Detekcija gena virulencije otoka patogenosti cag i gena dupA izolata Helicobacter pylori nakon višestruke neuspjele eradikacijske terapije

Varda Brkić, Dijana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:768796

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dijana Varda Brkić

Detekcija gena virulencije otoka patogenosti *cag* i gena *dupA* izolata *Helicobacter pylori* nakon višestruke neuspjele eradikacijske terapije

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Dijana Varda Brkić

Detekcija gena virulencije otoka patogenosti *cag* i gena *dupA* izolata *Helicobacter pylori* nakon višestruke neuspjele eradikacijske terapije

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb i u suradnji s Odjelom gastroenterologije i hepatologije i Kliničkim zavodom za patologiju i citologiju KB Merkur.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Vanda Plečko

Zahvaljujem svim djelatnicima i kolegama Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi disertacije.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Branki Bedenić na strpljivoj i stručnoj pomoći u ključnim trenucima.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr. sc. Miroslavi Katičić na nesebičnoj pomoći, pozitivnoj energiji, utrošenom vremenu i pravim smjernicama u izradi ove disertacije.

I na kraju, hvala mojoj obitelji, suprugu i sinovima, te roditeljima, na bezgraničnom strpljenju i podršci tijekom višegodišnjeg rada na disertaciji.

Rad posvećujem njima.

1. UVOD 1
1.1. Povijesni pregled 1
1.2. Epidemiologija *Helicobacter pylori* infekcije 2
1. 2.1. Prevalencija *Helicobacter pylori* infekcije 2
1.2.2. Rizični čimbenici za stjecanje *Helicobacter pylori* infekcije 4
1.2.3. Prijenos *Helicobacter pylori* infekcije 5
1.3. Povezanost *Helicobacter pylori* s gastroduodenalnim bolestima 6
1.3.1. Akutna bolest 6
1.3.1.1. Akutni gastritis 6
1.3.2. Kronična infekcija 6
1.3.2.1. Kronični gastritis 6
1.3.2.2. Peptička ulkusna bolest 7
1.3.2.3. Neulkusna dispepsija 8
1.3.2.4. *Helicobacter pylori* u usnoj šupljini 8
1.3.2.5. Gastroezofagealna refluksna bolest (GERB) 8
1.3.2.6. Karcinom želuca 9
1.3.2.7. MALT limfom 9
1.4. Povezanost *Helicobacter pylori* s ekstragastrointestinalnim bolestima 11
1.5. Mikrobiološke značajke *Helicobacter pylori* 12
1.5.1. Morfologija 12
1.5.2. Čimbenici virulencije 12
1.5.2.1. Čimbenici kolonizacije 13
1.5.2.2. Čimbenici perzistencije 14
1.5.2.3. Čimbenici indukcije bolesti (geni virulencije) 15
1.5.3. Povezanost *cag*PAI i *dupA* gena 20

1.6. Eradikacija infekcije *Helicobacter pylori* 21
1.6.1. Uzroci neuspjeha eradikacije infekcije *H. pylori* 22
1.6.1.1. Otpornost (rezistencija) *H. pylori* na antibiotike 23
1.6.1.2. Lučenje želučane kiseline 23
1.6.1.3. Pridržavanje uputa o uzimanju lijekova-suradljivost 24
1.6.1.4. Čimbenici virulencije *H. pylori* 24
2. HIPOTEZE 29
3. CILJEVI 30
3.1. Osnovni cilj: 30
3.2. Specifični ciljevi: 30
4. MATERIJALI I METODE 31
4.1. Ispitanici i mjesto istraživanja 31
4.2. Uzorci 32
4.3. Metode istraživanja 33
4.3.1. Kliničke i patohistološke metode 33
4.3.2. Mikrobiološke metode 35
4.3.2.1. Konvencionalne mikrobiološke metode 35
4.3.2.2. Molekularne mikrobiološke metode 38
4.4. Kemikalije 45
4.5. Medicinski uređaji i pribor 48
4.6. Statistička analiza 49
5. REZULTATI 50
5.1. Opće značajke bolesnika 50
5.1.1. Bolesnici prema dobi i spolu 50
5.1.2. Bolesnici prema subjektivnim tegobama 51
5.1.3. Bolesnici prema endoskopski utvrđenim dijagnozama 52

5.1.4. Bolesnici prema patohistološkom nalazu sluznice želuca 53

5.2. Učestalost i karakteristike *cag*PAI u *Helicobacter pylori* izolatima 57

5.3. Karakteristike bolesnika prema tipu *cag*PAI 60

5.4. Endoskopske dijagnoze prema tipu *cag*PAI 61

5.5. Patohistološke promjene želučane sluznice prema tipu *cag*PAI 62

5.6. Učestalost *cag*PAI gena u *Helicobacter pylori* izolatima 64

5.7. Usporedba *cag*PAI gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice 73

5.8. Usporedba *cag*PAI gena s endoskopski utvrđenim dijagnozama 75

5.9. *DupA gen* u *Helicobacter pylori* izolatima 77

5.9.1. Učestalost *dupA* gena 77

5.9.2. Karakteristike bolesnika inficiranih s *dupA* pozitivnim ili *dupA* negativnim *H. pylori* 80

5.9.3. Povezanost *dupA* gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice 82

5.9.4. Pojedinačna usporedba gena *jhp0917* i *jhp0918* s patohistološkim promjenama želučane sluznice 84

5.10. Testiranje osjetljivosti na antimikrobna sredstva 86

5.11. Povezanost gena virulencije *cag*PAI i *dupA* s antimikrobnom osjetljivošću 92

5.12. Povezanost *cag*PAI statusa i *dupA* gena 94

6. RASPRAVA 95

7. ZAKLJUČCI 106

8. SAŽETAK 108

9. SUMMARY 110

10. POPIS LITERATURE 112

11. ŽIVOTOPIS 140

POPIS OZNAKA I KRATICA

H. pylori	*Helicobacter pylori*
DAG	Difuzni antralni gastritis
NSAID	Ne-steroidni protuupalni lijekovi
NUD	Neulkusna dispepsija
EUV	Erozije/ulkus želuca
EUD	Erozije/ulkus duodenuma
GERB	Gastroezofagealna refluksna bolest
MALT-limfom	limfno tkivo sluznice (*engl. „mucosa-associated-lymphoid-tissue*“)
Hop proteini	protein vanjske membrane (engl. Helicobacter-specific Outer membrane Proteins)
BabA protein	antigen krvne grupe (*engl.* Blood-group Antigen-binding Adhesin)
DSBs	dvostruki lomovi (*engl*. double-strand breaks)
OipA	protuupalni protein vanjske membrane (*engl*. Outer-membrane proinflammatory protein)
HspA	protein toplinskog šoka (*engl.* heat shock protein A)
SOD	superoksid-dismutaza
VacA	vakuolizirajući citotoksin A
*cag*PAI	citotoksični otok patogenosti (*engl.* cytotoxin-associated gene pathogenicity island-*cag*PAI)
TNF- α	tumor nekrozis faktor-alfa

T4SS	tip IV sekrecijskog sistema
ASPP2	apoptosis-stimulirajući protein
CagA gen	citotoksični gen A
	(*engl.* cytotoxin-associated gene A)
CagE gen	citotoksični gen E
	(*engl.* cytotoxin- associated gene E)
CagT gen	citotoksični gen T
	(*engl.* cytotoxin- associated gene T)
CagM gen	citotoksični gen M
	(*engl.* cytotoxin- associated gene M)
LEC	lijevi kraj cag-a
	(*engl.* left end of the cag)
DupA	gen marker duodenalne ulkusne bolesti
	(*engl.* duodenal ulcer promoting gene A)
IL-8	interleukin-8
EHSG	*engl.* The European Helicobacter Study Group
IPP	inhibitor protonske pumpe
TNF	tumor nekrozis faktor
EFG	Ezofagogastroduodenoskopija
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
E- test	Epsilometer test
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
	(*engl*. Deoxyribonucleic Acid)
PCR	lančana reakcija polimeraze
	(*engl.* Polymerase Chain Reaction; PCR)
CCUG	*engl*. Culture Collection University of Gothenburg
AZT	Azitromicin
CLR	Klaritromicin
MTZ	Metronidazol
AMX	Amoksicilin
LEV	Levofloksacin

EUCAST	*engl.* European Committe on Antimicrobial susceptibility testing
SD	standardna devijacija
AS	aritmetička sredina

1. UVOD

1.1. Povijesni pregled

Već od 17. stoljeća počelo se razmišljati o vanjskim činiteljima kao i činiteljima sa strane domaćina kao uzrocima želučanih bolesti. Početkom 19. stoljeća smatralo se da samo djelomično adaptirane bakterije mogu proći neoštećeno kroz želudac u crijeva. Također su se neke bakterijske vrste *(Sarcina ventriculi*) koristile kao indikator smanjenja aciditeta, ako su kolonizirale želudac bile su dijagnostički pokazatelj poremećaja (1).

Rappin izvještava da je 1881. zamijetio spiralne bakterije u želucu psa. Giulio Bizzozero 1893. opisuje *Helicobacter heilmannii*. Tri godine kasnije Salomon opisuje mikromorfologiju *H. heilmannii*, a neki opisi odgovaraju i *Helicobacter pylori (H. pylori*). Godine 1899. objavljen je prvi izvještaj o zavijenim bakterijama u želucu. Donges je objavio 1939. godine nalaz obdukcije od serije bolesnika u kojih je u 40% našao spiralne bakterije. Freedberg je 1940. objavio rad u kojem je opazio vezu između spiralnih bakterija i želučanog ulkusa. Palmer je 1954. izjavio da ti nalazi predstavljaju artefakte i slijedećih 20 godina su ova istraživanja bila zaboravljena (1,2).

Od kraja 19. stoljeća objavljeno je preko stotinu eksperimentalnih studija u kojima je ispitivana uzročna veza između bakterija i ulkusa želuca. Najčešće su istraživani *Streptococcus* i *Escherichia coli.*

Konjetzny je 1928. opisao vezu između gastritisa i ulkusa. Ivy, Grossman i Bachrach 1950-ih kritičkom analizom isključili su infektivnu etiologiju ulkusa. Doduše, ostavili su mogućnost da je „moguć vrlo specifičan infektivni uzročnik udružen s drugim činiteljima“(2).

Ipak, do 1982. godine kada je kultiviran *H. pylori* iz želuca, većina je istraživača pretpostavljala da je želudac sterilan, te ignorirala prethodna istraživanja (1-4). Nakon rada Marshalla i Warrena u kojem su izolirali *H. pylori*, tada nazvan *Campylobacter pyloridis*, ta ispunjavanja Kochovih postulata, započinje novo vrijeme u razumijevanju gastroduodenalne patologije, posebno gastritisa i peptičkog ulkusa (5-7).

Goodwin i sur. 1989. dokazali su da bakterija ne pripada rodu *Campylobacter,* te je nazvan *Helicobacter pylori* (8).

Nakon tih istraživanja interes za *H. pylori* raste, čime se upotpunjuju saznanja o činiteljima virulencije i značajkama domaćina. Također se dokazuje veza između MALT limfoma i *H. pylori* (9). Prva cjelokupna genska sekvenca *H. pylori* soja 26695 objavljena je 1997. godine (1).

Barry Marshall i Robin Warren 2005. godine dobili su za svoj rad Nobelovu nagradu.

1.2. Epidemiologija *Helicobacter pylori* infekcije

Epidemiologija *H. pylori* infekcije se promijenila u zadnjih desetak godina. U većini zemalja bilježi se pad prevalencije, a paralelno s tim bilježi se i pad peptičke bolesti i želučanog karcinoma (10). Kao posljedica toga vidljive su epidemiološke promjene i u drugim bolestima, kao što su gastroezofagealna refluksna bolest, alergije i astma (11).

1. 2.1. Prevalencija *Helicobacter pylori* infekcije

Prevalencija je odraz ravnoteže između učestalosti i trajanja infekcije u nekoj zajednici. Usko je povezana s razinom stjecanja, tj. s incidencijom, te razinom nestanka infekcije. U slučaju *H. pylori,* jednom unesena i prisutna infekcija traje godinama (desetljećima), a spontana eradikacija izuzetno je rijetka. Infekcija je utvrđena u svim dijelovima svijeta.

Postoji velika varijacija u prevalenciji *H. pylori* infekcije između različitih zemalja, ali i između različitih etničkih grupa, različitih dobnih skupina i socioekonomskog statusa.

U Europi, prevalencija *H. pylori* je niža u sjevernim zemljama u odnosu na južne i istočne.

Studija provedena 2013. u Nizozemskoj na 1550 krvnih darivatelja testiranjem antitjela na *H. pylori* izvjestila je o prevalenciji od 32%. Tako se seroprevalencija populacije rođene između 1935. i 1946. smanjila sa 48% na 16% u onih rođenih između 1977. i 1987. Na temelju tih podataka za očekivati je i daljnje smanjenje prevalencije u Nizozemskoj (12). Jedna druga

studija u Nizozemskoj provedena na 6500 trudnicama našla je 24% prevalencije u Nizozemskih žena, za razliku od 64% prevalencije u žena koje su rođene van Nizozemske (prva generacija imigranata). U ovoj studiji je etnička pripadnost bila strogi prediktor za *H. pylori* infekciju (13).

U kontrastu sa sjeverno Europskim zemljama visoka prevalencija bilježi se u Portugalu, 84.2% što ga svrstava u zemlje s najvećom prevalencijom u Europi uz Tursku, 82.5% (14,15). Prevalencija je bila manja u populaciji koja živi na jugu zemlje i u čijoj prehrani je zastupljeno više citrusnog voća. Vitamin C je učinkovit u prevenciji mnogih infekcija, pa autori sugeriraju da bi mogao imati i ulogu u *H. pylori* infekciji (15).

U sjevernoj Americi, kanadska studija prezentirala je 37.9% prevalenciju na temelju pozitivnog histološkog nalaza nakon gastroskopije 203 starosjedioca (16). Zadnja studija iz Meksika potvrdila je visoku prevalenciju *H. pylori* infekcije u Latinskoj Americi. Od 343 trudne žene iz ruralnog područja Meksika 52.2% bilo je seropozitivno (17).

U Aziji, zadnje publicirane studije pokazale su visoku prevalenciju, od 54%-76% (18-23). Jedino je jedna studija rađena u Saudijskoj Arabiji na zdravim pojedincima imala nisku prevalenciju od 28% (24).

U Koreji je rađena multicentrična studija na 10000 asimptomatskih pojedinaca, bez prethodne eradikacije *H. pylori* u anamnezi. Nađena je seroprevalencija od 54.4%, što je manje od rezultata prethodnih studija iz 1998. i 2005. Smanjenje je bilo signifikantno u svim ispitivanim grupama populacije i područjima zemlje (18).

U Kini, studija rađena na 5417 zdravih pojedinaca testiranih ureja izdisajnim testom našla je prevalenciju od 63.4% (19). Slične visoke vrijednosti nađene su u Indiji, Kazahstanu i Butanu. U Indiji, prevalencija infekcije varirala je od 58%-62% u osoba s dispeptičkim simptomima (20, 21). U Kazahstanu, među simptomatskim i asimptomatskim slučajevima, prevalencija je bila 76.5% (22). Slično prevalencija od 73.4% nađena je u Butanu, s tim da je bila manja u glavnom gradu u odnosu na ruralna područja, uglavnom povezano s sanitarnim uvjetima (23).

Iz Afrike, nove studije iz Maroka i Etiopije našle su prevalenciju *H. pylori* od 75.5% i 65.7%. Obje studije bilježe porast prevalencije s godinama (25,26). Studija iz Nigerije, histološkim testiranjem našla je 80% prevalenciju, a serološkim testiranjem 93.6% (27).

Nekoliko studija istraživalo je prevalenciju *H. pylori* kod djece. Tako je studija u Belgiji našla prosječnu prevalenciju od 11% , koja je varirala od 3.2% kod djece rođene od roditelja belgijanaca do 60% kod djece rođene od roditelja stranaca koji su došli iz zemalja s visokom *prevalencijom H. pylori* (28).

Bastos i sur. našli su visoku prevalenciju kod 13-godišnjaka iz Portugala, 66.2% (29). U Brazilu, u populaciji starosti 2-19 godina, studija Pacheco i sur. našla je prevalenciju od 41.1% (30). U Kini je zabilježena prevalencija *H. pylori* od 32.1%, a u Iranu 50.5% (31, 32).

Ranije provedena studija u Hrvatskoj na populaciji starosne dobi između 20-70 godina pokazala je da u tri regije (sjevernoj, središnjoj i južnoj) prosječna seroprevalencija infekcije iznosi 60.4%, s višom stopom seropozitiviteta u starijoj životnoj dobi. U sjevernim dijelovima Hrvatske seroprevalencija je skoro identična (58.4%), kao u središnjim dijelovima (59.5%). U južnim krajevima seroprevalencija iznosi oko 71.3% (33).

1.2.2. Rizični čimbenici za stjecanje *Helicobacter pylori* infekcije

Spol i dob ne povezuju se s povećanim rizikom od infekcije. Većina studija ne nalazi značajnu razliku *H. pylori* infekcije između muškaraca i žena u odrasloj dobi (12,21,23-26) kao ni kod djece (28,29,32). Nije nađena značajna povezanost između infekcije i starosne dobi u odraslih (13,15,17,21,22,24).

Nekoliko socioekonomskih faktora povezuje se s *H. pylori* infekcijom. Osobe s niskim socioekonomskim statusom i niskim obiteljskim dohotkom imaju veću vjerojatnost za stjecanje *H. pylori* infekcije (13,16). Mnoge studije dokazale su povezanost između stupnja obrazovanja i *H. pylori* infekcije. Izuzev, u dvije studije, osobe s nižim stupnjem obrazovanja imale su veći rizik za stjecanje *H. pylori* infekcije u odnosu na one s višim stupnjem obrazovanja (17,19). Ista povezanost bila je prisutna i kod roditelja djece koja su bila uključena u studije (28,29).

Nekoliko čimbenika povezanih sa stanovanjem povezuje se s povećanim rizikom za stjecanje *H. pylori* infekcije; život u ruralnim područjima (18,23,24), prenapučenim domaćinstvima (24,29), korištenje onečišćene vode za piće (15).

Od životnih navika, pušenje i konzumacija alkohola imaju proturječne rezultate. U većini studija ne povezuje ih se s *H. pylori* infekcijom (22,19,25), dok su neki autori izvjestili da redovito pušenje (15,24) i konzumiranje alkohola predstavlja rizični čimbenik (24). Suprotno, jedna studija navodi kako je redovita konzumacija alkohola zaštitni čimbenik za stjecanje *H. pylori* infekcije (15).

1.2.3. Prijenos *Helicobacter pylori* infekcije

Usprkos visoke incidencije *H. pylori* infekcije, rezervoar i put prijenosa *H. pylori* još uvijek su u potpunosti nejasni.

Trenutne studije govore u prilog tome da se infekcija najčešće prenosi od zaražene osobe na zdravu osobu, bilo oralno-oralnim, gastro-oralnim ili fekalno-oralnim prijenosom. Na gastro-oralni prijenos upućuje i znatno učestaliji prijenos među malom djecom koja često povraćaju, s djece na odrasle osobe. Često se opisuje prijenos s roditelja na djecu, između bliskih rođaka, osoba koje žive u istom kućanstvu (34, 35). Urita i sur. su potvrdili majka-djete prijenos, ali i baka-djete prijenos. Majke najčešće prenose infekciju na djete putem sline koristeći istu žlicu za isprobavanje dječje hrane (36).

Osim toga, mnogi autori sugeriraju da humana infekcija nastaje putem kontaminirane hrane (37,38). Tako je *H. pylori* izoliran iz vode za piće, slavina, stomatoloških sistema za ispranje (39), morske vode, hrane životinjskog porijekla, kao što su ovce i kravlje mlijeko (40-42).

1.3. Povezanost *Helicobacter pylori* s gastroduodenalnim bolestima

1.3.1. Akutna bolest

1.3.1.1. Akutni gastritis

Malo je istraživanja o akutnoj infekciji *H. pylori.* Histološki se u većine bolesnika nalazi neutrofilni gastritis. Simptomi dispepsije traju 1-4 dana. Akutna infekcija prelazi u kroničnu. U većine bolesnika infekcija ukoliko nije liječena traje doživotno (43).

1.3.2. Kronična infekcija

1.3.2.1. Kronični gastritis

Difuzni antralni gastritis (DAG), ograničen je na antrum i povezan je s ulkusom dvanaesnika. Ovaj tip gastritisa češći je u mlađoj životnoj dobi, i to u osoba s normalnom ili povišenom sekrecijom želučane kiseline.

Multifokalni akutni gastritis (MAG) pojavljuje se multifokalno uz angularnu incizuru te na granici antruma i korpusa. U početku je sluznica tog dijela infiltrirana polimorfonuklearnim upalnim stanicama, a u kasnijoj fazi razvojem intestinalne metaplazije i displazije, nastupa atrofija. Oba tipa pripadaju grupi kroničnih superficijalnih gastritisa, ali u određenom postotku, postoji tendencija njihove progresije u kronični atrofični gastritis (1-3% na godinu). Rezultat dugotrajne upale jest jedan od tri oblika kroničnih gastritisa: korpus-predominantni, antrum- predominantni, te difuzni, pangastritis (44). Porastom stupnja atrofije smanjuje se broj pozitivnih nalaza *H. pylori*, što je rezultat smanjenja aciditeta, čime uvjeti preživljavanja *H*. *pylori* postaju nepovoljni.

Infekcija *H. pylori* najvažnija je značajka posebne klasifikacije gastritisa iz 1990.- Sydneyskog sustava (45). Među kroničnim gastritisima Sydneyska podjela razlikuje gastritis antralne sluznice, gastritis sluznice korpusa i tzv. pangastritis- sluznice cijelog želuca. Revizija iz 1994., tzv. Houstonska klasifikacija uključila je u morfološku analizu želučane sluznice: etiološki uzrok gastritisa (dokaz *H.pylori*) u topografski točno određenim uzorcima

sluznice (antrum, korpus), tip (mono/polimorfonukleari) i količinu infiltrata (malo, oskudno, srednje obilno ili obilno upalnih stanica) (45).

1.3.2.2. Peptička ulkusna bolest

H. pylori infekcija znatno povećava rizik za razvoj peptične ulkusne bolesti (3-10 puta), bilo da se radi o želučanom ulkusu, bilo o ulkusu na dvanaesniku (46-49). Veza između *H. pylori* infekcije i peptičkog ulkusa najbolje se vidi iz učestalosti nalaza infekcije *H. pylori* među bolesnicima s peptičnim ulkusom (do 95% u bolesnika s ulkusom na dvanaesniku, do 85% u bolesnika s želučanim ulkusom), kao i činjenicom da liječenjem infekcije dolazi do značajne promjene tijeka bolesti s praktičnom eliminacijom rekurencije (50). Superficijalni antralni gastritis uzrokovan kolonizacijom *H. pylori* nakon početne prolazne hipoklorhidrije praćen je povećanom sekrecijom gastrina i posljedičnom hiperklorhidrijom. Dugotrajna hiperklorhidrija i povećana razina gastrina dovode do želučane metaplazije na sluznici dvanaesnika. Time ta sluznica postaje dostupna za naseljavanje s *H. pylori.* Ukoliko se isključe bolesnici koji su koristili nesteroidne upalne lijekove, prevalencija *H. pylori* u bolesnika s želučanim ulkusima je također visoka.

Neosporna je činjenica da samo jedan od šest inficiranih ima znakove peptičke ulkusne bolesti. Razlozi za ekspresiju klinički značajne bolesti samo u dijela inficiranih pojedinaca mogu biti genetske osobine domaćina, specifičnost prehrane, čimbenici okoliša, te genske varijacije u *H. pylori* sojeva.

Želučani ulkus je povezan s *H. pylori* infekcijom u 50-90% bolesnika. U bolesnika s želučanim ulkusom uz difuzni antralni gastritis može postojati i multifokalni antralni gastritis, te je uz antralnu sluznicu najčešće upalnim promjenama zahvaćena i sluznica korpusa.

Zadnjih godina se istražuje i odnos ne-steroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) i *H. pylori*. Neka istraživanja su dokazala da *H. pylori* povećava rizik krvarenja iz peptičkih ulkusa u bolesnika koji koriste NSAID (51), dok također postoje ispitivanja koja navode da *H. pylori* smanjuje rizik krvarenja (52) ili uopće ne utječu na pojavu krvarenja u tih bolesnika (53).

1.3.2.3. Neulkusna dispepsija

Neulkusna dispepsija (NUD) ili funkcionalna dispepsija heterogena je grupa bolesti karakterizirana učestalim, stalnim ili rekuretnim tegobama tipa bolova ili nelagode u gornjem trbuhu za koje se ne može definirati uzrok (47). Mogući mehanizmi kojima *H. pylori* uzrokuje dispeptičke simptome uključuju oštećenje želučanog motiliteta kao rezultat upalne reakcije i oslobađanja mnoštva iona, citokina, amina, kinina, prostanoida (49). Glad, lučenje želučane kiseline i želučani motilitet regulirani su s grelinom**,** specifično proizvedenim od želučanih endokrinih odjeljaka i upravo se pojačani intenzitet simptoma povezuje s povišenom razinom grelina u plazmi (49). Sodi i sur. u svojoj studiji nisu našli pozitivan učinak *H. pylori* eradikacije na simptome NUD-a (54).

1.3.2.4. *Helicobacter pylori* u usnoj šupljini

Istraživanja su potvrdila povezaost *H. pylori* sa nekim stomatološkim bolestima, kao što su peridontitis (55), karijes (56), halitoza (57), te upalne ili neoplastične promjene usne šupljine (58). U zadnje vrijeme se istražuje prisutnost kvasaca u usnoj šupljini i njihova moguća uloga kao izvora i rezervoara za *H. pylori.* Tako su Saniee i sur. svjetlosnim mikroskopom unutar vakuole u *Candida* kvascu uspjeli vidjeti vijabilne *H. pylori* (59). Ista grupa autora našla je tragove *H. pylori* gena u majčinim vaginalnim i oralnim kvascima, otkriće koje pruža dodatne elemente u prilog hipotezi o načinu prijenosa *H. pylori* prezentiranih ranijih godina (60,61).

1.3.2.5. Gastroezofagealna refluksna bolest (GERB)

Povezanost GERBA i *H. pylori* još uvijek su kontraverzne. Tako se u posljednjem desetljeću u razvijenim zemljama povećao broj oboljelih od GERB-a, a broj inficiranih s *H. pylori* se smanjio. Jedno od mogućih objašnjenja jest indirektni utjecaj *H. pylori* na učestalost GERB-a preko promjene u izlučivanju želučane kiseline. Infekcija s *H. pylori* u ranoj životnoj dobi uvjetuje razvoj kroničnog gastritisa korpusa želuca s posljedičnim smanjenjem izlučivanja želučane kiseline, a to potom smanjuje opasnost od

razvoja GERB-a u tih osoba, sugerirajući protektivnu ulogu u razvoju GERB-a (62). Neki nalaze objašnjenje u neuro-imunološkim mehanizmima kao odgovornima za protektivnu ulogu *H. pylori* (63). U isto vrijeme drugi autori ne nalaze povezanost infekcije *H. pylori* sa stupnjem izraženosti kliničke slike GERB-a (64,65).

1.3.2.6. Karcinom želuca

Unatoč znatnom padu incidencije i mortaliteta u zadnjih šest godina, želučani je karcinom i dalje na trećem mjestu svih uzroka smrti od malignih bolesti, nakon karcinoma pluća i jetre (66). Iako je *H. pylori* klasificiran kao karcinogen I. reda, cijeli niz studija nije uspio riješiti niz nepodudarnosti koje dovode u pitanje uzročno posljedičnu vezu između *H. pylori* i karcinoma želuca. Identificirano je više nepodudarnosti („enigmi“). Tako je veća incidencija želučanog karcinoma u muškaraca (2-3 puta viša) uz gotovo jednaku seroprevalenciju infekcije među spolovima (spolna enigma). Nadalje, visoka prevalencija infekcije *H. pylori* u nekim područjima niskog rizika od oboljevanja od želučanog karcinoma („mediteranska enigma“ ili „afrička enigma“). Bolesnici s ulkusnom bolešću dvanaesnika rijetko obole od karcinoma iako su u pravilu svi inficirani („enigma peptičkog ulkusa“). Ni razlike u prevalenciji infekcije u mlađoj životnoj dobi ne koreliraju s mortalitetom od želučanog karcinoma („enigma mlađe dobi“). Konačno, najmanje je jasna razlika razlika između ukupnog broja zaraženih i onih u kojih se razvije želučani karcinom (1-3% zaraženih).

Želučana karcinogeneza vrlo je složen proces, a infekcija *H. pylori* samo je jedan od rizičnih čimbenika (67).

1.3.2.7. MALT limfom

Stalna prenapregnutost imunosnog sustava uzrokovana kontinuiranom infekcijom *H. pylori* želučane sluznice, dovodi već pri gastritisu do opsežnog nagomilavanja limfoidnih stanica u lamini propriji želučane sluznice. Mogu se naći i limfatični folikuli. Ova uobičajena poliklonalna proliferacija može zbog niza razloga , a ponajprije pod utjecajem *H. pylori,* prijeći u monoklonalnu i

stvoriti preduvjete za razvoj niskomalignih, a vjerojatno i visokomalignih, B-staničnih MALT-limfoma (*engl.* „mucosa-associated-lymphoid-tissue“). Histološki, ovi su tumori građeni od nakupina limfocita B, što ih razlikuje od reaktivne infiltracije limfocitima u tijeku uobičajene upale, kada su prisutni pretežno limfociti T. Zbog bliskog odnosa epitelnih stanica sluznice i transformiranih leukocita, lezije koje nastaju nazvane su i limfoepitelnim lezijama (68).

Više od 90% navedenih limfoma etiopatogenetski su povezani s infekcijom *H. pylori.* Uglavnom su niskomaligni i različiti od limfoma u limfnim čvorovima. Istraživanja su potvrdila da infekcija prethodi nastanku limfoma. Pretpostavlja se da bakterija osigurava antigenski poticaj koji je, kako se čini, ključan za rast limfoma. Aktivacija limfatičnog tkiva u želucu može se tako dovesti u vezu s neuobičajenim odgovorom na upalu uzrokovanu *H. pylori*, a neadekvatan imunološki odgovor u nekih je bolesnika samo korak do klonalne proliferacije. Posrednici su ovog odgovora intramuralni limfociti T. Pokazalo se da neoplastični limfociti B niskomalignih MALT-limfoma specifično odgovaraju na antigene *H. pylori.* Opisani su slučajevi iznenađujuće dobre regresije limfoma na eradikaciju infekcije *H. pylori.*

Isto tako, novija istraživanja su potvrdila da osobe inficirane s *Helicobacter suis* (*H. suis*) imaju veću incidenciju MALT limfoma u odnosu na one inficirane *s H. pylori* ukazujući na ozbiljan rizik za zdravlje za osobe izložene domaćim životinjama (svinje, mačke, psi) (69).

1.4. Povezanost *Helicobacter pylori* s ekstragastrointestinalnim bolestima

Helicobacter pylori povezuje s mnogim bolestima koje ne pripadaju gastrintestinalnom traktu. O ulozi u njihovoj patogenosti još se ne zna dovoljno. Svake godine se publicira nekoliko studija na tu temu.

Najčešće istraživana uloga *H. pylori* na ekstragastrointestinalne bolesti je kod koronarne bolesti. Tako neki autori nalaze povezanost smanjenja srčanih udara kao posljedicu eradikacije *H. pylori* i izlječenja duodenalnog ulkusa (70). Nakagawa i sur. povezali su visoku serumsku razinu IL-6 s *H. pylori* infekcijom i srčanim udarom (71). Slično, navode i drugi autori (72-73), dok neki autori ne nalaze povezanost koronarne bolesti i *H. pylori* infekcije (74).

Važna uloga posvećena je proučavanju povezanosti *H. pylori* i šećerne bolesti, kao i komplikacija šećerne bolesti. Tako neke studije nalaze povezanost (75-76), dok neke ne nalaze (77-78).

Od neuroloških bolesti, neke studije navode vezu između *H. pylori* i moždanog udara (79,80).

Neki autori opisuju utjecaj *H. pylori* na demenciju (81,82). Spominje se i manja prevalencija multiple skleroze kod *H. pylori* pozitivnih osoba, više sugerirajući protektivnu ulogu *H. pylori*, nego negativnu (83).

Sideropenična anemija i *H. pylori* našle su svoju potvrdu povezanosti u nekim studijama (84,85), za razliku od tri nedavne studije koje nisu potvrdile tu vezu (86-88).

Druge bolesti koje se povezuju s *H. pylori* infekcijom su autoimuna trombocitopenična purpura, autoimune bolesti (tiroiditis, reumatoidni artritis), hepatobilijarne bolesti, bolesti kolona i pankreasa, respiratorne bolesti, kožne bolesti (urtikarija, rosacea) (89).

1.5. Mikrobiološke značajke *Helicobacter pylori*

1.5.1. Morfologija

H. pylori je spiralna, mikroaerofilna, gram negativna bakterija zavijenih krajeva. Kultivacijom na krutim podlogama oblici su češće štapićasti, širine 0.3 do 0.60 μm, dužine 1.5 do 10.0 μm. Savinuti oblici povremeno poprimaju spiralni oblik. Nakon produžene kultivacije na krutim podlogama ili uzgojem u tekućim podlogama tipično dolazi do predominacije kokoidnih formi. Kokoidne forme promatrane elektronskim mikroskopom imaju izgled bacila oblika slova U u kojima su krajevi spojeni membranoznom strukturom (90). Saito i sur. su u svojim studijama dokazali da kokoidne forme također mogu penetrirati u humanu gastričnu epitelnu stanicu i uzrokovati aktivnu infekciju iste. Navode postojanje pet kategorija kokoidnih oblika *H.* pylori; sposobnih prodrijeti direktno u epitelnu stanicu, umirućih, živih i uzgojivih, živih, ali ne-uzgojivih i aktivnih forma za očuvanje vrste (91). *H. pylori* je vrlo pokretan zahvaljujući postojanju više flagela (4-6) smještenih na jednom ili oba pola bakterijske stanice. Flagele imaju zadebljanje na kraju koje je produžetak ovojnice. Vanjska membrana *H. pylori* je prekrivena strukturom nalik na glikokaliks.

Bakterija je mikroaerofilna, optimalni rast postiže se pri 37º C uz 100% vlažnost u mikroaerofilnoj atmosferi (10% CO_2, 5% O_2, 85% N_2). Raste vrlo sporo i za rast treba vrlo hranjivu podlogu. Može preživjeti na pH okoliša 3,0-7,0, na višem pH ugiba vrlo brzo. Vrlo je osjetljiva na isušivanje i na sva uobičajena dezinfekcijska sredstva (90).

1.5.2. Čimbenici virulencije

Iako svi inficirani imaju upalnu reakciju sluznice želuca (gastritis), samo 20% razvije ulkusnu bolest, a 1-3% želučani karcinom. Opseg i težina inflamacije sluznice i klinički ishod infekcije ovise o mnoštvu čimbenika. Među njima najznačajniji su genetska predispozicija i imunološki odgovor domaćina,

čimbenici okoline (pušenje, prehrana) i različitost u prevalenciji i ekspresiji čimbenika virulencije *Helicobacter pylori* (92).
Čimbenike virulencije *H. pylori* možemo podijeliti u tri skupine:

- čimbenike kolonizacije
- perzistencije
- čimbenike indukcije bolesti (gene virulencije) (93)

1.5.2.1. Čimbenici kolonizacije

Spiralni oblik *H. pylori* je važan čimbenik njenje pokretljivosti i bitan preduvjet za uspiješnu kolonizaciju. Danas su poznati geni (*csd1, csd2, csd3/hdpA, ccmA, csd4, csd5*, *csd6*) koji induciraju modifikacije u unakrsnom vezanju peptidoglikana u staničnom zidu *H. pylori* određujući njen spiralni oblik (94).
Pokretljivost *H. pylori* je esencijalna za kolonizaciju sluznice želuca i početni stupanj infekcije. Za pokretljivost su zadužene flagele. Flagele imaju tri funkcionalna dijela. Bazalno tijelo koje je motor flagela pretvarajući gradijent Na ili protona u rotaciju. Drugi dio predstavlja protein FlgE koji povezuje bazalno tijelo i treći dio flagelarni filament. Flagelarni filament je kopolimer dva različita flagelarna proteina (flagelina) FlaA i FlaB. Oba su neophodna za pokretljivost i prisutna u svim sojevima *H. pylori*. Flageline kodiraju geni *flaA* i *flab* (95). Poznati su mnogi regulatorni faktori iz skupine proteina stanične faze i vanjskih faktora (promjena pH, koncentracija ureje, viskoznost medija) uključenih u ekspresiju tih gena (95).
Idući stupanj u kolonizaciji je **adherencija**. Poznato je nekoliko adhezina među proteinima vanjske membrane stanične stjenke koji adheriraju na Lewis B antigen krvne grupe i još neke nepotpuno definirane receptore na epitelu koji sadrže protein, glikopeptide, glikoproteine, fosfolipide, kolagen, vibronektin i laminin. Zajedno čine grupu proteina vanjske membrane (*engl. Helicobacter*-specific Outer membrane Proteins; Hop proteins) (92). Dva najistraženija adhezina su BabA i OipA.

BabA protein (*engl*. Blood-group Antigen-binding Adhesin) kodiran je *babA* genom. BabA (74-78 kDa) potiče vezanje za Lewis-b (Le^b) antigen krvne grupe na stanicama sluznice želuca. Kompleks BabA-Le^b vezan na stanice domaćina inducira dvolančane lomove DNA (*engl.* double-strand breaks (DSBs)) domaćina neovisna o drugim faktorima (VacA, *cag*PAI) (96). DSBs biva efikasno popravljen, ali kod prolongirane infekcije kao da dolazi do zasićenja sistema za popravljanje i posljedično tome genske nestabilnosti, karakteristične za karcinom želuca.

OipA (*engl*. Outer-membrane proinflammatory protein A) poznato je, sudjeluje u fosforilaciji žarišnog adhezijskog proteina paksilina što rezultira reorganizacijom citoskeleta u ranoj fazi *H. pylori* infekcije (97).

1.5.2.2. Čimbenici perzistencije

U čimbenike perzistencije ubrajamo: enzim ureazu, HspA (*engl*. heat shock protein A), katalazu, superoksid-dismutazu (SOD), receptor za laktoferin.

Ureaza je presudna za postojanost *H. pylori* na želučanoj sluznici, hidrolizira ureju u amonijak i ugljični-dioksid (CO_2). Amonijak difundira natrag u periplazmatski prostor gdje se za njega veže vodikov ion. Time poraste pH periplazmatskog prostora do nivoa otprilike 6.2, što je nivo u skladu s vrijednostima potrebnim za preživljavanje i rast bakterije (98).

Protein HspA pojačava ulogu ureaze dajući joj nikal potreban za enzimatsko djelovanje.

Katalaza i superoksid-dismutaza (SOD) koje proizvodi bakterija djeluju nepovoljno na fagocite.

Receptor za humani laktoferin omogućava bakteriji uzimanje dovoljne količine željeza te na taj način utječe na njenu postojanost.

1.5.2.3. Čimbenici indukcije bolesti (geni virulencije)

Gene virulencije *H. pylori* klasificiramo u tri skupine:

1. Soj specifični geni koji su prisutni samo u *H. pylori* sojeva. Unutar te skupine najproučavaniji su geni unutar *cag* otoka patogenosti (PAI), *cag*PAI. Ostali soj specifični geni smješteni su izvan *cag*PAI otoka, tako je približno polovica tih gena smještena u plastičnoj regiji *(engl*. plasticity region).
2. Fazno-promjenljivi geni čiji se status mijenja rastom ovisno o različitim uvjetima. Tu pripada šest gena koji kodiraju proteine vanjske membrane (*oipA, sabA, sabB*, *babB, babC* i *hopZ*)**.**
3. Geni s varijabilnom strukturom ovisnom o soju. Tu spada *vacA* gen (*engl*. vacuolating cytotoxin A) (99).

Otok patogenosti (*engl*. cytotoxin-associated gene pathogenicity island-*cag*PAI) zauzima 40 kb fragmenta kromosoma *H. pylori*. Sadrži 30 gena podijeljenih u regiju I i II. *Cag*PAI se definira kao intaktni ako su svi geni prisutni, negativni *cag*PAI ako nema niti jednog gena, a parcijalno izbrisani *cag*PAI se definira kao prisustvo nekoliko gena. *Cag*PAI pozitivet se definira s prisutnošću intaktnog i parcijalno izbrisanog *cag*PAI (100-102). Mnoge studije opisuju vezu između prisutnosti intaktnog *cag*PAI, parcijalno izbrisanog i negativnog *cag*PAI i kliničkog ishoda. Neki autori tako povezuju intaktni *cag*PAI s teškim gastroduodenalnim bolestima, dok se parcijalno izbrisani *cag*PAI povezuje s blažim gastroduodenalnim bolestima (103). U isto vrijeme drugi autori ne nalaze povezanost između prisutnosti *cag*PAI i gastroduodenalne bolesti (104-106). Zadnja studija Hanade i sur. ustanovila je da su bolesnici inficirani sa *cag*PAI pozitivnim sojevima imali dva puta veći rizik od karcinogeneze od onih inficiranih s *cag*PAI negativnim sojevima. Naime, u bolesnika s *cag*PAI zabilježana je veća akumulacija dvostrukih lomova DNA (DSBs) za razliku od *cag*PAI negativnih (107). Takav rezultat sugerira da *cagA* učestvuje u inaktivaciji RAD51 i reducira aktivnost DBS

reparatornog sistema kroz homolognu rekombinaciju stanice domaćina nakon infekcije s *cag*PAI pozitivnim sojem. cag*PAI* je odgovoran za ranu indukciju inflamatornih medijatora tokom infekcije, kao što su kemokini CXCLI-3, CXCL5, CXCL8, CLL20, beta-defensin 2 (BD2) i tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α) (108).

*Cag*PAI kodira protein cagA i neke druge proteine koji sudjeluju u tvorbi tip IV sekrecijskog sistema (T4SS) pomoću kojeg translocira CagA direktno u stanice želučanog epitela gdje biva tirozin fosforiliran od domaćinovih kinaza. Promjenjeni status tirozin fosforiliranih proteina dovodi do promjene staničnog skeleta i do mikromorfoloških promjena epitela. U fosforilaciju cagA proteina uključene su tirozin kinaze iz obitelji Src tirozin kinaza kao što su: c-Src, Fyn, Lyn i Yes. Biološka aktivnost cagA determinirana je brojem i sekvencama tirozin fosforiliranim Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala motivom- (EPIYA) motif na C-terminalnom dijelu proteina CagA. Tako su poznata četri različita cagA EPIYA motivfa; Istočno Azijski-tip CagA, uključuje EPIYA-A, EPIYA-B i obično samo jedan EPIYA-D, dok zapadni tip cagA uključuje EPIYA-A, EPIYA-B, jedan ili različite EPIYA-C motife. Ustanovljeno je da je među zapadnim tipom cagA sojeva broj EPIYA-C motifa važan čimbenik rizika za nastanak karcinoma. Varizi i sur. su u svojoj studiji pokazali da varijante ABCCC onkoproteina mogu mijenjati sudbinu stanice potpuno drugačije od ABC tipa. ABCCC tip inducira intestinalnu metaplaziju, IL-8, smetnje Crk adaptirajućih proteina, anti-apoptotički efekt (109).

Uloga *cag*PAI u patogenezi je višestruka, inducira produkciju IL-8 (110-113). IL-8 je jaki induktor aktivnosti i kemotaksije za neutrofile. U akutnoj infekciji povezan je s migracijom i aktivacijom polimorfonukleara, a u kroničnoj infekciji kroz aktivaciju NFkB i kemokinske kaskade dovodi do oštećenja stanica. Također se pokazalo da prisustvo *cagA* i posljedična kemokinska reakcija dovodi do modulacije lučenja gastrina. Gastrin stimulira lučenje želučane kiseline u korpusu i to je kritični faktor u razvoju i progresiji karcinoma želuca. *CagA* pozitivni sojevi povezani su i sa smanjenom produkcijom mucina. Ovim mehanizmima *cagA* pozitivni sojevi povezani su s težim oblicima gastritisa i većom gustoćom bakterija u *in vivo* uvjetima.

Dokazano je da je *cagA* dijeluje u interakciji s apoptosis-stimulirajućim proteinom (ASPP2). ASPP2 inducira apoptozu aktivirajući tumor supresor p53 (114).

Gotovo svi izolati iz istočne Azije su *cagA* pozitivni, dok je otprilike 20-40% izolata iz Europe i Afrike *cagA* negativno. U zapadnim zemljama, studije su potvrdile, pojedinci inficirani s *cagA* pozitivnim *H. pylori* imaju veći rizik za razvoj peptičkog ulkusa ili želučanog karcinoma u odnosu na inficirane s *cagA* negativnim sojevima.(115). S druge strane u istočno Azijskim zemljama teško je dokazati važnost *cagA* u kliničkom ishodu jer su skoro svi *H. pylori* izolati pozitivni.

CagA gen (*engl.* cytotoxin-associated gene A) se nalazi u regiji I otoka patogenosti i smatra se markerom te regije. Obzirom na prepoznate patogenetske mehanizme povezane uz *cagA* gen, njegova prisutnost pokušala se povezati s različitim patohistološkim promijenama sluznice želuca te s kliničkim dijagnozama. Sam cagA protein je *in vivo* povezan s jače izraženom upalom i stimulacijom sekrecije IL-8 i drugih proupalnih citokina (IL-1 α β), te pojačanom neutrofilnom infiltracijom sluznice želuca (99).

U gastritisu povezanom s *H. pylori* infekcijom, patohistološki se često vide infiltrati neutrofilnih stanica u istmusu i vratu žlijezda. Otpuštanje reaktivnih metabolita kisika i proteaza dovodi do oštećenja i smrti epitelnih stanica. Sojevi koji posjeduju *cagA* povezuju se s višim stupnjem intestinalne metaplazije, neutrofilne aktivnosti, kronične inflamacije. Oštećenje stanica uzrokuje njihovo nestajanje i zamjenu drugim epitelnim stanicama (metaplazija) ili drugim tkivom (fibroza), a time i veću učestalost pojave atrofije (116). U zemljama Zapada u 40-50% *H. pylori* inficiranih tokom života razvije intestinalnu metaplaziju. U neinficiranih taj postotak je značajno niži (5-10%). Prisutnost intestinalne metaplazije povezuje se s povećanim rizikom nastanka želučanog karcinoma. Osim tipa intestinalne metaplazije čini se da značajnu ulogu ima i distribucija promjena na sluznici želuca. Kao i kod atrofije ekstenzivnije promjene češće su povezane s razvojem karcinoma. Suprotno neke studije nisu našle povezanost *cagA* statusa i kliničkog ishoda (117-120).

H. pylori gastritis nedvojbeno je rizični čimbenik za nastanak atrofičnog gastritisa, intestinalne metaplazije, displazije i želučanog karcinoma. Osim infekcije značajnu ulogu u patogenezi karcinoma želuca imaju čimbenici domaćina. Čimbenici virulencije bakterije povezuju se s pojačavanjem upalnog odgovora i neposrednim djelovanjem na gene uključene u karcinogenezu. Od strane domaćina različiti polimorfizmi gena za proinflamatorne cytokine povezani su s povećanim rizikom razvoja premalignih promjena i karcinoma želuca Kombinacijom navedenih polimorfizama proinflamatornih gena i virulentnih čimbenika bakterije rizik nastanka karcinoma višestruko se povećava.

Na *cag*PAI regiji smješteni su i drugi geni virulencije kao što su *cagE, cagG, cagH, cagM, cagL*, *cagI, LEC* (lijevi kraj cagII regije), *tnpA, tnpB* koji sudjeluju u *cag*PAI posredovanoj NF-$_K$B indukciji i translokaciji cagA pomoću T4SS.

***CagE* gen** (*engl*. cytotoxin associated gene E) također se nalazi u regiji I i neophodan je za induciranje produkcije interleukina IL-8 (121). Neki autori smatraju da je *cagE* gen bolji marker cagI regije nego *cagA* gen i da može biti korisniji u zapažanju različitog stupnja progresije bolesti povezanog sa prisutnošću *H. pylori* (116,122,123). Moguće je da je uz *cagA* i *cagE* neophodan za bakterijsku invaziju (124). Potvrđeno je da *cagE* pozitivni *H. pylori* sojevi mogu inducirati transformirajući faktor rasta beta-1 (*engl*. Transforming growth factor beta-1 -TGF-β1), koji je dokazani karcinogen i time potaknuti epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju (*engl.* Epithelial-mesenchymal transition- EMT) za koju se smatra da je ključni proces u invaziji i metastaziranju karcinoma (121). Neke studije opisuju prevalenciju *cagA/cagE* pozitivne kombinacije ili samog *cagE* sa razlikom u spolu i starošću bolesnika.

***CagT* gen** (*engl*. cytotoxin- associated gene T) je marker cagII regije, neke studije ga također povezuju s teškim kliničkim slikama, potvrđena je njegova uloga u formiranju T4SS sistema i stvaranju pila između epitelnih želučanih stanica i *H. pylori* (125).

Sličnu ulogu ima i ***cagM*** (*engl*. cytotoxin- associated gene M) (126). Jedna studija je potvrdila da je *cagM* jedan od glavnih dijelova cag T4SS, smješten u transmembranskom kanalu (127).

Prva studija koja je proučavala ***tnpA*** **i** ***tnpB*** ustanovila je značajnu povezanost između želučanog ulkusa i *H. pylori tnpA* pozitivnih sojeva (128). Neke druge studije također su potvrdile povezanost između *tnpA* i želučanog carcinoma u populaciji Perua, Brazila i Irana (128,129).

LEC (*engl.* left end of the cag) značajno se povezuje s želučanim ulkusom (128), slično je potvrdila i studija autora iz Brazila (130). Dokazana je i povezanost s karcinomom želuca (131).

Dok prisutnost *cagA* može signalizirati pojačanu predispoziciju za razvoj težih kliničkih oblika bolesti, mnoštvo čimbenika, poglavito zemljopisne varijacije u genotipovima mogu ograničiti vrijednost *cagA* i ostalih markera virulencije kao indikatora patogenosti sojeva. Postoji određeno klonalno grupiranje u pojedinim dijelovima svijeta otprije poznato kao razlika u distribuciji gena pozitivnih sojeva u Aziji, s jedne strane i sjevernoj Americi/Europi, s druge strane. Ova pojava najvjerojatnije odgovara adaptaciji bakterija pojedinoj etničkoj grupi populacije (132).

Približno polovica soj specifičnih gena van *cag*PAI otoka smještena je u plastičnoj regiji *H. pylori* genoma (133). U *H. pylori* soju J99, plastična regija zauzima oko 48 gena, ORF (*engl*. open reading frames) unutar koje se nalazi i *dupA* gen.

DupA **gen** *(engl.* duodenal ulcer promoting gene A) obuhvaća dvije komponente *jhp*0917 i *jhp*0918. Patogeneza *dupA* gena nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se da neki sojevi formiraju tip IV sekrecijski sistem, sličan sistemu *cag*PAI , koji uključuje *dupA* gen. Ima ulogu u indukciji interleukina-8 (IL-8). Lučenje IL-8 u antrumu dovodi do pojačane neutrofilne infiltracije i slike antrum dominantnog gastritisa, dobro prepoznatoj karakteristici duodenalnog ulkusa.

Originalno, Lu i ostali opisali su u Japanskoj populaciji značajno veću učestalost *dupA* gena kod bolesnika sa doudoenalnim ulkusom u odnosu na

one sa gastritisom, želučanim karcinomom i zaključili da je *dupA* povezan s povećanim rizikom za nastanak duodenalnog ulkusa, a ima zaštitnu ulogu u nastanku želučanog karcinoma i protektivnu ulogu u nastanku atrofije i intestinalne metaplazije (133).

Tako je *dupA* gen postao sinonim za prvi bolest-specifični marker (27-28). Studije koje su obuhvatila izolate iz sjeverne i južne Indije potvrdile su originalnu tezu Lu i suradnika (134,135). Suprotno, studija iz Irana nije našla povezanost između *dupA* i kliničkih dijagnoza, ali histološki nalazi želučane sluznice potvrdili su da je *dupA* obrnuto povezan s prekanceroznim lezijama, potvrđujući protektivnu ulogu *dupA* protiv razvoja želučanog carcinoma (136). Isto tako jedna druga studija u Japanskoj populacija pokazala je približno istu raspodjelu *dupA* gena unutar različitih kliničkih dijagnoza (137). Mnoge studije nisu uspijele dokazati povezanost *dupA* statusa i kliničkog ishoda (138-140). Dok su neke studije pokazale da *dupA* nije samo rizični čimbenik za razvoj duodenalnog ulkusa, već i za karcinom želuca u pojedinim zemljopisnim regijama (141).

Takve diskrepance mogle bi biti rezultat zamljopisne i etničke varijacije u prevalenciji *dupA* gena unutar iste zemlje i među različitim zemljama.

1.5.3. Povezanost *cag*PAI i *dupA* gena

Rezultati studija koji opisuju povezanost *cag*PAI i *dupA* također su dvojbeni. Studija koja je uključivala bolesnike iz Indije s gastritisom i duodenalnim ulkusom izvjestila je o povezanosti *dupA* s *cagA* pozitivnim genotipovima (134). Dvije studije su našle povezanost *dupA* s *cagA* pozitivnim genotipovima izoliranih u odraslih s duodenalnim ulkusom, ali ne i bolesnika s drugim bolestima i u izolatima djece (122,136).

1.6. Eradikacija infekcije *Helicobacter pylori*

Saznanje o znatnom kliničkom oporavku želučane sluznice nakon eradikacije infekcije *H. pylori,* bilo da se radi o peptičkoj ulkusnoj bolesti ili samo o gastritisu, potaknulo je znanstvenike diljem svijeta da ustanove može li eradikacija infekcije biti i dobar model prevencije nastanka želučanog karcinoma. Eradikacija infekcije *H. pylori*, osim prevencije želučanog karcinoma, donosi i dodatne kliničke i farmakoekonomske dobrobiti. Nedvojbeno je dokazano da eradikacijska terapija prevenira nastanak želučanog ili duodenalnog ulkusa (142). Bolesnici na terapiji acetilsalicilnom kiselinom, inficirani *H. pylori*, imaju povećan rizik od nastanka sluzničkih lezija. Eradicirajući infekciju *H. pylori*, indirektno smanjujemo potencijalnu interakciju između inhibitora protonske pumpe i antitrombocitnih lijekova u budućnosti. Poznato je da eradikacijska terapija *H. pylori* prevenira i nastanak MALT limfoma, sideropenične anemije, idiopatske trombocitopenične purpure, limfocitnog gastritisa i Menetrierove bolesti. Konačno, eradikacija koja pomaže u cijeljenju gastritisa, dovodi do smanjenja mortaliteta zbog samog gastritisa te prevenira i reducira buduće troškove liječenja komplikacija i drugih bolesti povezanih s *H. pylori* (143,144). Rizik od razvoja želučanog karcinoma znatnije je smanjen ako se eradikacija infekcije *H. pylori* provede prije razvoja premalignih promjena (atrofije, intestinalne metaplazije i displazije).

Prema preporukama Europskog društva za proučavanje Helicobactera (The European Helicobacter Study Group- EHSG) donešen je hrvatski postupnik za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnika s infekcijom *H. pylori*. Tako je preporuka za eradikacije *H. pylori* u:

najbližih rođaka bolesnika kod kojeg je dijagnosticiran želučani karcinom, bolesnika s već dijagnosticiranim želučanim tumorom u kojih je provedeno endoskopsko ili kirurško liječenje suptotalnom resekcijom želuca, bolesnika s visokim rizikom od gastritisa: teškim pangastritisom, gastritisom, gastritisom koji prevladava u korpusu i teškom atrofijom, bolesnika na kroničnoj protusekretornoj terapiji IPP-om koja traje više od godinu dana, bolesnika s ostalim značajnim rizičnim čimbenicima za želučani karcinom: jaki pušači,

rad u okruženju prašine od: ugljena, kremena, cementa, rad u kamenolomu, bolesnika pozitivnih na *H. pylori* sa strahom od želučanog karcinoma (145).

Standardni trojni režim eradikacijske terapije temeljen na inhibitoru protonske pumpe (IPP) i dva antimikrobna lijeka postao je preporuka svih svjetskih postupnika. Između triju najčešće propisivanih antibiotika Europska grupa daje prednost makrolidu klaritromicinu, uz koji preporučuje kao drugi antibiotik amoksicilin ili metronidazole/tinidazol. Hrvatska radna skupina za infekciju *H. pylori* preporučila je slične sheme liječenja, samo što je kao makrolid predložen azitromicin s obzirom da klaritromicin u to vrijeme još nije bio registriran u našoj zemlji (145). Novije studije pokazale su značajan pad djelotvornosti dosada uobičajene trojne terapije.

S obzirom na to da u pokušaje terapije nisu uvedeni novi lijekovi, traže se nove kombinacije postojećih antibiotika. Uspoređuju se rezultati tzv "sekvencijske terapije" (146,147) četverostruke "konkomitantne" (IPP-amoksicilin-klaritromicin-metronidazol) (148), terapije zasnovane na levofloksacinu (IPP-amoksicilin-amoksicilin-levofloksacin)(149), četverostruke terapije bazirane na bizmutu (IPP-soli bizmuta-metronidazol-tetraciklin) (150,151).

1.6.1. Uzroci neuspjeha eradikacije infekcije *H. pylori*

Na stopu izlječenja *H. pylori* infekcije utječe nekoliko različitih čimbenika: otpornost (rezistencija) *H. pylori* na antibiotike, genotipski čimbenici domaćina, kao što su citokrom P450 2C19 (CYP2C19), višestruko otporni transporter-1 (MDR 1), polimorfizam proupalnih citokina, pušenje, pridržavanje uputa o uzimanju lijekova-suradljivost *(engl*. compliance), dužina trajanja terapije (152,153).

1.6.1.1. Otpornost (rezistencija) *H. pylori* na antibiotike

Novije studije pokazuju značajan pad djelotvornosti dosada uobičajene trojne terapije. Uspjeh se postiže u najviše 70 % bolesnika (154-156), što je značajno niže od željenih 80-90% (157). Infekcija s rezistentnim *H. pylori* sojevima nesumljivo utječe na uspjeh ili neuspjeh eradikacijske terapije (153,158). Više od polovice bolesnika s neuspjelom eradikacijom bilo je inficirano klaritromicin rezistentnim sojevima (159).

Prevalencija klaritromicin rezistentnih sojeva raste iz godine u godinu u mnogim zemljama, s 9% u 1998. godini (160) na 17.6 % u 2009. godini (161,159). Rezultati iz Hrvatske pokazuju sličnu tendenciju: u sjevernim područjima primarna je rezistencija na klaritromicin sa 7 % u 1999. godini porasla na 25.6 % u 2011. godini (162).

U priobalnom području primarna je rezistencija također porasla na 22 % u 2011. godini (160). Iako je primarna *in vitro* rezistencija na metronidazol u brojnim europskim zemljama relativno visoka, taj se problem može prevladati povišenjem doze i dužom terapijom ili dodatkom preparata bizmuta.

1.6.1.2. Lučenje želučane kiseline

Nedovoljna inhibicija lučenja želučane kiseline može uzrokovati neuspjeh u liječenju. Želučana kiselina čini antibiotike nestabilnim, pogotovo klaritromicin i amoksicilin, razgrađuje ih u želucu i umanjuje antimikrobni efekt (163,164). Stoga je nužna primjena inhibitora protonske pumpe (IPP) tjekom eradikacijske terapije. Rast pH s 3.5 na 5.5 povećava *in vitro* aktivnost amoksicilina više od 10 puta (163). Tako je 24-satni pH u želucu izlječenih bolesnika bio znato viši od pH ne izliječenih bolesnika. Potvrđena je uspiješna eradikacija bez obzira na bakterijsku osjetljivost na klaritromicin u bolesnika kod kojih je 10% vremena pH u želucu bio < 4,0, uz prosječni 24-satni pH < 6,0 (152).

Farmakoterapijska istraživanja su potvrdila mnoge čimbenike koji dijeluju na lučenje želučane kiseline za vrijeme eradikacijske terapije: vrsta i doza IPP-a, genotipski čimbenici domaćina: kao što su polimorfizam citokromA P450

2C19 (CYP2C19), višestruko otporni transporter-1 (MDR1), polimorfizam upalnih citokina. Tako stopa izlječenja standardnom trojnom terapijom značajno ovisi o CYP2C19 genotipu: 72.7% kod brzih metabolizatora, 92.1% u intermedijarnih i 97.8% u sporih metabolizatora. Kod brzih metabolizatora inficiranih s klaritromicin rezistentnim sojem stopa izlječenja *H. pylori* je dramatično niska (7.1%) (159).

Od upalnih citokina koji se luče interleukin (IL)-1β i tumor nekrozis faktor (TNF) inhibiraju lučenje želučane kiseline (165).

1.6.1.3. Pridržavanje uputa o uzimanju lijekova-suradljivost

Stopa neuspjeha izlječenja povezana je sa slabijom suradljivošću bolesnika (preskakanje doza, skraćivanje vremenskog perioda terapije, pušenje) (153). Meta analize su pokazale da je 14-dnevni tretman imao veću stopu izlječenja od 7-dnevnog (166).

1.6.1.4. Čimbenici virulencije *H. pylori*

CagA status i eradikacijska terapija

Van der Hulst i sur. su prvi istražili povezanost *cagA* i stope izlječenja. Izvjestili su o značajno većoj stopi izlječenja kod bolesnika inficiranih s *cagA* pozitivnim sojevima (73%) u odnosu na *cagA* negativne sojeve (52%) (167). Neke studije su uspijele potvrditi orginalnu hipotezu (168-170), a neke nisu našle povezanost između *cagA* i stope izlječenja (171,172).

Objašnjenje povezanosti uspijeha ili neuspjeha terapije s *cagA* statusom nalazi se u pojačanoj inflamaciji sluznice želuca čemu pridonosi *cagA* pozitivitet. Polimorfonuklearna infiltracija u antrumu bolesnika s višim stupnjem inflamacije (skor 2-3) povezuje se s značajno većom stopom izlječenja za razliku od onih s nižim stupnjem inflamacije (skor 0-1). Upala povećava hiperemiju u sluznici, a time i bolju difuziju antibiotika (173).

Kao drugi mehanizam, navodi se da *cagA* pozitivni sojevi rastu brže od *cagA* negativnih sojeva, a pošto su antibiotici aktivniji tokom stanične diobe, djelotvorniji su na brzo rastuće bakterije za razliku od sporije rastućih (174).

Kao treći mehnizam navodi se utjecaj interleukina (IL)-1β čija povećana produkcija u odgovoru na *H. pylori* infekciju inhibira lučenje želučane kiseline. Potvrđeno je da *cagA* pozitivni sojevi proizvode znatno više IL-1β u želučanoj sluznici u usporedbi s *cagA* negativnim sojevima. Na taj način *cagA* negativni sojevi postaju manje dostupni antibioticima i njihva eradikacija je niža.

VacA status i eradikacijska terapija

Nekoliko studija je izvjestilo o povezanosti između *vacA* i izlječenja. Neke su našle povećani rizik od neuspjeha eradikacije *H. pylori* i *vacA s2* genotipa u odnosu na *s1* genotip (169,170). Jedna studija opisala je značajno povećan rizik od neuspjeha eradikacije povezan s *vacA m1* genotipom u usporedbi s *m2* genotipom (175). Neke studije nisu našle povezanost *vacA* i ishoda liječenja (154).

DupA staus i eradikacijska terapija

Shiota i sur. prvi su pokušali u svojoj studiji naći povezanost *dupA* stausa i neuspjeha eradikacijske terapije. *DupA* prevalencija je bila veća u neeradiciranoj grupi u odnosu na eradiciranu grupu. U multivarijatnoj analizi prilagođenoj za dob, spol, vrstu bolesti *dupA* je bio neovisan (u odnosu na klaritomicinsku rezistenciju) rizični faktor za neuspijeh liječenja.

Histološki skor se nije razlikovao između *dupA* pozitivne i *dupA* negativne grupe, sugerirajući da mehanizam niže stope izlječenja u *dupA* pozitivnoj grupi nije bio uzrokovan histološkim razlikama kakve viđamo u *cagA* pozitivnih i *cagA* negativnih bolesnika. Lučenje želučane kiseline je značajno veće u *dupA* pozitivnih bolesnika u odnosu na *dupA* negativne (176), to korelira sa povećanom razinom serumskog gastrina u *dupA* pozitivnih bolesnika u odnosu na *dupA* negativne bolesnike sugerirajući da je lučenje želučane kiseline veće u *dupA* pozitivnih (176). Lu i sur. su izvjestili o povezanosti *dupA* i povećanoj otpornosti na niski pH *in vitro* studiji. *DupA* pozitivni sojevi mogu inducirati povećanu količinu gastrina i pojačano lučenje

želučane kiseline, a pojačano lučenje želučane kiseline može biti povezano s manjom stopom izliječenja (133).
Mogući su i drugi mehanizmi odgovorni za neuspijeh izliječenja, buduće studije će odgovoriti na ova pitanja.

Gustoća *H. pylori* u želučanoj sluznici

Veća gustoća *H. pylori* uz postojanje intestinalne metaplazije smanjuje stopu izlječenja (170). Veća gustoća *H. pylori* u antralnoj sluznici povećava antralnu inflamaciju i uzrokuje nižu ekspresiju somatostatina. Zbog toga se povećava lučenje gastrina, što pak vodi pojačanom lučenju želučane kiseline i nastanku duodenalnog ulkusa.
Poznato je da intestinalna metaplazija ima smanjenu sposobnost lučenja kiseline zbog atrofičkih promijena u tijelu sluznice. Stoga je metaplazija s atrofičkim promijenama zaštitni faktor od neuspijeha izliječenja (169). Suprotno Zhao i sur. su izvjestili da intestinalna metaplazija može smanjiti uspijeh liječenja, spekulirajući da intestinalna metaplazija formira mikro-okoliš koji može uzrokovati pad stope izliječenja (170).

Cilj naše studije bio je da se na temelju učestalosti gena virulencije *cag*PAI otoka *H. pylori* izolata i usporedbe s patohistološkim promijenama želučane sluznice pokuša izdvojiti skupina bolesnika kod koje se mora i dalje inzistirati na eradikaciji *H. pylori* infekcije.

Ovom studijom obuhvatili smo bolesnike u kojih nismo uspjeli eradicirati *H. pylori* infekciju nakon višestrukih pokušaja liječenja, unatoč toga što je terapija, nakon jedan ili dva neuspjela pokušaja, bila kreirana prema testu antimikrobne osjetljivosti. Najveći broj bolesnika imao je uredan ili tek bezazleni endoskopski nalaz (erozije gastroduodenuma). S obzirom na sve veći broj bolesnika koji i dalje imaju smetnje i benigan endoskopski nalaz, nameće se pitanje: da li i dalje kod takvih bolesnika inzistirati na eradikaciji *H. pylori*.

Na temelju dosadašnjih istraživanja temeljenih na biološkoj vjerodostojnosti i eksperimentalnoj epidemiološkoj pouzdanosti može se pretpostaviti da će prisutnost gena virulencije *cag* otoka patogenosti biti povezana s višim stupnjem kronične inflamacije sluznice želuca, neutrofilne aktivnosti, kao i s prekanzeroznim lezijama (intestinalna metaplazija, atrofija), što u konačnici može dovesti do teških gastroduodenalnih bolesti. Uz osjetljivost domaćina, djelovanje čimbenika iz okoliša, *H. pylori cag*PAI gene virulencije i mnogi drugi čimbenici virulencije *H. pylori* vjerojatno su odgovorni da neki inficirani bolesnici ostanu bez simptoma (imaju samo gastritis utvrđen histološkom analizom), a neki razviju ozbiljnije gastroduodenalne bolesti, ili u najtežim slučajevima – malignu bolest. Dio odgovora pružiti će nam detekcija gena virulencije *cag*PAI otoka ove skupine bolesnika u našem zemljopisnom području.

Prema originalnim istraživanjima *dupA* gen je zastupljeniji u bolesnika s antrum predominantnim gastritisom koji uobičajeno prati duodenalni ulkus, za razliku od bolesnika s difuznim ili korpus predominantnim gastritisom, koji prati želučani ulkus, pa i karcinom. Brojna druga istraživanja su pokazala vrlo kontradiktorne rezultate, potrđujući postojanje različitih zemljopisnih varijacija u distribuciji *dupA* i povezanosti s gastroduodenalnim bolestima. S obzirom da u našoj sredini nema nikakvih saznanja o učestalosti i povezanosti *dupA*

gena s gastroduodenalnim bolestima i s obzirom na raznolikost rezultata drugih studija teško je za pretpostaviti rezultate našeg istraživanja.

Praktična vrijednost ovog rada je u stvaranju epidemiološke slike o distribuciji detektiranih *cag*PAI i *dupA* gena sjeverozapadne Hrvatske. Ti podaci mogu biti osnova za epidemiološku bazu podataka i usporedbu s drugim zemljopisnim regijama.

Istraživanjem je, naime, dokazano da postoji određeno klonalno grupiranje u pojedinim dijelovima svijeta otprije poznato kao razlika u distribuciji gena pozitivnih sojeva. Ova pojava najvjerojatnije odgovara adaptaciji bakterije pojedinoj etničkoj grupi populacije.

Danas je priznato mjesto molekularne dijagnostike u detekciji gena rezistencije na određene antibiotike direktno iz kliničkih uzoraka. Iako se smatra da je uporaba molekularne dijagnostike za detekciju gena virulencije u rutinskoj dijagnostici preskupa i nije preporučena za širu uporabu, ona bi trebala naći svoje mjesto u selektivno odabranim bolesnicima u kojih se nije uspijelo eradicirati infekciju uobičajenim terapijskim protokolima, pa makar se radilo i o *H. pylori* pozitivnoj ne-ulkusnoj dispepsiji sa blagom kliničkom slikom i urednim endoskopskim nalazom. Posebno se to odnosi na one, ma kako bili rijetki, kod kojih histološki nalazi upućuju na opasnost od razvoja težih ili premalignih promjena želučane sluznice.

Nezanemariva je vrijednost rada je i u određivanju antimikrobne rezistencije *H. pylori* izolata. Radi se o sekundarnoj rezistenciji, koja po literaturi doseže visoke vrijednosti u mnogim sredinama. Saznanje o rezistenciji naše skupine bolesnika može pomoći u odabiru novih terapijskih shema pri ponovnim pokušajima erdikacije *H. pylori* infekcije, te korekciji postojećih nacionalnih smjernica liječenja.

2. HIPOTEZE

1. Prisutnost gena virulencije *cag*PAI otoka povezana je s višim stupnjem kroničnog aktivnog gastritisa i prekanzeroznim lezijama

2. Prisutnost *dupA* gena veća je u bolesnika s antrum predominantnim gastritisom za razliku od bolesnika s difuznim ili korpus predominantnim gastritisom

3. CILJEVI

3.1. Osnovni cilj:

Detekcija gena virulencije *cag* otoka patogenosti i *dupA* gena *Helicobacter pylori* izolata bolesnika nakon višestruke neuspjele eradikacijske terapije i usporedba s patohistološkim promjenama želučane sluznice.

3.2. Specifični ciljevi:

1. Usporediti prisutnost intaktnog *cag*PAI, izbrisanog (deliranog) i parcijalno izbrisanog *cag*PAI otoka s patohistološkim promjenama želučane sluznice
2. Usporediti prisutnost *dupA* i *cag*PAI statusa
3. Odrediti antimikrobnu osjetljivost *Helicobacter pylori* izolata određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) Epsilon-testom (E-test)
4. Usporediti prisutnost gena virulencije *cag*PAI i *dupA* gena s antimikrobnom osjetljivošću

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici i mjesto istraživanja

Mikrobiološko i molekularno istraživanje bioptata provedeno je u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb, a patohistološko istraživanje bioptata želuca u Zavodu za patologiju Kliničke bolnice Merkur. Svi bolesnici u ovom istraživanju obuhvaćeni su projektom: „*Helicobacter pylori* infekcija - evolucija bolesti i novi terapijski postupci“, br. projekta 108-0000000-314 Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu i Ministarstva znanosti Republike Hrvatske.
Ispitivanje je odobreno od od strane Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur i Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

U ispitivanje su uključena 103 bolesnika, 25 muškaraca i 78 žena. Za sve bolesnike je bilo karakteristično da su proveli eradikacijsku terapiju (jednom ili više puta), a i dalje su imali jasno dokazanu *Helicobacter pylori* infekciju (pozitivan nalaz bakterije u brzom ureaza testu, histološkoj analizi sluznice želuca, mikrobiološkom izolacijom i molekularnom detekcijom). Bolesnici su imali jasno izražene i subjektivne tegobe. Svi bolesnici su potpisali informirani pristanak prije istraživanja.

4.2. Uzorci

Uzorci za ispitivanje bili su bioptati želučane sluznice 103 bolesnika dobiveni tijekom rutinskih, klinički indiciranih gastroduodenoskopija u endoskopskom laboratoriju Kliničke bolnice „Merkur“ u periodu od 2008. do 2012. kod kojih je izoliran *H. pylori.*

4.3. Metode istraživanja

U istraživanju su korištene kliničke, patohistološke i mikrobiološke metode.

4.3.1. Kliničke i patohistološke metode

Ezofagogastroduodenoskopija

Ezofagogastroduodenoskopija (EFGD) napravljena je s Olympus ezofagogastroduodenoskopima, a bioptički uzorci sluznice želuca uzimani su biopsijskim kliještima. Pri svakoj EFGD uzimano je 7 ciljanih bioptičkih uzoraka sluznice želuca iz antruma i korpusa. Antralni uzorak je stavljen u 2% urea agar za brzu detekciju aktivnosti *Helicobacter pylori* ureaze. Sljedeća 2 uzorka sluznice antruma, te 2 uzorka sluznice korpusa stavljena su u 4% formalin za histološku analizu, a po jedan bioptički uzorak sluznice antruma i korpusa stavljeni su transportnu podlogu za izolaciju bakterije *H. pylori*, tioglikolatni bujon.

Endoskopska dijagnoza klasificirana je u nekoliko kategorija:

1. neulkusna dispepsija (NUD)
2. želučani ulkus (UV)
3. duodenalni ulkus (UD)
4. želučane erozije (EV)
5. duodenalne erozije (ED)
6. maligni tumori (C)

Potvrda *Helicobacter pylori* infekcije napravljena je:

1. brzim ureaza testom
2. patohistološkom analizom želuca
3. mikrobiološkom izolacijom *H. pylori*

Brzi ureaza test

Kod svih 103 bolesnika učinjen je brzi ureaza test (Camphylobacter-like organism-CLO test, Delta West, Bentley, Western Australia).
Uzorak tkiva želuca stavljen je u 2% urea polukruti agar. Očitavano je nakon 20 minuta (razvoj crvene/ljubičaste boje oko bioptičkog uzorka znak je pozitivnog testa), a kod negativnih nalaza još i nakon 3 i 24 sata radi moguće zakašnjele pozitivne reakcije.

Histološka analiza sluznice želuca

U svih 103 bolesnika uzorci bioptata želuca fiksirani su u standardnom 4% neutralnom puferiranom formalinu, uklapani u parafin, serijski izrezani u rezove debljine 3 mikrona. Rezovi su rutinski obojeni.

1. hemalaun-eozinom za standardnu histološku aanalizu
2. PAS *(engl*. periodic acid Schiff-alcijan) plavilom za dokaz intestinalne metaplazije
3. modificiranim 2% Giemsa ili Warthin-Starry bojenjem za određivanje stupnja mukozne kolonizacije s *H. pylori*

Svaki uzorak mikroskopski je analiziran prema modificiranoj Sydney-skoj klasifikaciji gastritisa. To je uključivalo: prisutnost upalnih stanica (inflamacija), aktivnost upale (prisutnost neutrofila), prisutnost i gustoću *H. pylori,* te prisutnost atrofije i intestinalne metaplazije (45).
Zastupljenost svakog od prva četri parametra stupnjevana je prema kriterijima modificirane Sydney-ske klasifikacije gastritisa (0= nema, 1= rijetko, 2= osrednje, 3= obilno), a intestinalne metaplazije su skorirane s ima/nema, s obzirom da ni jedan bolesnik nije imao inkompletnu metaplaziju II ili III stupnja. Sve prisutne metaplazije bile su I stupnja.

4.3.2. Mikrobiološke metode

4.3.2.1. Konvencionalne mikrobiološke metode

Izolacija *Helicobacter pylori* iz želučanih bioptata

Uzorci bioptata želuca (1 iz korpusa i 1 iz antruma) pohranjeni su u tioglikolatni bujon i čuvani na 4ºC do nasađivanja (maksimalno 24 sata od uzimanja).

Uzorci želučanih biopsija mehanički su oslobođeni sluzi struganjem sa sterilnim iglama. Nakon toga su usitnjeni i naneseni na površinu hranjive podloge. Manji dio usitnjenog uzorka (otprilike 1/5) je podijeljen u dva dijela od kojih je jedan dio inokuliran u epruvete s reagensom za test ureaze (BioMerieux), a drugi iskorišten za izradu mikroskopskog preparata bojenog po Gramu. Uzorci su nasađeni na Columbia agar s dodatkom 7%-tne konjske krvi i selektivnim suplementom za uzgoj *H. pylori* (OxoidSR127).

Ploče su inkubirane uz 100% vlažnost pri 37° C 3-5 dana u mikroaerofilnoj atmosferi u anaerobnim loncima (10% CO_2, 5% O_2, 85% N_2). Mikroaerofilna atmosfera postignuta je korištenjem Gas Pak vrećica za anaerobne bakterije bez katalizatora (BioMerieux) i dodavanjem vode u svrhu ovlaživanja. Od trećeg dana inkubacije ploče su svakodnevno provjeravane za pojavu rasta bakterija.

Izolat je identificiran na temelju karakteristične makromorfologije, mikroskopskog preparata i biokemijskih testova. Makroskopski su *H. pylori* male, prozirne, konvekse kolonije nalik na kapi rose, do 3 mm promjera. Mikroskopski su zavijeni gram-negativni štapići koji u starijim kulturama poprimaju kokoidni oblik.

Biokemijski su izolati identificirani testom katalaze, ureaze i oksidaze. Za test katalaze se na predmetno stakalce nanese 2-3 porasle kolonije *H. pylori* staklenim štapićem i kapne kap 3%-tnog H_2O_2. Pojava mjehurića je znak aktivnosti katalaze. Za test ureaze su 2-3 kolonije stavljene u epruvetu s 0,5 mL urea-indol testa (Bio-Merieux). Pojava ljubičaste boje je dokaz aktivnosti ureaze. Za test oksidaze se 2-3 izolirane kolonije staklenim štapićem nanesu

na disk impregniran reagensom (BioMerieux), a pojava plave boje dokaz je oksidaza pozitivnog testa.

Svi potvrđeni izolati *H. pylori* pohranjeni su u brucela bujonu s 10%-tnim glicerolom u tekućem dušiku na - 80ºC.

Testiranje osjetljivosti na antimikrobna sredstva

Testiranje osjetljivosti na antibiotike napravljeno je metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) Epsilometer testom (E-test) (kombinacija difuzijske metode i određivanja MIK-a) (BioMerieux- France).

Za testiranje antimikrobne osjetljivost napravljena je bakterijska suspenzija 3 McFarland i nanesena na Columbia agar s dodatkom 5-10% defibrinizirane konjske krvi. Nakon apsorpcije suspenzije u agar nanesu se E-test trakice na površinu. Inkubacija je 3 i više dana u termostatu u mikroaerofilnim uvijetima. Koncentracija antibiotika koja inhibira rast bakterije očitava se direktno sa skale na traci na mjestu gdje rast mikroorganizma u obliku elipse siječe test traku.

Tablica 1 prikazuje vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) koje su korištene kao interpretacijski standard za ispitivanje osjetljivosti *H. pylori* prema European Committe on Antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) standardima (177).

Tablica 1. Antimikrobna sredstva i interpretacijski standardi minimalnih inhibitornih koncentracija za ispitivanje osjetljivosti *H. pylori* prema EUCAST standardima

Antibiotik	Osjetljivo MIK (mg/L)	Rezistentno MIK (mg/L)
Amoksicilin	≤ 0.12	>0.12
Azitromicin	≤ 0.25	>0.5
Klaritromicin	≤ 0.25	>0.5
Metronidazol	≤ 8	>8
Levofloksacin	≤ 1	>1

MIK- minimalna inhibitorna koncentracija

4.3.2.2. Molekularne mikrobiološke metode

Izolacija deoksiribonukleinske kiseline *Helicobacter pylori*

Izolacija DNA (*engl.* Deoxyribonucleic Acid; DNA) napravljena je pomoću komercijalnog kita High Pure PCR Template Preparation Kit, Version 16 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) prema uputi proizvođača prema standardnom protokolu.

Prije postupka izolacije uvijek se uključio termo-block (*Thermomixer comfort*) na 70ºC i otopila Proteinaza K.

Proteinaza K (liofilizat) otopila se u 4.5 ml sterilne destilirane H_2O, podijelila u alikvote i pohranila na - 20° C (stabilno na -15°C do -20°C 12 mjeseci).

U epruvete od 1.5 ml za mikrocentrifugiranje resuspendiralo se 10-15 kolonija (oko 10^9 CFU/ml) *H. pylori* s 200 µl pufera za liziranje tkiva (*Tissue Lysis Buffer*). Sadržaj je vorteksiran u centrifugi. Nakon toga dodano je 200µl pufera za vezivanje (*Binding Buffer*) i 40µl Proteinaze K. Sadržaj je vorteksiran. Nakon toga epruvete su inkubirane 10 minuta na 70°C u termo bloku. Nakon inkubacije epruvete su stavljene u centrifugu 5 s da se s čepova spusti kondenzat *(engl*. spindown). Dodano je 100 µl izopropanola i ponovo vorteksirano. Zatim je cijeli sadržaj (oko 600µl) prebačen u čiste filter epruvete. Nakon centrifugiranja 1 minutu na 8000 x g, supernatant je prebačen (sadrži DNA) u novu 1.5 ml epruvetu. Dodano je 500 µl pufera za odstranjivanje inhibitora (*Inhibitor Removal Buffer*) i ponovno se centrifugiralo 1 min. na 8000 g. Supernatant se ponovo prebacio u novu epruvetu, te se dodalo 500 µl pufera za ispiranje (*Wash Buffer*), centrifugiralo 1 min. na 8000 x g. Odbacio se sadržaj, a supernatant prebacio u novu epruvetu i centrifugirao 10 sekundi na 13000 x g. Supernatant se prebacio u nove epruvete s čepom od 1.5 ml , dodalo se 200 µl prethodno zagrijanog pufera za eluciju (*Elution Buffer*) na 70°C. Još jednom se centrifugiralo 1 min. na 8000 x g.

Konačan rezultat je isprana DNA u epruvetama koje su pohranjene na -20° do slijedećeg procesa.

Umnažanje DNA metodom lančane reakcije polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR)

Za tipizaciju 13 gena korišteno je 26 parova početnica. Tablica 2 prikazuje početnice, njihove sekvence i veličinu PCR produkta. Set početnica (P1 i P2) koji amplificiraju *Ag* gen, prisutan u svih *H. pylori* korišten je kao pozitivna kontrola izolata. Početnice (SIGMA) su isporučene liofilizirane. U sterilnom kabinetu liofilizirane početnice su otopljene s PCR vodom (Sigma), mililitri vode navedeni u originalnoj uputi proizvođača za svaku početnicu. Od dobivene količine odvojeno je 50µl i razrijeđeno sa dodatnih 450 µl PCR vode. Osnovni štok i razrijeđena otopina početnica pohranjeni su na -20°C.
U sterilnoj epruveti se za svaki od 13 navedenih parova početnica izmješalo 25.0 µl ukupnog reakcijskog volumena; 12.5 µl master mix-a (*eng*. master mix) 5.5 µl PCR vode, 2 µl svake početnice (’ 3,’ 5), 3µl izolirane DNA.

Tablica 2. Početnice korištene u istraživanju

Gen	Početnica	Sekvenca početnice	Veličina PCR produkta
cagM	Cag 5	ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC	586 bp
	Cag 6	ATTTTTCAACAAGTTAGAAAAAGCC	
tnpA	Cag10	ATCAGTCCAAAAAGTTTTTTCTTTCC	344 bp
	Cag11	TAAGGGGGTATATTTCAACCAACCG	
tnpB	Cag 8	ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC	569 bp
	Cag 9	AGCTAGGGAAAAATCTGTCTATGCC	
cagE	CagE-F1	ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC	329 bp
	CagE-R1	GAAGTGGTTAAAAAATCAATGCCCC	
cagT	CagT-F1	CCATGTTTATACGCCTGTGT	301bp
	CagT-R1	CATCACCACACCCTTTTGAT	
cagA3	CagA-F1	AACAGGACAAGTAGCTAGCC	701 bp
	CagA-R1	TATTAATGCGTGTGTGGCTG	
cagA2	CAG-1	AGACAACTTGAGCGAGAAAG	320 bp
	CAG-2	TATTGGGATTCTTGGAGGCG	
cagA1	CagA-F2	ACAAATACAAAAAAGAAAAAGAGGC	349 bp
	CagA-R2	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	
Ap*cag*	CagA-R2	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	730 bp
	AP-F1	GTGGGTAAAAATGTGAATCG	
LEC	LEC-F1	ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG	320-550 bp
	LEC-R1	TCTCCATGTTGCCATTATGCT	
Ag	P1	TGGCGTGTCTATTGACAGCGAGC	298 bp
	P2	CGTGCTGGGCATACTTCACCATG	
jhp0917	JHP0917F	TGGTTTCTACTGACAGAGCGC	307bp
	JHP0917R	AACACGCTGACAGGACAATCTCCC	
jhp0918	JHP0918F	CCTATACGCTAACGCGCGCTC	276 bp
	JHP0918R	AAGCTGAAGCGTTTGTAACG	

Umnažanje (amplifikacija) DNA provedeno je aparatu *Thermal Cycler,* GeneAmp® PCR Systems 97000, Applied Biosystems.

Termalni ciklusi bili su različiti za pojedine gene.

Za gen ***cagA2*** (178) reakcija amplifikacije se odvijala slijedom koji je naveden:

- razdvajanje dvostrukog DNA lanca (denaturacija) na temperaturi 94 ºC, tijekom 5 min
- 27 ciklusa na 94°C 30 s
- vezanje početnica na komplementarnu sekvencu DNA *(engl. annealing)* na temperaturi 53ºC, tijekom 30 s
- produljivanje početnice pomoću DNA polimeraze (ekstenzija) na temperaturi 72ºC, tijekom 30 s
- finalna ekstenzija na temperaturi 72ºC, tijekom 7 min

Za gene ***cagM***, ***tnpA***, ***tnpB*** (179):

- razdvajanje dvostrukog DNA lanca (denaturacija) na temperaturi 94ºC, tijekom 1 min
- 35 ciklusa na 94°C 1 min
- vezanje početnica na komplementarnu sekvencu DNA *(engl. annealing)* na temperaturi 53ºC, tijekom 3 min
- produljivanje početnice pomoću DNA polimeraze (ekstenzija) na temperaturi 72 ºC, tijekom 1.5 min
- finalna ekstenzija na temperaturi 72 ºC, tijekom 10 min

Za gene ***cagA1***, ***cagA3***, ***cagT***, ***cagE***, **Ap*cag*** (102):

- razdvajanje dvostrukog DNA lanca (denaturacija) na temperaturi 94ºC, tijekom 5 min
- 40 ciklusa na 94°C 30 s
- Vezanje početnica na komplementarnu sekvencu DNA *(engl. annealing)* na temperaturi 52 ºC, tijekom 30 s

- produljivanje početnice pomoću DNA polimeraze (ekstenzija) na temperaturi 72ºC, tijekom 1.5 min
- finalna ekstenzija na temperaturi 72ºC, tijekom 10 min

Za gen ***Ag*** (180):

- razdvajanje dvostrukog DNA lanca (denaturacija) na temperaturi 94 ºC, tijekom 5 min
- 40 ciklusa na 93˚C 1 min
- Vezanje početnica na komplementarnu sekvencu DNA *(engl. annealing)* na temperaturi 57ºC, tijekom 2 min
- produljivanje početnice pomoću DNA polimeraze (ekstenzija) na temperaturi 70ºC, tijekom 2 min
- finalna ekstenzija na temperaturi 72ºC, tijekom 10 min

Za gen ***LEC*** (181):

- razdvajanje dvostrukog DNA lanca (denaturacija) na temperaturi 95 ºC, tijekom 5 min
- 35 ciklusa na 94˚C 40 s
- Vezanje početnica na komplementarnu sekvencu DNA *(engl. annealing)* na temperaturi 55ºC, tijekom 60 s
- produljivanje početnice pomoću DNA polimeraze (ekstenzija) na temperaturi 72ºC, tijekom 2 min
- finalna ekstenzija na temperaturi 72ºC, tijekom 10 min

Za gene ***jhp0917*** i ***jhp0918*** (133):

- razdvajanje dvostrukog DNA lanca (denaturacija) na temperaturi 94ºC, tijekom 5 min
- 35 ciklusa na 94˚C 2 min
- Vezanje početnica na komplementarnu sekvencu DNA *(engl. annealing)* na temperaturi 57ºC, tijekom 30 s
- produljivanje početnice pomoću DNA polimeraze (ekstenzija) na temperaturi 72ºC, tijekom 1 min
- finalna ekstenzija na temperaturi 72ºC, tijekom 7 min

Kontrolni sojevi CCUG 17874 i 47164 korišteni su kao pozitivne kontrole, a destilirana voda kao negativna kontrola.

Detekcija PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu

Produkti PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 2% agaroznom gelu. Deset µl dobivenog PCR produkta i 1 µl boje (gel loading buffer) aplicirano je na agaroza gel koji je po završetku elektroforeze (100 V, 60 min) obojen etidij bromidom, te fotografiran pod ultravioletnim svjetlom. Za određivanje veličine PCR produkata korišten je DNA Molecular Weight Marker XIV (100-500 bp) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

4.4. Kemikalije

Mikrobiološke podloge

Tioglikolatni bujon

bio triptikaza 15 g/l
l-cistein 0,5 g/l
dekstroza 5g/L
ekstrkt kvasca 5g/l
NaCl 2,5 g/L
Na tioglikolat 0,5 g/l
Rezaurin 0,001 g/l
Agar 0,75 g/L

Columbia agar baza s konjskom krvi i antibiotskim suplementom

Otopiti 42,5 g praha (BioMerieux) u 1L destilirane vode. Grijati uz često miješanje do vrenja, da se potpuno otopi prah. Autoklavirati pri 120° C 15 minuta. Ohladiti bazu na 45-50° C i dodati 7% sterilne defibrinirane konjske krvi te antibiotski suplement SR0147E.

Helicobacter pylori

Selective Supplement (Dent) SR0147 (Oxoid)

Vankomicin 5,0 mg
Trimethoprim 2,5 mg
Cefsulodin 2,5 mg
Amphotericin B 2,5 m

Brucella bujon (BD BBL Brucella Broth)

GENbox (BioMerieux) - Gas pak vrećice bez katalizatora za postizanje mikroaerofilne atmosfere.

Određivanje antimikrobne osjetljivosti

E testovi (BioMerieux- France)

Izolacija DNA

Komercijalni kit : „High Pure PCR Template Preparation Kit" Version 16,0
(Roche Diagnostics, Njemačka)

Lančana reakcija polimeraze

Početnice (SIGMA)

PCR Master Mix (Roche Diagnostics**)** - komercijalni set, sadrži PCR vodu i Master Mix, 2X. PCR Master Mix već pripremljena otopina u sastavu: *Taq* DNA Polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ i reakcijski pufer.

Detekcija produkata

Agaroza (2%) (Sigma

Agaroza 2 g otopiti u 100 ml 1x TAE pufera

TAE pufer 1x

Tris-HCl 0,04 M
NaCl 0,02 M
EDTA 2 mM
Na - acetat 0,02 MpH 8,3

Loading pufer *(**eng*. Loading Buffer) (Sigma)

Bromfenol plavo 0,25 %
Xilen cijanol 0,25%
Ficoll 400 u vodi 25%

DNA molekularni marker, (Roche Diagnostics)

Digestijom dobiveni fragmenti DNA razlike 100 parova baza

Etidij bromid

10 mg etidij-bromida na 1ml destilirane vode. Dugo otapati na mješalici dok nije sav otopljen. Čuvati na tamnom.

4.5. Medicinski uređaji i pribor

Lonci za anaerobnu inkubaciju Medias

Vortex Sarstedt

Automatske pipete Eppendorf Research

Centrifuga Abott

Termoblok Abott

Aparat za umnažanje DNK, GeneAmp® PCR Systems 97000, Applied Biosystems

Oprema za elektroforezu, Submarine Cosulich

Spektrofotometar, Metertech 960

4.6. Statistička analiza

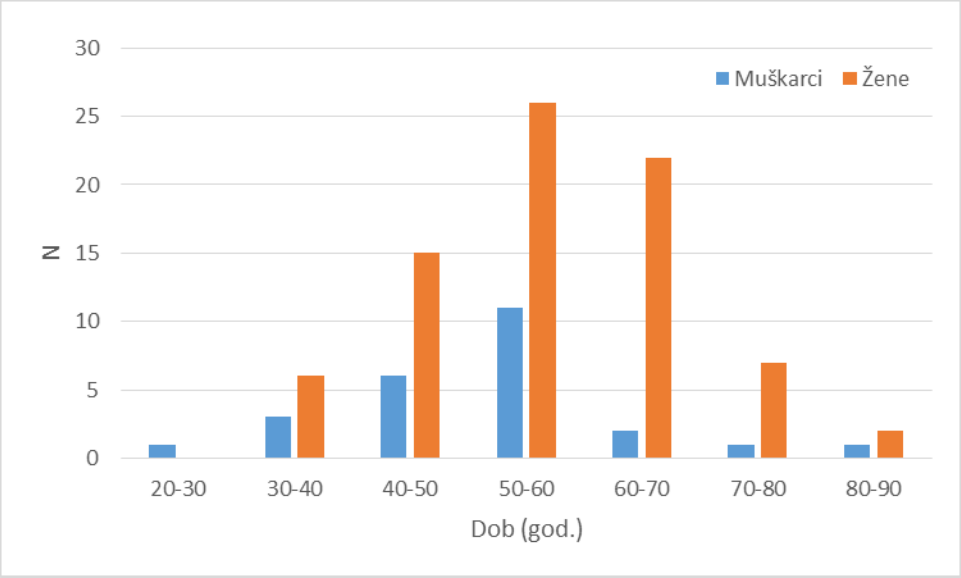
Statističke analize provedene su u statističkom programskom paketu STATISTICA verzija 12 (StatSoft Inc., OK, SAD), a grafički prikazi rezultata pripremljeni su u programu Excel® 2013 (Microsoft® Corporation, SAD). Kvalitativne/kategorijske varijable prikazane su kao broj i udio (%). Kvantitativne varijable prikazane su kao aritmetička sredina (AS) i standardna devijacija (SD). Usporedba među skupinama za kvalitativne varijable provedena je hi-kvadrat ($\chi 2$) testom ili Fisherovim egzakt testom ovisno o raspodjeli. Usporedba među skupinama za kvantitativne varijable provedena je Studentovim t-testom (t) ili Mann-Whitney U-testom (Z) ovisno o raspodjeli ili analizom varijance (ANOVA). Ocjena povezanosti među kvalitativnim varijablama provedena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (R) ili logističkom regresijskom analizom. Rezultat logističke regresijske analize prikazan je kao omjer šansi (OR) uz 95%-tni interval pouzdanosti. Statistički značajnima smatrani su rezultati svih analiza uz vjerojatnost manju od 5% ($P<0.05$).

5. REZULTATI

5.1. Opće značajke bolesnika

5.1.1. Bolesnici prema dobi i spolu

U ispitivanje su uključeni uzorci 103 bolesnika prosječne dobi (SD) 55.8 (±11.8) godina (raspon 28-81 godinu, Graf 1), od čega je 78 (80.34 %) bolesnika bilo ženskog spola, a 25 (25.75%) muškaraca. Nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli dobi ispitanika prema spolu iako su muškarci bili prosječno mlađi (muškarci, 52.4±12.2 god.; žene, 56.9±11.5 god.; t=1.674, P=0.097; Graf 1).



Graf 1. Raspodjela bolesnika prema dobi i spolu (N=103)

5.1.2. Bolesnici prema subjektivnim tegobama

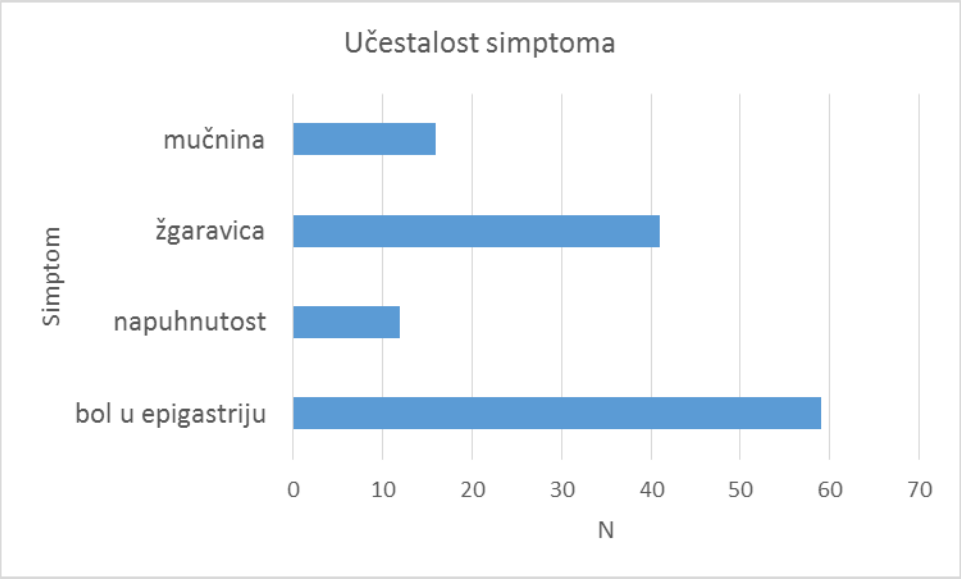
Od subjektivnih tegoba bolesnici su najčešće naveli bol u epigastriju (n=59), žgaravicu (n=39), mučninu (n=16) te napuhnutost (n=12), bilo kao jedan simptom ili u kombinaciji s preostala tri.

Od 103 bolesnika njih 4 navelo je tri simptoma, 19 bolesnika imalo je dva simptoma, a preostalih 80 navelo je samo jedan simptom.

Tablica 3 i Graf 2 prikazuju raspodjelu bolesnika prema subjektivnim tegobama.

Tablica 3. Raspodjela bolesnika prema subjektivnim tegobama

Subjektivne tegobe	**Broj (%)**
Bol u epigastriju	59 (57.3%)
Žgaravica	41 (39.8%)
Mučnina	16 (15.5%)
Napuhnutost	12 (11.7%)



Graf 2. Raspodjela bolesnika prema subjektivnim tegobama

5.1.3. Bolesnici prema endoskopski utvrđenim dijagnozama

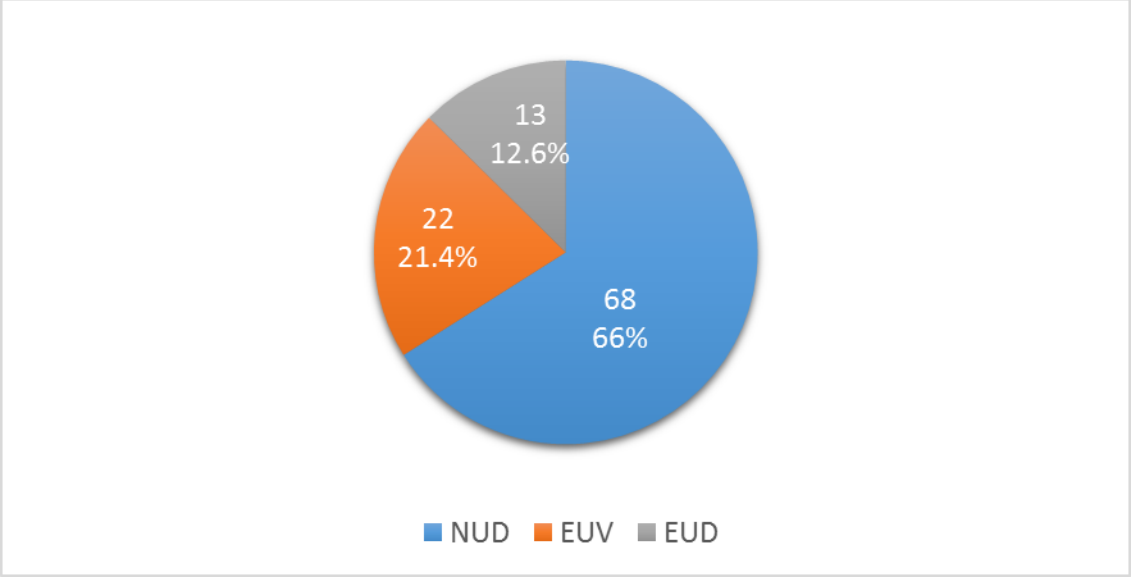
Neulkusnu dispepsiju (NUD) imalo je 68 (66.0%) bolesnika, erozije/ulkus želuca (EUV) 22 (21.4%), a erozije/ulkus duodenuma (EUD) 13 (12.6%) bolesnika.

Tablica 4 i Graf 3 prikazuju raspodjelu bolesnika prema endoskopski utvrđenim dijagnozama.

Tablica 4. Raspodjela bolesnika prema endoskopski utvrđenim dijagnozama (N=103)

Endoskopski utvrđena dijagnoza	Broj (%)
NUD	68 (66.0%)
EUV	22 (21.4%)
EUD	13 (12.6%)

NUD - neulkusna dispepsija, **EUV**-erozije/ulkus želuca, **EUD**-erozije/ulkus duodenuma



Graf 3. Raspodjela bolesnika prema endoskopski utvrđenim dijagnozama (N=103)

NUD - neulkusna dispepsija, **EUV**-erozije/ulkus želuca, **EUD**-erozije/ulkus duodenuma

5.1.4. Bolesnici prema patohistološkom nalazu sluznice želuca

Patohistološkom analizom sluznice želuca dobiveni su rezultati o zastupljenosti pojedinih stupnjeva histoloških parametara gastritisa (inflamacija, aktivnost, atrofija, gustoća *H. pylori,* metaplazija - klasificirano prema Sydneyskom sustavu) prikazani u Tablici 5.

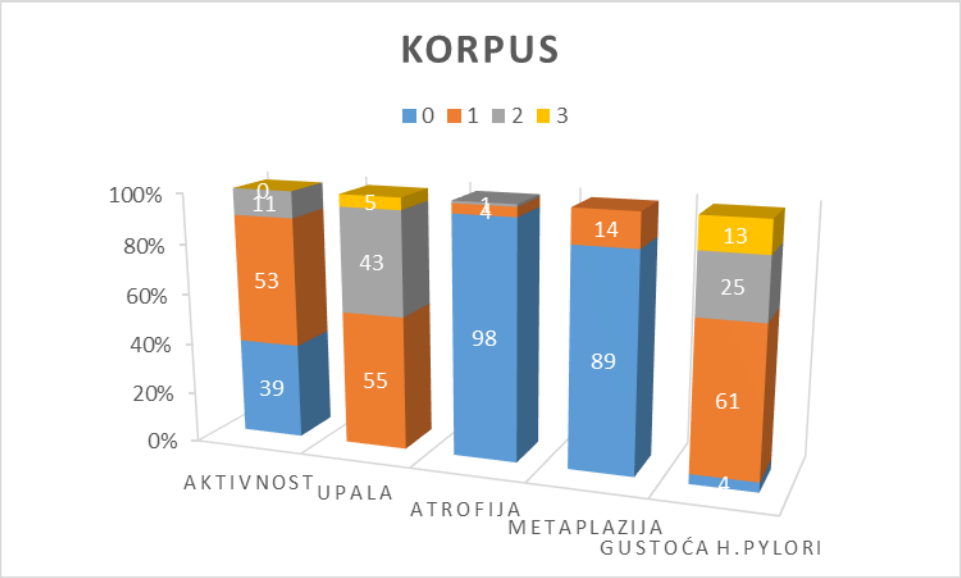
Tablica 5. Patohistološke karakteristike bolesnika (N=103)

	Karakteristike	Pozitivno	Skor	Broj (%)	AS (SD)
Antrum	Aktivnost	68 (66%)	0 1 2 3	35 (34.0) 50 (48.5) 15 (14.6) 3 (2.9)	
	Inflamacija	103 (100%)	1 2 3	35 (34.0) 65 (63.1) 3 (2.9)	
	Inflamatorni skor				2.5 (1.1)
	Atrofija	7 (6.8%)	0 1	96 (93.2) 7 (6.8)	
	Metaplazija*	25 (24.3%)	0 1	78 (75.7) 25 (24.3)	
	H. pylori	92 (89.3%)	0 1 2 3	11 (10.7) 33 (32.0) 34 (33.0) 25 (24.3)	
	Ukupni skor				4.5 (1.8)
Korpus	Aktivnost	64 (62.2 %)	0 1 2	39 (37.9) 53 (51.5) 11 (10.7)	
	Inflamacija	103 (100%)	1 2 3	55 (53.4) 43 (41.7) 5 (4.9)	
	Inflamatorni skor				2.2 (1.0)
	Atrofija	5 (4.9%)	0 1 2	98 (95.1) 4 (3.9) 1 (1.0)	
	Metaplazija*	14 (13.6%)	0 1	89 (86.4) 14 (13.6)	
	H. pylori	99 (96.1%)	0 1 2 3	4 (3.9) 61 (59.2) 25 (24.3) 13 (12.6)	
	Ukupni skor				**3.8 (1.5)**
Ukupni skor antrum+korpus					**8.4 (2.5)**

AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija,

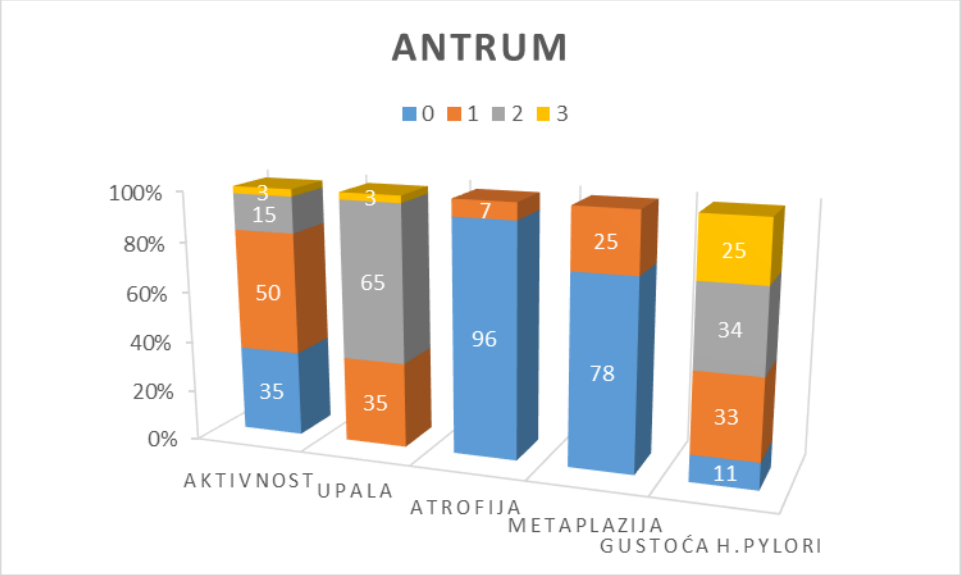
***** klasificirano prema Sydneyskom sustavu: metaplazija nije utvrđena=0, metaplazija=1.

U **korpusu** želuca inflamacija je bila prisutna u svih 103 (100%) bolesnika, pri čemu su najzastupljenije bile promjene prvog stupnja (55/103 bolesnika, 53.4 %), a drugog stupnja u 43/103 bolesnika (41.7%) te trećeg stupnja u 5/103 bolesnika (4.9%). Aktivnost upale bila je prisutna u 64/103 bolesnika (62.2%), pri čemu je prvi stupanj promjena bio najzastupljeniji (53/103 bolesnika, 51.5%), a drugi stupanj je imalo 11/103 bolesnika (10.7%). Atrofične promjene bile su prisutne u 5/103 (4.9%) bolesnika, a metaplazija u 14/103 bolesnika (13.6%) (Tablica 5 i Graf 4).



Graf 4. Raspodjela histoloških parametara u korpusu želuca (N=103)

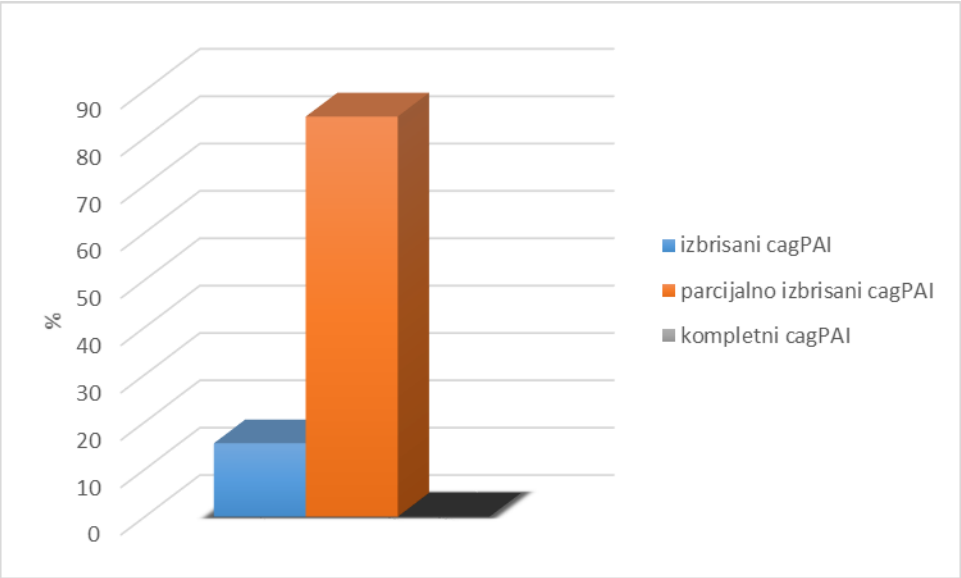
U **antrumu** želuca inflamacija je bila prisutna u svih 103 (100%) bolesnika, pri čemu su najzastupljenije bile promjene drugog stupnja (65/103 bolesnika, 48.5%), a prvog stupnja u 35/103 bolesnika (34.0%) te trećeg stupnja u 3/103 bolesnika (2.9%). Aktivnost upale bila je prisutna u 68/103 (66%) bolesnika pri čemu je prvi stupanj promjena bio najzastupljeniji (50/103 bolesnika, 48.5%). Atrofične promjene bile su prisutne u 7/103 (6.8%) bolesnika, a intestinalna metaplazija u 25/103 (24.3%) bolesnika (Tablica 5 i Graf 5).



Graf 5. Raspodjela histoloških parametara u antrumu želuca (N=103)

5.2. Učestalost i karakteristike *cag*PAI u *Helicobacter pylori* izolatima

Od 103 *H.pylori* izolata, 16 izolata (15.5%) je imalo izbrisani *cag*PAI, a 87 (84.5%) izolata parcijalno izbrisani *cag*PAI. Nijedan izolat nije posjedovao intaktni/kompletni *cag*PAI (Graf 6).

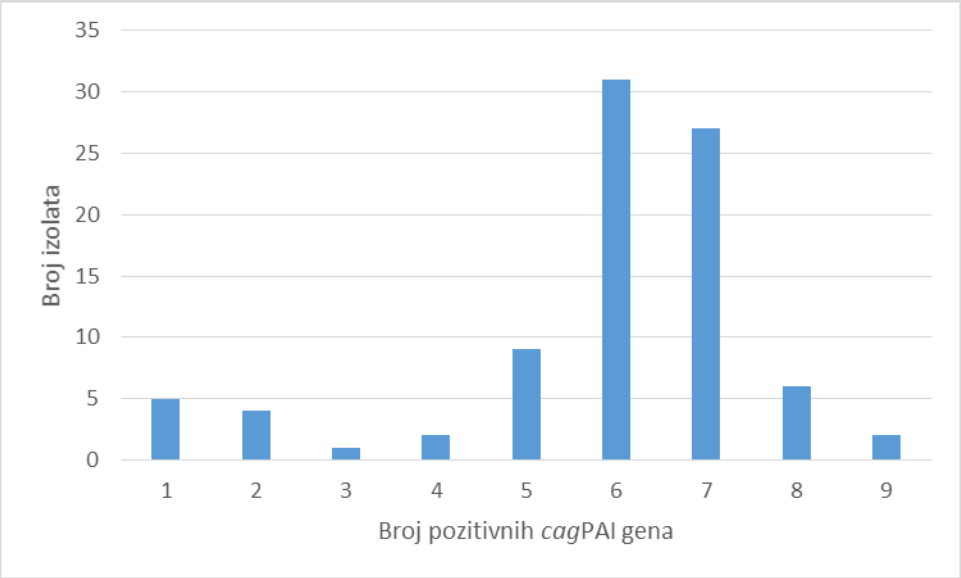


Graf 6. Učestalost *cag*PAI u *Helicobacter pylori* izolatima (N=103)

Analiza učestalosti broja gena po svakom pojedinom parcijalno izbrisanom *cag*PAI (n=87) pokazala je da je najviše bilo *cag*PAI sa 6 gena, zatim sa 7 gena, slijede sa 5, 8, 1, 2, 4, 9, 3 gena (Tablica 6, Graf 7).

Tablica 6. Učestalost broja gena u parcijalno izbrisanim *cag*PAI (n=87)

Broj izolata H.pylori	**Broj pozitivnih *cag*PAI gena**								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Broj (%)	5 (5.8%)	4 (4.6%)	1 (1.2%)	2 (2.3%)	9 (10.3%)	31 (35.6%)	27 (31.1%)	6 (6.9%)	2 (2.3%)



Graf 7. Distribucija broja gena u parcijalno izbrisanim *cag*PAI (n=87)

Analiza vrste gena po svakom pojedinačnom parcijalno izbrisanom *cag*PAI (n=87) pokazala je da najveći broj *cag*PAI, njih 24, ima kombinaciju slijedećih gena: *cagA1, cagA2, cagE, cagM, cagT, Apcag, LEC.* Slijedi 19 izolata s kombinacijom gena *cagA1*, *cagA2*, *cagE, cagM, cagT, Apcag;* 5 izolata s kombinacijom *cagA1, cagA2, cagE, cagM, cagT, LEC.* Ostale kombinacije gena zastupljene su u manjem broju (1-3) izolata (Tablica 7).

Tablica 7. Kombinacije gena u parcijalno izbrisanim *cag*PAI (n=87)

Pozitivni *cag*PAI geni	**Broj**	**%**
A1 A2 E M T Ap*cag LEC*	24	23.3
A1 A2 E M T Ap*cag*	19	18.4
A1 A2 E M T *LEC*	5	4.9
A1 A2 E M Ap*cag*	3	2.9
A1 A2 E M *tnpA* T Ap*cag LEC tnpB*	3	2.9
LEC	3	2.9
A1 A2 E M T	3	2.9
A1 A2 A3 E M T Ap*cag*	2	1.9
A1 A2 A3 E M T Ap*cag LEC*	2	1.9
A1 A2 E M T Ap*cag LEC tnpB*	2	1.9
A1 E M T Ap*cag LEC*	2	1.9
A1 A2 E M *tnpA* T Ap*cag LEC*	2	1.9
tnpA tnpB	2	1.9
A1 A3 E T *LEC*	1	1.0
A1 A2 E M Ap*cag LEC*	1	1.0
A1 A2 E M *tnpA* Ap*cag*	1	1.0
A1 T Ap*cag LEC*	1	1.0
E *tnpA tnpB*	1	1.0
A1 E	1	1.0
A1 A2 E M *LEC*	1	1.0
A2	1	1.0
A1	1	1.0
E M T *LEC*	1	1.0
A1 A2 M T Ap*cag LEC*	1	1.0
E	1	1.0
E *tnpA*	1	1.0
A2 E M T Ap*cag LEC*	1	1.0
A2 E M T Ap*cag*	1	1.0

A1-*cagA1*, A2-cagA2, E-*cagE*, M-*cagM*, T-*cagT*, A3- *cagA3*

5.3. Karakteristike bolesnika prema tipu *cag*PAI

Tablica 8. prikazuje razdiobu bolesnika prema spolu, dobi i simptomima u odnosu na izbrisani i parcijalno izbrisani *cag*PAI.

Tablica 8. Bolesnici prema tipu *cag*PAI

		Izbrisani *cag*PAI	Parcijalno izbrisani *cag*PAI	Statistika
		16 (15.5%)	87 (84.5%)	
Spol	Muškarci Žene	4 (16%) 12 (15.4%)	21 (84%) 66 (84.6%)	χ2=0.005 P=0.941
Dob (god.)	AS±SD	55.2±15.5	55.9±11.1	t=0.225, P=0.822
Simptomi	bol u epigastriju napuhnutost žgaravica mučnina	10 (62.5%) 1 (6.3%) 7 (43.8%) 4 (25%)	49 (56.3%) 11 (12.6%) 34 (49.1%) 12 (13.8%)	χ2=0.211, P=0.646 χ2=0.537, P=0.464 χ2=0.123, P=0.726 χ2=1.294, P=0.255

AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija.

Iz Tablice 8 je vidljivo da statističkom obradom nije utvrđena statistički značajna razlika za raspodjelu tipa *cag*PAI prema spolu (χ2=0.005, df=1, p=0.941) ili prema subjektivnim simptomima (P>0.250 za sve simptome). Nije utvrđena niti statistički značajna razlika u dobi bolesnika prema tipu *cag*PAI (t=0.225, P=0.822).

5.4. Endoskopske dijagnoze prema tipu *cag*PAI

Najviše izbrisanih *cag*PAI bilo je u skupini bolesnika s neulkusnom dispepsijom 9 (13.2%), a najmanje u bolesnika s erozijom/ulkusom dudenuma 2 (15.4%). Bolesnici s neulkusnom dispepsijom imali su i najviše parcijalno izbrisanih *cag*PAI 59 (86.8%) (Tablica 9).

Tablica 9. **Raspodjela endoskopskih dijagnoza prema tipu *cag*PAI**

Endoskopska dg	Parcijalno izbrisani *cag*PAI	Izbrisani *cag*PAI
EUV 22 (21.4%)	17 (77.3%)	5 (22.7%)
EUD 13 (12.6%)	11 (84.6%)	2 (15.4%)
ND 68 (66.0%)	59 (86.8%)	9 (13.2%)

NUD- neulkusna dispepsija, **EUV**-erozije/ulkus želuca, **EUD**-erozije/ulkus duodenuma

Statističkom obradom nije utvrđena statistički značajna razlika raspodjele tipa *cag*PAI prema endoskopskim dijagnozama ($\chi 2=1.142$, df=2, p=0.565; Tablica 9).

5.5. Patohistološke promjene želučane sluznice prema tipu *cag*PAI

U Tablici 10 prikazana je distribucija izbrisanog *cag*PAI i parcijalno izbrisanog *cag*PAI u sklopu patohistoloških promjena želučane sluznice antruma i korpusa.

U antrumu želuca inflamacija je prisutna u svih 103 (100%) bolesnika, pri čemu je parcijalno izbrisani *cag*PAI najzastupljeniji u bolesnika s upalnim promjenama drugog stupnja, 56/87 bolesnika (64.4%), prvog stupnja u 28/87 bolesnika (32.2%) i trećeg stupnja u manjem broju bolesnika, 3/87 (3.4%).

Aktivnost upale prisutna je u 68/103 (66%) bolesnika, pri čemu je parcijalno izbrisani *cag*PAI najzastupljeniji u bolesnika s prvim stupnjem aktivnosti upale 33/87 (37.9%).

Atrofične promjene prisutne su u 5/87 (5.7%) bolesnika s parcijalno izbrisanim *cag*PAI, a intestinalna metaplazija u 22/87 (25.3%) bolesnika s parcijalno izbrisanim *cag*PAI (Tablica 10).

U korpusu želuca inflamacija je prisutna u svih 103 (100%) bolesnika, pri čemu je parcijalno izbrisani *cag*PAI najzastupljeniji u bolesnika s upalnim promjenama prvog stupnja, 45/87 (51.7%) bolesnika, slijedi parcijalno izbrisani *cag*PAI u promjenama drugog stupnja u 37/87 (42.5%) bolesnika i u 5/87 (5.7%) bolesnika s promjenama trećeg stupnja.

Aktivnost upale je prisutna u 64/103 (62.2%) bolesnika pri čemu je parcijalno izbrisani *cag*PAI najzastupljeniji u bolesnika s prvim stupnjem aktivnosti upale, 46/87 (52.9%) bolesnika. Drugi stupanj aktivnosti imalo je 9/87 (10.3%) bolesnika s parcijalno izbrisanim *cag*PAI (Tablica 10).

Atrofične promjene 1 i 2 stupnja prisutne su u 4/87 (4.5%) bolesnika s parcijalno izbrisanim *cag*PAI, a intestinalna metaplazija u 12/87 (13.8%) bolesnika s parcijalno izbrisanim *cag*PAI (Tablica 10).

Iz Tablice 8 je vidljivo da nije utvrđena statistički značajna razlika patohistoloških promjena između bolesnika s izbrisanim *cag*PAI i onih s parcijalno izbrisanim *cag*PAI ($p>0.05$ za sve varijable koje opisuju patohistološke promjene).

Tablica 10. Patohistološke promjene želučane sluznice prema tipu *cag*PAI

	Karakteristike	Skor	Izbrisani *cagPAI*	Parcijalno Izbrisani *cagPAI*	Statistika
Antrum	Aktivnost	0 1 2 3	2 (12.5) 11 (68.7) 3 (18.8)	33 (37.9) 39 (44.8) 12 (13.8) 3 (3.4)	Z=1.347, P=0.178
	Inflamacija	1 2 3	7 (43.8) 9 (56.2)	28 (32.2) 56 (64.4) 3 (3.4)	Z=0.851, P=0.395
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.6±1.0	2.5±1.1	t=0.331, P=0.741
	Atrofija	0 1	14 (87.5) 2 (12.5)	82 (94.3) 5 (5.7)	Z=0.423, P=0.672
	Metaplazija	0 1	13 (81.3) 3 (18.7)	65 (74.7) 22 (25.3)	Z=0.410, P=0.682
	H. pylori	0 1 2 3	3 (18.7) 4 (25) 6 (37.5) 3 (18.7)	8 (9.2) 29 (33.3) 28 (32.2) 22 (25.3)	Z=0.542, P=0.588
	Ukupni skor	AS±SD	4.5±1.8	4.6±1.8	t=0.108, P=0.915
Korpus	Aktivnost	0 1 2	7 (43.7) 7 (43.7) 2 (12.5)	32 (36.8) 46 (52.9) 9 (10.3)	Z=0.305, P=0.760
	Inflamacija	1 2 3	10 (62.5) 6 (37.5)	45 (51.7) 37 (42.5) 5 (5.7)	Z=0.815, P=0.415
	Inflamatorni skor		2.1±1.0	2.3±1.0	t=0.754, P=0.453
	Atrofija	0 1 2	15 (93.7) 1 (6.3)	83 (95.4) 3 (3.4) 1 (1.1)	Z=0.096, P=0.924
	Metaplazija	0 1	14 (87.5) 2 (12.5)	75 (86.2) 12 (13.8)	Z=0.077, P=0.938
	H. pylori	0 1 2 3	1 (6.3) 13 (81.2) 1 (6.3) 1 (6.3)	3 (3.4) 48 (55.2) 24 (27.6) 12 (13.8)	Z=1.812, P=0.070
	Ukupni skor	AS±SD	3.4±1.6	4.0±1.5	t=1.382, P=0.170
Ukupni skor antrum+korpus		AS±SD	7.9±1.8	8.5±1.8	t=0.919, P=0.360

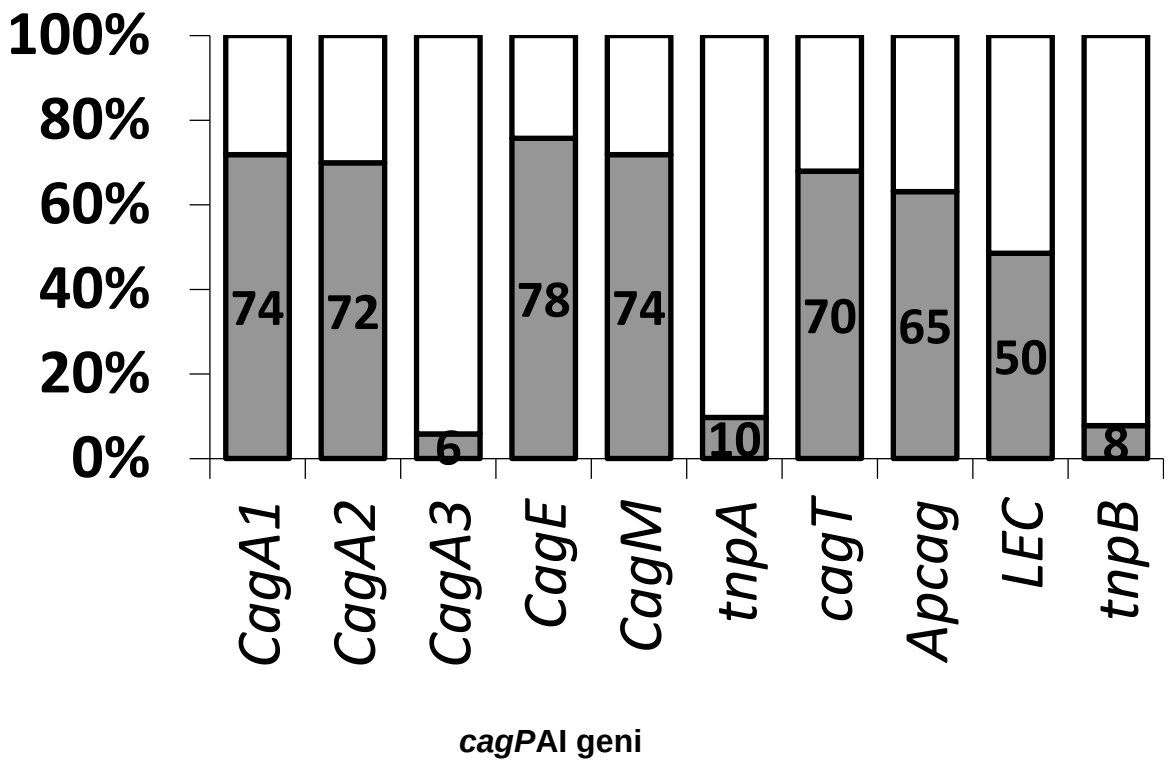
AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija.

5.6. Učestalost *cag*PAI gena u *Helicobacter pylori* izolatima

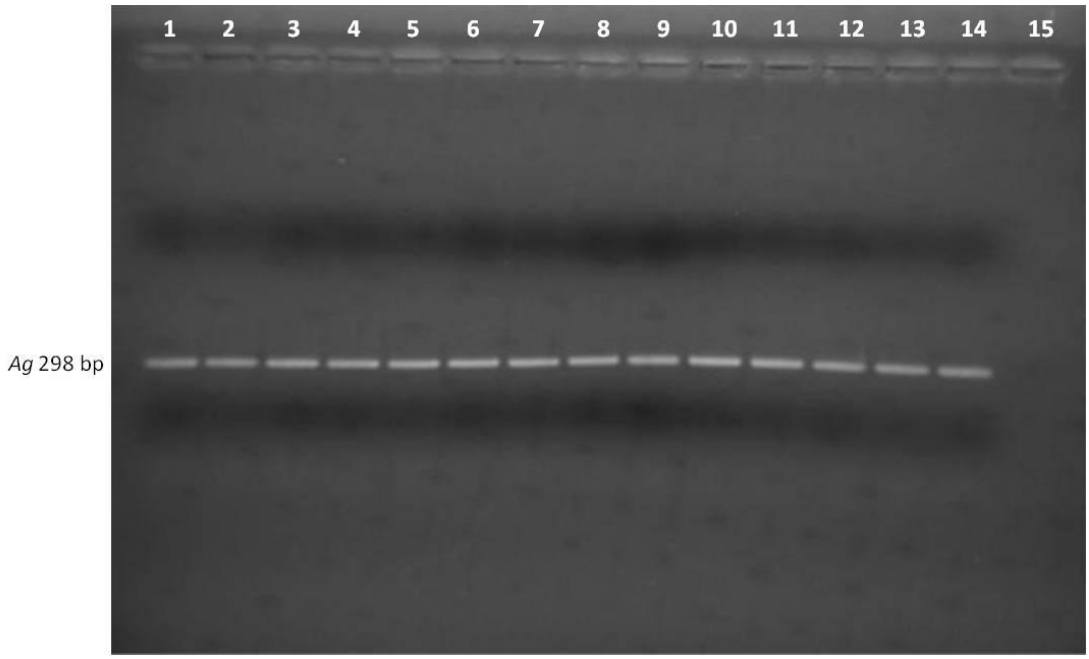
PCR metodom detekcije *Ag* gena potvrđena je identičnost *H. pylori* DNA u svih 103 izolata (Slika 1). Utvrđena je pojedinačna učestalost *cag*PAI gena: *cagA1* 71.8%, *cagA2* 69.9%, *cagA3* 5.8%, *cagE* 75.7%, *cagM* 71.8%, *tnpA* 9.7% *cagT* 68.0%, *Apcag* 63.1%, *LEC* 48.5% i *tnpB* 6.3% (Tablica 11, Graf 8, Slike 2-8).

Tablica 11. Učestalost *cag*PAI gena

Geni	*Cag A1*	*Cag A2*	*Cag A3*	*Cag E*	*Cag M*	*tnpA*	*Cag T*	Apcag	*LEC*	*tnpB*
Pozitivno	71.8%	69.9%	5.8%	75.7%	71.8%	9.7%	68.0%	63.1%	48.5%	6.3%
Negativno	28.2%	30.1%	94.2%	24.3%	28.2%	90.3%	32.0%	36.9%	51.5%	93.7%
Ukupno	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

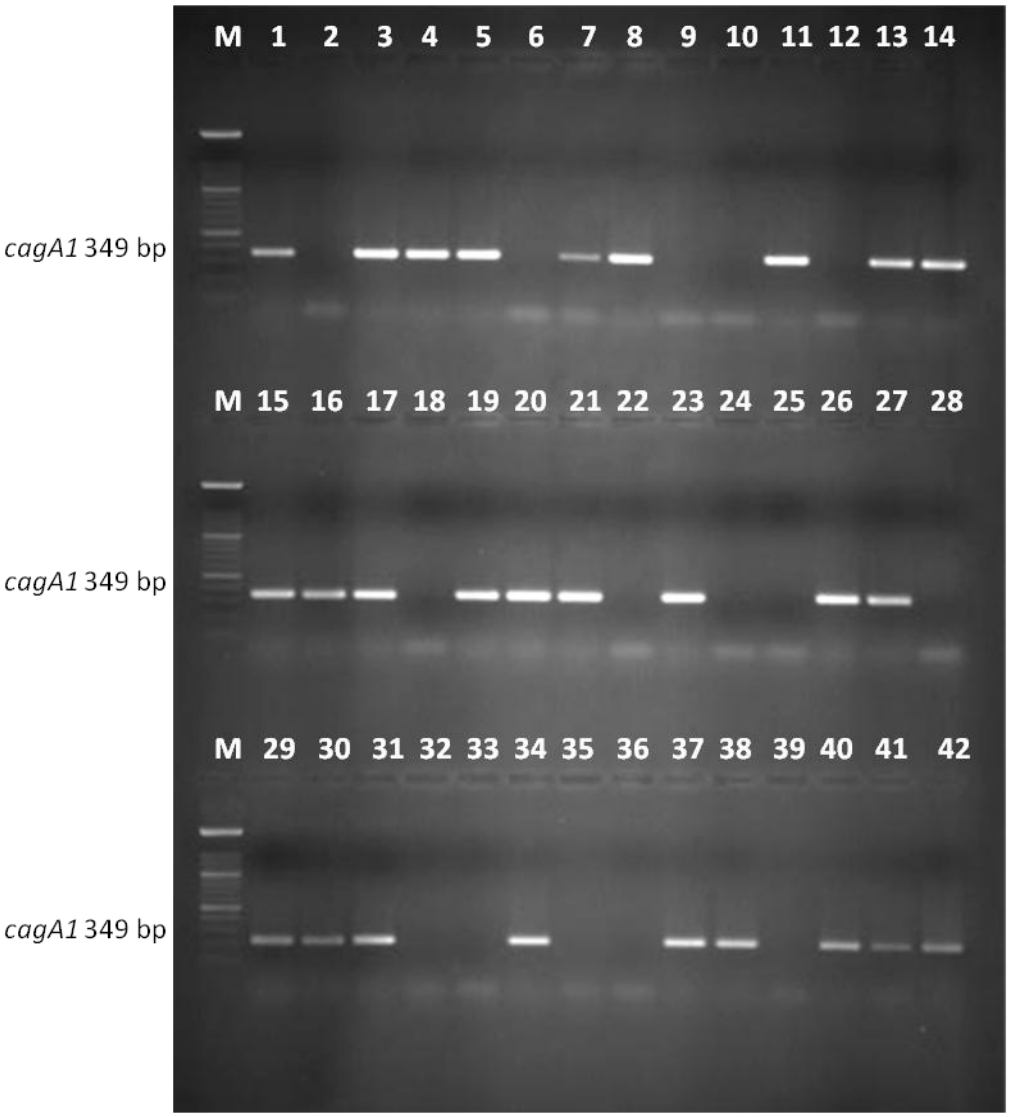


Graf 8. Raspodjela *H. pylori* izolata prema izoliranim genima virulencije



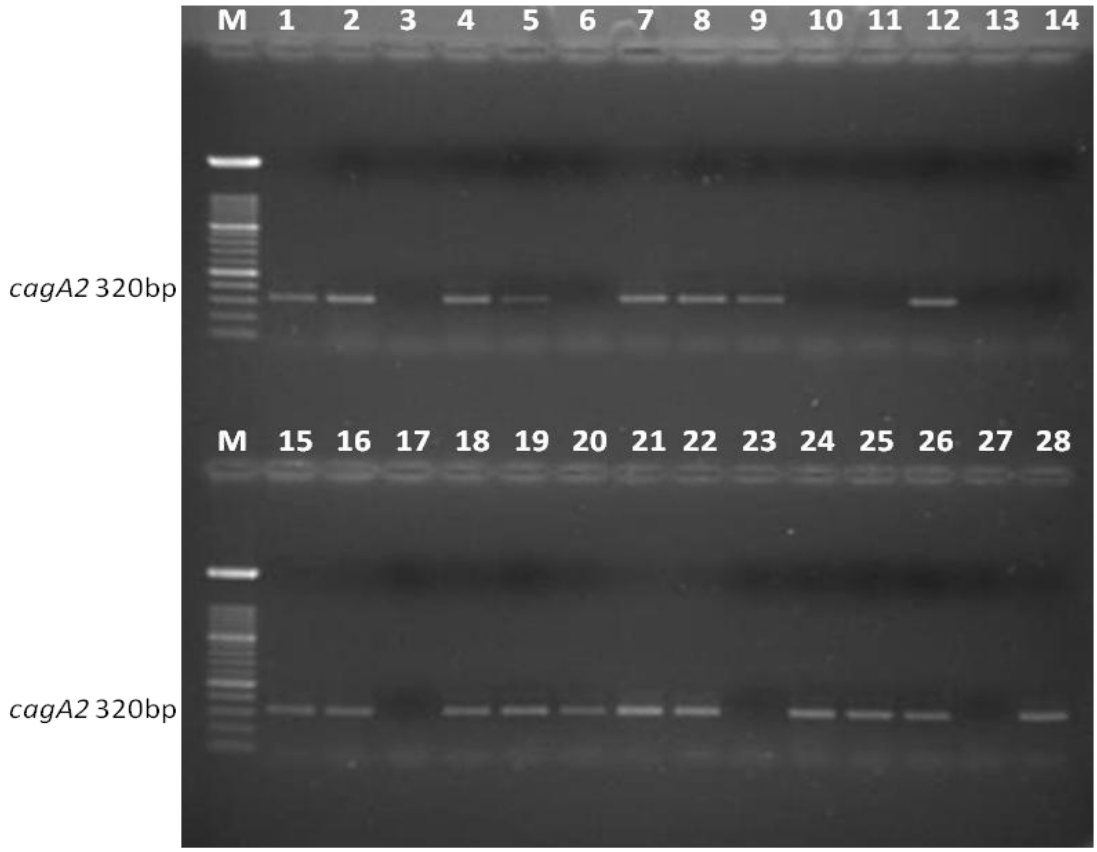
Linije 1-14 izolati *H. pylori*, linija 15 negativna kontrola (sterilna destilirana voda)

Slika 1. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *Ag* gena (298pb) prisutnog u svih *H. pylori* sojeva (pozitivna kontrola)



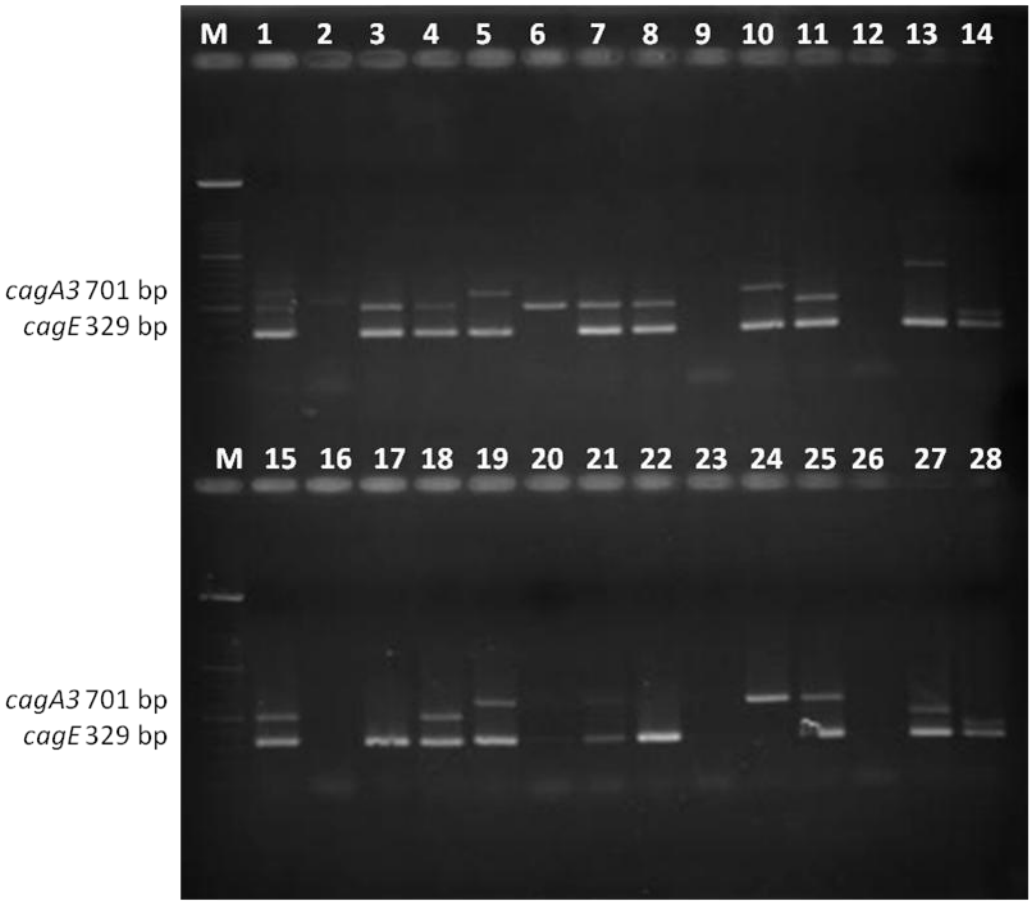
Linija 1 M – DNA marker, linije 1,15, 29
pozitivna kontrola (CCUG 17874), linije 3-5, 11, 13, 14, 16, 17,19-21, 23, 26, 27, 30, 31, 34, 37, 38, 40-42 pozitivna amplifikacija *cagA1* (349 bp)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 2. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *cagA1* gena (349 bp)



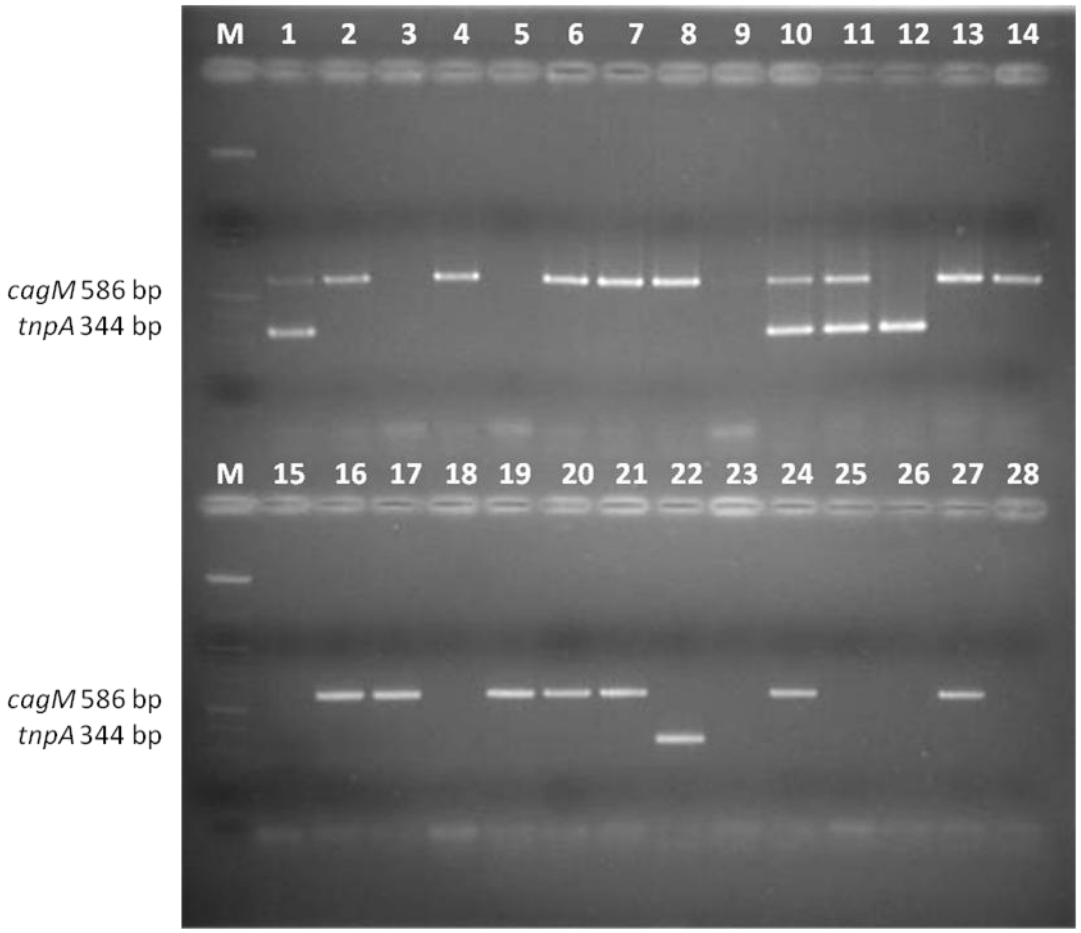
Linija 1 M - DNA marker, linije 1,15 pozitivna kontrola (CCUG 17874), linije 2, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 28 pozitivna amplifikacija *cagA2* (320bp)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 3. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *cagA2* gena(320 bp)



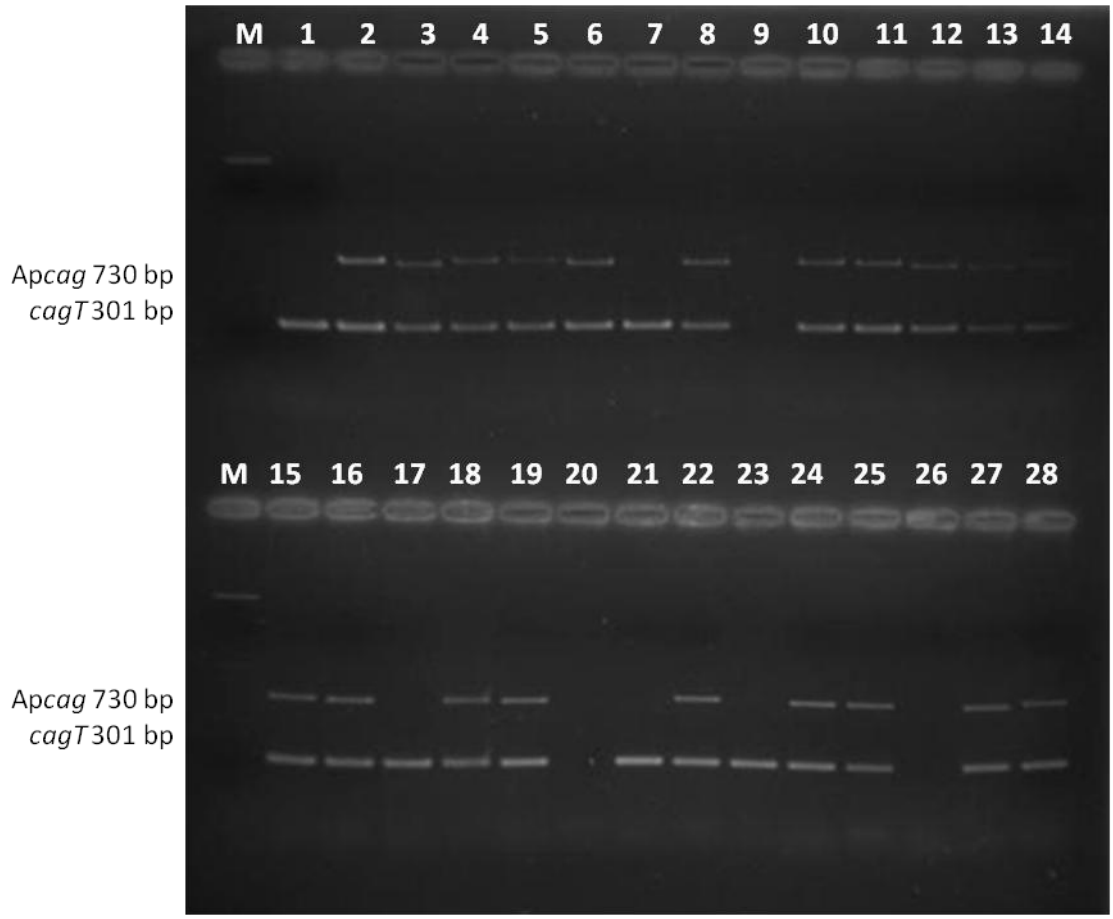
Linija 1 M – DNA marker, linije 14, 28 pozitivna kontrola (CCUG 17874) za *cagE*, linije 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13 pozitivna amplifikacija *CagE* (329 bp); linije 14, 28 negativna kontrola za *cagA3*, linije 13 pozitivna amplifikacija *cagA3* (701 bp)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 4. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *cagA3* i *cagE* gena (701 i 329 bp)



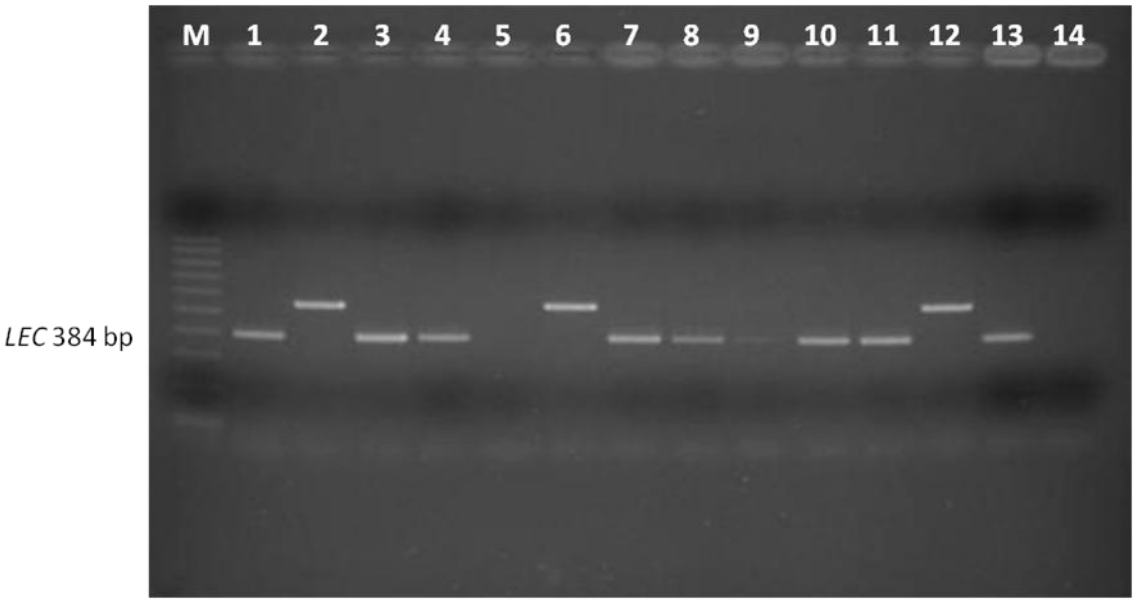
Linija 1 M – DNA marker, linije 1, 2 pozitivna kontrola (CCUG 17874, 47164) za *cagM*, linije 4, 6, 7, 8, 10, 11, 13, 14 pozitivna amplifikacija *CagM* (586bp); linija 1 pozitivna kontrola (CCUG 17834), linija 2 negativna kontrola (CCUG 47164) za *tnpA* gen, linije 10-12, 22 pozitivna amplifikacija *tnpA* (344 bp)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 5. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *cagM* i *tnpA* gena (586 i 344 bp)



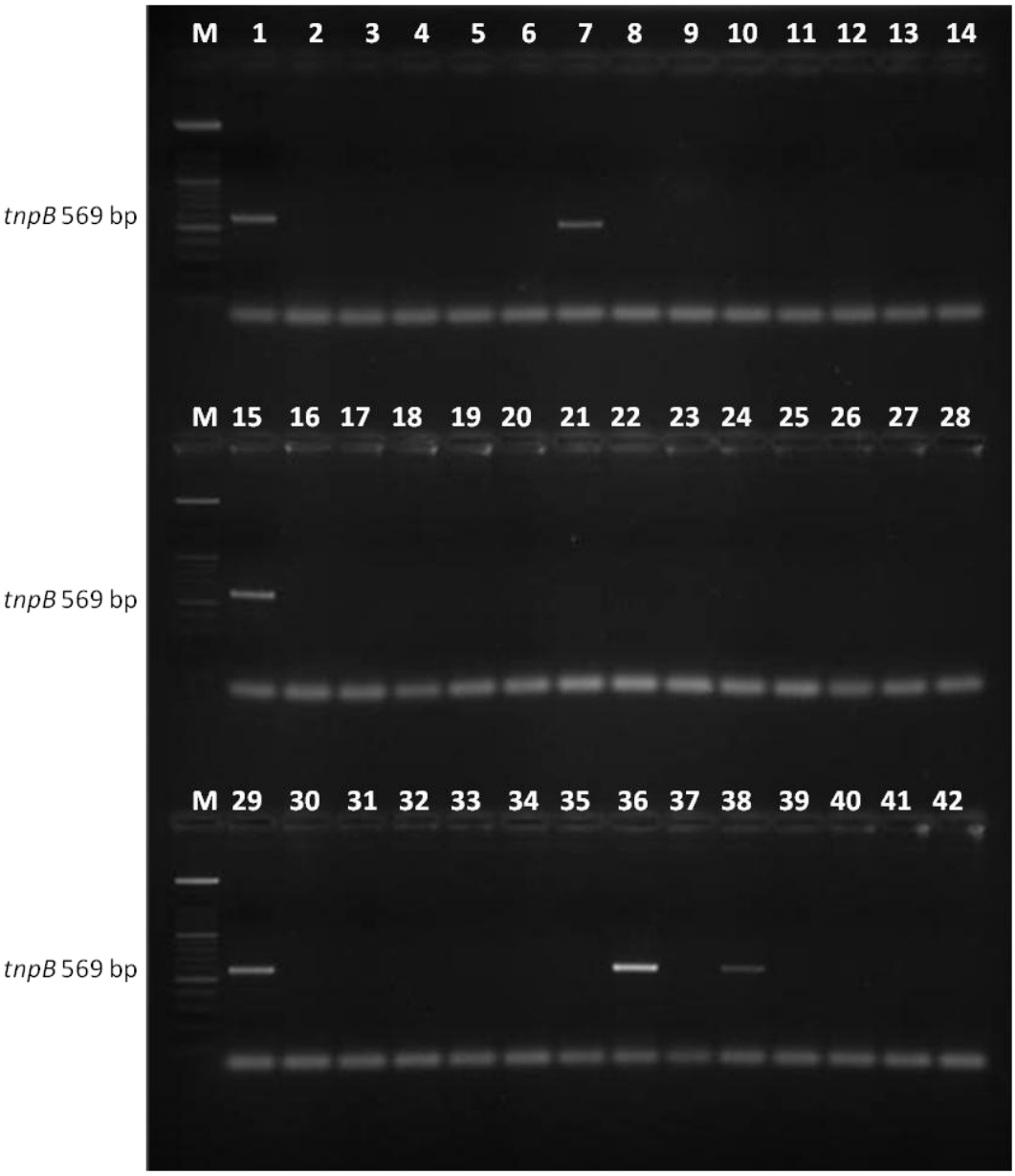
Linija 1 M – DNA marker, linije 13, 14, 27, 28 pozitivna kontrola (CCUG 17874, 47164), linije 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 22, 24, 25 pozitivna amplifikacija Ap*cag*; linije 1-8, 10-12, 15-19, 21-25 pozitivna amplifikacija *cagT* (301 pb)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 6. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju Ap*cag* i *cagT* gena (730 i 301 bp)



Linija 1 M – DNA marker, linija 13 pozitivna kontrola (CCUG 17874), linija 14 negativna kontrola (CCUG 47164), linije 1, 3, 4, 7, 8, 10, 11 pozitivna amplifikacija *LEC* (384 pb)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 7. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *LEC* gena (384 bp)



Linija 1 M – DNA marker, linije 1, 15, 29 pozitivna kontrola (CCUG 17874), linije 7, 36, 38 pozitivna ampflikacija *tnpA* (569 pb)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 8. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *tnpB* gena (569 bp)

5.7. Usporedba *cag*PAI gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice

Usporedbom rezultata dobivenih PCR metodom o prisustvu *cag*PAI gena i patohistološkog nalaza gastritisa sluznice korpusa i antruma (klasificiranog prema Sydneyskom sustavu) želuca dobiveni su rezultati u Tablici 12.

Prisustvo ***CagA2*** statistički značajno povećava rizik za viši stupanj inflamacije antruma ($\chi2=6.872$, df=2, P=0.032; OR za stupanj 2/3 prema stupnju 1=2.941, 95% CI 1.216-7.217), za značajno veću gustoću *H. pylori* u korpusu ($\chi2=16.700$, df=3, P=0.001; OR za stupanj 2/3 prema stupnju 0/1 = 15.02, 95% CI 4.558-67.12) te za veći ukupni skor za korpus (*CagA2*+ AS±SD, 4.1±1.5; *CagA2*- 3.3±1.4; t=2.687, P=0.008; OR za jediničnu promjenu = 3.841, 95% CI 1.531-9.638; Tablica 12).

Prisustvo ***CagM*** statistički značajno povećava rizik za značajno veću gustoću *H. pylori* u korpusu ($\chi2=9.864$, df=3, P=0.020; OR za stupanj 2/3 prema stupnju 0/1 = 8.665, 95% CI 2.621-38.73) te za veći ukupni skor za korpus (*CagM*+ AS±SD, 4.1±1.6; *CagA2*- 3.4±1.4; t=2.021, P=0.046; OR za jediničnu promjenu = 3.259, 95% CI 1.293-8.215; Tablica 12).

Prisustvo ***CagT*** i ***LEC*** statistički značajno smanjuju rizik za atrofiju u antrumu (*cagT,* $\chi2=5.352$, df=1, P=0.021, OR=0.165, 95% CI 0.030-0.918; *LEC*, $\chi2=7.085$, df=1, P=0.008, OR=0, 95% CI 0-0.524; Tablica 12).

Prisustvo **Apc*ag*** statistički je značajno povećava rizik za viši inflamatorni skor antruma (Apc*ag*+ AS±SD, 2.7±1.1; Apc*ag*- 2.2±1.0; t=2.283, P=0.025; OR za jediničnu promjenu = 2.448, 95% CI 1.285-26.008) te za veći ukupni skor za antrum (Apc*ag*+ AS±SD, 4.9±1.7; Apc*ag*- 4.0±1.7; t=2.332, P=0.022; OR za jediničnu promjenu = 2.349, 95% CI 1.027-5.374; Tablica 12).

Tablica 12 prikazuje samo statistički značajne gene.

Tablica 12. Usporedba *cag*PAI gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice

Patohistologija				**Statistika**	**OR (95% CI) za jediničnu promjenu i promjenu stupnja**
	Stupanj	**Negativno**	**Pozitivno**		
CagA2					
Inflamacija, antrum	1 2 3	16 15 0	19 50 3	χ2=6.872, P=0.032	2.941 (1.216-7.217) za stupanj 2/3 vs. 1
H. pylori, korpus	0 1 2 3	3 25 1 2	1 36 24 11	χ2=16.700, P=0.001	15.02 (4.558-67.12) za stupanj 2/3 vs. 0/1
Ukupni skor, korpus	AS±SD	3.3±1.4	4.1±1.5	t=2.687, P=0.008	3.841 (1.531-9.638)
CagM					
H. pylori, korpus	0 1 2 3	1 24 2 2	3 37 23 11	χ2=9.864, P=0.020	8.665 (2.621-38.73) za stupanj 2/3 vs. 0/1
Ukupni skor, korpus	AS±SD	3.4±1.4	4.1±1.6	t=2.021, P=0.046	3.259 (1.293-8.215)
cagT					
Atrofija, antrum	0 1	28 5	68 2	χ2=5.352, P=0.021	0.165 (0.030-0.918)
Ap*cag*					
Inflamatorni skor, antrum	AS±SD	2.2±1.0	2.7±1.1	t=2.283, P=0.025	2.448 (1.285-26.008)
Ukupni skor, antrum	AS±SD	4.0±1.7	4.9±1.7	t=2.332, P=0.022	2.349 (1.027-5.374)
LEC					
Atrofija, antrum	0 1	46 7	50 0	P=0.016*	0 (0-0.524)

*Fisherov egzakt test, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija.

5.8. Usporedba *cag*PAI gena s endoskopski utvrđenim dijagnozama

Usporedbom rezultata dobivenih PCR metodom o prisustvu *cag*PAI gena: *cagA1, cagA2, cagA3, cagE, cagM, tnpA, cagT,* Ap*cag, LEC, tnpB* i endoskopski utvrđene dijagnoze dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 13.

CagA1, cagA2, cagE, cagT, cagM, tnpA, tnpB, Ap*cag, LEC* najzastupljeniji su u bolesnika s endoskopski utvrđenom dijagnozom neulkusne dispepsije (NUD), 50/74, 48/72, 52/78, 48/74, 9/10, 6/8, 41/65, 34/50; susljedno. *CagA3* je jednakomjerno raspoređen, po 2/6 u sve tri skupine bolesnika. Kod bolesnika s endoskopski utvrđenom dijagnozom erozije/ulkus želuca nije detektiran ni jedan *tnpA* (0/10) i t*npB* gen (0/8).

Nije utvrđena statistički značajna povezanost prisutnosti niti jednog od 10 *cag*PAI gena s endoskopskom dijagnozom ($p>0.16$ za sve *cag*PAI gene).

Tablica 13. Prisustvo pozitivnog nalaza gena *cag*PAI prema endoskopski utvrđenoj dijagnozi

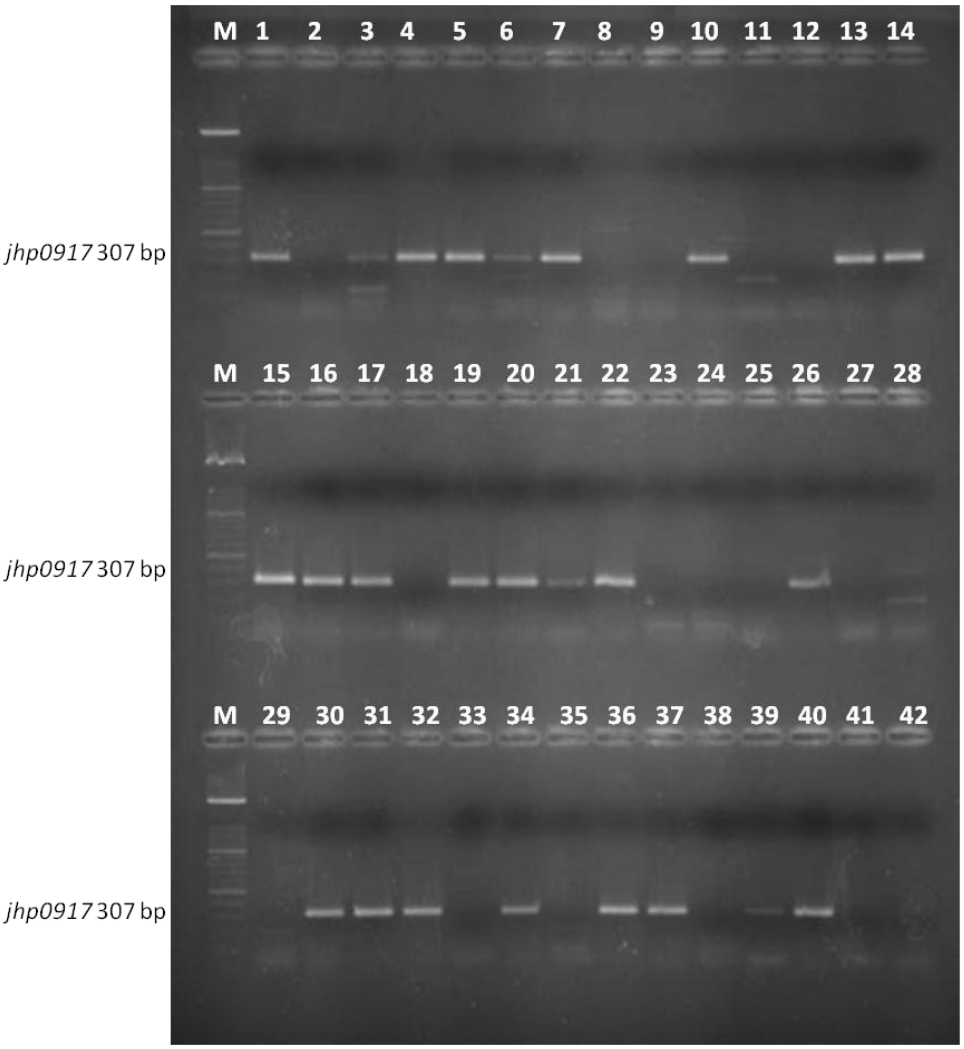
*cag*PAI gen	Endoskopska dijagnoza	Pozitivan	Negativan	Statistika
CagA1	NUD EUV EUD	50 (73.5%) 15 (68.2%) 9 (69.2%)	18 (26.5%) 7 (31.8%) 4 (30.8%)	χ2=0.285, P=0.867
CagA2	NUD EUV EUD	48 (70.6%) 15 (68.2%) 9 (69.2%)	20 (29.4%) 7 (31.8%) 4 (30.8%)	χ2=0.049, P=0.976
CagA3	NUD EUV EUD	2 (2.9%) 2 (9.1%) 2 (15.4%)	66 (97.1%) 20 (90.9%) 11 (84.6%)	χ2=3.624, P=0.163
CagE	NUD EUV EUD	52 (76.5%) 17 (77.3%) 9 (69.2%)	16 (23.5%) 5 (22.7%) 4 (30.8%)	χ2=0.348, P=0.841
CagM	NUD EUV EUD	48 (70.6%) 17 (77.3%) 9 (69.2%)	20 (29.4%) 5 (22.7%) 4 (30.8%)	χ2=0.417, P=0.812
tnpA	NUD EUV EUD	9 (13.2%) 0 (0%) 1 (7.7%)	59 (86.8%) 22 (100%) 12 (92.3%)	χ2=3.391, P=0.184
CagT	NUD EUV EUD	44 (64.7%) 17 (77.3%) 9 (69.2%)	24 (35.3%) 5 (22.7%) 4 (30.8%)	χ2=1.217, P=0.544
Apc*ag*	NUD EUV EUD	41 (60.3%) 16 (72.7%) 8 (61.5%)	27 (39.7%) 6 (26.3%) 5 (38.5%)	χ2=1.119, P=0.571
LEC	NUD EUV EUD	34 (50%) 8 (36.4%) 8 (61.5%)	34 (50%) 14 (63.6%) 5 (38.5%)	χ2=2.243, P=0.326
tnpB	NUD EUV EUD	6 (2.9%) 0 (0%) 2 (15.4%)	62 (91.2%) 22 (100%) 11 (84.6%)	χ2=3.012, P=0.222

NUD- neulkusna dispepsija, **EUV**-erozije/ulkus želuca, **EUD**-erozije/ulkus duodenuma

5.9. *DupA gen* u *Helicobacter pylori* izolatima

5.9.1. Učestalost *dupA* gena

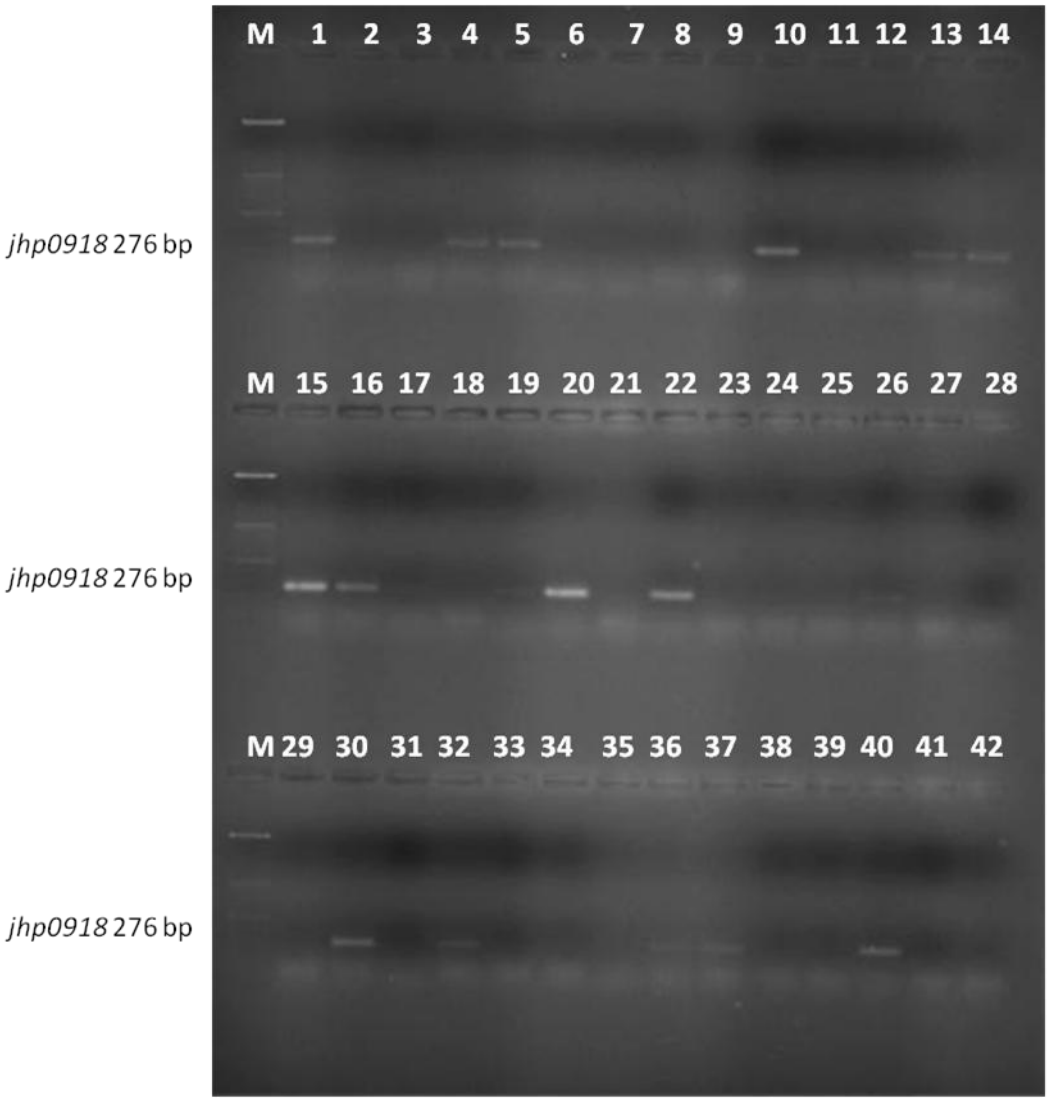
PCR metodom detektirano je 35 (34.0%) *dupA* gena u izolatima *H. pylori*. *DupA* gen proglasili smo pozitivnim uz *jhp0917* pozitivan i *jhp0918* pozitivan status (Slika 9, 10).



.

Linija 1- DNA marker, linija 1 pozitivna kontrola (CCUG 47164) linija 2 negativna kontrola (CCUG 17874), linije 3-7, 10, 13, 14, 15-17,19-22, 26, 30-32, 34, 36, 37, 40 pozitivna amplifikacija *jhp0917* (307 pb)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 9. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *jhp0917* gena (307 bp)



Linija 1- DNA marker, linija 1 pozitivna kontrola (CCUG 47164) linija 2 negativna kontrola (CCUG 17874), linije 4, 5, 10, 13- 15, 16, 20, 22, 30, 32, 36, 37, 40 pozitivna amplifikacija *jhp0918* (276pb)
CCUG – Culture Collection University of Gothenburg

Slika 10. Agarozni gel s produktima PCR reakcije amplifikacije sa začetnicama za detekciju *jhp0918* gena (276 bp)

Pedeset i šest (54%) od 103 izolata je negativno na oba gena (jhp0917/jhp0918). Ostatak 11 (10.7%) izolata je bilo jhp0917-pozitivano/jhp0918-negativano i 1 (1%) izolat je jhp0917-negativan/jhp0918-pozitivan (Tablica 14).

Tablica 14. Odnos gena *jhp0917* i *jhp0918*

	jhp0918 neg.	***jhp0918*** poz.
***jhp0917* neg**.	56 (54.4%)	1 (1%)
***jhp0917* poz**.	11 (10.7%)	35 (34%)

Iz Tablice 14 je vidljivo da je prisutnost *jhp0917* i *jhp0918* bila statistički značajno usko povezana (Spearman rang R=0.775, P<0.001)

5.9.2. Karakteristike bolesnika inficiranih s *dupA* pozitivnim ili *dupA* negativnim *H. pylori*

Tablica 15 prikazuje raspodjelu bolesnika prema spolu, dobi, simptomima i endoskopskoj dijagnozi u odnosu na prisutnost *dupA* gena.

Od 35 detektiranih *dupA* gena, 28 žena i 7 muškaraca ima *dupA.* Vezano uz simptome, najviše *dupA* pozitivnih bolesnika žalilo se na bol u epigastriju, njih 19/35.

Raspodjela *dupA* po endoskopski utvrđenim dijagnozama bila je slijedeća: 28/35 NUD i 7/35 EUV. Ni jedan bolesnik s EUD nije imao pozitivan *dupA* gen.

Učestalost *dupA* gena je statistički značajno različita (p=0.016) obzirom na endoskopsku dijagnozu, najveća je u NUD (28/68), usporediva je u EUV (7/22) te je nema u EUD (0/13).

Iz Tablice 15 je vidljivo da statističkom obradom nije utvrđena statistički značajna razlika za prisustvo *dupA* gena prema spolu ($\chi 2=0.526$, P=0.468) ili prema subjektivnim simptomima (P>0.410 za sve simptome). Nije utvrđena niti statistički značajna razlika u dobi bolesnika prema prisustvu *dupA* gena (t=0.418, P=0.677).

Tablica 15. Karakteristike bolesnika u odnosu na prisutnost *dupA* gena.

		***dupA* poz**	***dupA* neg**	**Statistika**
N		35 (34%)	68 (66%)	
Spol	Muškarci Žene	7 (28%) 28 (35.9%)	18 (72%) 50 (64.1%)	χ2=0.526, P=0.468
Dob (god.)	AS±SD	56.4±11.8	55.4±11.8	t=0.418, P=0.677
Simptomi	bol u epigastriju napuhnutost žgaravica mučnina	19 (54.3%) 5 (14.3%) 12 (34.3%) 5 (14.3%)	40 (58.8%) 7 (10.3%) 29 (42.7%) 11 (16.2%)	χ2=0.194, P=0.659 χ2=0.358, P=0.550 χ2=0.674, P=0.412 χ2=0.063, P=0.802
Endoskopska dijagnoza	EUV 22 (21.4%) EUD 13 (12.6%) NUD 68 (66.0%)	7 (31.8%) 0 (0%) 28 (41.2%)	15 (68.2%) 13 (100%) 40 (58.8%)	χ2=8.307, P=0.016

NUD**-** neulkusna dispepsija, EUV-erozije/ulkus želuca, EUD-erozije/ulkus duodenuma, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija.

5.9.3. Povezanost *dupA* gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice

Usporedbom rezultata dobivenih PCR metodom o prisustvu *dupA* gena i patohistološkog nalaza gastritisa sluznice korpusa i antruma (klasificiranog prema Sydneyskom sustavu) želuca dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 16.

U antrumu želuca inflamacija je prisutna u svih 103 (100%) bolesnika, pri čemu je *dupA* najzastupljeniji u bolesnika s upalnim promjenama drugog stupnja, 24/35 *dupA* pozitivnih bolesnika (68.6%), slijede upalne promjene prvog stupnja s 10/35 *dupA* pozitivnih bolesnika (28.6%) i upalne promjene trećeg stupnja u manjem broju bolesnika, 1/35 (2.9%).

Aktivnost upale prisutna je u 68/103 (66%) bolesnika, pri čemu je *dupA* gen najzastupljeniji u bolesnika s prvim stupnjem aktivnosti upale, 16/35 (45.7%).

Atrofične promjene prisutne su u 2/35 (5.7%) bolesnika s *dupA* pozitivnim genom, a intestinalna metaplazija u 10/35 (28.6%) *dupA* pozitivnih bolesnika.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa u **antrumu** prema zastupljenosti *dupA* gena (p=0.434).

U korpusu želuca inflamacija je prisutna u svih 103 (100%) bolesnika, pri čemu je *dupA* najzastupljeniji u bolesnika s upalnim promjenama prvog stupnja, 23/35 (65.7%), slijedi *dupA* u promjenama drugog stupnja 12/35 (34.3%).

Aktivnost upale je prisutna u 64/103 bolesnika (62.2%), pri čemu je *dupA* najzastupljeniji u bolesnika s prvim stupnjem aktivnosti upale 15/35 (42.9%). Drugi stupanj aktivnosti imala su 4/35 (11.4%) bolesnika s pozitivnim *dupA.*

Atrofične promjene prvog stupnja prisutne su u 1/35 (2.9%) *dupA* bolesnika, a intestinalna metaplazija u 6/35 (17.1%) *dupA* pozitivnih bolesnika.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa u **korpusu** prema zastupljenosti *dupA* gena (p=0.084).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti *dupA* gena prema predominaciji gastritisa (p=0,691).

Tablica 16. Usporedba *dupA* gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice

	Karakteristike	Skor	*dupA* poz	*dupA* neg	Statistika
Antrum	Aktivnost	0 1 2 3	15 (42.9) 16 (45.7) 3 (8.6) 1 (2.9)	20 (29.4) 34 (50) 12 (17.6) 2 (2.9)	Z=1.396, P=0.163
	Inflamacija	1 2 3	10 (28.6) 24 (68.6) 1 (2.9)	25 (36.8) 41 (60.3) 2 (2.9)	Z=0.651, P=0.515
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.4±1.0	2.6±1.1	t=0.786, P=0.434
	Atrofija	0 1	33 (94.3) 2 (5.7)	63 (92.6) 5 (7.4)	Z=0.132, P=0.895
	Metaplazija*	0 1	25 (71.4) 10 (28.6)	53 (77.9) 15 (22.1)	Z=0.536, P=0.592
	H. pylori	0 1 2 3	4 (11.4) 11 (31.4) 11 (31.4) 9 (25.7)	7 (10.3) 22 (32.4) 23 (33.8) 16 (23.5)	Z=0.049, P=0.961
	Ukupni skor		4.5±1.6	4.6±1.8	t=0.239, P=0.812
Korpus	Aktivnost	0 1 2	16 (45.7) 15 (42.9) 4 (11.4)	23 (33.8) 38 (55.9) 7 (10.3)	Z=0.818, P=0.413
	Inflamacija	1 2 3	23 (65.7) 12 (34.3)	45 (47.1) 37 (45.6) 5 (7.4)	Z=1.751, P=0.080
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.0±1.0	2.4±1.0	t=1.744, P=0.084
	Atrofija	0 1 2	34 (97.1) 1 (2.9)	64 (94.1) 3 (4.4) 1 (1.5)	Z=0.251, P=0.802
	Metaplazija*	0 1	29 (82.9) 6 (17.1)	60 (88.2) 8 (11.8)	Z=0.442, P=0.658
	H. pylori	0 1 2 3	2 (5.7) 18 (51.4) 8 (22.9) 7 (20)	2 (2.9) 43 (63.2) 17 (25) 6 (8.8)	Z=0.818, P=0.413
	Ukupni skor	AS±SD	3.7±1.6	3.9±1.5	t=0.569, P=0.571
Ukupni skor antrum+korpus		AS±SD	8.2±2.6	8.5±2.5	t=0.515, P=0.607
Predominacija		Antrum Difuzno Korpus	6 (17.1) 27 (77.1) 2 (5.7)	13 (19.1) 48 (70.6) 7 (10.3)	$\chi 2$=0.740, P=0.691

AS-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija,
*prema Sydneyskom sustavu klasifikacije: metaplazija nije utvrđena=0, metaplazija=1

5.9.4. Pojedinačna usporedba gena *jhp0917* i *jhp0918* s patohistološkim promjenama želučane sluznice

Pojedinačna učestalost *jhp0917* gena utvrđena PCR metodom je 46 gena, a *jhp0918* 36 gena. Prema distribuciji u bolesnika po tipu gastritisa, i *jhp0917* i *jhp0918* najzastupljeniji su u difuznom gastritisu 37/46 (80.0%), 28/36 (77.8%).

Tablica 17. Usporedba *jhp0917* i *jhp0918* gena s patohistološkim promjenama želučane sluznice

	Karakteristike		Gen		Statistika
Antrum			*jph0917* poz	*jph0917* neg	
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.5±1.0	2.6±1.1	t=0.373, P=0.710
			jph0918 poz	*jph0918* neg	
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.4±1.0	2.6±1.1	t=0.692, P=0.491
Korpus			*jph0917* poz	*jph0917* neg	
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.2±1.0	2.3±1.0	t=0.345, P=0.731
			jph0918 poz	*jph0918* neg	
	Inflamatorni skor	AS±SD	2.0±1.0	2.3±1.0	t=1.565, P=0.121
			jph0917 poz	*jph0917* neg	
Domi-nacija	Antrum Difuzno Korpus		7 (15.2) 37 (80.4) 2 (4.4)	12 (21.1) 38 (66.7) 7 (12.3)	χ2=2.966, P=0.227
			jph0918 poz	*jph0918* neg	
Domi-nacija	Antrum Difuzno Korpus		6 (16.7) 28 (77.8) 2 (5.6)	13 (19.4) 47 (70.2) 7 (10.5)	χ2=0.924, P=0.630

AS-aritmetička sredina, SD-standardna devijacija

Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa u antrumu prema zastupljenosti *jhp0917* gena (t=0.373, P=0.710). Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa u korpusu prema zastupljenosti *jhp0917* gena (t=0.345, P=0.731). Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti *jhp0917* prema predominaciji gastritisa (χ2=2.966, P=0.227).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa u antrumu prema zastupljenosti *jhp0918* gena (t=0.692, P=0.491). Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa u korpusu prema zastupljenosti *jhp0918* gena (t=1.565, P=0.121). Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti *jhp0918* prema predominaciji gastritisa ($\chi 2$=0.924, P=0.630).

5.10. Testiranje osjetljivosti na antimikrobna sredstva

Testiranje antimikrobne osjetljivosti 103 *Helicobacter pylori* izolata metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) E-testom pokazalo je rezistenciju od 74,8% na azitromicin (AZT) i klaritromicin (CLR), 80.6% rezistenciju na metronidazole (MTZ) te 14.6% rezistenciju na levofloksacin (LEV). Rezistencija na amoksicilin nije zabilježena (Tablica 18 i Graf 9).

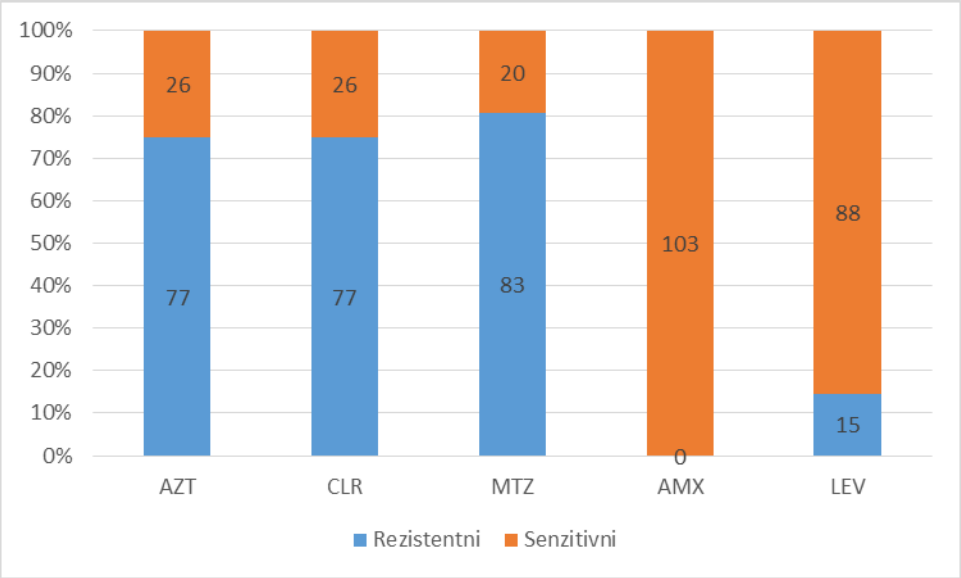
Raspon MIK-ova za azitromicin i klaritromicin kretao se od 0.1215 µg/mL – 64 µg/mL. Više od polovice izolata (63.1%, 56.3%) imalo je MIK na azitromicin i klaritromicin 64 µg/mL. Tu vrijednost MIK-a dosegnulo je 43.7% izolata testiranih na metronidazol i 10.7% izolata testiranih na levofloksacin.

Testirani izolati pokazuju osjetljivost na klaritromicin uz načešći MIK od 0.125 µg/mL (18.4%). Testirani izolati pokazuju sličan obrazac i na azitromicin uz najčešći MIK od 0.25 µg/mL (16.5%), najviše testiranih izolata bilo je osjetljivo na amoksicilin uz MIK 0.125 µg/ml (62.1%). Na lefofloksacin najviše osjetljivih izolata bilo je uz MIK 2 µg/ml (85.4%). (Tablica 19, Graf 10).

Tablica 18. Antimikrobna osjetljivost *H. pylori* izolata (N=103)

H. pylori	**Antibiotici**				
	AZT	**CLR**	**MTZ**	**AMX**	**LEV**
Rezistentni	77 (74.8%)	77 (74.8%)	83 (80.6%)	0 (0%)	15 (14.6%)
Senzitivni	26 (25.2%)	26 (25.2%)	20 (19.4%)	103 (100%)	88 (85.4%)

AZT-azitromicin, CLR-klaritromicin, MTZ- metronidazol, AMX- amoksicilin, LEV-levofloksacin



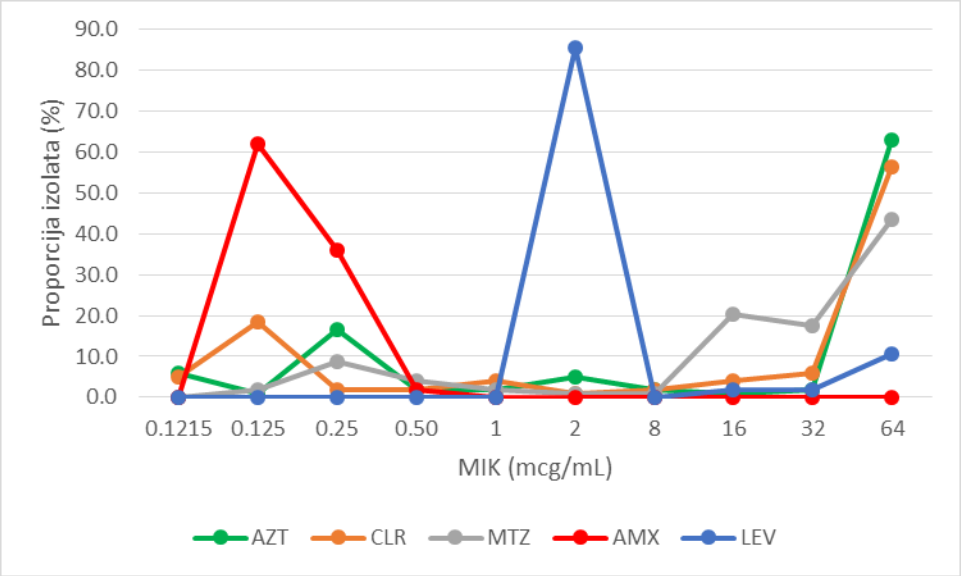
Graf 9. Distribucija antimikrobne osjetljivosti *H. pylori* izolata (N=103)

AZT-azitromicin, CLR-klaritromicin, MTZ- metronidazol, AMX- amoksicilin, LEV-levofloksacin

Tablica 19. Raspon vrijednosti MIK-ova testiranih antibiotika

MIK (µg/ml)	Antibiotik				
	AZT	CLR	MTZ	AMX	LEV
0.1215	6 (5.8%)	5 (4.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
0.125	1 (1.0%)	19 (18.4%)	2 (1.9%)	64 (62.1%)	0 (0%)
0.25	17 (16.5%)	2 (1.9%)	9 (8.7%)	37 (35.9%)	0 (0%)
0.50	2 (1.9%)	2 (1.9%)	4 (3.9%)	2 (1.9%)	0 (0%)
1	2 (1.9%)	4 (3.9%)	2 (1.9%)	0 (0%)	0 (0%)
2	5 (4.9%)	1 (1.0%)	1 (1.0%)	0 (0%)	88 (85.4%)
8	2 (1.9%)	2 (1.9%)	1 (1.0%)	0 (0%)	0 (0%)
16	1 (1.0%)	4 (3.9%)	21 (20.4%)	0 (0%)	2 (1.9%)
32	2 (1.9%)	6 (5.8%)	18 (17.5%)	0 (0%)	2 (1.9%)
64	65 (63.1%)	58 (56.3%)	45 (43.7%)	0 (0%)	11 (10.7%)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija, AZT-azitromicin, CLR-klaritromicin, MTZ- metronidazol, AMX- amoksicilin, LEV-levofloksacin



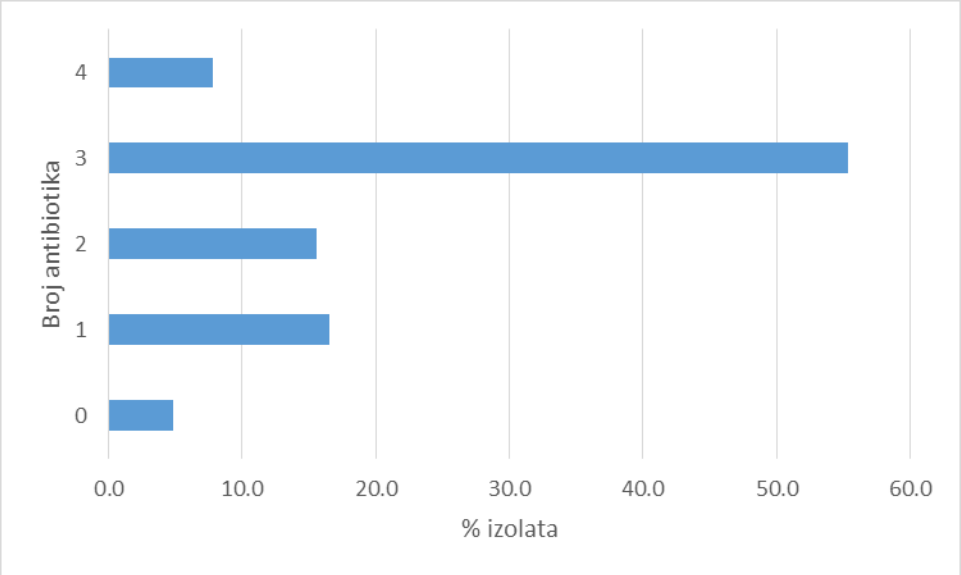
Graf 10. Raspon vrijednosti MIK-ova testiranih antibiotika

MIK-minimalna inhibitorna koncentracija, AZT-azitromicin, CLR-klaritromicin, MTZ- metronidazol, AMX-amoksicilin, LEV-levofloksacin

U Tablicama 20 i 21 te na Grafovima 11 i 12 prikazana je učestalost rezistencije prema broju i kombinaciji antibiotika za testirane *H. pylori* izolate. Pet izolata je bilo osjetljivo na sve testirane antibiotike. Rezistencija na samo jedan antibiotik nađena je u manjeg broja izolata, i odnosila se na rezistenciju na MTZ (n=17). Češće su izolati bili rezistentni na više od jednog antibiotika. Dvostruka rezistencija zabilježena je za CLR&AZT (n=12), MTZ&LEV (n=4). Višestruka rezistencija uključivala je trostruku rezistenciju. Nađena je za CLR&AZT&MTZ (n=54), CLR&AZT&LEV (n=3). Četverostruka rezistencija na CLR&AZT&MTZ&LEV nađena je u 8 izolata.

Tablica 20. Učestalost rezistencije *H. pylori* izolata po broju antibiotika

Broj antibiotika na koje izolati pokazuju rezistenciju	Broj (%) izolata
0	5 (4.9%)
1	17 (16.5%)
2	16 (15.5%)
3	57 (55.3%)
4	8 (7.8%)

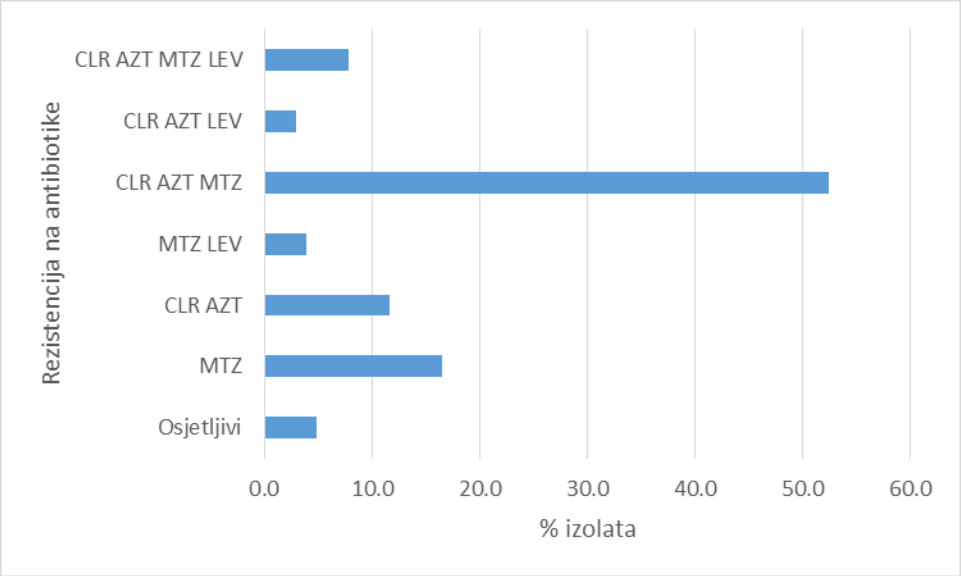


Graf 11. Učestalost rezistencije *H. pylori* izolata po broju antibiotika

Tablica 21. Učestalost rezistencije *H. pylori* izolata po vrsti antibiotika

Rezistencija na:	Broj (%) izolata
Osjetljivi	5 (4.9%)
MTZ	17 (16.5%)
CLR AZT	12 (11.7%)
MTZ LEV	4 (3.9%)
CLR AZT MTZ	54 (52.4%)
CLR AZT LEV	3 (2.9%)
CLR AZT MTZ LEV	8 (7.8%)

AZT-azitromicin, CLR-klaritromicin, MTZ-metronidazol,
AMX-amoksicilin, LEV-levofloksacin



Graf 12. Učestalost rezistencije *H. pylori* izolata po vrsti antibiotika

AZT-azitromicin, CLR-klaritromicin, MTZ-metronidazol,
AMX-amoksicilin, LEV-levofloksacin

Nije utvrđena statistički značajna razlika za prosječni broj antibiotika na koje izolati pokazuju rezistenciju između muškaraca i žena (2.5±0.9 prema 2.4±1.1, t=0.413, P=0.680), a niti vezano uz endoskopsku dijagnozu (NUD 2.5±1.0, EUV 2.5±1.1, EUD 2.2±1.1, F=0.624, P=0.543).

5.11. Povezanost gena virulencije *cag*PAI i *dupA* s antimikrobnom osjetljivošću

Odnos rezistencije na testirane antibiotike i pojedinačnih *cag*PAI gena i *dupA* gena prikazan je u Tablicama 22, 23, 24, 25. Rezistencija na amoksicilin nije zabilježena.

Tablica 22. Odnos rezistencije azitromicina i gena *cag*PAI i *dupA* gena

	Cag A1	*Cag A2*	*Cag A3*	*Cag E*	*CagM*	*tnpA*	*cagT*	*Apcag*	*LEC*	*tnpB*	*dupA*
Wald hi kvadrat	0.009	0.043	0.432	2.056	0.056	0.008	0.565	0.0314	1.040	0.009	0.887
P-vrijednost	0.925	0.8357	0.511	0.152	0.813	0.927	0.452	0.859	0.308	0.926	0.346
OR (za jediničnu promjenu)	0.899	1.293	2.189	0.179	1.527	0.915	1.942	1.145	0.573	1.108	1.667
-95% CI	0.097	0.110	0.205	0.0167	0.044	0.132	0.336	0.250	0.193	0.125	0.568
+95% CI	8.322	15.181	23.379	1.937	53.226	6.352	11.221	5.243	1.696	9.793	4.894

Rezistencija na azitromicin nije bila statistički značajno povezana s prisutnošću bilo kojeg od *cag*PAI gena ili *dupA* gena (P>0.150 za sve gene).

Tablica 23. Odnos rezistencije klaritromicina i gena *cag*PAI i *dupA* gena

	Cag A1	*Cag A2*	*Cag A3*	*Cag E*	*CagM*	*tnpA*	*cagT*	*Apcag*	*LEC*	*tnpB*	*dupA*
Wald hi kvadrat	0.009	0.043	0.432	2.056	0.056	0.008	0.565	0.0314	1.040	0.009	0.887
P-vrijednost	0.925	0.8357	0.511	0.152	0.813	0.927	0.452	0.859	0.308	0.926	0.346
OR (za jediničnu promjenu)	0.899	1.293	2.189	0.179	1.527	0.915	1.942	1.145	0.573	1.108	1.667
-95% CI	0.097	0.110	0.205	0.0167	0.044	0.132	0.336	0.250	0.193	0.125	0.568
+95% CI	8.322	15.181	23.379	1.937	53.226	6.352	11.221	5.243	1.696	9.793	4.894

Rezistencija na klaritromicin nije bila statistički značajno povezana s prisutnošću bilo kojeg od *cag*PAI gena ili *dupA* gena (P>0.150 za sve testirane gene).

Tablica 24. Odnos rezistencije metronidazola i gena *cag*PAI i *dupA* gena

	Cag A1	*Cag A2*	*Cag A3*	*Cag E*	*CagM*	*tnpA*	*cagT*	*Apcag*	*LEC*	*tnpB*	*dupA*
Wald hi-kvadrat	0.001	0.012	0.036	1.067	0.000	0.635	2.255	2.117	0.050	0.198	6.260
P-vrijednost	0.974	0.911	0.848	0.301	0.983	0.425	0.133	0.145	0.822	0.655	0.012
OR (za jediničnu promjenu)	1.045	0.858	0.793	3.760	0.952	0.423	4.593	0.093	0.864	1.747	0.246
-95% CI	0.068	0.054	0.071	0.294	0.008	0.049	0.611	0.003	0.238	0.145	0.080
+95% CI	15.881	13.407	8.757	48.031	109.315	3.599	34.508	2.377	3.134	21.000	0.748

Rezistencija na metronidazol bila je statistički značajno povezana s izostankom *dupA* gena (OR=0.246, 95% CI 0.081-0.749, P=0.012), ali ne i prisutnošću *cag*PAI gena (p>0.130 za sve *cag*PAI gene). Pozitivan *dupA* genotip statistički značajno smanjuje šansu za rezistenciju izolata *H. pylori* na metronidazol za 75.4%.

Tablica 25. Odnos rezistencije levofloksacina i gena *cag*PAI i *dupA* gena

	Cag A1	*Cag A2*	*Cag A3*	*Cag E*	*CagM*	*tnpA*	*cagT*	*Apcag*	*LEC*	*tnpB*	*dupA*
Wald hi-kvadrat	1.369	0.068	1.351	0.130	0.000	0.000	1.310	2.874	0.670	0.418	0.120
P-vrijednost	0.241	0.794	0.245	0.717	0.993	0.983	0.252	0.090	0.412	0.517	0.728
OR (za jediničnu promjenu)	9.280	1.681	3.435	0.572	1.022	1.025	0.296	0.238	1.796	2.316	1.253
-95% CI	0.211	0.032	0.416	0.026	0.004	0.082	0.035	0.044	0.433	0.175	0.344
+95% CI	407.402	88.021	28.311	12.233	227.725	12.790	2.444	1.279	7.432	30.549	4.561

Rezistencija na levofloksacin nije bila statistički značajno povezana s prisutnošću bilo kojeg od *cagPAI* gena ili *dupA* gena (P>0.090 za sve testirane gene).

5.12. Povezanost *cag*PAI statusa i *dupA* gena

Kod *H. pylori* izolata s parcijalno izbrisanim *cag*PAI (n=87) detektiran je 31/35 (88.5%) *dupA* gen, a 4/35 (11.5%) *dupA* vezuju se uz *H. pylori* izolate koji su imali izbrisani *cag*PAI (n=16), Tablica 26.

Tablica 26. Odnos *cag*PAI i *dupA* gena

	Izbrisani *cag*PAI	**Parcijalno izbrisani *cag*PAI**
dupA neg.	12 (11.7%)	56 (54.4%)
dupA poz.	4 (3.9%)	31 (30.1%)

Nije utvrđena statistički značajna povezanost *dupA* genotipa s tipom *cag*PAI (Spearman rang R=0.081, P=0.414).

6. RASPRAVA

Razvoj *H. pylori* infekcije ovisi o više čimbenika, bilo od strane domaćina, bakterije ili okolišnih čimbenika. Brojne studije istraživale su čimbenike vezane uz bakteriju, točnije različite gene za koje se smatra da uzrokuju ozbiljne gastrointestinalne bolesti.

*Cag*PAI otok sa svojih 30 gena je glavna odrednica virulencije *H. pylori*. Mnoge su pretpostavke da kromosomski integritet (cjelovitost) gena *cag*PAI otoka ili nedostatak istih mogu imati važnu ulogu u razvoju gastroduodenalne bolesti uzrokovane *H. pylori*. Čini se da je izostanak gena u *cag*PAI otoku prevladavajući fenomen i smatra se da su upravo ti geni pod pritiskom selekcije više nego bilo koja druga regija *H. pylori* kromosoma (182).

Predmet ovog istraživanja bilo je određivanje cjelovitosti *cag*PAI otoka pojedinačnom detekcijom 10 gena PCR metodom i usporedba s patohistološkim promjenama želučane sluznice.

U našoj studiji nismo našli niti jedan intaktni *cag*PAI, parcijalno izbrisanih bilo je 84.5%, a kompletno izbrisanih 15.5%. Slično, studija iz Meksika analizirala je 11 gena, našli su 90% intaktnih, 4% parcijalno izbrisanih i 6% kompletno izbrisanih (183).

Treba naglasiti da postoji neusklađenost među studijama u analizi broja gena *cag*PAI regije i definiranju intaktnog, izbrisanog i parcijalno izbrisanog *cag*PAI. Najčešće se radi o analizi limitiranog broja gena. Tako su Salih i sur. u svojoj studiji na temelju analize 4 gena *cag*PAI regije izvijestili o 42.1% intaktnih, 39.5% parcijalno izbrisanih i 18.4% kompletno izbrisanih *cag*PAI i povezanosti intaktnog *cag*PAI s duodenalnim ulkusom (184). Baghaei i sur. su analizom samo 3 gena izvjestili o 17% intaktnih *cag*PAI, 62% parcijalno izbrisanih i 20% izbrisanih *cag*PAI u iranskoj populaciji (185). Nygen i sur. su u vijetnamskoj populaciji analizom 30 gena na istom broju uzoraka i sličnim endoskopskim dijagnozama kao u našoj studiji ustanovili 88% intaktnih *cag*PAI i 12% parcijalno izbrisanih *cag*PAI (186). U studiji Kausera i sur. genotipizirano je osam gena *H. pylori* iz osam različitih regija svijeta. Najveća

proporcija intaktnog *cag*PAI zabilježena je u izolatima iz Japana (57.1%), što je u suglasju s izvješćima o povećanoj incidenciji karcinoma želuca u tom dijelu svijeta, 18.6% u Peruu, 12% u Indiji, 15.8% u Irskoj, 1.3% u Engleskoj. Nijedan izolat iz Costa Rice nije imao intaktni *cag*PAI (187).

Na temelju dosadašnjih publiciranih istraživanja vidljivo je da učestalost intaktnog *cag*PAI varira u izolatima iz različitih geografskih regija.

Rezultati naše studije nisu pokazali statističku povezanost raspodijele izbrisanog i parcijalno izbrisanog *cag*PAI s endoskopskom dijagnozom niti s patohistološkim promjenama. U prethodnim istraživanjima je dokazano da *cag*PAI nije jedini čimbenik virulencije i da je teško predvidjeti tijek bolesti na temelju integriteta *cag*PAI segmenta, osim u slučajevima kada se analizira veliki broj sojeva s precizno definiranim kliničko-epidemiološkim i patološkim značajkama.

Treba imati na umu da su naši rezultati odraz specifično odabrane skupine bolesnika s prevladavajućom neulkusnom dispepsijom koji su višestruko neuspješno liječeni različitim kombinacijama antibiotika. Teško bi bilo ocijeniti jesu li ovi rezultati stvarni odraz stanja u našoj geografskoj regiji, kao i kakvi bi rezultati bili u *H. pylori* izolatima bolesnika s različitim težim stupnjevima gastroduodenalne bolesti. Do sada u Hrvatskoj nije rađena niti jedna druga studija genotipiziranja *cag*PAI gena da bismo mogli usporediti rezultate. Svakako bi idući poželjni korak u budućnosti bilo genotipiziranje *H. pylori* izolata bolesnika prije liječenja i s težim želučanim bolestima kao što su ulkusi i karcinomi želuca.

I u istraživanju Maeda i sur. iz Japana parcijalno izbrisani *cag*PAI izoliraju se samo kod bolesnika s neulkusnom dispepsijom, za razliku intaktnih *cag*PAI koji se izoliraju u bolesnika s karcinomom želuca (173).

CagA smatra se markerom *cag*PAI regije (188). Pozitivitet *cagA* ovisi o regiji *cagA* gena koju se istražuje. U našoj studiji analizirali smo tri različita segmenta *cagA* gena: *cagA1* segment blizu promotor regije, srednji segment *cagA2* i desni kraj *cagA3*. U većini studija analiziran je samo jedan segment *cagA* gena. Dok je u našoj studiji učestalost *cagA1* (71.8%) i *cagA2* (69.9%)

približno ista, učestalost *cagA3* (5.8%) bila je niska. Čest izostanak *cagA3* u kontrolnih sojeva u studiji Mattar i sur. iz 2007. u odnosu na segment *cagA1* i *cagA2* povezuje se s manjom patogenosti (128). Prevalencija *cagA* pozitivnih sojeva razlikuje se između pojedinih zemalja: u istočno Azijskim zemljama je 90% (189), u Ekvadoru 46%, Panami 20% (190), Kolumbiji 64%, Japanu 100% (191). Bugarska ima prevalenciju 84.9% (192), Iran 62% (193), Turska 49%, (194), Portugal 31.8% (116), Slovenija 61.2% (u dječjoj populaciji) (195). U ranije rađenom istraživanju u Hrvatskoj (Filipec-Kanižaj i sur.), u kojoj su testirani serumi bolesnika na prisutnost serumskog antitijela na bakterijski antigen (*CagA* – cytotoxin-associated antigen), 91.3% bolesnika bilo je pozitivno (196). U našoj studiji *cagA* nije bio statistički povezan s kliničkom dijagnozom, kao ni u studiji Straus i sur. gdje je učestalost *cagA* bila 81%, za razliku od studije Marie MAM i sur. gdje se prisutnost *cagA* (62%) statistički značajno povezuje s gastritisom i peptičkim ulkusom (197,198). *CagA* u našoj studiji bio je povezan s većim stupnjem inflamacije želučane sluznice, poglavito antruma (p=0.001). U radu Filipec-Kanižaj p120 (cagA) seropozitivitet bio je značajno prisutniji kod bolesnika s višim stupnjem aktivnosti u antrumu što se slaže s našim rezultatima (196). Ti rezultati su konzistentni i s nekim drugim studijama u kojima *cagA* dokazano potiče neutrofilnu akumulaciju mjerenu kao inflamatorni skor, odnosno prema nekim studijama inducira produkciju interleukina IL -8 (184). Takve rezultate potvrđuju Hosseini i sur. u preglednom članku u kojem analiziraju većinu iranskih studija (199); Dubiri i sur. nisu našli povezanost *cagA* i *cagE* s kliničkim ishodom u iranskih bolesnika (200). U našoj studiji *cagA2* se povezuje i s većom gustoćom *H. pylori* (p=0.001). Tu povezanost potvrdili su i Salimzadeh i sur. (201), Belda i sur. (202), Atherton i sur. (203). Suprotno tome Vaziri i sur. nisu našli značajnu povezanost između *cagA* pozitiviteta i *H. pylori* gustoće, neutrofilne aktivnosti, limfoidne agregacije u lamini propriji i glandularne atrofije, ali su našli značajnu povezanost s teškim aktivnim kroničnim gastritisom (193). Zastupljenost *cagE* u našoj studiji je bila veća od *cagA* (75.7% vs 71.8%). To ide u prilog istraživanjima u kojima je dokazano da je *cagE* bolji marker cagI regije nego *cagA* (128,204). Mi nismo našli

povezanost *cagE* ni s endoskopskom dijagnozom, ni s patohistološkim promjenama, što se poklapa s rezultatima studije iz Portugala gdje je *cagE* bio zastupljeniji od *cagA* (116). I u studiji Kausera i sur. *cagE* i *cagT* je nađen značajno češće u odnosu na *cagA* (82% *vs* 72.8%) (187). Modena i sur. također nisu našli povezanost *cagE* (88,9*%) i* kliničkog ishoda (205), za razliku od istraživanja u kojima je nađena veća učestalost *cagE* gena u težim gastrointestinalnim bolestima kao što su peptički ulkusi i želučani karcinom u odnosu na gastritis (206). *CagT* kao marker cagII regije nađen je u 68% naših izolata i uočena je povezanost sa značajno manjom učestalošću atrofije antruma, a bez povezanosti s kliničkom dijagnozom. Baghaei i sur. u svojoj studiji također nisu našli povezanost niti s kliničkom dijagnozom, niti s patohistološkim karakteristikama sluznice (185). U studiji Mattar i sur. 98% izolata bolesnika s peptičkom ulkusnom bolesti sadržavalo je *cagT* gen (128), dok su izolati s izbrisanim *cagT* u japanskoj populaciji bili češći u bolesnika s kroničnim gastritisom u odnosu na ulkusnu bolest ili želučani karcinom (102). Fischer i sur. u svojoj studiji navode da *H. pylori* sojevi kojima nedostaje *cagT* gen imaju nefunkcionalan T4SS i nesposobni su translocirati *cagA* protein u stanicu domaćina (207). U studiji iz Engleske, većina sojeva ulkusnih bolesnika sadržavala je *cagT* i *cagE* gene (208). U našoj studiji *CagM* s učestalošću od 71.8% povezivao se s značajno većom gustoćom *H. pylori* u korpusu i povećanim ukupnim skorom za korpus, a bez povezanosti s endoskopskom dijagnozom. Uz *cagE, cagM* je također neophodan za induciranje produkcije interleukina IL-8. U studiji Mattar i sur. povezivan je s osam puta većim rizikom za razvoj ulkusne bolesti (128). *CagA* promotor regija (Ap*cag*) u našoj studiji bila je povezana s višim stupnjem aktivne inflamacije, ali bez povezanosti s endoskopskom dijagnozom. Mattar i sur. visoku učestalost Ap*cag* u svojoj studiji povezuju i s višim stupnjem gastritisa i s ulkusnom bolešću (128). LEC (lijevi kraj cagII) nađen je u 48,5% naših izolata i bio je povezan s značajno manjom učestalošću atrofije antruma, što je konzistentno sa studijom Kausera i sur. gdje je LEC bio zastupljeniji u bolesnika s benignim promjenama (187).

U istraživanju iz 2007. Mattar i sur. našli su značajnu povezanost želučanog ulkusa s prisutnošću *tnpA* (63%) i *tnpB* (13.5%) gena u izolatima (128), a novija i manja studija istog autora iz 2010. potvrdila je vezu *tnpA* i želučanog karcinoma (131). U prilog tome ide i iranska studija provedena među bolesnicima s želučanim karcinomom i gastritisom, koja je našla povezanost između *tnpA* i želučanog karcinoma (47.5% udio tnpA), ali bez povezanosti s patohistološkim karakteristikama (209). I studija iz Perua je potvrdila visok udio *tnpA* gena (46%) u populaciji s karcinomom želuca i njihovu povezanost. U našoj studiji udio *tnpA* i *tnpB* gena bio je nizak i bez povezanosti sa endoskopskom dijagnozom ili patohistološkim nalazom. To se može objasniti time što u našoj skupini nije bilo bolesnika s karcinomom želuca.
Iako je u više istraživanja nađena značajna povezanost karcinoma želuca i *tnpA* gena, da bi se taj gen uvrstio u biomarkere za karcinom želuca baš kao i *cagA* gen potrebna su dalja istraživanja na većem uzorku za potvrdu tih rezultata.

Sukladno originalnoj studiji Lu i sur. iz 2005. (133) i naša studija je potvrdila međusobnu prisutnost sekvenci *jhp0917* i *jhp0918,* čineći kompletni/aktivni *dupA* gen u 34.0% izolata, smješten unutar plastične regije *H. pylori.*
U Hrvatskoj je to prva i jedina studija, pa nije moguća usporedba rezultata unutar naše zemlje. Slične rezultate (33.33%) našli su i Zhang i sur. u Kini (210), Soud i sur. u Iranu (211). U našoj studiji 10.7% izolata *H. pylori* nije posjedovalo *jhp0918* uz pozitivni *jhp0917.* Taj rezultat je sličan rezultatu Archachi i sur. koji su našli 11% *H. pylori* izolata negativnih na *jhp0918*, uz 37.5% pozitivnih *dupA* u bolesnika s DU (134). Manje vrijednosti zabilježila je iranska studija 6% (211) i studija Pacheco i sur. 2.5% (130). *DupA* bez *jhp0918* smatra se nefunkcionalnim. Ta činjenica proizlazi iz istraživanja koja su potvrdila da jedino intaktni *dupA* sojevi, dakle oni koji sadržavaju i *jhp0917* i *jhp0918*, mogu formirati tip IV sekrecijski sistem (T4SS) i biti uključeni u patogenezu gastroduodenalne bolesti (212).
Postoje različite gegrafske varijacije u prevalenciji *dupA* i njegovoj povezanosti ili nepovezanosti sa duodenalnom ulkusnom bolesti (DU).

Rezultati različitih studija o povezanosti *dupA* i kliničkog ishoda su kontroverzni. Isto tako, povezanost *dupA* i DU u samo nekim populacijama može biti odraz razlike u definiciji i dijagnostici DU ili u upotrebi lijekova koji uzrokuju ili liječe DU. Razlike mogu biti uvjetovane i različitim PCR tehnikama u detekciji intaktnog *dupA.* Razlike mogu biti prisutne i unutar etničkih i starosnih skupina stanovnika unutar iste zemlje. U prilog toj tvrdnji idu različiti rezultati dviju studija iz Brazila: Pereira i sur. su detektirali *dupA* gen u 23.4% odraslih i 18.1% djece (213), a Gomes i sur. u odraslih 89.46%, a u dječjoj populaciji 100% (214). U našoj studiji radilo se o odraslim bolesnicima u kojih nije nađena statistički značajna razlika u dobi i prisustvu *dupA.*

Prevalencija *dupA* je značajno veća u izolata bolesnika s DU, a manja u bolesnika s karcinomom želuca (Japan, Koreja, Kolumbija) (42% *vs* 9% u prosjeku) (133). U preglednim člancima navode se podaci o prevalenciji *dupA* širom svjeta od oko 44.8% i razlikuju se u pojedinim nacionalnim i etničkim grupama stanovništva. Povezanost *dupA* i razvoja bolesti uglavnom je proučavana u većini azijskih zemalja. Meta analiza iz 2010. koja je uključila 17 studija sa 2466 bolesnika potvrdila je povezanost *dupA* i kliničkog ishoda i pokazala prevalenciju *dupA* od 31.0% u azijskim zemljama i 64.1% u zapadnim zemljama. Infekcija s *dupA* pozitivnim *H. pylori* povećava rizik za DU u azijskim zemljama, ali ne i u zapadnim zemljama (215).

Glavno ograničenje naše studije je u mali broj bolesnika s duodenalnom ulkusom bolešću (12.6%) i potpuni izostanak bolesnika s karcinomom želuca, što narušava definitivni zaključak o *dupA* kao markeru duodenalnog ulkusa i njegovoj protektivnoj ulozi za razvoj atrofije, intestinalne metaplazije i želučanog karcinoma. Gotovo isti broj uzoraka *H. pylori* i slične grupe bolesnika kao u našoj studiji istraživali su Osman i sur. u malezijskoj populaciji. Slično kao u našem istraživanju detektirali su prevalenciju od 22.9% *dupA* gena, najčeće učestalosti u NUD grupi i bez statističke povezanosti sa kliničkim ishodom (216).

Studija Schmidta i sur. iz Švedske nije našla razliku u prevalenciji *dupA* u bolesnika s NUD, DU i karcinomom želuca, a ni povećanu produkciju IL-8 *in vitro* kod *dupA* pozitivnih izolata (139).

Originalno istraživanje podupire hipotezu o povezanosti *dupA* i povećane produkcije IL-8 u antrumu želučane sluznice, a time i razvoju antrum predominantnog gastritisa (133).

Vodeći se originalnim istraživanjem Lu i sur. iz 2005. godine i mi smo u na početku našeg istraživanja postavili istu hipotezu. Naša studija nije pokazala statistički značajnu razliku u inflamatornom skoru gastritisa u antrumu i korpusu, a samim tim ni statistički značajnu razliku u zastupljenosti *dupA* prema dominaciji gastritisa , što je konzistentno sa studijom Schmidt i sur. (139). Suprotno, Imagawa i sur. su u svojoj studiji ustanovili da bolesnici sa *dupA* pozitivnim *H. pylori* luče značajno više želučane kiseline od *dupA* negativnih (176). Abadi i sur. su promatrajući otpornost *dupA* pozitivnih sojeva na želučanu kiselinu sugerirali da su se ti sojevi zapravo adaptirali u želucu (217). Takvi rezultati podupiru tezu povezanosti *dupA* i povećanog rizika za DU. Arachi i sur., te Alam i sur. u populaciji jugoistočne Indije našli su povezanost *dupA* i DU (134, 135).

Antimikrobna rezistencija (otpornost) *H. pylori* sojeva definira se kao primarna (antibiotik je nedjelotvoran na bakteriju i prije pokušaja liječenja) i sekundarna ili stečena (kad osjetljivi soj stekne rezistenciju tijekom liječenja) rezistencija. Glavni uzrok tog fenomena su točkaste mutacije u DNA *H. pylori* (218).

Analiza antimikrobne aktivnosti *in vivo* je mnogo kompleksnija nego one *in vitro*. Aktivnost ne ovisi samo o odnosu između antibiotika i bakterije, nego postoji i treći čimbenik – domaćin. Različiti čimbenici iz okoliša utječu na mikroorganizam koji može biti lociran u različitim tkivima i tjelesnim tekućinama, a koji se razlikuje od uvjeta na umjetnim podlogama. Odgovor mikrobne populacije na antibiotike u organizmu čovjeka nije tako uniformiran kao kod testiranja in vitro.

U našoj studiji testiranjem antimikrobne osjetljivosti 103 *H. pylori* izolata dobili smo rezultate osjetljivosti nakon provedenih eradikacijskih shema (sekundarna rezistencija). Uspoređujući s rezultatima ostalih studija iz različitih geografskih područja uočava se izrazita heterogenost, ne samo među pojedinim zemljama, već i unutar iste zemlje. Također je važno

napomenuti i neujednačenost u tumačenju primarne/sekundarne rezistencije. Tako su brojne studije rezultate rezistencije proglašavali primarnom rezistencijom ako je bio izostanak eradikacijske terapije i samo 4 tjedna prije endoskopije i uzimanja uzoraka. Dosadašnji objavljeni podaci o rezistenciji *H. pylori* za Hrvatsku odnosili su se na primarnu rezistenciju. Ponekad je usporedba studija otežana zbog malog broja testiranih izolata, često ograničenih na određenu skupinu bolesnika, a i zbog različitih laboratorijskih tehnika kojima se detektira antimikrobna osjetljivost.

Dokazano je da rezistencija na klaritromicin, a u manjoj mjeri na metronidazol utječe na neuspjeh eradikacijske terapije ukoliko su uključeni u eradikacijski režim. U slučaju kada je soj osjetljiv na klaritromicin eradikacija iznosi oko 87.8%, dok u slučajevima gdje je taj soj rezistentan na klaritromicin stopa eradikacije spušta se na 18.3%. Osjetljivost na metronidazol rezultira u 97% - tnoj eradikaciji, a rezistencija na taj antibiotik rezultira u 25%- tnom smanjenju eradikacije (219).

Od kako je 1990-ih klaritromicin uveden u terapiju *H. pylori*, u mnogim zemljama bilježi se porast *H. pylori* klaritromicin rezistentnih sojeva. Velikim dijelom to je i rezultat propisivanja klaritromicina za liječenje respiratornih i zubnih infekcija (219-221). Postotak rezistentnih sojeva u određenoj zemlji proporcionalan je s godinama potrošnje tog antibiotika u toj zemlji i razlikuje se u različitim dobnim skupinama (djeca, odrasli), kao rezultat povećanog propisivanja makrolida za infekcije respiratornog trakta (219,220,222).

U našoj studiji sekundarna rezistencija izolata u periodu od 2008. do 2012. na klaritromicin/azitromicin iznosila je 74.8%. U studiji provedenoj u Krakowu u periodu od 1999. do 2002. nađena je sekundarna rezistencija od 66.7% (223). Nešto manja rezistencija od 54% zabilježena je u studiji provedenoj u više centara u Poljskoj u periodu od 2001. do 2004. (224), dok studija iz iste zemlje u periodu od 2006. do 2008. bilježi rezistenciju od 80% (225). Selgrad i sur. u studiji provedenoj u Njemačkoj u sedmogodišnjem periodu (2005.-2012.) našli su rezistenciju na klaritromicin od 63.2% (226), a Raymond i sur. u Francuskoj u periodu od 2004. do 2007., 68% (227). Visoku stopu sekundarne rezistencije, oko 70%, slično našoj studiji, zabilježila je i studija iz

južnog Tajvana provedena u periodu od 2010. do 2014. (228). U Kini je zabilježen porast sekundarne rezistencije od 29% u 2000. na 100% u 2009. (229). U studiji iz Izraela testirano je 1042 izolata u periodu 2007. do 2014. godine. Zabilježena je rezistencija od 57.2%. Proučavajući čimbenike povezane s antimikrobnom rezistencijom ustanovljeno je da je viša starosna dob bila značajno povezana s rezistancijom na klaritromicin, metronidazol i levofloksacin, te dvostrukom rezistencijom na kraritromicin-metronidazol, vjerojatno kao posljedica dužeg trajanja infekcije i povećane ranije potrošnje antibiotika. Rezistencija je bila veća kod osoba rođenih u istočnoj Europi i Srednjem/Bliskom istoku u odnosu na rođene u Izraelu. Spol se nije povezivao s rezistencijom (230). U našoj studiji nije nađena povezanost dobi i spola i rezistencije, kao ni u studiji iz Londona provedenoj na 101 izolatu, slično kao u našoj studiji (231).

Druge studije pokazale su različite rezultate povezanosti spola i rezistencije. U belgijskoj studiji izolati žena pokazali su veću rezistenciju (232). Jedna od pretpostavki te povezanosti je veća potrošnja makrolida i nitroimidazola za ginekološke infekcije. Neke studije opisale su veću rezistenciju izolata izoliranih od muškaraca (234-235).

Rezistencija *H. pylori* na metronidazol je kompleksna i primarno povezana s inaktivacijom nekoliko gena povezanih s redoks procesima (235). Suprotno od klaritromicinske rezistencije ima manji utjecaj na uspjeh eradikacije i može se prevladati povećanjem doze (236,150). Nepodudarnost između rezistencije *in vitro* na metronidazol i ishoda liječenje dijelom se može objasniti u promjenama razine kisika u želucu, gdje metronidazol rezistentni *H. pylori* sojevi postaju osjetljivi na metronidazol u uvjetima niske razine kisika *in vivo* (237). U naših izolata zabilježena je visoka rezistencija od 80.6%. U spomenutim studijama zabilježena je sekundarna rezistencija na metronidazol od 66.7% u Poljskoj (225), 68% u Njemačkoj (226), 72% u Francuskoj (227), 63.2% u Tajvanu (228), 53.3% u Izraelu (230).

Česta upotreba makrolida i metronidazola u terapiji *H. pylori* učinile su da je *H. pylori* vrlo često rezistentan na obje skupine antibiotika. U našoj studiji dvostruka rezistencija na CLA/AZT-MTZ prisutna je u više od 50% (52.4%)

izolata. Slične rezultate nalazimo u Izraelskoj studiji Boltin i sur. (230), te u studiji Toracchio i sur. iz centralne Italije (238).

Rezistencija na amoksicillin je niska u cijelom svijetu, a u mnogim zemljama nije ni registrirana (219). To je potvrđeno i u našoj studiji gdje su *H. pylori* izolati bili jako dobro osjetljivi na amoksicillin (100%), kao i u studijama iz Poljske (223,225), Njemačke (226), Italije (1% rezistencija) (238). Ta se situacija nije mijenjala godinama usprkos česte upotrebe amoksicillina kako u terapiji *H. pylori* infekcije, tako i drugih infekcija (224). Izuzetak su Brazil i južna Koreja gdje je zabilježena rezistencija na amoksicillin od 38%, odnosno 18.5% (239, 240).

Danas se sve više bilježi porast rezistencije na levofloksacin i to postaje globalni problem. Rezultat je to nekritičkog propisivanja florokinolona za druge infekcije (urinarne, respiratorne). A upravo je Maastricht IV koncenzus preporučio levofloksacin kao drugu liniju liječenja nakon neuspjeha prve linije (241). Raspon sekundarne rezistencije na levofloksacin u studijama kretao se od niskih 5.1% u studiji Boltin i sur. iz Izraela (230), do visokih 44.5% u studiji Wueppenhorst i sur. iz Njemačke (242) i 44.2% u studiji Almeida i sur. iz Portugala (243). Naši rezultati se poklapaju sa studijom Romano i sur. iz Italije koja je provedena na 104 *H. pylori* izolata i izvjestila o 14.6% sekundarne rezstencije na levofloksacin (225). Nešto veću rezistenciju od 16% ustanovila je poljska studija (225), te studija iz centralne Njemačke (17.6%) (226). Srednju vrijednost tog raspona rezistencije zabilježila je tajvanska studija (26.5%) (228). U našoj studiji bile su isključene osobe mlađe od 18 godina, ali studije koje su se bazirale na dobi ustanovile su manju rezistenciju u djece u odnosu na odrasle (232). To je osobito bilo značajno za florokinolone koji se rijetko propisuju u toj dobnoj skupini. Megraud i sur. našli su da je starija dob rizični čimbenik za rezistenciju na levofloksacin (245).

Van der Hulst i sur. su prvi istražili povezanost *cagA* i stope izlječenja. Izvjestili su o značajno većoj stopi izlječenja kod bolesnika inficiranih s *cagA* pozitivnim sojevima (73%) u odnosu na *cagA* negativne sojeve (52%) (167).

Neke studije su uspijele potvrditi originalnu hipotezu (168,169,170), a neke nisu našle povezanost između *cagA* i stope izlječenja (171,172). S obzirom da su svi naši izolati rezultat neuspjelog liječenja nije moguća usporedba s tim studijama koje su uspoređivale prisutnost gena sa stopom izlječenja.

Naša studija nije našla povezanost gena virulencije *cag*PAI s antimikrobnom rezistencijom, kao ni studija Ortiz Godoy i sur. iz Brazila i studija iz Londona (246,231). Studija Taneike i sur. pokazala je povezanost rezistencije na metronidazol i *cagA* negativnih *H. pylori* izolata, sugerirajući da je odsutnost *cagA* razlog za stjecanje rezistencije na metronidazol (247). Suprotno, neke studije su našle povezanost MTZ rezistencije i *cagA* pozitiviteta (248), te *cagA, dupA* i CLARO, MTZ i AMX rezistentnih *H. pylori* izolata (249). Hussein i sur. su u svojoj studiji našli povezanost *dupA* i A2147G mutacije za klaritromicinsku rezistenciju (250).

Suprotno, u našoj studiji pozitivni *dupA* značajno smanjuje rezistenciju *H. pylori* izolata na metronidazole za 75.4%.

Mogući su i drugi mehanizmi odgovorni za neuspjeh izliječenja, buduće studije će odgovoriti na ova pitanja.

7. ZAKLJUČCI

1. Rezultati naše studije pokazali su predominantnu prisutnost parcijalno izbrisanog *cag*PAI otoka (84.5%) i mali broj izolata s izbrisanim *cag*PAI (15.5%). Nijedan izolat nije posjedovao intaktni/kompletni *cag*PAI. Nije nađena statistička povezanost raspodjele istih s endoskopskom dijagnozom niti s patohistološkim promjenama želučane sluznice.
2. Nije utvrđena statistički značajna povezanost prisutnosti niti jednog od 10 detektiranih gena *cag*PAI otoka s endoskopskom dijagnozom (P>0.16).
3. Prevalencija *cagA1* pozitivnih *Helicobacter pylori* sojeva u bolesnika iz sjeverozapadne Hrvatske je visoka, iznosi 71.8%.
4. *CagA2* gen u našoj studiji je bio povezan s višim stupnjem inflamacije želučane sluznice antruma (P=0.032), višim ukupnim skorom za korpus (P=0.008) i s većom gustoćom *H. pylori* u korpusu (P=0.001).
5. Zastupljenost *cagE* u našoj studiji je bila veća od *cagA* (75.7% vs 71.8). Nije utvrđena statistički značajna povezanost s patohistološkim promjenama želučane sluznice.
6. *CagT* kao marker cagII regije detektiran je u 68% izolata i nađena je povezanost sa značajno manjom učestalošću atrofije antruma (P=0.021).
7. *CagM* detektiran je u 71.8% izolata i utvrđena je povezanost s većom gustoćom *H. pylori* u korpusu (P=0.020) i višim ukupnim skorom za korpus (P=0.046).
8. Ap*cag* detektiran je u 63.1% izolata i utvrđena je povezanost s višim stupnjem inflamatornog skora u antrumu (P=0.025) i višim ukupnim skorom za antrum (P=0.022).
9. *LEC* (lijevi kraj cagII) detektiran je u 48,5% izolata i utvrđena je povezanost sa značajno manjom učestalošću atrofije antruma (P=0.008).

10. U našoj studiji udio *tnpA* i *tnpB* gena bio je nizak i bez povezanosti s patohistološkim nalazom, te bi se na temelju prethodno navedenih istraživanja moglo zaključiti da je rezultat analize izolata *H. pylori* specifične skupine bolesnika, tj. potpunog izostanka bolesnika s karcinomom želuca.
11. Sekundarna rezistencija *H. pylori* izolata iz sjeverozapadne Hrvatske nakon jednog ili više neuspjelih pokušaja liječenja izrazito je visoka. Više od 50% izolata posjeduje dvostruku rezistenciju na makrolid (azitromicin/klaritromicin) i metronidazol, a 14.6% na levofloksacin.
12. Nije utvrđena prisutnost *dupA* gena u bolesnika s duodenalnom ulkusnom bolesti iz sjeverozapadne Hrvatske. Nađena je značajno veća učestalost *dupA* gena u bolesnika s neulkusnom dispepsijom te s ulkusnom bolešću želuca (P=0.016). Takva raspodjela može biti i rezultat nejednolike zastupljenosti NUD i ulkusnih bolesnika u našoj studiji.
13. Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa ni u antrumu (P=0.434), ni u korpusu (P=0.084) prema zastupljenosti *dupA* gena.
14. Nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti *dupA* gena prema predominaciji gastritisa (P=0.691).
15. Nije nađena povezanost prisutnosti 10 gena virulencije *cag*PAI otoka i rezistencije *H. pylori* izolata iz sjeverozapadne Hrvatske na testirane antibiotike.
16. Izostanak *dupA* gena bio je statistički značajno povezan s rezistencijom na metronidazol (P=0.012). Pozitivan *dupA* gen statistički značajno smanjuje šansu za rezistenciju izolata *H. pylori* na metronidazol za 75.4%.
17. Nije utvrđena statistički značajna povezanost *dupA* genotipa s tipom *cag*PAI (P=0.414).

8. SAŽETAK

UVOD

Nekoliko gena virulencije, uključujući i *cagA* smještenih u otoku patogenosti *cag*PAI (*eng*. citotoxin pathogenicity island) *Helicobacter pylori* povezuje se s gastroduodenalnim bolestima i stoga varijacije u genskoj strukturi *cag*PAI mogu biti odgovorne za različite kliničke ishode. Prema nekim istraživanjima *dupA* gen smješten u plastičnoj regiji (eng. plasticity region) *H. pylori* povezuje se s razvojem duodenalnog ulkusa i ima protektivnu ulogu u razvoju atrofije i intestinalne metaplazije.

CILJ

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost gena virulencije *cag*PAI otoka (Ap*cag*, *cagA1*, *cagA2*, *cagA3*, *cagM*, *cagT*, *cagE*, *LEC*, *tnpA* i *tnpB*) i *dupA* gena *Helicobacter pylori* izolata bolesnika nakon višestruke neuspjele eradikacijske terapije, te ustanoviti njihovu povezanost s endoskopskom dijagnozom i patohistološkim promijenama želučane sluznice.

MATERIJALI/METODE

Geni virulencije 103 *H. pylori* DNA izolata detektirani su PCR metodom. Bolesnici su prema endoskopskoj dijagnozi svrstani u tri grupe: neulkusna dispepsija (NUD) (n=69), erozije/ulkus želuca (EUV) (n=22) i erozije/ulkus duodenuma(EUD) (n=12).
Patohistološki nalazi skorirani su po Sydney-skoj klasifikaciji.

REZULTATI

Pojedinačna učestalost *cag*PAI gena bila je slijedeća Ap*cag* 63.1%, *cagA1* 71.8%, *cagA2* 69.9%, *cagA3* 5.8%, *cagM* 71.8%, *cagE* 75.7%, cagT 68% tnpA 9.7%, *tnpB* 6.3% i *LEC* 48.5%. Učestalost *dupA* bila je 34.0%.
Nije utvrđena statistički značajna povezanost prisutnosti niti jednog od 10 detektiranih gena *cag*PAI otoka s endoskopskom dijagnozom (P>0.16). Za

CagA, Apcag i *cagM* gene utvrđena je statistički značajna povezanost s višim stupnjem patohistoloških parametara kroničnog gastritisa ($p<0.05$). Nije utvrđena prisutnost *dupA* gena u bolesnika s duodenalnom ulkusnom bolesti iz sjeverozapadne Hrvatske. Nađena je značajno veća učestalost *dupA* gena u bolesnika s neulkusnom dispepsijom te s ulkusnom bolešću želuca ($P=0.016$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u skoru intenziteta gastritisa ni u antrumu ($P=0.434$), ni u korpusu ($P=0.084$) prema zastupljenosti *dupA* gena.
Više od 50% izolata pokazivalo je rezistenciju i na makrolide i na metronidazol.

ZAKLJUČAK

Naše istraživanje ukazalo je na visoku frekvenciju *cagA,* Ap*cag* i *cagM* gena u izolatima bolesnika i njihovu povezanost s višim stupnjem patohistoloških promjena u želučanoj sluznici, što može ukazati na pojačani rizik za razvoj ulkusne, premaligne i maligne bolesti u bolesnika s bezazlenim endoskopskim nalazom.
Nije nađena povezanosti *dupA* gena i duodenalnog ulkusa u bolesnika, kao ni statistički značajna zastupljenosti *dupA* gena prema dominaciji gastritisa.
Ponovna eradikacija *H*. *pylori* infekcije kod tih bolesnika nameće se kao jedini pravilan izbor. S obzirom na nezadovoljavajuću djelotvornost uobičajene trojne terapije zasnovane na klaritromicinu zbog rastuće antibiotske rezistencije, nameće se potreba za promjenama strategije liječenja koje bi povećale stupanj eradikacije (novi antibiotici ili nove kombinacije lijekova).

9. SUMMARY

BACKGROUND

Certain virulence genes including *cagA* located in the pathogenicity island *cag*PAI (*eng*. citotoxin pathogenicity island) of *Helicobacter pylori* are associated with gastroduodenal diseases and thus the variation of *cag*PAI might influence various clinical syndroms. According to some studies *dupA* gene located in plastic region (eng. plasticity region) of *H. pylori* is associated with development of duodenal ulcer and has protective role against development of atrophy and gastric metaplasia.

AIM

The aim of this study was to determine the frquency of virulence genes within *cag*PAI island (Ap*cag*, *cagA1*, *cagA2*, *cagA3*, *cagM*, *cagT*, *cagE*, *LEC*, *tnpA* i *tnpB*) and *dupA* gene in *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients after multiple unsuccessful antimicrobial therapy, and to analyze the correlation between the presence of these genes and endoscopic diagnosis and pathohistological alterations of gastric mucosa.

MATERIALS/METHODS

Virulence genes of 103 *H. pylori* isolates were detected by PCR. According to endoscopid diagnosis the patients were classified into three groups: non-ulcer dyspepsia (NUD) (n=69), erosio/ulcus ventriculi (EUV) (n=22) and erosio/ulcus duodeni (EUD) (n=12).
Pathohistological findins were interpreted according to Sydney classification sheme.

RESULTS

Single prevalence of *cag*PAI gene was as follows: Ap*cag* 63.1%, *cagA1* 71.8%, *cagA2* 69.9%, *cagA3* 5.8%, *cagM* 71.8%, *cagE* 75.7%, *cag*T 68% *tnp*A 9.7%, *tnpB* 6.3% i *LEC* 48.5%. The frequency of *dupA* was 34.0%.

There was no correlation between 10 analysed genes of *cag*PAI island with endoscopic diagnosis (P>0.16). The presence of *CagA*, *Apcag* i *cagM* gene was associated with higher grade of pathohistological parameters of gastritisa (p<0.05). *DupA* gene was not found in patients with duodenal ulcer disease from Nortwest Croatia. *DupA* gene was significantly more frequent in patients with non-ulcer dyspepsia and gastric ulcer disease (P=0.016). There was no statistically significant difference in gastritis intensity score either in antrumu (P=0.434), or in corpus (P=0.084) in relation to the presence of *dupA* gene.

More then 50% of the isolates were resistant to both macrolides and metronidazol.

CONCLUSION

Our study demonstrated high frequency of *cagA,* Ap*cag* i *cagM* genes in patient's isolates and their correlation with high grade of pathohistological alterations in gastric mucosa, representing a risk factor for development of ulcer, premalignant and malignant diseases.

There was no correlation between the presence of *dupA* gene and duodenal ulcer. Moreover, no significant difference in the frequency of *dupA* gene according to the type of gastritis was found.

Repeated attempt to eradicate *H*. *pylori* seems to be the best choice for the patient. Concerning the unsatisfactory efficiency of triple therapy based on clarithromycine due to increasing resistance, new therapeutic options based on the new treatment strategies should be implemented in order to increase the level of eradication (new antibiotics or combination of antibiotics).

10. POPIS LITERATURE

1. Ernst PB, Michetti P, Smith PD. The immunobiology of *H. pylori.* Pathogenesis to Prevention 1997; 13-17.
2. Palmer ED. Gastritis: A reevaluation. Medicine 1954; 33:199.
3. Axon ATR. Ten year milestones. Curr Opin Gastroenterol 1994; (Supp1):1-5.
4. Steer HW. Ultrastructure and cell migration trough gastric epithelium and its relationship to bacteria. J Clin Pathol 1975; 28: 639-646.
5. Marshall BJ, Waren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984;1311-1314.
6. Marshall BJ, Royce H, Annear DI i sur. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. Microbios Lett 1984; 25:83-88.
7. Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy JR. Attempts to fulfil Kochs postulates for pyloric *Campylobacters*. Med J Aust 1985; 142: 436-439.
8. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustellae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustellae* comb. nov. respectively. Int J Syst Bacteriol 1989; 39:397-405.
9. Wotherspoon AC, Dagliono C, Diss TC i sur. Regression of primary low grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1993;342:575-577.
10. Fuccio L, Eusebi LH, Bazzoli F. Gastric cancer, *Helicobacter pylori* infection and other risk factors. World J Gastrointest Oncol 2010; 2(9): 342:7.

11. Sonnenberg A. Review article: historic changes of *Helicobacter pylori*-associated diseases. Aliment Pharmacol Ther 2013;38:329-42.
12. van Blankenstein M, van Vuuren AJ, Looman CW, Ouwendijik M, Kuipers EJ. The prevalence of *Helicobacter* infection in the Netherlands. Scand J Gastroenterol 2013;48:794-800.
13. Den Hollander WJ, Holster IL, den Hoed i sur. Ethnicity is a strong predictor for *Helicobacter pylori* infection in young women in a multi-ethnic European city. J Gastroenterol Hepatol 2013;28:1705-11.
14. Bastos J, Peleteiro B, Barros R i sur. Sociodemographic determinants of prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* infection in Portuguese adults. Helicobacter 2013;18(6):413-22.
15. Ozaydin N, Turkyilmaz SA, Cali S. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* in Turkey: a nationally-representative, cross-sectional, screening with the (1)(3)C-Urea breath test. BMC Public Health 2013;13:1215.
16. Seth A, Chaudhuri M, Kelly L, Hopman W. Prevalence of *Helicobacter pylori* in a First Nations population in northwestern Ontario. Can Fam Physician 2013;59:e 182-7.
17. Alvardo-Esquivel C. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in pregnant women in rural durango. Mexico Int J Bio-med Sci. 2013;9:224-9.
18. Lim SH, Kwon JW, Kim N i sur. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in Korea: nationwide multicenter study over 13 years. Gastroenterol 2013;13:104.
19. Zhu Y, Zhou X, Wu J, Su J, Zhang G. Risk factors and prevalence of *Helicobacter pylori* infection in persistent high incidence area of gastric carcinoma in Yangzhong city. Gastroenterol Res Pract 2014;481365.
20. Javid G, Zargar SA,Bhat K i sur. Efficacy and safety of sequential therapy versus standard triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication in Kashmir India: a randomized comparative trial. Indian Gastroenterol 2013;32(3):190-4.

21. Adlekha S, Chadha T, Krishnan P, Sumangala B. Prevalence of *Helicobacter* infection among patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy in a medical college hospital in Kerala, India. Ann Med Health Sci Res 2013;3:559-63.
22. Benberin V, Bektayeva R, Karabayeva R i sur. Prevalence of *H. pylori* infection and atrophic gastritis among symptomatic and dyspeptic adults in Kazahstan. A hospital-based screening study using a panel of serum biomarkers. Anticancer Res 2013;33:4595-602.
23. Vilaichone RK, Mahachai V, Shiota S i sur. Extremely high prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Bhutan. World J Gastroenterol 2013;19:2806-10.
24. Hanafi MI, Mohamed AM. *Helicobacter pylori* infection: seroprevalence and predictors among healthy individuals in Al Madinah, Saudi Arabia. J Egypt Public Health Assoc 2013:88;40-5.
25. Benajah DA, Lahbabi M, Alaoui S i sur. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its recurrence after successful eradication in a developing nation (Morocco). Clin Res Hepatol Gastroenterol 2013;37:519-26.
26. Mathewos B, Moges B, Dagnew M. Seroprevalence and trend of *Helicobacter pylori* infection in Gondar University Hospital among dyspeptic patients, Gondar, North West Ethiopia. BMC Res Notes 2013;6:346: 22.
27. Olokoba AB, Gashau W, Bwala S, Adamu A, Salawu FK. *Helicobacter pylori* infection in nigerians with dyspepsia. Ghana Med J 2013;47:79-81.
28. Mana F, Vandebosch S, Miendje Deyi V, Haentjens P, Urbain D. Prevalence of and risk factors for *H. pylori* infection in healthy children and young adults in Belgium anno 2010/2011. Acta Gastroenterol Belg 2013;76:381-5.
29. Bastos J, Peleteiro B, Pinto H i sur. Prevalence, incidence and risk faktors for *Helicobacter pylori* infection in a cohort of Portuguese adolescents (EpiTeen). Dig Liver Dis 2013;45:290-5.

30. Pacheco SL, Ogata SK, Machado RS, Patricio FR, PardoML, Kawakami E. Diagnosis of *Helicobacter* infection by means of reduced-dose (13)C-urea breath test and early sampling of exhaled breath. J Pediat Gastroenterol Nutr. 2013;57:607-11.
31. Yu Y, Su L, Wang X, Xu C. Association betwen *Helicobacter pylori* infection and pathological changes in the gastric mucosa in Chinese children. Intern Med 2014;53:83-8.
32. Ghasemi-Kebria F, Ghaemi E, Azadfar S, Roshandel G. Epidemiology of *Helicobacter* pylori infection among Iranian children. Arab J Gastroenterol 2013;14:169-72.
33. Babuš V, Presečki V, Katičić M i sur. Rasprostranjenost infekcije s *Helicobacter pylori* u odrasloj populaciji Hrvatske. Liječ vjes 1997;119:139-142.
34. Didelot X, Nell S, Yang I, Woltemate S, van der Merwe S, Suerbaum S.Genomic evolution and transmission of *Helicobacter pylori* in two South African families. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:13880-5.
35. Osaki T, Okuda M, Ueda J i sur. Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 2013;62:761-5.
36. Urita Y, Watanabe T, Kawagoe N i sur. Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. J Paediatr Child Health 2013;49:394-8.
37. Gomes BC, De Martinis CP. The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples. Food Control 2004;15:397-403.
38. Quaglia NC, Dambrosio A, Normanno G i sur. High occurence of *Helicobacter pylori* in raw goat, sheep and cow milk inferred by gimM gene: a risk of food-borne infection?. Internat J of Food Microb 2008;124:43-47.
39. Bahrami AR, Rahimi E, Safaei HG. Detection of *Helicobacter pylori* in City Water, Dental Units Water, and Bottled Mineral

Water in Isfahan, Iran. The Scien World J 2013; Article ID 280510, 5 stranica.

40. Dore MP, Sepulveda AR, EL- Zimaty H, Isolation of *Helicobacter pylori* from milk sheep-implications for transmission to humans. Am J of Gastroenterol. 2001;96:1396- 1401.
41. Fujimura S, Kawamura T, Kato S, Tateno H, Watanabe A. Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. Letters in Applied Microbiol 2002;35:504-507.
42. Safaei HG, Rahimi E, Zandi A, Rashidipour A. *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: the detection of *H. pylori* antigens in the milk and faeces of cows. J of Res in Med Sci 2011;16:184-187.
43. den Hollander WJ, Sostres C, Kuipers EJ, Lanas A. *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. Helicobacter 2013;18:24-7.
44. Varbanova M, Frauenschlanger K, Malfertheiner P. Chronic gastritis- an update. Best Practice&Research Clinical Gastroenterology 2014;28(6):1031-1042.
45. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH i sur. Classification and grading of gastritis. The update Sydney Sistem. International workshop on the Histopathology of Gastritis, Huston 1994. Am. J. of Surg. Pathology 1996;20:1161-1181.
46. Peters FT, Kuipers EJ, Ganesh S, Sluiter WJ, Klinkenberg-Knol EC, Lamers CB i sur. The influence of *Helicobacter pylori* on oesophageal acid exposure in GERD during acid suppressive therapy. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:921.
47. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR i sur. Functional gastroduodenal disorders. Gastroenterology 2006:130:1466.
48. Ford AC, Forman D, Bailey AG, Axon AT, Moayyedi P. Effect of dispepsia on survival: a longitudinal 10-year follow-up study. Am J Gastroenterol 2012;107:912-21.
49. Suzuki H, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia. Nat Rev Gastroenterol 2013;10:168-74.

50. Marušić M. Dijagnostičke vrijednosti seroloških postupaka za utvrđivanje *Helicobacter pylori* infekcije i evaluacija učinka liječenja. Doktorska disertacija, Sveučilište Zagreb Medicinski fakultet 2000, Zagreb
51. Li L, Kelly LK, Ayub K, Graham DY, Go MF. Genotypes of *Helicobacter pylori* obtained from gastric patients taking or not taking NSAIS. Am J Gastroenterol 1999;1502-1507.
52. Labenz J, Peitz U, Kohl H, Kaiser J, Malfertheiner P, Hackelsberger A. *Helicobacter pylori* increases risk of peptic ulcer bleeding: A case control study. Italian J Gastroenterol Hepatol 1999; 31:110-115.
53. Hawkey CJ. *Helicobacter pylori*, NSAIDs and cognitive dissonance. Aliment Pharmacol Ther 1999;13:695-702.
54. Sodhi JS, Javid G, Zargar SA, Tufail S, Shah A, Khan B i sur. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and the effect of its eradication on symptoms of functional dyspepsia in Kashmir, India. J Gastroenterol Hepatol 2013; 808-13.
55. Al AM, Al Hamoudi N, Anil S, Al Jebren A, Al-Hamoudi WK. Is the presence of *Helicobacter pylori* in dental plaque of patients with chronic periodontitis a risk factor for gastric infection?Can J Gastroenterol 2009; 23:177-9.
56. Liu Y, Lin H, Bai Y i sur. Study on the relationship between *Helicobacter pylori* in the dental plaque and occurrence of dental caries or oral hygiene indeks. Helicobacter 2008;13:256-60.
57. Ierardi E, Amoruso A, La Notte T i sur. Halitosis and *Helicobacter pylori*: a possible relationship. Dig Dis Sci 1998;43:2733-7.
58. Grimm M, Munz A, Exarchou A. Polligkeit J, Reinert S. Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* without association of TLR5 expression in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2014;43:35-44.
59. Saniee P, Siavoshi F, Nikbakht BG, Khormali M, Sarrafnejad A, Malekzadeh R. Immunodetection of *Helicobacter pylori*-specific

proteins in oral and gastric Candida yeasts. Arch Iran Med 2013;16:288-94.

60. Slavoshi F, Taghikhani A, Malekzadeh R i sur. The role of mothers oral and vaginal yeasts in transmission of *Helicobacter pylori* to neonates. Arch Iran Med 2013;16:288-94.
61. Baldassarre ME, Monno R, Laforgia N i sur. The source of *Helicobacter pylori* infection in the neonatal period. J Perinat Med 2009; 37:288-92.
62. Chung SJ, Lim SH, Choi J i sur. *Helicobacter pylori* serology inversely correlated with the risk and severity of reflux esophagitis in *Helicobacter pylori* endemic area: a matched case-control study of 5,616 health check-up Koreans. J Neurogastroenterol Motil 2011;17:267-73.
63. Shahabi S, Rasmi Y, Jazani NH, Hassan ZM. Protective effect of *Helicobacter pylori* against gastroesophageal reflux disease may be due to a neuroimmunologica ant-inflammatory mechanism. Immunol Cell Biol 2008; 86(2):175-8.
64. Kim N, Lee SW, Kim JI i sur. Effect on *Helicobacter pylori* eradication on the development of refluks esophagitis and gastroesophageal reflux symptoms: a nationwide multi-center prospective study. Gut Liver 2011;5:437-46.
65. Qian B, Shijie M, Shang L, Qian J, Zhang G. Effect of *H. pylori* eradication on gastroesophageal reflux disease. Helicobacter. 2011;16:255-65.
66. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M i sur. Globocan 2012. vl.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: JARC Cancer Base No 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Available from http://globocan.iarc.fr.
67. Figueiredo C, Costa S, Karameris A, Machado JC. Pathogenesis of Gastric Cancer. Helicobacter 2015; 20 (Suppl. S1):30-35.
68. Chrisment D, Dubus P, Chambonnier L i sur. Neonatal thymectomy favors *Helicobacter pylori*-promoted gastric mucosa-

associated lymphoid tissue lymphoma lesions in BALB/c mice. Am J Pathol 2014;184:2174-84.

69. Uchida K, Okazaki K, Debrecceni A i sur. Analiysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid folicles in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy. Infect Immun 2001;69:6749-54.
70. Hughes WS. An hypotesis: the dramatic decline in heart attacks in the United States is temporally related to the decline in duodenal ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2014;19:239-41.
71. Nakagawa H, Tamura T, Mitsuda Y i sur. Significant association between serum interleukin-6 and *Helicobacter pylori* antibodi levels among *H. pylori*-positive Japanese adults. Mediators Inflamm 2013;2013:142358.
72. Figura N, Palazzuoli A, Vaira D i sur. Cross-sectional study: CagA-positive *Helicobacter pylori* infection, acute coronary artery disease and systemic levels of B-type natriuretic peptide. J Clin Pathol 2014;67:251-7.
73. Vahdat K, Pourbehi MR, Ostovar A i sur. Association of pathogen burden and hypertension: the Persian Gulf Healthy Heart Study. Am J Hypertens 2013;26:1140-7.
74. Ikeda A, Iso H, Sasazuki S, Inoue M, Tsugane S. The combination of *Helicobacter pylori* and cytotoxin-associated gene-A seropositivity in relation to the risk of myocardial infarction in middle-aged Japanese: The Japan Public Health Center-based study. Atherosclerosis 2013;230:67-72.
75. Yang GH, Wu JS, Yang YC, Huang YH, Lu FH, Chang CJ. Gastric Helicobacter pylori infection associated with risk of diabetes mellitus, but not prediabetes. J Gastroenterol Hepatol 2014; April 14. doi:10.1111.

76. Wang F, Fu Y, Lv Z. Association of *Helicobacter pylori* infection with diabetic complications: a meta-analysis. Endocr Res 2014;39:7-12.
77. Vafaeimanesh J, Heidari A, Effatpanah M, Parham M. Serum adiponectin level in diabetic patients with and without *Helicobacter pylori* infection: is there any difference? Scientific World J 2014;2014:402685.
78. Vafaeimanesh J, Rajabzadeh R, Ahmadi A i sur. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on glycemia control in patients with type 2 diabetes mellitus and comparasion of two therapeutic regiments. Arab J Gastroenterol 2013;14:55-8.
79. Sealy-Jefferson S, Gillespie BW, Aiello AE i sur. Antibody levels to persistent pathogens and incident stroke in Mexican Americans. PLoS One 2013;8:e65959.
80. Katan M, Moon YP, Paik MC, Sacco RL, Wright CB, Elkind MS. Infectious burden and cognitive function: the Northern Manhattan Study. Neurology 2013;80:1209-15.
81. Huang WS, Yang TY, Shen WC, Lin CL, Lin MC, Kao CH. Association between *Helicobacter pylori* infection and dementia. J Clin Neurosci 2014;(14)00043-5. Doi:10.1016.
82. Chang YP, Chiu GF, Kuo FC i sur. Eradication of *Helicobacter pylori* is associated with the progression of dementia: a population-based study. Gastroenterolol Res Pract 2013; 2013:175729.
83. Mohebi N, Mamarabadi M, Moghaddasi M. Relation of *Helicobacter pylori* infection and multiple sclerosis in Iranian patients. Neurol Int 2013;5:31-3.
84. Hershko C, Camaschell C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. Blood 2014;123:326-33.
85. Monzon H, Forne M, Esteve M i sur. *Helicobacter pyori* infection as a cause of iron deficiency anaemia of unknown origin. World J Gastroenterol 2013;19:4166-71.

86. Ali Habib HS, Murad HA, Amir EM, Halawa TF. Effect of sequential versus standard *Helicobacter pylori* eradication therapy on the associated iron deficiency anemia in children. Indian J Pharmacol 2013;45:470-3.
87. Shih HY, Kuo FC, Wang SS i sur. *Helicobacter pylori* Infection and Anemia in Taiwanese Adults. Gastroenterol Res Pract 2013;2013:390967.
88. Mubarak N, Gasim GI, Khalafalla KE, Ali Ni, Adam I. *Helicobacter pylori,* anaemia, iron deficiency and thrombocytopenia among pregnant women at Khartoum, Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg 2014;108:380-4.
89. Francesco F, Tortora A, Gasbarrini G, Gasbarini A. *Helicobacter pylori* and Extragastric Diseases. Helicobacter 2014;19(Suppl.1):52-58.
90. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology, 8th Edition. Elsevier Health Science 2015: 727-738.
91. Saito N, Ooi HK, Konishi K, Shoji E, Mototsugu K, Asaka M. Coccoid *Helicobacter pylori* Can Directly Adhere and Invade in Agminated Formation to Human Gastric Epithelial Cells. Advan in Microbiol 2012;2:112-116.
92. Montefusco S, Esposito R, Andrea I i sur. Copper promotes TFF1-mediated *Helicobacter pylori* colonization. PLoS ONE 2013;8:e79455.
93. Bernard M, Josenhans C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2014; 19 (Supp 1):11-18.
94. An DR, Kim HS, Kim J. Structure of Csd3 from *Helicobacter pylori*, a cell shape-determining metallopeptidase. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2015;71(Pt 3):675-86.
95. Radin JN, Gaddy JA, Gonzalez-Rivera C, Loh JT, Algood HM, Cover TL. Flagelar localization of a *Helicobacter pylori* autotransporter protein. M Bio 2013;4:e00613-12.

96. Toller IA, Neelsen KJ, Steger M, Hartung MI, Hottiger MO, Stucki M i sur. Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:14944-9.
97. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. Paxillin is a novel celular target for converging *Helicobacter pylori*-induced cellular signaling. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;301:G601-11.
98. Tenguria S, Ansari SA, Khan N, Ranjan A, Devi S, Tegtmeyer N i sur. *Helicobacter pylori* cell translocating kinase (CtkA/JHP0940) is pro-apoptotic in mouse macrophages and acts as auto-phosphorylating tyrosine kinase. Int J Med Microbiol 2014; 304:10066-76.
99. Delahay R, Rugge M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2012; 17 (Supp.1): 9-15.
100. Ta L. H., Hansen L., Sause W. E i sur. Front. Cell. Inf. Microbiol 2012; 2:46.
101. Duncan S, Valk P, McClain M i sur. Comparative Genomic Analysis of East Asian and Non-Asian *Helicobacter pylori* Strains Identifies Rapidly Evolving Genes. PLoS One 2013; 8(1):e55120.
102. Ikenoue T, Maeda S, Gura K i sur. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. Clin. Diagn. Lab. Immunol 2001; 8:181-186.
103. Xu X, Liu Z, Fang M i sur. *Helicobacter pylori CagA* induces ornithine decarboxylase upregulation via Src/MEK/ERK/c-Myc pathway: implication for progression of gastric diseases. Exp. Biol. Med 2012; 237:435-41.
104. Hu Y, Fang Y, Xiao Shu. Can the incidence of gastric cancer be reduced in the new century? J. of Dig. Disease 2013; 14:11-15.
105. Rajashree P. Santanu C, Ronita D i sur. Intact *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* without disease association in Kolkata, India. Int. Med. Microbiol 2011; 301(4): 293-302.

106. Tanih NF, McMilian M, Naidoo N, Ndip LM, Weaver LT, Ndip RN. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in South African patients with upper gastrointestinal diseases. Acta Tropica 2010; 116(1): 68-73.
107. Hanada K, Uchida T, Tsukamoto Y i sur. *Helicobacter pylori* infection introduces DNA doubl-strand breaks in host cells. Infect Immun 2014; 82:4182-9.
108. Mustapha P, Paris I, Garcia M, Chemokines and antimicrobial peptides have a cag-dependent earlyresponse to *Helicobacter pylori* infection in primary human gastric epithelial cells. Infect Immun 2014;82:2881-9.
109. Vaziri F, Peerayeh SN, Alebouyeh M, Maghsoundi N, Azimzadeh P, Siadat SD. Novel effects of *Helicobacter pylori* CagA on key genes og gastric cancer signal transduction;a comparative transfection study. Pathog Dis 2015;73:8.
110. Shaffer L, Gaddy A, Loh T i sur. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type IV secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. PLoS Pathog 2011; 7, e1002237.
111. Olberman P, Josenhans C, Moodley Y i sur. A Global Overview of Genetic and Functional Diversity in the *Helicobacter pylori cag* Pathogenicity Island. PLoS Genet 2010;6(8): e1001069.
112. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S i sur. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science 2002; 295:683-686.
113. Yamazaki S, Yamakawa A, Ito Y i sur. The *CagA* protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa J. Infec. Dis 2003; 187:334-337.
114. Buti L, Spooner E, Van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (*cagA*) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2)

tumor suppressor pathway of the host. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:9238-43.

115. Nomura AM, Lee J, Stemmermann GN, Nomura RY, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori CagA* seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. J Infect Dis 2002; 186:1138-1144.
116. Almeida N, Donato MM, Romaozinho JM, Luxo C, Cardoso O, Cipriano MA. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European country. Dig Dis Sci 2015; 60(1): 74-85.
117. Mansour-Ghanaei F, Abbasi R, Joukar F, Besharati S, Skari-Jirhandeh N. Anti *CagA* antibody among patients with non-cardia gastric cancer in comparasion with non-ulcer dyspepsia in area with high incidence of gastric cancer. Saudi Med J 2008; 29:1606-1610.
118. Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y i sur. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in *H. pylori*-associated disease. J Clin Microbiol 2008; 46:1774-1779.
119. Talebkhan Y, Mohammadi M, Mohagheghi MA i sur. *CagA* gene and protein status among Iranian *Helicobacter pylori* strains. Dig. Dis. Sci 2008; 53:925-932.
120. Karmali-Sarvestani E, Bazargani A, Masoudian M, Lankarani K, Taghavi AR, Saberifiroozi M. Association of *H. pylori cagA* and *vacA* genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. World J Gastroenterol 2006; 12:5205-5210.
121. Chang H, Kim N, Park JH, Nam RH, Choi YJ, Yoon H. *Helicobacter pylori* Might Induce TGF-β1-Mediated EMT by Means of cagE. Helicobacter 2015; 3.doi:10.1111.
122. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AM, Soares TF, Oliveira CA, Bittencourt PF. Lack of association betwen *Helicobacter pylori*

infection with *dupA* positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. Int J Med Microbiol 2008; 298 (3-4):223-30.

123. Ramis IB, Vianna JS, Silva LV, Von Groll A, Silva PE. *CagE* as biomarker of the pathogenicity of *Helicobacter pylori*. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46(2):185-9.
124. Zhang X, Zhang J, Lin Y, Xu K, Li N, Chen H. Analysis of the relationship between invasive capability of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases. J Med Microbiol 2015; 64(5): 498-506.
125. Ding H, Zeng H, Huang L i sur. *Helicobacter pylori* chaperone- like protein cagT plays an essential role in the translocation of cagA into host cells. J. of Microb. And Biotechnology 2012; 22(10): 1343-1349.
126. Johnson EM, Gaddy JA, Voss BJ, Hennig EE, Cover TL. Genes required for assembly of pili associated with the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Infect Immun 2014; 82(8): 3457-70.
127. Ling F, Wang X, Dai D, Yu M, Chen C, Qian J. The *Helicobacter pylori* protein *CagM* is located in the transmembrane channel that is required for *CagA* translocation. Curr Microbiol 2013; 67(5):531-6.
128. Mattar R, Marques SB, Monteiro MS, Santos AF, Irya K, Carriho FJ. *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island genes: clinical relevance for peptic ulcer disease development in Brazil. J Med Microb 2007; 56:9-14.
129. Kersulyte D, Kalia A, Zhang MJ, Lee HK, Subramaniam D, Kinduliene L. Sequence organization and insertion specificity of the novel chimeric ISHp609 transposable element of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 2004;186(22):7521-7528.
130. Pacheco AR, Proenca-Modena JL, Sales AIL, Fukuhara Y, da Silveira WD, Pimenta-Modena. Involment of the *Helicobacter pylori* plasticity region and *cag* pathogenicity island genes in the

development of gastroduodenal diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2008; 27:1053-1059.

131. Mattar R, Monteiro MS, Marques SB, Zilberstein B, Hashimoto CL, Carrilho FJ. Association of *LEC* and *tnpA Helicobacter pylori* genes with gastric cancer in a Brazilian population. Infect Agent Cancer 2010; 11;5:1.
132. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P,Megraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter 2012; 17(1):1-8.
133. Lu H., Hsz, P. I., Graham, D. Y. & Yamaoka, Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 2005; 128: 833-848.
134. Arachchi HSJ, Kalra V, Lal B, Bhatia V, Baba CS, Chakravarthy S. Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (*dupA*) of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer in North Indian population. Helicobacter 2007; 12:591-597
135. Alam J, Maiti S, Ghosh P, De R, Chowdhury A, Das S. Significant association of the *dupA* gene of *Helicobacter pylori* with duodenal ulcer development in South-east Indian population. J Med Microbiol 2012; 61(9): 1295-302.
136. Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, Abdirad A, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M. *DupA* as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. J Med Microbiol 2008; 57:554-562.
137. Nguyen T, Uchida T, Tsukamoto Y i sur. *Helicobacter pylori dupA* gene is not assoiciated with clinical outcomes in the Japanese population, Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1264-1269.
138. Yamaoka Y. Mehanism of disease. *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat. Rev. Gastroenterology and Hep 2010; 7 :629-41.
139. Schmidt HM, Andres S, Kaakoush N i sur. The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene *(dupA*) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated

with disease development: a case-control study. Gut Pathogens 2009;1:5.

140. Osman HA, Hasan H, Suppian R, Hassan S, Andee DZ, Abdul Majid N. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA, babA2*, and *dupA* genotypes and correlation with clinical outcome in Malaysian petients with dyspepsia. Turk J Med Sci 2015;45(4):940-6.
141. Argent RH, Burette A, Miendje Deyi VY, Atherton JC. The presence of *dupA* in *Helicobacter pylori* is not siginificantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China or North America. Clin. Infect. Dis 2007; 45:1204-1206.
142. Malfertheiner P, Chan FK, McColl KE. Peptic ulcer diseases. Lancet 2009;374:1449-61.
143. Ford AC, Forman D, Bailey AG i sur. A community screening program for *Helicobacter pylori* saves money: 10-year follov up of a randomized controlled trial. Gastroenterology 2005;129:1910-17.
144. Hansen JM, Wildner-Christensen M, Hallas J i sur. Effect of community screening for *Helicobacter pylori*: a 5-yr follow- up study. Am J Gastroenterol 2008;103:1106-13.
145. Katičić M, Banić M, Crčević Urek M i sur. Hrvatski postupnik za prevenciju želučanog raka eradikacijom infekcije *Helicobacterom pylori*. Liječ Vjesn 2014;136:59-68.
146. Gisbert JP, Calvet X, O` Connor A i sur. Sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a critical review. J Clin Gastroenterol 2010; 44:313-25.
147. Vaira D, Zullo A, Vukil N i sur. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. Ann Intern Med 2007; 146:556-63.
148. Gisbert JP, Calvet X. Review article: non –bismuth quadriple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 2011; 34: 604-17.

149. Gisbert JP, Fernandez-Bermejo M, Molina-Infante J i sur. First-line triple therapy with levofloxacin for *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther 2007; 26:495-500.
150. Laine L, Hunt R, El- Zimaity H i sur. Bismut-based quadriple therapy using a single capsule of bismuth biskalcitrate, metronidazole and tetracycline given with omeprazole versus omeprazole, amoxicillin and clarithromycin for eradication of *Helicobacter pylori* in duodenal ulcer patients: a prospective, randomized, multicentre North American trial. Am J Gastroenterol 2003; 98:562-7.
151. Malfertheiner P, Bazzoli F, Delchier JC i sur. *Helicobacter pylori* eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: a randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial. Lancet 2011; 377:905-13.
152. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N i sur. Evidence that the degree and duration of acid suppression are related to *Helicobacter pylori* eradication by triple therapy. Helicobacter 2007; 12: 317-323.
153. Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2008; 5:321-331.
154. Russo F, Berloco P, Cuomo R i sur. *Helicobacter pylori* strains and histologically-related lesions affect the uutcome of triple eradication therapy: a study from southern Italy. Aliment Pharmacol Ther 2003: 17:421-428.
155. Gisbert JP, Gonzales L, Calvet X. Systematic rewiew and metaanalysis: proton pump inhibitor vs. ranitidine bismuth citrate plus two antibiotics in *Helicobacter pylori* eradication. Helicobacter 2005; 10: 157-71.
156. Suzuki T, Matsuo K, Sawaki A, Ito H, Hirose K i sur. Systematic review and meta-analysis: importance of *CagA* status for

successful eradication of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24:273-280.

157. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut 2010; 59:1143-53.
158. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. A report card to grade *Helicobacter pylori* therapy. Helicobacter 2007; 12: 275-278.
159. Furuta T, Shirai N, Takashima M i sur. Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with a proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. Clin Pharmacol Ther 2001; 69:158-168.
160. Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M i sur. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 820-3.
161. Megraud F, Coenen S, Versporten A i sur. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut 2012; 62: 34-42.
162. Plečko V, Katičić M, Varda Brkić D i sur. Primary resistance of *Helicobacter pylori* to macrolides and metronidazole in the northern part of Croatia. Helicobacter 2012; 17 (Suppl.1):107.
163. Grayson ML, Eliopoulus GM, Feraro MJ i sur. Effect of varying Ph on the susceptibility of *Campylobacter pylori* to antimicrobial agents. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989; 8:888-889.
164. Hunt RH, Ph and Hp-gastric acid secretion and *Helicobacter pylori*: implication for ulcer healing and eradication of the organism. Am J Gastroenterol 1993; 88:481-483.
165. Furuta T, Shirai N, Xiao F i sur. Effect of genotypic differences in interleukin-1 beta on gastric acid secretion in Japanese patients infected with *Helicobacter pylori*. Am J Med 2002; 112:141-143.
166. Calvet X, Garcia N, Lopez T i sur. A meta-analisis of short versus long therapy with a proton pump inhibitor, clarithromycin and either metronidazole or amoxicillin for treating *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther 2000; 14:603-609.

167. Van der Hulst RW, van der Ende A, Deker FW i sur. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on gastritis in relation to *cagA*: a prospective 1-year follow-up study. Gastroenterology 1997; 113: 25-30.
168. Saruc M, Goksel G, Ozkaya S i sur. The effect of *CagA* status on response to *Helicobacter pylori* eradication therapy in Western Turkey. Braz J Med Biol Res 2001; 34:1435-1439.
169. Scholte GH, van Doorn LJ, Cats A i sur. Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy speciemens: relation to histological parameters and effects on therapy. Am J Gastroenerol 2002; 97:1687-1695.
170. Zhao JJ, Wang JB, Yang L i sur. Influence of *Helicobacter pylori* genotype on triple eradication therapy. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22:2251-22255.
171. Lopez-Brea M, Martinez MJ, Domingo D i sur. Metronidazole resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in paediatric population. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 24:183-188.
172. De Francesco V, Faleo D, Panella C i sur. Sequential eradicating therapy: a treatment that does not discriminate *Helicobacter pylori* strains in patients with nonulcer dyspepsia? Am J Gastroenterol 2002:97:2686-2687.
173. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T i sur. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. Gut 1999; 44:336-341.
174. Van Doorn LJ, Schneeberg PM, Nouhan N i sur. Importance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. Gut 2000; 46:321-326.
175. Chaudhuri S, Chowdhury A, Datta S i sur. Anti-*Helicobacter pylori* therapy in India: differences in eradication efficiency associated with particular alleles of vacuolating cytotoxin (*vacA*) gene. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18:190-195.

176. Imagava S, Ito M, Yoshihara M i sur. *Helicobacter pylori dupA* and gastric acid secretion are negatively associated with gastric cancer development. J Med Microbiol 2010(12): 1484-1489.
177. EUCAST. 2011. EUCAST clinical breakpoints for *Helicobacter pylori*. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST/files/Breakpoint tables/Breakpoint table v 4.0 pdf.
178. Covacci A, Censini S, Bugnoli M i sur. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90,5791-5795.
179. Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with vacA alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates. Gut 2001;49:11-17.
180. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Tole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polimerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30:54-58.
181. Akopyants N, Clifton SW, Kersulyte D i sur. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori.* Mol Microbiol 1998;28:37-53.
182. Carroll IM, Ahmed N, Beesley SM i sur. Microevolution between paired antral and paired antrum and corpus *Helicobacter pylori* isolates recovered from individual patients. J Med Microbiol 2004 Jul; 53(Pt 7):669-77.
183. Antonio-Rincon F, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G, i sur. Pathogenicity island *cag*, *vacA* and IS605 genotypes in Mexican strains of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcers. Annals of Clinical Mycrobiology and Antimicrobials 2011; 10:18.
184. Salih BA, Guner A, Karademir A i sur. Evaluation of the effect of *cag*PAI genes of *Helicobacter pylori* on AGS epithelial cell

morphology and IL-8 secretion. Antonie van Leeuwenhoek 2014;105:179-189.

185. Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F i sur. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cag* pathogenicity island isolates from Iranian population. Dig. Liver Dis 2009;41(9):634-638.
186. Nguyen LT, Uchida T, Tsukamoto Y i sur. Clinical relevance of *cag*PAI intactness in *Helicobacter pylori* isolates from Vietnam. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29(6):651-660.
187. Kauser F, Khan AA, Hussain MA i sur. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human population. J Clin Microbiol 2004; 40:5302-5308.
188. Souod N, Kargar M, Doosti A, Ranjbar R, Sarshar M. Genetic Analysis of *cagA* and *vacA* genes in *Helicobacter pylori* isolates and their relationship with gastroduodenal diseases in the west of Iran. Iran Red Crescent Med J 2013;15(5): 371-375.
189. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M i sur. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS* Lett 2002;517:180-184.
190. Sasaki T, Hirai I, Izurieta R i sur. Analisis of *Helicobacter pylori* Genotype in Stool Specimens of Asymptomatic People. Lab Med 2009; 40: 412- 414.
191. Watada M, Shiota S, Matsunari O i sur. Association betwen *Helicobacter pylori cagA*-related genes and clinical outcomes in Columbia and Japan. BMC Gastroenterol 2011;11:5685-5692.
192. Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R, Mitov I. Benefits of *Helicobacter pylori cagE* genotyping in addition to cagA genotyping: a Bulgarian study. Antonie Van Leeuwenhoek 2011:100:529-535.

193. Vaziri F, Peerayeh S, Alebouyeh M i sur. Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes in Iranian patients with different gastroduodenal disorders. World J Gastroenterology 2013; 19(34):5685-5692.
194. Chung C, Olivares A, Torres E, Yilmaz O, Cohen H, Perez-Perez G. Diversity of *VacA* Intermediate Region among *Helicobacter pylori* Strains from Several Regions of the World. J Clin Microbiol 2010; 48:690-696.
195. Homan M, Lužar B, Kocijan BJ i sur. Prevalence and clinical relevance of *cagA, vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Slovenian children. M J Pedijatr Gastroenterol Nutr 2009;49(3):289-96.
196. Filipec-Kanižaj T, Katičić M, Presečki S i sur. Serum Antibodies Positivity to 12 *Helicobacter pylori* Virulence Antigens in Patients with Benign or Malignant Gastroduodenal Diseases- Cross-sectional Study. Croat Med J 2009; 50: 124-132.
197. Straus EW, Patel H, Chang J i sur. *H. pylori* Infection and Genotyping in Patients Undergoing Upper Endoscopy at Inner City Hospitals. Dig Dis Sci 2002; 47(7):1575-1581.
198. Marie MAM. Relationship between *Helicobacter pylori* Virulence Genes and Clinical Outcomes in Saudi Patients. J Korean Med Sci 2012;27:190-193.
199. Hosseini E, Poursina F, van de Wiele T, Ghasemian Safaei H, Adibi P. *Helicobacter pylori* in Iran: A sistematic review on the association of genotypes and gastroduodenal diseases. J Res Med Sci 2012;17.
200. Dabiri H, Bolfion M, Mirsalehian A i sur. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes in Afghani and Iranian isolates. Pol J Microbiol 2010;59 61-66.
201. Salimzadeh L, Bagheri N, Zamanzad B i sur. Frequency of virulence factors in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis. Microb Pathog 2015; Feb 3.pii:S0882-4010(15)000009-1.

202. Belda S, Saez J, Santibanez M i sur. Relationship between bacterial load, morbidity and *cagA* gene in patients infected by *Helicobacter pylori.* C Microb and Inf 2012;18:251-253.
203. Atherton JC, Tham K, Peek R i sur. Density of *Helicobacter pylori* Infection in Vivo as Assessed by Quantitative Culture and Hystology. J of Inf Diseases 1996;174:552-556.
204. Backert S, Schwarz T, Miehlke S i sur. Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Infect Immun 72: 1043-1056.
205. Modena P, Sales L, Acrani G i sur. Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogeniciti island. Diagn Microbiolol Infect Dis 2007;59:7-16.
206. Lima VP, de Lima MA, Ferreira MV, Baros MA, Rabenhorst SH. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. Int J Infect Dis 2010;14:e613-7.
207. Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for *Cag*A translocation in host cells and induction of interleukin-8. Mol. Microbiol 2001;42(5): 1337-48.
208. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I i sur. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. BMC Microbiology 2005;5:32.
209. Abadi Bezmin AT, Mobarez AM, Bonten MJM, Wagenaar JA, Kusters GJ. Clinical relevance of the *cagA, tnpA* and *tnpB* genes in *Helicobacter pylori.* BMC Gastroenterol 2014;33:14-33.
210. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, *dupA* in China. BMC Gastroenterol 2008;8:49.

211. Souod N, Sarshar M, Dabiri H, i sur. The study of the *oipA* and *dupA* genes in *Helicobacter pylori* strains and their relationship with different gastroduodenal diseases. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2015;8(Suppl.1):S47-S53.
212. Jung SW, Sugimoto M, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y. The intact *dupA* cluster is more reliable *Helicobacter pylori* virulence marker than *dupA* alone. Infect Immun 2012;80:381-7.
213. Pereira WN, Ferraz MA, Zabaglia LM i sur. Association among *H. pylori* virulence markers *dupA, cagA* and *vacA* in Brazilian patients. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis 2014; 20:1.
214. Gomes LI, Rocha GA, Rocha AM i sur. Lack of association between *Helicobacter pylori* infection with *dupA*-positive strains and gastroduodenal diseases in Brazilian patients. Int J Med Microbiol 2008;298(3-4):223-230.
215. Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, Yamaoka Y. Sistematic review and meta- analisis:the relationship between the *Helicobacter pylori dupA* gene and clinical outcomes. Gut Pathog 2010.;2:13.
216. Osman AH, Hasan H, Suppian R i sur. Prevalence of *Helicobacter pylori cagA, babA2* and *dupA* genotypes and correlation with clinical oucome in Malaysian patients with dyspepsia. Turk J Med Sci 2015;45:940-946.
217. Abadi AT, Taghvaei T, Wolfram L, Kustres JG. Infection with *Helicobacter pylori* strains lacking *dupA* is associated with an increased risk of gastric ulcer and gastric cancer development. J Med Microbiol 2012;61 (Pt 1):23-30.
218. Boyanova L. Prevalence of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* in Bulgaria. J Med Microbiol 2009;58:930-935.
219. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004;53:1374-1384.

220. Boyanova L, Mentis A, Gubina M i sur. The status of antimicrobial resistance of Helicobacter pylori in eastern Europe. Clin Microbiol Infect Dis 2002;8:388-396.
221. Karczewska E, Wojtas I, Budak A. Occurence of *Helicobacter pylori* primary resistance to antibacterial drugs in Poland and in the world (Polish). Post Mikrobiol 2009;48:31-41.
222. Koletzko S, Richy F, Bontems P i sur. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut 2006;55:1711-1716.
223. Ziemniak W. Efficacy of *Helicobacter pylori* eradication taking into account its resistance to antibiotics. J Physiol Pharmacol 2006;57:123-141.
224. Dzierzanowska-Fangrat K, Rozynek E, Celinska-Cedro D i sur. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland; a multicentre study. Int J Antimicrob Agents 2005;26:230-234.
225. Karczewska E, Wojtas-Bonior I, Sito E, Zwolinska-Wcislo M, Budak A. Primary and secondary clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin resistance to *Helicobacter pylori* in southern Poland. Pharmacolog Reports 2011;63:799-807.
226. Selgrad M, Meissle J, Bornschein J i sur. Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in central Germany and its relationship with the number of eradication therapies. Eur J Gastroenterol Hepatol 2013;25(11): 1257-60.
227. Raymond J, Lamarque D, Kalach N, i sur. High Level of Antimicrobial Resistance in French *Helicobacter pylori* Isolates. Helicobacter 2010;15:21-27.
228. Wu IT, Chuah SK, Lee CH i sur. Five-year sequential changes in secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan. World J Gastroenterol 2015;21(37):10669-10674.
229. Gao W, Cheng H, Hu F i sur. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. Helicobacter 2010;15:460-466.

230. Boltin D, Ben-Zvi H, Perets TT i sur. Trends in Secondary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* from 2007 to 2014: Has the Tide Turned? J Clin Microbiol 2015;53:522-527.
231. Elviss NC, Owen RJ, Breathnach A, Palmer C, Shetty N. *Helicobacter pylori* antibiotic-resistance patterns and risk factors in adult dyspeptic patients from ethnically diverse populations in central and south London during 2000. J Med Microb 2005;54:567-574.
232. Miendje VY, Bontems P, Vanderpas J i sur. Multicenter survey of routine determinations of resistance of *Helicobacter pylori* to antimicrobials over the last 20 years (1990-2009) in Belgium. J Clin Microbiol 2011;49:2200-2209.
233. Koletzko S, Richy F, Bontems P i sur. Prospective multicentere study on antbiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from childern living in Europe. Gut 2006;55:1711-1716.
234. Kobayashi I, Murakami K, Kato M i sur. Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005. J Clin Microbiol 2007;45:4006-4010.
235. Prazeres MP, De Magalhaes Queiroz DM, Campos Barbosa DV i sur. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2021-2023.
236. Fiscbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect on antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadriple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 2007;26:343-357.
237. Moon JY, Kim GH, You HS i sur. Levofloxacin, Metronidazole, and Lansoprazole Triple Therapy Compared to Quadruple Therapy as a Second-Line Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Korea. Gut Liver 2013;7:406-410.

238. Toracchio S, Marzio L. Primary and secondary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. Dig Liver Dis 2003; 35(8):541-5.
239. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH i sur. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol 2003;3:20.
240. Kim JM, Kim JS, Kim N i sur. Comparasion of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentrations for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. Int J Antimicrob Agents 2006;28:6-13.
241. Chuah SK, Tai WC, Lee CH, Liang CM, Hu TH. Quinolone-containing therapies in the eradication of *Helicobacter pylori*. Biomed Res Int 2014; 2014:151543.
242. Wueppenhorst N, Stueger HP, Kist M, Glocker EO. High secondary resistance to quinolones in German *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2013;68(7): 1562-6.
243. Almeida N, Romaozinho JM, Donato MM. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance rates in the central region of Portugal. Clin Microbiol Infect 2014; 20:1127-1133.
244. Romano M, Iovene MR, Russo MI. Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Clin Pathol 2008;61 (10):1112-5.
245. Megraud F, Coenen S, Versporten A i sur. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut 2013;62:34-42.
246. Ortiz Godoy AP, Ribeiro ML, Borges Benvengo YH i sur. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterology 2003;3:20.
247. Taneike I, Nami A, O Connor A i sur. Analysis of drug resistance and virulence-factor genotype of Irish *Helicobacter pylori* strains:

is there any relationship between resistance to metronidazole and *cagA* status? Aliment Pharmacol Ther 2009;30:784-790.

248. Vilaichone RK, Mahacahai V, Tumwasorn S, Kachintorn U. *CagA* genotype and metronidazole resistant strain of *Helicobacter pylori* in functional dyspepsia in Thailand. J Gastroenterol Hepatol 2011;26:46-48.
249. Rasheed F, Campbell BJ, Alfizah H i sur. Analysis of Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* in Pakistan Reveals High Degrees of Pathogenicity and High Frequencies of Antibiotic Resistance. Helicobacter 2014;19(5):387-399.
250. Hussein NR, Tunjel I, Majedi HS, Yousif ST, Aswad ST, Assafi MS. Duodenal ulcer promoting gene 1 (*dupA*1) is associated with A2147G clarithromycin-resistance mutation but not interleukin-8 secretion from gastric mucosa in Iraqi patients. New Microbes New Infect 2015;6:5-10.

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. svibnja 1964. u Zagrebu. Nakon završene srednje farmaceutske škole upisala sam 1982. godine Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 1987. godine. Specijalistički ispit iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom položila sam 2002. godine. Tijekom specijalizacije završila sam stručni poslijediplomski studij iz medicinske mikrobiologije s parazitologijom na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2011. upisala sam znanstveni poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Nakon završenog jednogodišnjeg staža u KBC Zagreb i položenog državnog ispita radila sam od 1989. do 1998. kao odjelni liječnik na plućnom i neurološkom odjelu Opće bolnice Zabok. Nakon završene specijalizacije od 2002. do 2010. godine radila sam kao Voditelj Odsjeka za kliničku mikrobiologiju s parazitologijom u OB Zabok. Od 6. Do 7 mj. 2010. radila sam kao specijalist kliničke mikrobiologije u Klinici za plućne bolesti „Jordanovac“, a od 7. mj. 2010. do danas djelatnik sam Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC Zagreb.

Član sam više znanstvenih i strukovnih organizacija (Hrvatski liječnički zbor, Hrvatska liječnička komora, Hrvatsko društvo za medicinsku mikrobiologiju, Hrvatsko torakalno društvo, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases).

Autor sam i koautor nekoliko stručnih i znanstvenih radova. Sudjelujem u nastavi iz predmeta Bakteriologija, virologija i parazitologija učenika Škole za medicinske sestre Vinogradska (laboratorijske vježbe).
Udana sam i majka dvojice sinova.