Post Mikrobiol* 2003; 42(2):115-137.
60. Godoy A.P., Ribeiro M.L., Benvenuto Y.H. et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Gastroenterol* 2003; 3: 20-28.

61. Goldman K.J., Cockburn M. The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemiology*. 2001; 12(2): 266-271.
62. Gorzer I., Niesters H.G., Cornelissen J.J., Puchhammer—Stockl E. Characterization of Epstein-Barr virus Type 1 variants based on linked polymorphism among EBNA-3A,-3B, and -3C genes. *Virus Res*. 2006;118:105–114.
63. Hardie D.R.: Human γ -herpesviruses: A review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus. Apher. Sci*. 2010;42:177–183.
64. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2005; 96(12):835-843.
65. Heslop E.H.: How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*. 2009;114:4002–4008.
66. Hess R.D. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. *J. Clin. Microbiol*. 2004; 42: 3381–3387.
67. Hoshikawa Y., Satoh Y., Murakami M., Maeta M. et al. Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J Med Virol*. 2002; 66(3):351-359.
68. <http://www.ptg-e.org.pl/helico.php>
69. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, Coelho LGV, Fock M, Fedail S, Cohen H, Malfertheiner P, Vakil N, Hamid S, Goh KL, Wong BCY, Krabshuis J, Le MA: *Helicobacter Pylori* in Developing Countries. 2010, 1-15.
70. IARC: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1994; 61: 1-241.
71. Ishikawa S., Ohta T., Hatakeyama M. Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS Lett*. 2009; 583(14):2414-2418.
72. Iwańczak B., Laszewicz W., Iwańczak F., Dzierzanowska-Fangrat K. et al. Genotypic and clinical differences of seropositive *Helicobacter pylori* children and adults In the Polish population. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(6):801-807.
73. Jagusztyn-Krynicka E.K., Gajkowska A., Godlewska R. Czynniki wirulencji *Helicobacter pylori*. *Mikrobiol Med*. 1999; 3(20): 3-13.
74. Jagusztyn-Krynicka E.K., Godlewska R., Łaniewski P. *Helicobacter pylori*-patogen roku 2005. *Kosmos* 2005; 54(4): 307-319
75. Jang B.G., Kim W.H. Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology*. 2011; 78(6):302-310.

76. Jenson H.B. Epstein-Barr virus. Nelson textbook of pediatrics. 2004;1062-1066.
77. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. Helicobacter. 2004; 9 (2): 115-123.
78. Karamanolis G., Daikos G.L., Xouris D., Goukos D. et al. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Greece. Digestion. 2014; 90: 229-231.
79. Karita M., Blaser M.J. Acid-tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between cagA+ and cagA- strains. J Infect Dis. 1998; 178(1):213-219.
80. Karpiński T.M., Andrzejewska E., Eder P., Linke K., Szkaradkiewicz A. Evaluation of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* In the last 15 years In West Europe. Acta Microbiol. Et Immun. 2015; 62(3):81-87.
81. Klein G., Klein E., Kashuba E.: Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human B-lymphocytes. Biochem. Biophys. 2010;396:67–73.
82. Kodama M., Murakami K., Nishizono A., Fujioka T. Animal models for the study of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma. J Infect Chemother. 2004; 10(6):316-325.
83. Kokkola A., Sipponen P., Rautelin et al. The effects of *Helicobacter pylori* eradication on the natural course of atrophic gastritis with dysplasia. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16: 515-520.
84. Kolts B.E., Joseph B., Achem S.R. et al. *Helicobacter pylori* detection: a quality and cost analysis. Am. J. Gastroenterol. 1993; 88 (5): 650-655.
85. Konturek J.W. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. J. Physiol. Pharmacol. 2003; 54(3):23-41.
86. Konturek P.C., Kania J., Konturek J.W., Nikiforuk A. et al. *H. pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR gamma and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. Med Sci Monit. 2003; 9(7):53-66.
87. Konturek S.J. Laureaci Nagrody Nobla z fizjologii i medycyny w roku 2005: Barry J. Marshall i Robin J. Warren. Med Dypl. 2005; 14(11): 1-6
88. Konturek S.J., Konturek P.C., Konturek J.W., Plonka M. et al. *Helicobacter pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. J Physiol Pharmacol.2006; 57(3):29-50.
89. Konturek S.J., Śliwowski Z. Rola *Helicobacter pylori* w patogenezie zapalenia żołądka i wrzodu trawiennego. Med Dypl. 2006;13:11-17.

90. Kurashima Y., Murata-Kamiya N., Kikuchi K., Higashi H. Deregulation of beta- -catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA multimerization sequence. *Int. J. Cancer*. 2008;122:823–831.
91. Kowalski M., Konturek P., Pieniazek P., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease and effect of its eradication on coronary lumen reduction after percutaneous coronary angioplasty. *Dig Liver Dis*. 2001; 33(3):222-229.
92. Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(3):449-490.
93. Lee H.H., Chang S.S., Lin S.J., Chua H.H. et al. Essential role of PKCdelta in histone deacetylase inhibitor-induced Epstein-Barr virus reactivation in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Gen Virol*. 2008;89:878–883.
94. Lisby G. Application of nucleic acid amplification to clinical microbiology. *Mol. Biotechnol*. 1999;12:75–99.
95. Lu H.S., Saito Y., Umeda M., Murata-Kamiya N. et al. Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci*. 2008;99:2004–2011.
96. Łaszewicz W., Iwańczak F., Iwańczak B. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Polish children and adults depending on socioeconomic status and living conditions. *Advances in Medical Sciences*. 2014;59:1:147-150.
97. Ma J.L., Zhang L., Brown L.M. et al. Fifteen-year effects of *Helicobacter pylori*, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *J. Natl. Cancer Inst*. 2012; 104: 488–492.
98. Makola D., Peura D.A., Crowe S.E. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol*. 2007; 41(6):548-558.
99. Malfertheiner P. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology*. 2008; 135: 787-795.
100. Malfertheiner P., Bornschein J., Selgrad M.: Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: a chance for prevention. *J. Dig. Dis*. 2010;11:2–11.
101. Malfertheiner P., Megraud F., O' Morain C.A. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017; 66: 6–30.

102. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C..A. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*. 2012; 61: 646–664.
103. Malfertheiner P., Sipponen P., Naumann M., Moayyedi P. et al. *H. pylori*-Gastric Cancer Task Force. *Helicobacter pylori* eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100(9):2100-2115.
104. Marshall B. *Helicobacter pylori*: past, present and future. *Keio J. Med.*2003; 52: 80–85.
105. Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983; 4(1):1273-1275.
106. McMahon B.J, Hennessy T.W, Bensler J.M, et al. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med*. 2003; 139: 463–469.
107. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing *Gut*. 2004;53(9): 1374–1384.
108. Mégraud F., Bessède E., Varon C. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21(11):984-990.
109. Megraud F., Coenen S., Versporten A. et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013; 62: 34–42.
110. Megraud F., Coenen S., Vesporten A., Lopez-Brea M. et al. Study group participants *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013; 62(1):34-42.
111. Mégraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(2):280-322.
112. Murray P.G., Young L.S.: The role of the Epstein-Barr virus in human disease. *Front. Biosci*. 2002;7: 519–540.
113. Nakamura S., Ueki T., Yao T. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by the polymerase chain reaction and in situ hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis. *Cancer*. 1994; 73: 2239-2249.

114. Narumi Y., Isomoto H., Shiota M., Sato K. et al. Polymorphisms of PTPN11 coding SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J. Clin. Immunol.* 2009;29: 303–310.
115. Nista E.C., Candelli M., Zocco M.A., Cremonini F. et al. Levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101(9): 1985-1990.
116. Nurgalieva Z.Z., Graham D.Y. Pearls and pitfalls of assessing *Helicobacter pylori* status. *Dig. Liver Dis.* 2003;35:375–377.
117. O’Conor A., Gisbert J.P., McNamara D. et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2010. *Helicobacter.* 2010; 15(1):46-52.
118. Ohnishi N., Yuasa H., Tanaka S., Sawa H. et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008;105:1003–1008.
119. Oliveira D.E., Ballon G., Cesarman E.: NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol.* 2010;18:248–257.
120. Ostrowski B., Budzyńska A., Janczewska A., et al. Zapadalność i czynniki ryzyka infekcji *Helicobacter pylori* wśród krewnych pacjentów zakażonych. *Pediatr Med Rodz.* 2017; 13 (3):377–383.
121. Owen R.J., Bell G.D., Desai M., Moreno M. et al. Biotype and molecular fingerprints of metronidazole resistant strains of *Helicobacter pylori* from antral gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 1993;38:6.
122. Papini E., Zoratti M., Cover T.L. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *Toxicin.* 2001; 39:1757-1767.
123. Palka M., Tomasik T., Windak A., et al. The reliability of ELISA in predicting *H. pylori* infection in dyspeptic populations under age 45. *Med Sci Monit* 2010; 16(1):24-28.
124. Parsonnet J. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut.* 1998; 43(1):6-9.
125. Parsonnet J., Friedman G.D., Orentreich N., Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1997; 40(3): 297-301.
126. Paschale M., Clerici P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. *World J Virol.* 2012; 1(1): 31-43.
127. Peek R.M., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(1):28-37.

128. Peng N.J., Lai K.H., Liu R.S., Lee S. et al. Capsule 13c-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *World J. gastroenterol.* 2005;11:1361–1364.
129. Perez-Perez G.I., Rothenbacher D., Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2004; 9(1): 1-6.
130. Piecyk-Sidor M., Polz-Dacewicz M.A. Rola wirusa Epsteina-Barr w chorobach oczu. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2005; 59: 602–607.
131. Pilotto A., Rassa M., Leandro G., Franceschi M., Di Mario F. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicentre study. *GISU. Interdisciplinary Group for the Study of Ulcer. Dig Liver Dis.* 2000; 32:763–768.
132. Rahman H.Z.S., Gedevischvili A., Bungo M.W., Vijaya-Kumar V. et al. Non-invasive diagnosis of *H. pylori* infection: evaluation of serological tests with and without current infection marker CIM. *World J. gastroenterol.* 2008;14:1231–1236.
133. Rechsteiner M.P., Bernasconi M., Berger C., Nadal D.: Role of latent membrane protein 2 isoforms in Epstein-Barr virus latency. *Trends Microbiol.* 2008;16:520–527.
134. Ricci C., Hollton J., Voira D.: *Diagnosis of Helicobacter pylori: Invasive and non-invasive tests.* *Best Res.Clin. Gastroenterol.* 2007;21(2):299-313.
135. Rieder G., Merchant J.L., Haas R. *Helicobacter pylori* cag- -type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 2005;128:1229–1242.
136. Roszkowiak B., Niemir Z. Udział wirusa Epsteina-Barr w patogenezie toczenia rumieniowatego układowego i chorób nerek. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalne.* 2004; 58: 390-397.
137. Ryan J.L., Shen Y., Morgan D.R., Leigh B. et al. Epstein-Barr Virus Infection is Common in Inflamed Gastrointestinal Mucosa. *Dig Dis Sci.* 2012;57:1887-1898.
138. Saracino I.M., Zullo A., Holton J. et al. High prevalence of primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Italy. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2012; 21: 363–365.
139. Shair K.H.Y., Bendt K.M., Edwards R.H., Bedford E.C. et al. EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFκB, and Stat3 in B cell Lymphomas. *PLoS. Pathog.* 2007;3:1669–1683.

140. Sheikh I., Waghray A., Waghray N. et al. Consumer use of over-the-counter proton pump inhibitors in patients with gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2014; 109:789.
141. Shibata D., Tokunaga M., Uemura Y. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol.* 1991;139:469-474.
142. Shibata W., Hirata Y., Maeda S., Ogura K. et al. CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J. Pathol.* 2006;210:306–314.
143. Stenstrom B., Mendis A., Marshall B. *Helicobacter pylori*: The latest in diagnosis and treatment. *austral. Family phys.* 2008;37:8, 609–612.
144. Swaminathan S. Noncoding RNAs produced by oncogenic human herpesviruses. *J. Cell. Physiol.* 2008; 216: 321–326.
145. Szajewska H., Horvath A., Piwowarczyk A.: Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010; 32: 1069–1079.
146. Takada K. Epstein–Barr virus and gastric carcinoma. *Mol. Pathol.* 2000;53:255–261.
147. Talley N.J., Vakil N. Guidelines for the management of dyspepsia. *Am. J. Gastroenterol.* 2005;100:2324–2337.
148. Tegtmeyer N., Wessler S., Backert S. Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J.* 2011; 278(8):1190-1202.
149. Thompson S.K., Doerr T.D., Hengerer A.S. Infectious Mononucleosis and Corticosteroids Management Practices and Outcomes. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2005;131:900-904.
150. Thung I., Aramin H., Vavinskaya V. et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2016;43(4):514–533.
151. Timothy L., Cover, Uma S. Krishna, Dawn A. Israel and Richard M. Peek, JR. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *H. pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Research –Abstracts* : Cover et al. 63(5):951-959.

152. Tiwawech D., Srivatanakul P., Karalak A., Ishida T. Association between EBNA2 and LMP1 subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais. *J. Clin. Virol.* 2008;42:1–6.
153. Torres J., Camorlinga-Ponce M., Pérez-Pérez G. et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2677–2680.
154. Torres V.J., Ivie S.E., McClain M.S., Cover T.L. Functional properties of the p33 and p55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem.* 2005; 280(22): 21107-21114.
155. Tsang Y.H., Lamb A., Romero-Gallo J., Huang B. et al. *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* 2010; 29(41):5643-5650.
156. Urban J. *Helicobacter pylori*– charakterystyka i patogenność. *Dent. Med. Probl.* 2010;47(4):482–486.
157. Viala J., Chaput C., Boneca I.G., Cardona A. et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 2004; 5(11):1166-1174.
158. Watanabe T., Tada M., Nagai H., Sasaki S., Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology.* 1998; 115(3):642-648.
159. Wessler S., Backert S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends Microbiol.* 2008; 16(8):397-405.
160. Whitney A., Guarner J., Hutwagner L., Gold B. *Helicobacter pylori* Gastritis in Children and Adults: Comparative Histopathologic Study. *Ann Diagn Pathol.* 2000;4: 279-285.
161. Winter J.A., Letley D.P., Cook K.W., Rhead J.L. et al. A role for the vacuolating cytotoxin, VacA, in colonization and *Helicobacter pylori*-induced metaplasia in the stomach. *J Infect Dis.* 2014; 210(6):954-963.
162. Xia H.H., Wong B.C. Nitric oxide in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and its significance in gastric carcinogenesis. *J.Gastroenterol. Hepatol.*2003;18:1227-1230.
163. Xiang Z., Censini S., Bayeli P.T. et al. Analysis of expression CagA and VacA virulence factors in 49 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* 1995; 63 (1): 94-98.

164. Zhang Y., Zhou L., Song Z., Zhang J-Z. et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with dyspeptic symptoms in Beijing: a prospective serial study. *World J Gastroenterol.* 2015; 21: 2786–2792.
165. Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into account its resistance to antibiotics. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(3): 123-141.
166. Żuk-Wasek A. Charakterystyka białek wirusa Epsteina-Barr- ich udział w zakażeniu latentnym. *Post. Mikrobiol.* 2012;51(3):191–201.

X. WYKAZ TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

TABELE

Tab. 1. Leczenie zakażeń *H. pylori*- terapia potrójna.

Tab. 2. Leczenie zakażeń *H. pylori* - terapia poczwórna.

Tab. 3. Leczenie zakażeń *H. pylori* - terapia sekwencyjna.

Tab. 4. Wartości graniczne antybiotyków/chemioterapeutyków wg EUCAST dla *H. pylori*.

Tab. 5. Warunki amplifikacji wykrywania genu *ureA* .

Tab. 6. Warunki amplifikacji wykrywania genu *cagA* .

Tab. 7. Warunki amplifikacji wykrywania genu *EBNA-1*.

Tab. 8. Ocena częstości występowania genu *ureA* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Tab. 9. Ocena częstości występowania genu *cagA* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Tab. 10. Ocena częstości występowania genu *EBNA-1* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Tab. 11. Ocena częstości współwystępowania genu *ureA* i genu *EBNA-1* w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka.

Tab. 12. Lekowrażliwość badanych szczepów *H. pylori*.

Tab. 13. Zależność pomiędzy płcią, a częstością występowania oporności *H. pylori* na metronidazol.

Tab. 14. Częstość występowania *H. pylori* wśród grup kontrolnych

Tab. 15. Zestawienie pacjentów badanych z grupami kontrolnymi

RYCINY

Ryc. 1. Polimorfizm genu *vacA* oraz budowa białka *VacA*

Ryc. 2. Następstwa zakażenia *Helicobacter pylori*

Ryc. 3. Etiologia występowania wrzodów żołądka i dwunastnicy.

Ryc. 4. A- budowa wirusa Epsteina-Barr, B- schemat budowy genomu wirusa Epsteina-Barr

Ryc. 5. Wzór karty informacyjnej dla pacjentów

Ryc. 6. Ilościowy udział występowania genu *ureA* wśród badanych grup.

Ryc. 7. Procentowy udział występowania genu *ureA* wśród badanych grup.

Ryc. 8. Ilościowy udział obecności genu *cagA* wśród badanych grup.

Ryc. 9. Procentowy udział obecności genu *cagA* wśród badanych grup.

Ryc. 10. Ilościowy udział występowania genu *EBNA-1* wśród badanych grup.

Ryc. 11. Procentowy udział występowania genu *EBNA-1* wśród badanych grup.

Ryc. 12. Współwystępowanie genu *ureA* i genu *EBNA-1* wśród badanych grup.

Ryc. 13. Procentowy udział współwystępowania genu *ureA* i genu *EBNA-1* wśród badanych grup.

Ryc. 14. Aktywność amoksycyliny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 0,125 mg/l dla szczepów opornych).

Ryc. 15. Aktywność lewofloksacyny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).

Ryc. 16. Aktywność klarytromycyny względem badanych szczepów *H.pylori* wyrażona w MIC (MIC > 0,5 mg/l dla szczepów opornych).

Ryc. 17. Aktywność metronidazolu względem badanych szczepów *H.pylori* wyrażona w MIC (MIC > 8 mg/l dla szczepów opornych).

Ryc. 18. Aktywność tetracykliny względem badanych szczepów *H. pylori* wyrażona w MIC (MIC > 1 mg/l dla szczepów opornych).

FOTOGRAFIE

Fot. 1. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka - *Gastritis chronica activa* (barwienie H+E, pow. 40x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego.

Fot. 2. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka - *Gastritis chronica activa* (barwienie H+E, pow. 100x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego.

Fot. 3. Przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka - *Gastritis chronica activa* (barwienie metodą Giemsy pow. 200x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego.

Fot. 4. Rak żołądka – *Adenocarcinoma tubulare G1* (barwienie H+E, pow. 200x). Za zezwoleniem prof. dr hab. Przemysława Majewskiego.

Fot. 5. Wzrost *H. pylori* na podłożu Columbia agar 7% z dodatkiem antybiotyków.

Fot. 6. Ocena wrażliwości za pomocą E-testu szczepu *H. pylori* nr 19 na klarytromycynę, MIC >256 mg/l.

Fot. 7. Ocena wrażliwości za pomocą E-testu szczepu *H. pylori* nr 19 na tetracyklinę, MIC = 0,5 mg/l.

Fot. 8. Ocena wrażliwości za pomocą E-testu szczepu *H. pylori* nr 19 na metronidazol, MIC >256 mg/l.

XI. ZAŁĄCZNIK



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701 Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 499/15

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. 2008 Nr 45, poz. 271 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 161, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 184, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 listopada 2010 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Człowiekiem Ludzi.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 06 maja 2015 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

Miejsce prowadzenia badań:

**Katedra i Klinika Gastroenterologii, Żywienia Człowieka i Chorób
Wewnętrznych oraz Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
UM w Poznaniu**

Główny badacz: mgr Kamila Malinowska

**Członkowie zespołu
badawczego:**

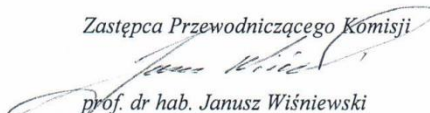
**prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz
dr hab. Tomasz Karpiński**

Temat badań:

„Ocena udziału *Helicobacter pylori* oraz wirusa Epsteina- Barr (EBV) w przewlekłym zapaleniu, chorobie wrzodowej i w raku żołądka- studium mikrobiologiczne”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Zastępca Przewodniczącego Komisji


prof. dr hab. Janusz Wiśniewski

MISJA BIOETYCZNA
 przy
 UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
 im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
 61-701 Poznań, ul. Fredry 10
 tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
 fax (+48 61) 854 61 03

SKŁAD OSOBOWY KOMISJI BIOETYCZNEJ

z dnia06.05.2015r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UM, ZOZ MSWiA ul. Dojazd 34, Poznań
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, Poznań
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Okręgowa Izba Radców Prawnych w Poznaniu, ul. Chwaliszewo 69, Poznań
5.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UM ul. Grunwaldzka 55, Poznań
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, Poznań
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UM, ul. Polna 33, Poznań
8.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Zakład Patologii Nowotworów UM ul. Garbary 15, Poznań
9.	prof. dr hab. n. med. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych UM, ul. Przybyszewskiego 49, Poznań
10.	prof. dr hab. Wojciech Szużewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UM ul. Szpitalna 27/33, Poznań
11.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UM, ul. Polna 33, 60-535 Poznań
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UM, ul. Szamarzewskiego 82/84, Poznań
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UM; ul. Szpitalna 27/33, Poznań
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, Poznań
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Klinika Intensywnej Terapii Kardiologicznej i Chorób Wewnętrznych UM ul. Przybyszewskiego 49, Poznań