SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2646.

KOCSMÁR ÉVA

Sejt-, extracelluláris matrix-, rostrendszer változások szív- és érrendszeri egyes daganatos megbetegedésekben.
Kísérletes és diagnosztikus pathomorfológiai vizsgálatok
című program

Programvezető: Dr. Kiss András, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Lotz Gábor, egyetemi docens

A clarithromycin-heterorezisztens *Helicobacter pylori* fertőzések *in situ* diagnosztikája és klinikopatológiai jellemzése

Doktori értekezés

Dr. Kocsmár Éva

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Herszényi László, az MTA doktora, címzetes egyetemi tanár
Dr. Krenács Tibor, az MTA doktora, kutatóprofesszor

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Dr. Sótonyi Péter, az MTA rendes tagja, professor emeritus
Tagok: Dr. Rácz Gergely, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Harisi Revekka, Ph.D., adjunktus

Budapest
2021

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE ... 4

I. BEVEZETÉS ... 6

I./1. A *Helicobacter pylori* fertőzés ... 6

I./1.1. A *H. pylori* fertőzés epidemiológiája ... 7

I./1.2. A fertőzés átvitele ... 8

I./1.3. A baktérium kolonizációja ... 9

I./1.4. A baktérium virulenciafaktorai ... 9

I./1.5. A baktériumhoz köthető gyomorbetegségek ... 10

I./1.6. Gyomorrák ... 13

I./1.7. MALT-limfóma ... 14

I./1.8. A *H. pylori* fertőzés extragasztrikus manifesztációi ... 16

I./1.9. A *Helicobacter* genusba tartozó egyéb kórokozók ... 18

I./2. A *H. pylori* fertőzés diagnosztikája ... 19

I./2.1. A fertőzés szövettani diagnosztikájának kérdései ... 19

I./2.1.1. A gasztritisz szövettani klasszifikációja ... 20

I./2.1.2. Mintavétel az endoszkópos vizsgálat során ... 21

I./2.1.3. A patológiai feldolgozás során használt festések a kezdetektől napjainkig ... 22

I./2.2. A fertőzés diagnózisára használt egyéb eljárások ... 26

I./3. A *H. pylori* fertőzés kezelése ... 29

I./3.1. A *H. pylori* kezelésében alkalmazott terápiás protokollok ... 29

I./3.1.1. A clarithromycin és a klasszikus hármas terápia ... 30

I./3.1.2. A fertőzés eradikációjára használt egyéb antibiotikumok és terápiás protokollok ... 31

I./4. Antibiotikumrezisztencia ... 32

I./4.1. Clarithromycin-rezisztencia ... 33

I./4.2. Más antibiotikumok elleni rezisztencia ... 34

I./4.3. Heterorezisztencia ... 35

I./4.4. Az antibiotikumrezisztencia diagnózisa ... 36

I./4.4.1. A fenotípusos rezisztencia kimutatása ... 37

I./4.4.2. A genotípusos rezisztencia kimutatása ... 38

II. CÉLKITŰZÉS ... 41

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK ... 43

III./1. Betegek és a minták szövettani feldolgozása ... 43

III./1.1. Beteganyag I. – Immunhisztokémia és FISH összehasonlítása ... 43

III./1.2. Beteganyag II. – A heterorezisztencia vizsgálata ... 46
III./1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat ... 46
III./2. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) ... 47
III./2.1. A FISH reakció protokollja ... 47
III./2.2. A FISH reakcióhoz használt próbamix összetétele ... 48
III./2.3. A FISH reakció eredményének kiértékelése ... 49
III./2.4. A FISH reakció protokollja a korábban Giemsa-festett metszeteken ... 50
III./2.5. A Helicobacter heilmannii-fertőzés diagnózisa ... 50
III./3. Statisztikai analízis ... 50
IV. EREDMÉNYEK ... 53
IV./1. Az immunhisztokémia és a FISH eljárás diagnosztikai értékének vizsgálata ... 53
IV./1.1. Szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív értékek ... 53
IV./1.2. A kifaragódás szerepének vizsgálata a FISH eljárás diagnosztikus értékének csökkenésében ... 54
IV./1.3. Az aktivitás, a nyálkahártyaszerkezeti változások és a baktériumdenzitás szerepe az immunhisztokémia és a FISH-vizsgálat diagnosztikus teljesítményében ... 54
IV./2. A clarithromycin-heterorezisztens fertőzések vizsgálata ... 58
IV./2.1. A betegek clarithromycin-rezisztencia státusza és a heterorezisztens fertőzések mintavételi hely szerinti rezisztenciamintázata ... 58
IV./2.2. A betegek klinikopatológiai jellemzői és a rezisztenciacsoportok közötti különbségek ... 61
IV./2.3. Az antrumból és corpusból vett szövetminták eltérései a különböző rezisztenciacsoportokban ... 63
IV./2.4. A betegek eradikációs anamnézise ... 65
IV./2.5. A sikeres eradikációk aránya ... 66
V. MEGBESZÉLÉS ... 68
VI. KÖVETKEZTETÉSEK ... 78
VII. ÖSSZEFOGLALÁS ... 80
VIII. SUMMARY ... 81
IX. IRODALOMJEGYZÉK ... 82
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE ... 107
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 110

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABO=A, B, O vércsoportrendszer

ACG=American College of Gastroenterology

BabA= blood group antigen binding adhesin A

CagA=cytotoxin-associated gene A

cagPAI=cytotoxin-associated gene-pathogenicity island

CI=confidence interval, konfidencia-intervallum

Cla=clarithromycin

CRISPR=clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DAPI=4',6-diamidino-2-phenylindole

DNS=dezoxiribonukleinsav

EHMSG=European Helicobacter & Microbiota Study Group

ELISA= enzyme-linked immunoassay

E-teszt=epszilométer-teszt

EUCAST=European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FFPE=Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, formalinfixált, paraffinba ágyazott

FISH=fluorescence in situ hybridization, fluoreszcens in situ hibridizáció

GAPPS=gastric adenocarcinoma and proximal polyposis syndrome

GERD= gastrooesophageal reflux disease, gasztroözofageális refluxbetegség

GGT=γ-glutamil-transzpeptidáz

gGlu-HMRG= γ-glutamil-hidroxi-metil-rodamin-zöld

GLOBOCAN=Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence

H&E=hematoxylin és eozin

H. pylori=Helicobacter pylori

H. heilmannii=Helicobacter heilmannii

IARC=International Agency for Research on Cancer

IHC=immunhisztokémia

MALT=mucosa-associated lymphoid tissue

ME=magnifying endoscopy

MIC=minimum inhibitory concentration

NBI=narrow band imaging, szűkített spektrumú képalkotás

NGS=next generation sequencing, újgenerációs szekvenálás

NHPH=Non-Helicobacter pylori Helicobacter

OLGA=operative link on gastritis assessment

OLGIM=operative link on intestinal metaplasia assessment

OMV=outer membrane vesicles; külső membránvezikulák

OR=Odds Ratio

PAS=periodic acid Schiff, perjódsav-Schiff

PNA=peptide nucleic acid

PNA-FISH=peptide nucleic acid–fluorescence in situ hybridization

PPI=protonpumpa-inhibitor, protonpumpa-gátló

RNS=ribonukleinsav

rRNS=riboszómális ribonukleinsav

RUT=rapid urease test, gyors ureáz teszt

SAT=stool antigen test, széklet antigén vizsgálat

UBT=urea breath test, urea kilégzési teszt

WHO=World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet

WLE=white light endoscopy, fehér fényű endoszkópia

I. BEVEZETÉS

I./1. A *Helicobacter pylori* fertőzés

A 19-20. század fordulója környékén jelentek meg az első olyan közlemények, melyek spirális baktériumok jelenlétét írták le mind állati, mind humán gyomorminták vizsgálata során.[1,2] A 19. század során elvétve már publikáltak a baktériumok gyomorbeli jelenlétéről, de ennek nem tulajdonítottak nagy jelentőséget, mert a gyomrot savas közege miatt mikroorganizmusok kolonizációjára alkalmatlannak tekintették.[3,4] A század során a gyomorban az ureáz enzim aktivitásáról is beszámoltak, mely képes a gyomorsavat semlegesíteni gyomorfekélyben szenvedő betegekben.[5]

Az 1980-as évek elején Robin Warren patológus és Barry Marshall gasztroenterológus voltak az elsők, akik közös munkájuk során e kirakós utolsó darabjait is helyükre illesztve forradalmasították a gasztroduodenális betegségekről alkotott korábbi képet, ezzel elindítva a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) okozta kórképek kezelésének majd 40 éve tartó sikertörténetét.[6]

A Gram-negatív *H. pylori* baktérium számos humán megbetegedésért tehető felelőssé, oki szerepét igazolták a fekélybetegség, a gyomorrák és a gyomor eredetű MALT-limfóma kialakulásában. A *H. pylori* fertőzés a világ népességének mintegy 50%-át érinti, az általa okozott kórképek gyakori előfordulása jelentős globális terhet jelent az egészségügy számára. Az összes daganatkeltő fertőző ágens közül a *H. pylori* fertőzés tehető felelőssé a legtöbb daganatos megbetegedésért világszerte (5,5%).[7] Karcinogén folyamatot indukáló hatása miatt 1994-ben az Egészségügyi Világszervezet I. típusú onkogén baktériummá nyilvánította.[8] A baktérium azonosításának jelentőségét tükrözi, hogy Barry Marshall és Robin Warren úttörő munkáját 2005-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták.[9]

A *H. pylori* felfedezése a gasztroenterológia történetének egyik meghatározó mérföldköve, mely ugyan számos kérdésre választ adott, de ugyanakkor számtalan újabbat is felvetett, aminek köszönhetően e baktérium napjainkban is az orvosi és mikrobiológiai kutatások kiemelt célpontja.

I./1.1. A *H. pylori* fertőzés epidemiológiája

A *H. pylori* fertőzés előfordulási gyakorisága földrajzi területenként, életkoronként, etnikai hovatartozástól és szocioökonómiai körülményektől függően változik; a fejlődő országokban és a rosszabb társadalmi-gazdasági körülmények között élők körében a fertőzés előfordulási gyakorisága magasabb. Az elmúlt évtizedekben a higiéniai körülmények javulásának és a társadalmi-gazdasági fejlődésnek köszönhetően a prevalencia csökkenő tendenciát mutat; azonban a népesség növekedésének köszönhetően a fertőzöttek száma továbbra is stagnál vagy emelkedik.[10,11] Hooi és munkatársai nemrégiben közölt metaanalízisükben majd 200 közlemény eredményeinek feldolgozásával összesítették a *H. pylori* globális prevalenciáját.[12] Becslésük alapján mintegy 4,4 milliárd fertőzött van világszerte, azonban a fertőzés előfordulása földrajzi régiótól és országtól függően nagy variabilitást mutat. A legmagasabb prevalenciát Afrikában (79,1%), Latin-Amerikában és a Karib-térségben (63,4%), valamint Ázsiában (54,7%) találták, míg a fertőzöttek aránya Észak-Amerikában (37,1%) és Óceániában (24,4%) bizonyult a legalacsonyabbnak.[12] Gyakorisága azonban egy adott földrajzi régión belül is széles határok között mozoghat etnikai hovatartozástól és szocioökonómiai státusztól függően, például az Egyesült Államokban készült felmérések alapján a nem spanyolajkú fehér lakosság körében csak 18,4-26,2%, míg a színesbőrűek esetében 34,5% és 61,6% közötti volt a *H. pylori*-pozitív személyek aránya.[12]

Ugyan az elmúlt évtizedekben a *H. pylori* előfordulása csökkenő tendenciát mutat a felnőtt populációban, a becslések szerint minden harmadik tünetmentes vagy egészséges gyermek szeropozitív világszerte.[13] A felnőtt fertőzésekhez hasonlóan, gyermekek esetében is lényegesebb alacsonyabb gyakoriságot közölnek a fejlett országokban végzett tanulmányok, mint amelyek a fejlődő országok fiatal fertőzötteinek arányát mérik.[14] A tünetekkel rendelkező gyermekek esetében a különböző közlemények régiótól és az alkalmazott diagnosztikus eljárástól függően 3-76% közötti értékekről számolnak be, az általános világszintű becslés 39%.[13] Az életkorcsoportokat is figyelembe vevő vizsgálatok alapján a fertőzés prevalenciája a fiatalabb generáció életkorával párhuzamosan nő.[14–16] A felnőtt és gyermek fertőzöttek aránya régiótól függően változik, ugyanis míg az észak-európai, észak-amerikai és japán gyermekek körében alacsonyabb az átfertőzöttség a felnőttekkel összevetve, addig az epidemiológiai tanulmányok alapján ennek pont az ellenkezője figyelhető meg Dél-Amerikában,

Ázsiában és Koreában is.[14] Mindenesetre a fiatalabbak körében tapasztalható alacsonyabb átfertőzöttség előrevetítheti a *H. pylori* fertőzés és a hozzá kapcsolt megbetegedések további csökkenését a jövőben.[14]

A hazai prevalenciáról nem rendelkezünk átfogó adatokkal. Az első epidemiológiai tanulmány 1995-ben készült, eredményeik alapján a 20 és 60 év közötti résztvevők körében a szeropozitivitás aránya 63,3%.[17] A vizsgálat során nem találtak szignifikáns különbséget a férfiak és nők, vagy a városi és falusi lakosok átfertőzöttsége között, ellenben a szeropozitív esetek aránya statisztikailag korrelált az epigasztriális panaszok jelenlétével.[17] Az ezt követő években több hazai közlemény is született, melyek azonban mind az ország egy-egy régiójára vagy a populáció egy szűkebb rétegére korlátozódtak.[18–20] A legfrissebb tanulmány alapja a Bálint és munkatársai által végzett délkelet-magyarországi felmérés, mely során 1001 egészséges önkéntes véradó körében a fertőzés prevalenciáját 32%-osnak találták.[21] Eredményeiket azonban több szempontból sem tekinthetjük reprezentatívnak a teljes magyar lakosságra nézve. Vizsgálatuk ugyanis csak Csongrád és Békés megye egészséges lakosságára terjedt ki, ezen területeken pedig az országos szinthez képest lényegesen magasabb a mezőgazdasági dolgozók aránya, mely ráadásul alacsonyabb népsűrűséggel is párosul.

I./1.2. A fertőzés átvitele

A *H. pylori* humán patogén, mely emberről emberre terjed,[22] azonban a fertőzöttek magas száma ellenére átviteli mechanizmusa nem teljesen tisztázott. A legelfogadottabb elképzelés szerint a fertőzés átvitele főként feko-orális úton történik, a szennyezett víz és élelmiszerek fontos szerepet játszanak a humán megbetegedésekben.[23] Orális-orális átvitel is lehetséges, amint azt a baktérium nyálból és foglepedékből való izolálása is igazolta.[24,25] Különösen a fejlődő országokra jellemző, hogy a fertőzés leginkább családon belül, elsősorban anyáról gyermekre terjed.[25,26] A felső endoszkópos vizsgálatok során alkalmazott eszköz nem megfelelő megtisztítása esetén a fertőzés iatrogén átvitele is lehetséges.[11,25] Egy nemrégiben közölt tanulmányban két kutya és a gazdájuk *H. pylori*-pozitivitását igazolták és az ureaB gén szekvenciája alapján mindhárom fertőzés ugyanazzal a *H. pylori* törzzsel történt. Ez az első olyan közlemény, mely a *H. pylori* emberek és kutyák közötti átvitelének lehetőségét igazolja, ennek jelentősége azonban a fertőzés széleskörű elterjedésében még kérdéses.[27]

I./1.3. A baktérium kolonizációja

A baktérium kemoreceptorai a flagellák mozgását a magasabb H^+-ionkoncentráció felé irányítják, így a gyomor-bél traktusba való bejutását követően gyorsan utat talál a gyomor nyálkahártyájához, ahol a nyákbarrieren áthatolva adhéziós proteinek segítségével közvetlenül a hámsejtekhez tapad.[25,28,29] A gyomor savas környezetében enzimatikus aktivitással képes túlélni, ureáz enzimje a karbamidot ammóniává és széndioxiddá, majd utóbbit a periplazmatikus α-karbon anhidráz bikarbonáttá alakítja.[25] Az ureáz enzim termelése esszenciális, ugyanis az enzimdefektussal rendelkező baktériumok nem képesek a gyomor kolonizációjára.[30] Mindezen túl még számos másodlagos tényező is közrejátszik abban, hogy a baktérium képes lesz-e hosszú évtizedeken át perzisztálni a gazdaszervezetben. A baktérium ureáztermeléséhez elengedhetetlen a nikkel felvétele és a metalloenzimekbe való beépülése közötti optimális egyensúly, ugyanis a nikkel kötődése szükséges a Ni-metallochaperon HypA N-terminális NHE-motívumához, amely részt vesz az ureáz enzim érésében.[28] Maga a savas környezet is szükséges a kolonizációjához, ugyanis a legismertebb adhéziós fehérje, az ABO/Leb vércsoport-antigénekhez, valamint a gyomorhámsejtek és mucinok által expresszált fukozilált szénhidrátokhoz kötődő BabA által kialakított kötés savérzékeny, mely magasabb pH esetén reverzibilis.[28]

I./1.4. A baktérium virulenciafaktorai

A baktérium patogenitásához elengedhetetlen virulenciafaktorok az általuk mediált folyamatok jellege alapján három nagy csoportot alkotnak, tágabb értelemben ugyanis ide sorolhatóak a gyomor savas környezetében való túlélésben, vagy az epitélsejtekhez való kötődésben szerepet játszó tényezők is. Jelen összefoglalás a közvetlenül az epitélsejtek károsításában résztvevő legfontosabb virulenciafaktorokat ismerteti.

A baktérium virulenciája szempontjából a legfontosabb a cag patogenitási szigetet (cagPAI) kódoló kromoszómális DNS-régió. A CagPAI lókuszon kódolt körülbelül 31 gén egy IV-es típusú szekréciós rendszert alkot, amely pilust formálva egy merev tűszerkezeten keresztül a **CagA onkoproteint** a gyomor epitélsejtjeinek citoszoljába juttatja.[28,31] Ezt követően a CagA Src-függő tirozin-foszforiláción megy keresztül, és aktivál egy eukarióta foszfatázt (SHP-2), ami a gazdasejt morfológiai elváltozásaihoz és

fehérjéinek defoszforilációjához vezet.[28,31] A CagA számos intracelluláris jelátviteli út működését és fehérje expresszióját befolyásolja, melyek a CagA-pozitív törzzsel való fertőzéshez köthető gyulladás súlyosbodásához és a következményes peptikus fekély, valamint gyomorrák gyakoribb előfordulásához vezetnek.[31]

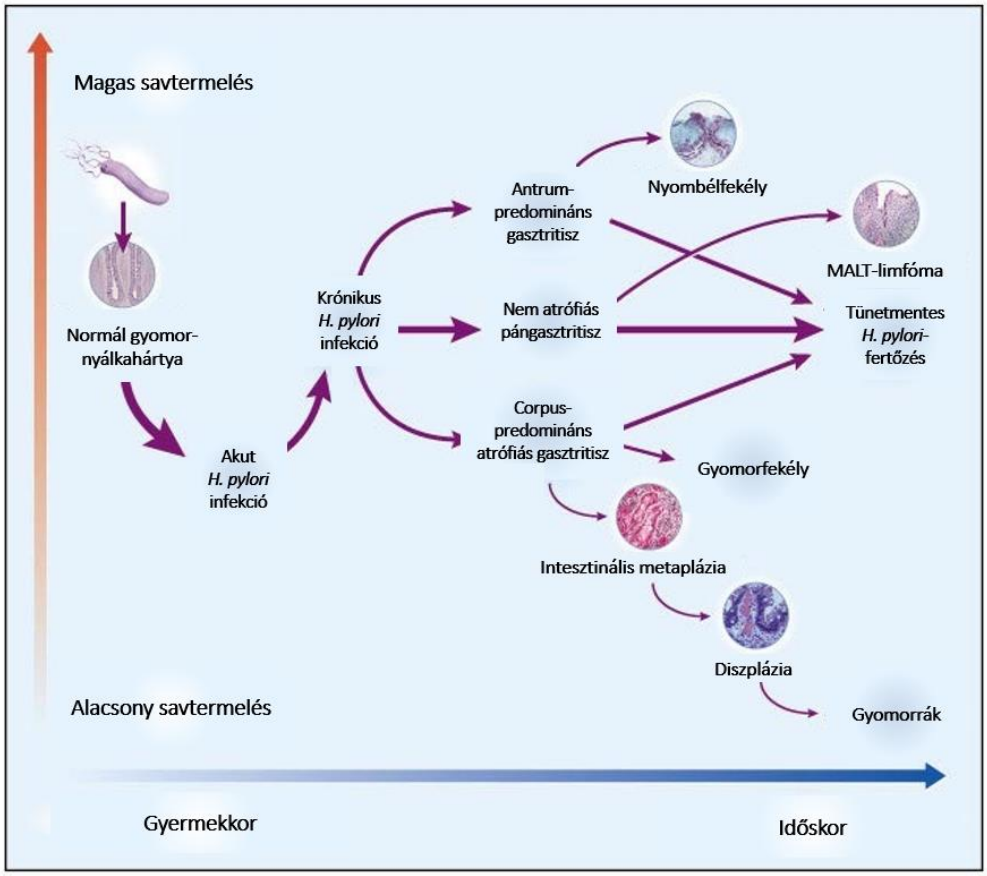
A baktérium másik fontos virulenciafaktora a vakuolizáló citotoxin A (**VacA**), melynek citotoxicitását a szignál régió (s1/s2), a középső régió (m1/m2) és a köztes régió (i1/i2) allélvariációi határozzák meg.[28,32] A VacA-t kódoló gén minden *H. pylori* törzsben jelen van, azonban citotoxicitása törzsenként változik.[31] Magát a citotoxint a baktériumok egy 140 kDa nagyságú polipeptid formájában választják ki, majd mindkét végét levágva, aktív formájában juttatják a gazdasejtbe.[31,32] A VacA elnevezést arról kapta, hogy az endoszómális kiérést megváltoztatja, melynek következtében vakuolák jelennek meg a hámsejtekben.[31,32] A citotoxin sejtkárosító szerepe összetett, a sejtek vakuolizációja által sejtnekrózist indukál, de az endoplazmatikus retikulum stresszén keresztül is fokozott autofágiát és sejthalált idéz elő.[32] Számos vizsgálat igazolta a VacA egyes allélvariációinak prognosztikus szerepét a peptikus fekély és a gyomorrák kialakulásában.[32] Li és munkatársai nemrég megjelent metaanalízisükben a VacA antitest szérumszintje és a peptikus fekély, valamint gyomorrák kialakulásának összefüggését írták le, ami felveti a VacA biomarkerként való alkalmazását ezen betegségek előrejelzésében.[33]

A külső membrán vezikulák („**outer membrane vesicles", OMVs**), mint elnevezésük is mutatja, a baktérium külső membránjából alakulnak ki, így az arra specifikus foszfolipideket és számos bakteriális virulenciafaktort, például adhezineket, proteázokat és toxinokat tartalmaznak.[32] Felszabadulásuk után a gyomorhámsejtek klatrin-függő endocitózissal vagy más klatrin-független mechanizmussal felveszik ezeket, majd az általuk szállított virulenciafaktorok fokozzák a gyulladásos reakciót és károsítják a sejtfunkciókat.[32] Lekmeechai és munkatársai nemrég megjelent közleménye alapján továbbá a KatA kataláz enzim expresszióján keresztül szerepük van a kórokozó reaktív oxigéngyökökkel szembeni védelmében is.[34]

I./1.5. A baktériumhoz köthető gyomorbetegségek

A *H. pylori* kolonizációja az akut gyulladásos fázis után minden esetben **krónikus gasztritisz** kialakulását eredményezi,[22,35] melynek súlyossága az élethosszon át

panaszmentes fertőzéstől a szövődmények kialakulása révén fatális megbetegedésig széles skálán mozog. Azt, hogy a fertőzéshez köthető súlyos szövődmények közül melyek kialakulásának kockázata fokozott az adott betegben, a baktérium okozta gyulladás jellege és gyomorbeli lokalizációja határozza meg.[36] A többnyire tünetmentes állapotból ugyanis a fertőzöttek körülbelül 20%-ánál a gyulladás progressziója figyelhető meg, mely klinikai tünetekkel járó megbetegedés kialakulását eredményezi.[37] A baktérium kolonizációjának lehetséges következményeit az intragasztrikus pH és az életkor függvényében az **1. ábra** foglalja össze.



[Reproduced with permission from (Suerbaum S & Michette P, N Engl J Med, 2002[36]), Copyright Massachusetts Medical Society.]

1. ábra. A *Helicobacter pylori (H. pylori)* fertőzés lefolyása.

A baktérium tartós kolonizációja **peptikus fekélybetegség** kialakulásához vezethet. A *H. pylori* fertőzés a nem szteroid típusú gyulladásgátló szerek tartós szedése mellett mind a gyomorfekély, mind a nyombélfekély legfontosabb rizikófaktora. A kialakuló fekély típusát a fertőzéshez társuló gyulladás okozta hypochlorhydria vagy hyperchlorhydria mellett még számos más tényező, többek között az intragasztrikus

szomatosztatin és gasztrin szintjének finomhangolása határozza meg.[38] A gyomorfekély a corpus érintettségével és gyomorsav szekréciójának csökkenésével társul, ugyanakkor az antrum-predomináns gasztritisz esetén megfigyelhető fokozott savszekréció nyombélfekély kialakulását eredményezi.[38] Becslések szerint a *H. pylori* okozta krónikus aktív gasztritiszben szenvedő középkorú férfiak körében 20-30%-ban alakulhat ki tüneteket okozó nyombélfekély vagy gyomorfekély életük során.[39]

A *H. pylori* hosszútávú kolonizációja olyan szerkezeti elváltozásokat idézhet elő a gyomor nyálkahártyáján, melyek a krónikus aktív gasztritiszből indulva az invazív intesztinális típusú gyomorcarcinóma kifejlődéséig vezethetnek.[35] A gyomor karcinogenezisének „**Correa-kaszkád**" néven elhíresült többlépcsős szekvenciáját Pelayo Correa írta le először 1992-ben. A folyamat kezdetén a nem-atrófiás gasztritiszből **atrófiás gasztritisz** alakul ki. Az atrófia az antrumból a corpus irányába progrediál a gyomor kisgörbülete mentén, szövettanilag a fő- és parietalis sejtek elvesztésével határozható meg.[40] Az atrófia jelenléte a gyomorrák kifejlődésének rizikófaktora,[35,40,41] súlyosságának foka, elhelyezkedése és kiterjedése a karcinogenezis végbemenetelének becslésére is alkalmazható.[41]

A Correa-kaszkád következő szakaszában az atrófiás gasztritiszt **intesztinális metaplázia** megjelenése követi. Kialakulása során a gyomor hámsejtjei szerkezetük megváltozásával bél típusú hámsejtekre jellemző morfológiát vesznek fel, köztük a normál gyomorra nem jellemző, bélspecifikus sejttípusok jelennek meg. A sejtek morfológiai átalakulása mellett a bélhámsejtekre jellemző CDX1 és CDX2 transzkripciós faktorok expressziója is megfigyelhető.[40] Az intesztinális metaplázia komplett és inkomplett altípusa hematoxylin&eozin (H&E) festett metszeteken egyszerűen elkülöníthető.[40,42] A komplett (vékonybél) típusú formában a vékonybél hámra jellemző kefeszegéllyel rendelkező eozinofil enterocyták jelennek meg kehelysejtek, valamint elszórtan Paneth sejtek és endokrin sejtek kíséretében.[43] E típusban a gyomorra jellemző mucinok (MUC1, MUC5AC, MUC6) komplett hiánya jellemző. Az inkomplett (vastagbél) típusú intesztinális metapláziában a vastagbél mirigyhámjára jellemző mucintermelő kolumnáris sejtek vannak jelen, melyekre a gyomor és bél típusú mucinok egyidejű termelése jellemző.[40,42] Ebben a típusban az enterocyták kefeszegélye nem alakul ki,[43] és minthogy a gyomor típusú mucinok termelése nem tűnik el teljesen illetve keverten jelenik meg bél mucinokkal, így gyomor vagy kevert típusú intesztinális

metapláziaként is említik az irodalomban.[40] Ezzel nem összetévesztendő jelenség, hogy a két intesztinális metaplázia típus keverten is megjelenhet így mind a komplett, mind az inkomplett típus jellemzőinek együttes jelenléte figyelhető meg, gyakran egy biopsziás mintán belül.[43]

A metaplázia, különösen annak kevert típusa általában az alacsony fokú **diszplázia** előfutára, amely magas fokú diszpláziába és karcinómába torkollhat.[44] Továbbra sem világos azonban, hogy a metaplázia a gyomorrák közvetlen előfutára vagy csupán a magas rákkockázat jelzője.[37,40] Shichijo és munkatársai retrospektív tanulmánya alapján mind az antrum régiójában jelenlévő, mind a corpusra is kiterjedő intesztinális metaplázia prediktív értékkel bír a gyomorrák kialakulását illetően.[45] Az atrófiához hasonlóan az intesztinális metaplázia is preneoplasztikus elváltozásnak tekinthető,[37] így elhelyezkedése és kiterjedése alkalmas lehet a magasabb rákkockázat becslésére is.[46]

I./1.6. Gyomorrák

A Correa-kaszkád utolsó állomása a gyomor intesztinális típusú adenokarcinómája. A sporadikus gyomorrák világszerte az ötödik leggyakoribb rákos megbetegedés, a daganatos halálokok listáján pedig a harmadik helyen szerepel. A becslések szerint 2018-ban mintegy egymillió új megbetegedésért és több mint 780 000 halálesetért volt felelős.[47] Az intesztinális típusú gyomorrák elsődleges kockázati tényezője a *H. pylori* fertőzés, a daganat okozta globális egészségügyi teher legalább 80%-a a kórokozónak tulajdonítható.[48] A baktérium hosszútávú kolonizációja és a gyomorrák kialakulása közötti szoros kapcsolat azonosítását követően a Nemzetközi Rákkutató Egyesület („International Agency for Research on Cancer”, IARC) 1. osztályú onkogén baktériummá nyilvánította.[8]

A Correa-kaszkád leírása óta ismertek a gyomornyálkahártya prekancerózus elváltozásai, melyek a gyomorrák kifejlődésének előfutárainak tekinthetőek. A fertőzés egyértelmű patogenetikai szerepének ismeretében felmerült ezen elváltozások lehetséges reverzibilitása a baktérium eradikációját követően. A kérdés megválaszolására az elmúlt években több metaanalízis is vizsgálta az eradikáció hosszútávú hatásait a gyomornyálkahártya elváltozásaira. Egybehangzó eredményeik alapján a karcinogenezis folyamatában az intesztinális metaplázia az a kritikus pont, mely esetében a fertőzés eliminációját követően javulás már nem várható.[22,49–51]

Az utóbbi években igazolták a *H. pylori* fertőzés szerepét a diffúz típusú gyomorrák sporadikus variánsának kifejlődésében is. Kísérletes tanulmányok alapján a baktérium virulenciafaktorai a daganat patogenezisébe elsődlegesen az E-cadherin fehérje szintézisének, expressziójának és működésének akadályozásával avatkoznak be.[52]

A gyomor proximális polipózisával társuló gyomor adenokarcinóma („gastric adenocarcinoma and proximal polyposis syndrome", GAPPS) egy ritka, autoszomális domináns öröklődési mintázatú gyomorrák szindróma.[53] A sporadikus gyomorrákkal ellentétben a *H. pylori* fertőzés általában hiányzik a GAPPS-betegeknél, melynek háttere még nem tisztázott.[54]

A baktérium eradikációja hatékony a gyomorrák megelőzésében, még az előrehaladott preneoplasztikus elváltozásokkal rendelkező betegek esetében is.[55] A daganat prevalenciájának csökkentése érdekében tömeges megelőzési programokra lenne szükség, mely primer prevenciós stratégiaként magában foglalja a fertőzés szűrését és kezelését, másodlagos prevencióként pedig a betegek felső endoszkópos vizsgálattal végzett kezelés utáni követését.[55] Ugyanakkor a fertőzés okozta daganatos megbetegedés megelőzését tágabban értelmezve a korszerű és érzékeny technikák alkalmazása a fertőzés diagnózisára, a prekancerózus nyálkahártyaléziókkal rendelkező betegek rákkockázatának pontos becslése és a betegek követése, valamint a fertőzés eradikációjára hatékony antibiotikumkombinációk használata is ebbe a fogalomkörbe tartozik.

I./1.7. MALT-limfóma

A marginális zóna B-sejtjeiből származó MALT-limfóma az extranodálisan elhelyezkedő limfómák leggyakoribb típusa, az összes non-Hodgkin-limfóma mintegy 7-8%-a sorolható ebbe a csoportba.[56,57] Jellemzően a gasztrointesztinális rendszerben fordul elő, de számos más szervrendszer érintettségét is dokumentálták.[57] A daganat többnyire a nyálkahártya olyan területein alakul ki, amely nem rendelkezik saját limfoid follikulusokkal, de krónikus gyulladás következtében limfoid infiltráció következik be.[57,58] Ugyan a vékony- és vastagbél nyálkahártyája limfoid struktúrákban gazdag szövetnek számít, az egészséges gyomorra nem jellemző a jelenlétük.[59]

Már a baktérium azonosítása utáni években megfigyelték, hogy a *H. pylori* fertőzés okozta krónikus gyulladás esetén a helyi immunválasz részeként limfoid

follikulusok jelennek meg.[58–60] Stolte és Eidt munkájuk során 220 egészséges, 104 refluxbetegségben szenvedő, valamint 2544 *H. pylori*-pozitív beteg gyomorbiopsziás mintáját vizsgálták. Míg az egészséges résztvevők és a refluxbetegek esetében nem, a fertőzött betegcsoport esetében 1297 mintában (50,97%) találtak limfoid follikulusokat a minták szövettani kiértékelése során.[59] Wotherspoon és munkatársai tanulmányának célja az volt, hogy a fertőzéshez kapcsoltan megjelenő limfoid szövet és a MALT-limfóma közös jellemvonásait felderítsék. Munkájuk során 450 *H. pylori*-fertőzött beteg szövettani mintáját vizsgálták, melyek közül 125 esetben (27,78%) figyelték meg limfoid follikulusok kialakulását a krónikus gyulladásra adott lokális válaszreakcióként. Ebből nyolc esetben a B-limfociták a MALT-limfómára jellemző módon infiltrálták az epitéliumot. Ugyanebben a közleményben további 110 MALT-limfómában szenvedő beteg mintájának vizsgálata során 101 esetben (92%) a baktérium jelenlétét mutatták ki.[58] Eredményeik alapján ok-okozati kapcsolatot feltételeztek a két kórkép között. Parsonnet és munkatársai az összesen mintegy 230 ezer résztvevővel végzett beágyazott eset-kontroll vizsgálatukban azt találták, hogy azon 33 beteg esetében, akiknél a gyomor primer MALT-limfómája fejlődött ki, szignifikánsan gyakrabban volt igazolható korábbi *H. pylori* fertőzés, mint a kontroll esetekben (párosított OR: 6,3; CI: 2-19,9).[61] Nem találtak összefüggést azonban a nem gyomor eredetű non-Hodgkin-lymphomában szenvedő 31 beteg esetében a korábbi fertőzéssel (párosított OR: 1.2, CI: 0,5-3).[61]

A fertőzés szerepének igazolását követően Wotherspoon és munkatársai már 1991-ben felvetették, hogy a baktérium eradikációja a MALT-limfóma gyógyulásához vezethet, hiszen a fertőzés eliminációjával a krónikus gyulladásos állapot is megszűnik, így a MALT-limfóma talajául szolgáló limfoid szövet nem lesz jelen többé a gyomor nyálkahártyájában.[58] Az európai szakmai konszenzus irányelvei alapján a lokalizált MALT-limfóma elsővonalbeli kezelése a baktérium eradikációja, ezzel a korai stádiumú (Lugano I/II) esetek jelentős része gyógyítható. Amennyiben a MALT-limfóma a t(11,18) transzlokációt hordozza, a baktérium eradikációja a daganat progressziójára már nincs hatással, ezért más kezelési lehetőséget kell választani.[22]

I./1.8. A *H. pylori* fertőzés extragasztrikus manifesztációi

Az elmúlt évtizedekben a fertőzés számos extragasztrikus manifesztációját igazolták. A legtöbbet vizsgált entitások az iszkémiás szívbetegség, a vashiányos anémia, az Alzheimer-kór és a refluxbetegség („gastroesophageal reflux disease", GERD).

A *H. pylori* fertőzés és a gyomron kívüli betegségek közötti kapcsolatot először Mendall és munkatársai közölték 1994-ben.[62] Prospektív tanulmányukban a fertőzés és az **iszkémiás szívbetegség** kialakulása között találtak összefüggést 45-65 éves férfiakban. A fertőzés pontos szerepe még nem tisztázott, továbbá az sem, hogy szerepe a betegség kialakulásában vagy a folyamat progressziójában jelentősebb. Az összefüggés hátterében a legvalószínűbb elmélet alapján a fertőzés által fenntartott krónikus gyulladásos állapot áll, melyet alátámasztanak az iszkémiás szívbetegségekre jellemző emelkedett gyulladásos paraméterek is.[63] Egy másik elképzelés szerint molekuláris mimikri eredményeként a bakteriális antigének olyan T- és B-sejtes választ indukálnak, mely során képződő ellenanyagok a saját szervezet egyes antigénjeivel keresztreagálnak.[63] Ayada és munkatársai állatmodellen igazolták, hogy a baktérium 60-as hősokkfehérjéjére irányuló Th1-limfocita-túlsúlyú immunválasznak ezen mechanizmus révén szerepe van az ateroszklerózis progressziójában.[64]

Több tanulmány is összefüggésbe hozta az **Alzheimer-kórt és a nem Alzheimer eredetű demencia** kialakulását a baktériummal,[65,66] sőt egyes vizsgálatok szerint demens betegekben a fertőzés eradikációjával a kognitív képességek javulása[67] mellett hosszabb ötéves túlélés is elérhető.[68] A kapcsolat hátterében a fertőzöttekben gyakrabban előforduló apolipoprotein E polimorfizmusa lehet, amely az Alzheimer-kór kockázati tényezőjeként ismert.[69] A *H. pylori* idegrendszerre gyakorolt hatásának mechanizmusára több elképzelés született. Egyes szerzők szerint a kórokozó oro-nazális úton közvetlenül vagy az enterális idegrendszeren keresztül elérve az agyat okoz károsodást, míg mások szerint csak a fertőzött monocyták jutnak a központi idegrendszerbe a vér-agy gát gyulladásos citokinek által mediált károsításán keresztül.[70] Mindenesetre a baktérium idegrendszerkárosító hatását alátámasztja, hogy a demenciával való kapcsolatán túl számos más neurológiai betegséggel is összefüggésbe hozták.

A hematológiai kórképek közül a legtöbbet vizsgált entitás, a **vashiányos anémia** és a fertőzés kapcsolatát Blecker és munkatársai már 1991-ben felvetették esettanulmányukban.[71] Később számos metaanalízis alátámasztotta a két kórkép közötti

szoros összefüggést.[72–75] A baktérium vashomeosztázist befolyásoló hatásai között igazolták a vasfelszívódásért felelős hepcidin fehérje megváltozott szérumszintjét,[76] vaselvonó képességét a gazdaszervezet transzferrinjéből és laktoferrinjéből,[77] valamint a vashiányos anémiás fertőzöttekben a baktérium neutrofil-aktiváló proteinjében gyakran megfigyelt génpolimorfizmusokat, melyek képessé teszik a vas gyorsabb felvételére[78]. A fertőzés következményeként kialakuló erozív gasztritisz akut vagy krónikus vérzéshez vezethet, különösen nem szteroid gyulladásgátlók egyidejű szedése esetén.[79] A nemzetközi irányelvek alapján a vashiányos anémiában szenvedő betegekben a vérzésforrás tekintetében negatív gasztroszkópiás és kolonoszkópiás eredmény esetén *H. pylori* tesztelés indokolt, melynek pozitivitása esetén a baktérium eradikációja szükséges.[22,80]

Ugyan a *H. pylori* fertőzéssel összefüggésbe hozható extragasztrikus betegségek tárháza igen széles, az egyik legtöbbet vitatott entitás azonban kétségkívül a fertőzés **refluxbetegséggel** való kapcsolata. Kezdetben azt gondolták, hogy mivel mind a fertőzéshez asszociált antrumgasztritisz és nyombélfekély, mind a refluxbetegség hiperaciditáshoz köthető kórképek, a baktérium eradikációjával mindkét entitás egyszerre gyógyítható.[81] A kezdeti klinikai tapasztalatok azonban ellentétes kapcsolatot vetettek fel a két kórkép között.[82,83] A *H. pylori* fertőzés protektív szerepét a refluxbetegség kialakulásában először Labenz és munkatársai igazolták 1997-ben.[83] Klinikai vizsgálatukban *H. pylori* fertőzéshez asszociált nyombélfekélyben szenvedő betegekben figyelték, hogy a fertőzés sikeres eradikációját követően gyakrabban alakul-e ki refluxbetegség a páciensekben, mint a nem eradikált betegekben. Azonban a három év elteltével végzett kontrollvizsgálaton azt tapasztalták, hogy a *H. pylori*-fertőzött betegek ritkábban szenvedtek refluxbetegségben, mint a sikeresen eradikált páciensek (12,9% és 25,8%, $p<0.001$).[83] Vizsgálatukban a sikeres eradikáció után kialakuló refluxbetegség rizikófaktorai a férfi nem, az előrehaladott, corpusra lokalizált gasztritisz és a terápiát követő súlygyarapodás voltak.[83]

Az elmúlt évtizedekben számos további klinikai vizsgálat, metaanalízis és összefoglaló közlemény elemezte a két kórkép összefüggését, eltérő eredménnyel.[84–86] A jelen szakmai álláspont szerint a gasztritisz lokalizációjától függően a fertőzésnek védő és súlyosbító szerepe is lehet a GERD lefolyásában, ugyanis míg a corpusgasztritisz hypoaciditáshoz vezet, az antrum túlsúlyú gasztritisz hyperacid állapottal jár. A CagA virulenciafaktort

hordozó törzsek által gyakran okozott, az egész gyomorra kiterjedő pángasztritisz szintén hypochlorhydriát eredményez.[87,88]

A két kórkép ellentétesen változó prevalenciája is felveti összefüggésüket, ugyanis míg az elmúlt két évtizedben a *H. pylori* fertőzés prevalenciája csökken, a GERD előfordulása világszerte növekszik.[88] A *H. pylori*-pozitív corpusgasztritisz, pángasztritisz és atrófiás gasztritisz esetében az eradikációt követően valóban gyakrabban lépnek fel refluxos panaszok azon betegekben, akiknek alapvetően gyengébb a nyelőcső alsó sphinctere.[22,86] Ez azonban a baktérium kiirtásának szükségességét nem kérdőjelezi meg.[22,88]

I./1.9. A *Helicobacter* genusba tartozó egyéb kórokozók

A *H. pylori* klinikai jelentőségének felismerését követően a figyelem a gasztrointesztinális és hepatobiliáris rendszer egyéb kórokozói felé irányult.[89] Számos további *Helicobacter* genusba tartozó fajt leírtak, melyekre „újabb" *Helicobacter* speciesekként vagy non-*Helicobacter pylori Helicobacter*ekként (NHPH) hivatkoztak az irodalomban.[89] A genusba tartozó fajok száma évről évre nő, mára már 41 fajt foglal magában.[90]

Elsőként Dent és munkatársai írták le a *H. pylori*hoz hasonló baktériumok jelenlétét 1987-ben megjelent tanulmányukban.[91] A gyomorminták vizsgálata során megfigyelt, a *H. pylori*-nál csavartabb alakú baktériumot egy önálló fajnak gondolták a *Helicobacter* genuson belül, első leírói a *Gastrospirillum hominis* nevet adták neki. A később elterjedt *Helicobacter heilmannii* elnevezést Konrad Heilmann német patológusról kapta, aki röviddel halála előtt elsőként közölt nagyobb esetszámú hisztológiai tanulmányt humán betegcsoporton.[92,93] Az ekkor még egységesen kezelt kórokozó szerepét igazolták a gasztritisz,[94] a peptikus fekély[95] és a MALT-limfóma[96] kialakulásában is. Nakamura és munkatársai nemrégiben megjelent közleményükben polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel igazolták, hogy ezen kórképek *H. pylori*-negatív formájának több mint 20%-ában NHPH baktériummal való fertőzés mutatható ki.[97]

Az NHPH csoportba tartozó baktériumok gyomorrákkal való kapcsolata nem bizonyított, melynek hátterében az állhat, hogy kisebb affinitással kötődnek a hámsejtekhez, mint a *H. pylori*.[96] Ezek a kórokozók a *H. pylori*val összevetve azonban lényegesen gyakrabban vezetnek MALT-limfóma kialakulásához.[98,99]

A baktérium 16S rRNS génszekvenciája alapján igazolták, hogy kettő, genetikailag lényegesen eltérő típusa van.[100] A **H. heilmannii 1-es típusba** mindössze egy kórokozó tartozik, a *H. suis,* melyet először disznók gyomrából izoláltak sikeresen.[101] A *H. suis* a humán gyomorban leggyakrabban előforduló NHPH csoportba tartozó faj.[97,100] A **H. heilmannii 2-es típusa** több kórokozót foglal magában, melyek jellemzően kutyák és macskák gyomrában találhatóak, és zoonózis formájában okoznak humán megbetegedést. Az ide tartozó számos faj közül a legnagyobb jelentőségűek a *H. felis,* a *H. bizzozeronii*, és a *H. salomonis*. A 16S rRNS és a 23S rRNS szekvenciája alapján a *H. suis* tökéletesen elkülöníthető a 2-es típusba tartozó baktériumoktól, míg azok ezen génszakaszok alapján nem differenciálhatóak egymástól.[100] A 2-es típusba tartozó kórokozók pontos fajszintű azonosítása jóval bonyolultabb, az egyes fajok közötti genetikai különbségek különböző génszakaszokon jelennek meg.[100]

A Helicobacter heilmannii csoportba tartozó baktériumok nomenklatúrájának egyszerűsítésére és az egyes fajok körülményes azonosításának kiküszöbölésére vezették be a *Helicobacter heilmannii sensu lato (Helicobacter heilmannii s.l.)* összefoglaló elnevezést, mely minden olyan, emberi vagy állati gyomrot kolonizáló NHPH baktériumra használható, melyről csak hisztopatológiai vagy elektronmikroszkópos adat áll rendelkezésre. A *Helicobacter heilmannii sensu stricto (Helicobacter heilmannii s.s.)* elnevezés vagy a taxonómiailag pontos neve használandó, amennyiben a kórokozót faj szinjén azonosítani tudták.[93,102]

I./2. A *H. pylori* fertőzés diagnosztikája

I./2.1. A fertőzés szövettani diagnosztikájának kérdései

A baktérium tenyésztésének körülményessége és alacsony szenzitivitása okán a fertőzés szöveti diagnosztikája már a kezdeti időkben a figyelem középpontjába került.[103] A nemzetközi iránymutatások alapján a felső endoszkópos vizsgálat során nyert gyomorbiopsziás minták szövettani kiértékelése jelenleg is a *H. pylori* fertőzés kimutatásának arany standard eljárása.[104]

I./2.1.1. A gasztritisz szövettani klasszifikációja

A baktérium felfedezése előtti időkben a gyomorminták rutin patológiai vizsgálata során gyakran megfigyelt gasztritiszt sokkal inkább szövettani mellékleletnek tartották, mint betegségnek.[105] Azonban a fertőzés szerepének igazolását követően több, széles körben használt iránymutatást is közöltek a krónikus gasztritisz, illetve a gyomornyálkahártya szerkezeti elváltozásainak szövettani kiértékelésére. Jelen összefoglalás a rutin patológiai feldolgozás során leggyakrabban használt klasszifikációs rendszerek bemutatására korlátozódik.

Az első szakmai iránymutatást 1990-ben mutatták be a gasztroenterológiai világkongresszuson, melynek helyszínéről a **Sydney-protokoll** („The Sydney System") elnevezést kapta.[106] A gasztroenterológusok, mikrobiológusok és patológusok közreműködésével született megállapítások nem csak a gasztritisz szövettani revíziójára, hanem epidemiológiai és klinikai kérdéseire is kiterjedtek, így végül hat különálló tanulmány formájában kerültek közlésre a *Journal of Gastroenterology and Hepatology* folyóiratban 1991-ben.[107–112] A klasszifikáció alapja a gasztritisz elhelyezkedése volt, mely az antrum vagy a corpus területére korlátozódott, vagy pángasztritisz formájában az egész gyomorra kiterjedt.[106] A Sydney-protokoll alapján a gasztritisz feltételezett etiológiai háttere mellett mind az antrum, mind a corpus területéről származó minták esetén külön-külön rögzíteni kell a krónikus gasztritisz, aktivitás, intesztinális metaplázia, atrófia, és a *H. pylori* baktériumok jelenlétét.[106] A vizsgált elváltozások szemikvantitatív értékelésére négyfokú skála használatát javasolták.[106]

Az eredeti Sydney-protokoll megalkotása után négy évvel gasztroenterológiai betegségekben jártas patológusok nemzetközi csoportja találkozót rendezett Houstonban a korábbi protokoll frissített változatának összeállítására. Az 1996-ban közölt **módosított Sydney-protokoll** a megjelenése óta eltelt két évtized ellenére is a legszélesebb körben használt szakmai iránymutatás világszerte.[113] Az eredeti protokoll alapjaiban nem változott, a legjelentősebb módosítás az atrófiás és nem-atrófiás gasztritisz terminológiai pontosítása volt. A korábban is vizsgált elváltozások szemikvantitatív kiértékeléséhez bevezették a vizuális analóg skála használatát.[113]

A módosított Sydney-protokoll töretlen népszerűsége okán megjelenését követően több mint tíz évnek kellett eltelnie egy újabb széles körben elterjedni képes klasszifikációs rendszer megalkotásáig. Egy nemzetközi szakértőkből álló csoport 2007-

ben hozta nyilvánosságra az **OLGA („operative link on gastritis assessment”)** elnevezésre hallgató szakmai iránymutatást a *Gut* szakmai folyóirat hasábjain.[41] Míg a korábbi Sydney-protokoll elsődleges célja a gyomorbiopsziás minták szövettani leleteinek egységesítése volt, addig az OLGA a gyomorrák kockázatának becslésével terápiás és prognosztikus információkat is nyújt a kezelőorvos számára. Ennek alapja az atrófia foka és topográfiai elhelyezkedésének becslése a mintavétel helye szerint, melyek alapján a betegeket a gyomorrák kialakulásának rizikója alapján öt stádiumba osztja. A rendszer a gasztritisz súlyosságát a korábbiakkal megegyezően négyfokú skálán méri, kiértékelése során azonban ugyanakkora jelentőséget tulajdonít mindegyik típusú gyulladásos sejtnek.[41]

Capelle és munkatársai 2010-ben közölték az **OLGIM („operative link on intestinal metaplasia assessment”)** klasszifikációs rendszert.[46] Az OLGA módosított változata csak egy apró csavarral különbözik az eredetitől: az atrófia helyett az intesztinális metaplázia fokát és elhelyezkedését tekinti a gyomorrák kialakulása szempontjából legrelevánsabb rizikófaktornak. A szerzők azzal indokolták döntésüket, hogy az atrófia patológiai definiálása nehézkesebb, ebből következőn a vizsgálók közötti diszkrepancia is nagyobb lehet, míg az intesztinális metaplázia megítélése esetén ez a probléma jóval ritkábban áll fenn.[46]

I./2.1.2. Mintavétel az endoszkópos vizsgálat során

A biopsziás mintavétel topográfiai helyeinek megválasztására az egyik első és a mai napig legszélesebb körben használt ajánlás az 1996-ban megjelent módosított Sydney-protokoll.[113] Az eredeti Sydney-protokoll összesen négy biopsziás minta vételét javasolja, kettőt az antrum, és kettőt a corpus területéről, mindkét régióban az első és hátulsó gyomorfalból.[107] A módosított Sydney-protokoll ezt pontosítva az antrum területéről a kis- és nagygörbület mentén 3 cm-re a pylorustól, a corpus területéről a kisgörbület mentén 4 cm-re proximálisan az incisura angularistól, valamint a nagygörbület mentén középről, és egy ötödik biopsziás minta vételét is javasolja az incisurából.[113,114] A jelenleg érvényben lévő európai szakmai iránymutatás alapján a felső endoszkópos vizsgálat során az antrum és a corpus kis- és nagygörbületi részéről szükséges biopsziás mintát venni, majd a mintákat topográfiai régió szerint két külön csőben felcímkézve kell elküldeni a szövettani feldolgozás helyszínére.[114] Amennyiben

ezen felül daganatos elváltozásra gyanús terület is megfigyelhető a vizsgálat során, abból is szükséges mintát venni a képlet szövettani verifikálásához.[114] Az európai szakmai ajánlás kiemeli, hogy a kromoendoszkópos képalkotó technikák alkalmazása segítheti a gyanús területek feltérképezésével az ideális mintavételi helyek megválasztását.[114] A konszenzus továbbá ajánlja az OLGA és OLGIM szövettani klasszifikációs rendszerek alkalmazását az előrehaladott atrófiás gasztritiszben szenvedő betegek azonosításához.[114] A módosított Sydney-protokoll szerint ajánlott incisura területéről vett biopszia szükségességéről megoszlik a gasztroenterológusok véleménye.[113,114] Az európai szakmai konszenzus ajánlása szerint amennyiben az OLGA vagy OLGIM rendszereket használják a betegek stádiumbeosztásához vagy kromoendoszkópia nem áll rendelkezésre a célzott mintavételhez, úgy a biopsziás mintavétel az incisura angularis területéről is megfontolandó, ugyanis ezen a területen a leggyakoribb az intesztinális metaplázia és a premalignus diszplázia előfordulása is.[114]

I./2.1.3. A patológiai feldolgozás során használt festések a kezdetektől napjainkig

A baktérium szövettani diagnosztikájának kérdése egészen Warren és Marshall 1983-as közleményéhez vezethető vissza, melyben a szerzők az eredetileg a spirochaeták kimutatására kifejlesztett **Warthin-Starry féle ezüstözést** használták a kórokozók azonosítására. Warren a gyomorbiopsziás minták vizsgálata során tapasztalta, hogy a kis spirális baktériumok sokkal jobban láthatóvá tehetők ezzel az eljárással, mint a konvencionálisan használt H&E-festéssel.[6] Marshall szerint a gyomorbiopsziás minták rutinszerű ezüstözésének hiánya az oka annak, hogy az endoszkópos mintavétel elterjedése óta eddig nem azonosították a szövetminták mintegy felében jelenlévő kórokozót azok patológiai feldolgozása során. Ugyanebben a közleményben Palmer és munkatársai 1954-es tanulmányára hivatkozik,[115] melyben a szerzők 1140 gyomorbiopsziás minta elemzése során nem tudták igazolni spirális baktériumok jelenlétét, melynek hátterében szerinte az ezüstözés hiánya állt.[6] A közlemény hatására más tanulmányok szintén a Warthin-Starry féle eljárást alkalmazták a baktérium jelenlétének igazolására a kezdeti időkben.[116–120] Az ezüstözés azonban időigényes és drága technikának számított,[103] ráadásul a folyamat során a kicsapódó ezüstszemcsék a gyomornyákban elhelyezkedve akár téves diagnózishoz is vezethették a vizsgálót.[121] A

precipitált ezüstszemcséktől való elkülönítését a baktérium granuláris megjelenése ugyancsak nehezítette.[119]

Az 1980-as években a fertőzés szöveti diagnózisa az érdeklődés középpontjába került, érvényes szakmai iránymutatás hiányában különböző szövettani festésekkel kísérleteztek a szerzők.

A Giemsa-festést már a 19. század végétől használták, elsősorban hematológiai minták patológiai feldolgozása során.[122] A **módosított Giemsa-festés** során az eredeti protokollban fellelhető ecetsavas differenciálási lépést hagyják el.[103,123,124] A gyors és alacsony költségű eljárást Rathbone és munkatársai javasolták a fertőzés diagnózisára.[124] Ugyanabban az évben Gray és munkatársai az eljárás érzékenységét az akkor arany standardnak számító Warthin-Starry-ezüstözésével megegyezőnek tartották, így elsőként vezették be rutin diagnosztikai célra a laboratóriumukban.[123] Később más tanulmányok is alátámasztották a Giemsa-festés megfelelő érzékenységét és javasolták rutinszerű alkalmazását gyomorbiopsziás minták vizsgálatára.[119,125,126] Napjainkban is az egyik legszélesebb körben használt szövettani festés a fertőzés diagnózisára világszerte.

Montgomery és munkatársai 1988-as közleményükben a baktériumok azonosítására széles körben elterjedt **Gram-festést** használták a *H. pylori* kimutatására.[127] Vizsgálatukban a tenyésztés, a Warthin-Starry-féle ezüstözés és a H&E-festés eredményéhez mérten a Gram-festés érzékenysége 92%, specificitása pedig 100% volt.[127] Egyes szerzők kefecitológiai minták festésére találták leginkább megfelelőnek.[128] Madan és munkatársai tanulmányukban a Gram-festés két módosított háttérfestésű változatát, a Brown-Hopps és a Brown-Brenn-festést használták.[119] A Brown-Hopps-festés érzékenysége ugyan hasonlónak bizonyult a már szélesebb körben vizsgált Giemsa-festéshez, azonban technikailag lényegesen bonyolultabb és időigényesebb eljárás.[119] Ugyan a kezdeti időkben még számos tanulmányban alkalmazták, elsősorban körülményesebb technikai kivitelezése miatt a Gram-festés használata nem terjedt el hosszútávon a fertőzés szöveti diagnosztikájában.[119,128–131]

Az 1980-as évek végén több közleményben is kimagasló érzékenységűnek találták az **akridin-narancs-festés** érzékenységét a fertőzés diagnózisában.[121,132] Az akridin-narancs egy, a nukleinsavakhoz specifikusan kötődő fluorokróm, melyet már korábban is használtak más fertőzések diagnózisára klinikai mintákban.[133] Pinkard és munkatársai 1985-ben **fáziskontraszt mikroszkópot** használtak a baktérium

kimutatására, melynek érzékenységét a speciális festésekkel összehasonlítva magasnak találták.[134] Ezen eljárások széles körben való elterjedését nagymértékben korlátozta, hogy használatuk során speciális mikroszkóp szükséges, amely kevés rutin szövettani laboratórium eszköztárában található meg.[123,124]

A korábban háttérfestésként elterjedt **Loeffler-féle metilénkék** festéket 1994-ben használták először a baktérium kimutatására.[135] Maga a metilénkék festék és a gyomor kapcsolata többrétű, a festéket már a kezdeti időkben kipróbálták a felső endoszkópos vizsgálat során az intesztinális metaplázia megjelenítésére,[136] nemrég megjelent közlemények pedig fotodinamikus terápia keretében a fertőzés eradikációját kísérlik meg vele antibiotikum használata nélkül.[137] A baktérium szövettani kimutatásában ugyan használják még, de nem tartozik a legszélesebb körben alkalmazott eljárások közé.

Genta és munkatársai egy olyan festés kifejlesztését tűzték ki célul, mely mind a *H. pylori* fertőzés diagnózisára, mind a gyomornyálkahártya szerkezetének pontos megjelenítésére alkalmas. A Steiner-féle ezüstözés, a H&E és az Alciánkék-perjódsav-Schiff (PAS) ötvözetéből született **Genta-festést** 1994-ben közölték, érzékenységét a baktérium kimutatásában a Warthin-Starry-féle ezüstözésével megegyezőnek tartották.[138] Jelentőségét az adja, hogy ez az első olyan eljárás, amit direkt a *H. pylori* szövettani detektálására fejlesztettek ki. Ennek ellenére széles körben nem terjedt el.

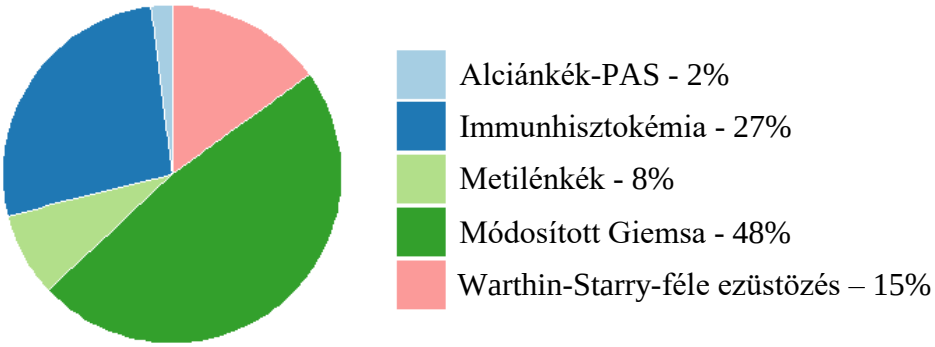
Az **alciánkék-PAS-festés** használata elsősorban az intesztinális metaplázia kimutatása, illetve altípusainak elkülönítése céljából honosodott meg a gyomorpatológiában. Alacsony érzékenysége miatt nem javasolják a fertőzés diagnózisára.[139]

A **H&E-festés** a fertőzés diagnózisára való használatáról megoszlik a patológusok véleménye. Az eljárás a baktériumok mellett a szövetet is megszínezi, ezért a bakteriális infiltráció nehezebben kivehető a vizsgáló számára.[140] A baktérium felfedezésének idején sem Robin Warren kollégái, sem a főnöke nem volt képes felismerni a kórokozókat a gyomormintákban, ami végül is a kutatókat más eljárás kipróbálásához vezette.[140] Mindezek ellenére időről időre felmerül a speciális eljárások elhagyása, és csak a H&E-festés használata a fertőzés diagnózisára.[141,142]

Az **immunhisztokémia** magas érzékenységű eljárás, azonban emellett még kiváló specificitásával is kiemelkedik a baktérium szöveti diagnosztikájában alkalmazott egyéb festések közül.[143] Utóbbi tulajdonsága különösen hasznos azokban az esetekben,

amelyekben a baktérium a gyakran megfigyelhető kokkoid alakjában van jelen.[144] Más, gyakran használt eljárásokhoz hasonlítva több tanulmány is az immunhisztokémia használata esetén találta a legkisebb különbséget a vizsgálók között.[126,143] A baktérium detektálására használt egyéb eljárásokhoz képest költségesebb, és automatizáció hiányában bonyolultabb a kivitelezése. Mindezek ellenére kimagasló diagnosztikus teljesítménye okán széleskörű alkalmazása javasolt a *H. pylori* szöveti kimutatásában.[142]

A széles körben elterjedt eljárások már évtizedek óta ismertek, azonban a baktérium szöveti kimutatásával elérhető magas szenzitivitás okán időről időre újabb technikákkal is kísérleteznek a szerzők. A fejlesztések klinikai szempontból legfőbb mozgatórugója a diagnózisig eltelt idő. A **γ-glutamil-hidroxi-metil-rodamin-zöld próbát** (gGlu-HMRG) már alkalmazták korábban daganatos megbetegedések valós idejű megjelenítésére, de csak nemrég merült fel alkalmassága a baktérium által termelt γ-glutamil-transzpeptidáz (GGT) kimutatására biopsziás mintákból. Akashi és munkatársai tanulmányukban azt találták, hogy az eljárás alkalmazható a *H. pylori* gyors kimutatására, szenzitivitása azonban nem éri el a kívánt szintet (75-82%).[145]



2. ábra. A hazai szövettani laboratóriumokban használt festések a *H. pylori* kimutatására. (Saját felmérés, 2014.)

A kördiagram a válaszadó 60 hazai patológiai osztály által használt festéseket mutatja. A módosított Giemsa-festés (48%) volt a legszélesebb körben használt eljárás, ugyanakkor a megkérdezett laboratóriumok negyede rutinszerűen az immunhisztokémiát alkalmazza a fertőzés diagnózisára. A hazai gyakorlatban a H&E-festés önálló használata nem honosodott meg.

I./2.2. A fertőzés diagnózisára használt egyéb eljárások

Már az **endoszkópos vizsgálat** során látható *H. pylori*-asszociált gyomornyálkahártya-elváltozások felvetették a fehér fényű képalkotás („white light endoscopy", WLE) alkalmasságát a fertőzés diagnózisára biopsziás mintavétel nélkül is. A kórjelző strukturális elváltozások közül a legtöbbet vizsgáltak az antrum-nyálkahártya nodularitása, eritémája, a gyomorredők elsimulása, a szubmukózus vérerek láthatósága és az eróziók jelenléte.[146,147] A vizsgálatra legalkalmasabb gyomorrégiónak a corpus nagygörbület menti része bizonyult.[147] Az endoszkópos vizsgálat diagnosztikus pontossága a *H. pylori*-asszociált gyomornyálkahártya-elváltozások megítélésében javult a nagyító endoszkópia („magnifying endoscopy", ME) és a szűkített spektrumú képalkotás („narrow band imaging", NBI) elterjedésével.[148] Újabb tanulmányok az endoszkópos vizsgálat során készített képi dokumentáció automatizált kiértékelésére mesterséges intelligencia-alapú eljárásokat dolgoztak ki és alkalmaztak sikerrel a *H. pylori* fertőzés diagnózisára.[149–151] Ugyan számos, endoszkóppal is látható elváltozás köthető a fertőzéshez, annak diagnózisára az endoszkópos vizsgálat biopsziás mintavétel nélkül nem alkalmas.[146,148,152,153] A fejlett képalkotó technikák klinikai haszna, hogy alkalmazásukkal pontosabban meg lehet ítélni a biopsziás mintavétel helyét és a minták számát, mellyel a szövettani diagnózis pontosítása mellett a mintavételt követő vérzés előfordulása csökkenthető.[153] Az orvosi képalkotás gyors fejlődése és az új technikák térhódítása fényében ezek az „optikai biopszia" végzésére alkalmas módszerek ígéretes diagnosztikus eszköznek tűnnek, így a jövőben endoszkópos vizsgálóorvosok a kellő szaktudás megszerzésével akár igazi „endo-patológusokká" is válhatnak majd.[153]

A felső endoszkópos vizsgálat lehetőséget biztosít mintavételre, melyből a baktérium tenyészthető laboratóriumi körülmények között. A **tenyésztés** magas specificitású, de alacsony szenzitivitású eljárás, ugyanis a baktérium speciális környezeti igényeinek teljesülése és a tapasztalt személyzet ellenére is az esetek relatíve nagy arányában (30-50%) sikertelen lehet. Az eljárás érzékenységét növeli, ha a minta laboratóriumba szállítása 30 percen belül bekövetkezik, valamint, ha 35 °C-ra előmelegített véragart és helicobacter-szelektív, polymixin és colistin tartalmú agart használnak a baktérium tenyésztése során.[148] Előnye abban rejlik, hogy a baktériumtenyészeten antibiotikumrezisztencia vizsgálat végezhető, így az a fertőzés

diagnózisa mellett terápiás útmutatást is adhat. A baktérium kokkoid formájának tenyésztése - számos kísérletes próbálkozás ellenére - mindeddig nem járt sikerrel.[154]

A **gyors ureáz teszt („rapid urease test", RUT)** alapja a baktérium által termelt ureáz enzim kimutatása. Az endoszkópos vizsgálat során nyert biopsziás mintát ureát és fenolvörös indikátort tartalmazó közegbe helyezik. A baktérium jelenlétében annak ureáz enzimje az ureából ammóniát és szén-dioxidot szabadít fel, mely a közeg pH-ját lúgos irányba tolja. A pH változására a közegben található indikátor sárgáról vörös színűre festi a közeg színét.[148,155] Az 1987-ben közölt eljárást napjainkban is széles körben használják, mivel képes már az endoszkópos helyiségben választ adni a fertőzés kérdésére.[156] Antibiotikumok, bizmut-tartalmú gyógyszerek és protonpumpa-inhibitorok (PPI) használata, valamint az intesztinális metaplázia jelenléte növeli az álnegatív eredmények gyakoriságát.[148,155,157] Gyorsasága mellett az eljárás további előnye az egyszerű használata, magas specificitása és alacsony költségei.[148] Magas specificitásának feltétele azonban a mintában található magas baktériumsűrűség (legalább 10^4 baktérium).[148] Akárcsak a szövettani vizsgálatra szánt biopsziás minták esetében, a gyors ureáz tesztre is javasolt a többszörös mintavétel mind az antrum, mind a corpus területéről.[157]

A Graham és munkatársai által 1987-ben leírt **urea kilégzési teszt („urea breath test", UBT)** a RUT-hoz hasonlóan a baktérium ureáz enzimjének kimutatatásán alapul.[116,158] A vizsgálat során a betegek egy szénizotópból (^{13}C) előállított ureatartalmú kapszulát nyelnek le, majd a gyomorban jelenlévő baktérium az ureát ammóniára és szén-dioxidra bontja. Az eredmény kiértékeléséhez a betegtől légzésmintát vesznek és mérik a kilélegzett szén-dioxid ^{13}C-tartalmát.[159] Amennyiben a ^{13}C-izotóp kimutatható a kilélegzett levegőben, a beteg *H. pylori*-pozitív, az izotóp koncentrációja arányos a gyomornedv ureáz aktivitásával, azaz a gyomorban lévő baktériumok mennyiségével.[159] Az eljárás első leírását követően nem sokkal a ^{13}C-izotóp helyett a radioaktív ^{14}C-izotóp használatával is megjelentek az első közlemények.[160] A baktériummennyiség csökkentése révén álnegatív eredményt adhat, ha a beteg a vizsgálatot megelőző két hétben PPI-t szedett, illetve ha a megelőző négy hétben antibiotikumterápián esett át.[159] A baktériummal összefüggésbe hozható rákmegelőző gyomornyálkahártya-elváltozások, illetve gyomorrák vagy MALT-limfóma jelenléte is tartósan alacsonyabb baktériumdenzitást eredményez, mely befolyásolhatja a teszt eredményét. Aktív vérzés jelenlétében szintén csökken az érzékenysége, ezért ilyen esetekben negatív eredmény

esetén legalább négy hét elteltével javasolják a vizsgálat megismétlését.[159,161] Az eradikációs kezelés eredményének megítélésére is az UBT az elterjedt vizsgálóeljárás, mivel az sikeres kezelés esetén rögtön negatívvá válik.[162]

A **széklet antigén vizsgálat („stool antigen test", SAT)** ugyancsak széles körben használt, alacsony költségű, nem invazív eljárás a fertőzés kimutatására. Az enzim immunoassay és immunkromatográfia alapú változatai terjedtek el. Érzékenységét az UBT-hez hasonlóan befolyásolják a baktériumok mennyiségét csökkentő körülmények, mint a PPI- vagy antibiotikumhasználat, akut vérzés, illetve a nyálkahártya szerkezeti elváltozásai. A túl híg székletben felhígulhat a *H. pylori*-specifikus antigének koncentrációja, mely szintén befolyásolhatja a teszt eredményét.[22]

A fertőzés kimutatásának indirekt módja a baktérium ellen kialakuló immunválasz mérése. A **szerológiai vizsgálat** során a *H. pylori*-specifikus IgG és IgA antitesteket mérik enzimhez kötött immunszorbens teszt („enzyme-linked immunosorbent assay", ELISA) technikával a betegek vérében vagy szérumában. Az eljárás legnagyobb előnye, hogy érzékenységét nem befolyásolják azok a körülmények, melyek alacsony baktériumterheléshez és ezáltal más vizsgálattal álnegatív eredményhez vezetnek.[163] Egyes széles körben használt eljárások kereskedelmi forgalomban is elérhetőek, például a Gastropanel® szerológiai teszt, amely monoklonális antitestek segítségével vizsgálja négy gyomorspecifikus biomarker (pepszinogén I, pepszinogén II, gasztrin-17 és *H. pylori*-specifikus antitestek) szintjét.[159,164] Mind a négy biomarker normális plazmaszintje azt jelzi, hogy a gyomor nyálkahártyája normális szerkezetű és működésű. Az egyes biomarkerek megváltozott szintje a *H. pylori* fertőzésen túl a gyomor savtermeléséről és a gyomorrák kialakulásának kockázatáról is információt ad.[159]

A **polimeráz láncreakció (PCR) és ezen belül is a real-time (rt)-PCR-alapú eljárások** jelenleg a legszélesebb körben használt molekuláris technikák a fertőzés diagnózisára. Kimagasló érzékenységüknek köszönhetően a baktériumok alacsony száma vagy kokkoid formában való jelenléte esetén is diagnózishoz juthatunk.[154] A különböző eljárásokhoz primerek széles tárháza áll rendelkezésre, a leggyakrabban az ureA vagy ureC génszakaszok a célrégiók.[154] Számos közelmúltban végzett tanulmány közölte a 16S rRNS gén szekvenálásának magas érzékenységét a *H. pylori* diagnózisára.[165] Szymczak és munkatársai tanulmányukban a szövettani kiértékelést (H&E- és Giemsa-festéssel), a PCR eljárást ureA specifikus primerekkel és a 16S rRNS gén szekvenálását hasonlították

össze. Vizsgálatukban 40 betegből vettek biopsziás mintát az antrumból, melyből a szövettani vizsgálattal 8, ureA-specifikus PCR vizsgálattal 13, míg a 16S rRNS gén szekvenálásával 20 pozitív esetet találtak.[166] Legnagyobb előnye, hogy a PCR-alapú eljárások használatával a *H. pylori* diagnózisa mellett annak antibiotikumrezisztenciájáról is információt nyerhetünk.

A közelmúltban számos új, ígéretes eljárást közöltek a fertőzés diagnózisára, klinikai alkalmazásukat azonban még további vizsgálatoknak kell alátámasztaniuk. Qiu és munkatársai egy **CRISPR-Cas12a technológián** alapuló, nem invazív diagnosztikus eljárást dolgoztak ki a baktérium kimutatására székletmintában. A módszert gyorsasága, egyszerű használata és alacsony költségei teszik ígéretessé a klinikai használatra.[167] A nemrég kifejlesztett **EndoFaster** eszköz a baktérium jelenlétét indirekten határozza meg a gyomornedv ammónium-koncentrációjából és pH-jából az endoszkópos vizsgálat során.[168,169] Zullo és munkatársai vizsgálatában a szövettanilag *H. pylori*-negatív páciensek 61,1%-a pozitívnak bizonyult az eszköz használatával. Az eljárás előnye, hogy sem a PPI-kezelés, sem a korábbi eradikációs kísérlet nem befolyásolja a teszt pontosságát.[168] Széleskörű alkalmazásának kezdő lépcsőfoka lehet, hogy magas szenzitivitással képes detektálni a hypochlorhydriát, mellyel képes lehet leszűkíteni azon páciensek körét, akik esetében szövettani mintavétel szükséges.[169]

I./3. A *H. pylori* fertőzés kezelése

I./3.1. A *H. pylori* kezelésében alkalmazott terápiás protokollok

Ugyan *in vitro* körülmények között a *H. pylori* számos antibiotikumra érzékeny, ugyanezek a szerek *in vivo* sokszor hatástalannak bizonyulnak a fertőzéssel szemben. Ennek hátterében feltehetően az áll, hogy a baktérium a savas gyomor belső felszínét borító vastag nyákréteg alatt, közvetlenül a gyomorhámsejtekhez tapadva található meg, ahol kevés szer képes kifejteni a hatását. Így a kezdeti időkben az eradikációra szánt antibiotikum kiválasztásánál a legfőbb kihívás az volt, hogy az adott gyógyszer képes legyen a kórokozók helyszínén megfelelő koncentrációt elérni, ellenállva a gyomorsav károsító hatásának is. A vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy ezeknek az elvárásoknak önállóan egyik szer sem képes a kívánt szinten eleget tenni, ellenben több gyógyszer kombinációban történő alkalmazásával kiváló terápiás hatékonyság érhető el. A

felismeréssel megkezdődött a kombinációs terápiák mai napig tartó korszaka. Történelmileg az első igazán hatékony protokollt 1990-ben írták le, mely bizmutból, tetraciklinből és metronidazolból állt.[170] Bazzoli és munkatársai néhány évvel később javasolták elsőként a clarithromycin alkalmazását hármas kombináció részeként, mely - ezt nem sokkal követően - a *H. pylori* fertőzés kezelésének arany standardjává vált. [171,172]

A fertőzés kezelésére vonatkozó hatályos szakmai irányelveket régiótól függően nemzetközi szakértők csoportja állítja össze. Az Európában érvényes, „maastrichti konszenzus" néven elterjedt iránymutatás jelenleg érvényben lévő ötödik revízióját az Európai Helicobacter és Mikrobióta Tanulmányozó Csoport („European Helicobacter and Microbiota Study Group", EHMSG) közölte 2017-ben a *Gut* szakmai folyóirat hasábjain.[22] A fertőzés globális elterjedtségét tekintve jelentősek még az Európán kívüli ajánlások, így az Amerikai Gasztroenterológiai Kollégium („American College of Gastroenterology", ACG) által összesített irányelvek,[173] valamint a kanadai szakértők részvételével készült, „Torontó-konszenzus" néven ismertté vált szakmai iránymutatás.[174]

I./3.1.1. A clarithromycin és a klasszikus hármas terápia

A makrolid antibiotikumcsaládba tartozó **clarithromycin** a *H. pylori* fertőzés kezelésének egyik kulcsgyógyszere.[175,176] Szerkezetileg az erythromycinhez hasonlóan 14 laktongyűrűt tartalmaz, melyhez L-kladinóz és D-dezozamin csoport kapcsolódik.[176] Bakteriosztatikus hatású szer, mely a riboszómák 50S alegységében található 23S rRNS V. doménjéhez kapcsolódva gátolja a baktérium fehérjeszintézisét.[177,178] Antibakteriális hatékonysága a többi makrolidéval megegyező, de jobb a felszívódása a gyomor nyálkahártyáján és savállóbb, melynek köszönhetően az antibiotikumcsalád tagjai közül a legalkalmasabbnak bizonyult a *H. pylori* fertőzés kezelésére.[178]
Ugyan monoterápiában próbálva is a leghatékonyabb antibiotikum a fertőzéssel szemben, de ez még nagyon magas dózis szedése esetén sem éri el a kívánt szintet.[179] További veszélye, hogy ilyen formában történő alkalmazása esetén sokkal nagyobb százalékban alakul ki ellene másodlagos rezisztencia, mint amikor egy kombinációs terápia része.[180]

A klasszikus **hármas terápia** PPI és két antibiotikum, a clarithromycin és amoxicillin vagy metronidazol kombinációjából áll.[22,177,181] Már az 1996-ban megrendezésre került első maastrichti konszenzuskonferencia is a hármas terápia egy

hétig tartó alkalmazását javasolta a fertőzés kezelésére, mely magas hatásfoka mellett könnyen tolerálható volt a betegek számára.[181]

A kezdeti időkben valóban kiemelkedő hatékonyságúnak bizonyult, a kilencvenes években végzett tanulmányokban 80-90% feletti eradikációs sikerről számoltak be a szerzők.[172,181,182] A sikeres eradikációk utóbbi évtizedekben megfigyelt csökkenésének hátterében elsősorban a clarithromycin-rezisztencia széleskörű elterjedése áll.[22] A terápia sikerességét ugyanakkor befolyásolhatja még többek között a betegek csökkent együttműködési hajlama, a gyomor magasabb savtartalma, a magas baktériumterhelés vagy akár az adott baktériumtörzs egyedi jellemzői is.[22] Mind az európai, mind az amerikai szakmai konszenzus alapján a klasszikus hármas terápia nem alkalmazható előzetes érzékenységi teszt nélkül azon körben, ahol a clarithromycin-rezisztencia a 15%-ot meghaladja.[22,173] Azonban továbbra is a klasszikus hármas terápia alkalmazása javasolt elsővonalbeli kezelésként olyan régiókban, ahol alacsonyabb a rezisztencia gyakorisága és nem áll fenn a betegnél korábbi makrolidexpozíció lehetősége.[22,173]

I./3.1.2. A fertőzés eradikációjára használt egyéb antibiotikumok és terápiás protokollok

A *H. pylori* fertőzés kezelésére széles körben használt protokollokban szereplő további antibiotikumok az amoxicillin, a metronidazol, a levofloxacin és a tetraciklin. A klasszikus hármas terápia másik komponense, az aminopenicillinek közé tartozó **amoxicillin** a baktérium sejtfalszintézisét gátolja.[177] Az 5-nitroimidazol-származék **metronidazol** egy olyan antimikrobiális szer, amelynek hatása kifejtéséhez nitro-reduktázok általi aktivációjára van szükség. A redukció során citotoxikus intermedierek képződnek, amelyek DNS-károsodást okozva a baktériumok elpusztulásához vezetnek.[176] A fluorokinolonok családjába tartozó **levofloxacin** a DNS-giráz gátlásával a baktérium DNS-szintézisét akadályozza.[176] A **tetraciklin** a riboszómák nagy alegységéhez kötődik, ahol az aminoacil-tRNS működését befolyásolva gátolja a fehérjék bioszintézisét.[177]
A kezelésre alkalmazott további terápiás protokollok a bizmut-alapú négyes terápia, a szekvenciális terápia, az egyidejű (nem bizmut alapú négyes) terápia, a hibrid terápia, valamint többnyire mentőterápiaként a levofloxacin-alapú hármas terápia.

A bizmutsót ugyan már évtizedek óta használják antibiotikummal kombinációban a baktérium eradikációjára, de hatásmechanizmusa még ma sem teljesen ismert. Yao és

munkatársai nemrég közölt tanulmányában proteomika és metabolomika alapú eljárásssal azonosították, hogy a bizmut *H. pylori*-ellenes hatása *in vitro* elsősorban a CagA és a VacA virulenciafaktorok expressziójának alulszabályozásán, a baktérium kolonizációjában kulcsszerepet játszó flagellák felépülésének megzavarásán és az antioxidáns enzimek gátlásán alapul. [183]

Az európai szakmai konszenzus alapján a magas (>15%) clarithromycin-rezisztenciával rendelkező területeken a bizmut-alapú négyes kombináció vagy az egyidejű (nem bizmut-alapú négyes) terápia ajánlott, míg a magas clarithromycin- és metronidazol kettős rezisztenciával rendelkező területeken a bizmut alapú négyes terápia az ajánlott első vonalbeli kezelés.[22]

A probiotikumok kiegészítő alkalmazása javasolt az eradikációs arány növelése és a kezeléssel kapcsolatos mellékhatások előfordulásának csökkentése érdekében.[22,172]

I./4. Antibiotikumrezisztencia

A kezdeti idők kihívásaira a több gyógyszer kombinációjából álló terápiás protokollok bevezetése jelentette a választ. Azonban ezek korábban tapasztalt magas hatékonysága az idők folyamán nagymértékben csökkent, melynek hátterében az alkalmazott antibiotikumok ellen kialakuló rezisztencia állt. Jelenleg a globálisan növekvő mértékű antibiotikumrezisztencia jelenti a legnagyobb akadályt a fertőzés sikeres eradikációjában. Leggyakrabban szekunder típusa figyelhető meg, mely sikertelen eradikációs kísérlet következtében alakul ki.[184] A korábban nem eradikált betegek körében megfigyelhető primer rezisztencia magas szintje összefüggésbe hozható a *H. pylori* fertőzés eradikációjában is használt antibiotikumok növekvő és ellenőrizetlen fogyasztásával, amelyeket a lakosság más gyakori fertőzéseinek (pl. légúti, nemi szervi és húgyúti fertőzések, parazitafertőzések) kezelésére is használnak.[184] A nem tudatos antibiotikumhasználat következtében a multidrog-rezisztencia kérdésköre a *H. pylori* esetében is felmerül, ugyanis világszerte a törzsek 9,6%-a három vagy több antibiotikummal szemben is rezisztens.[176]

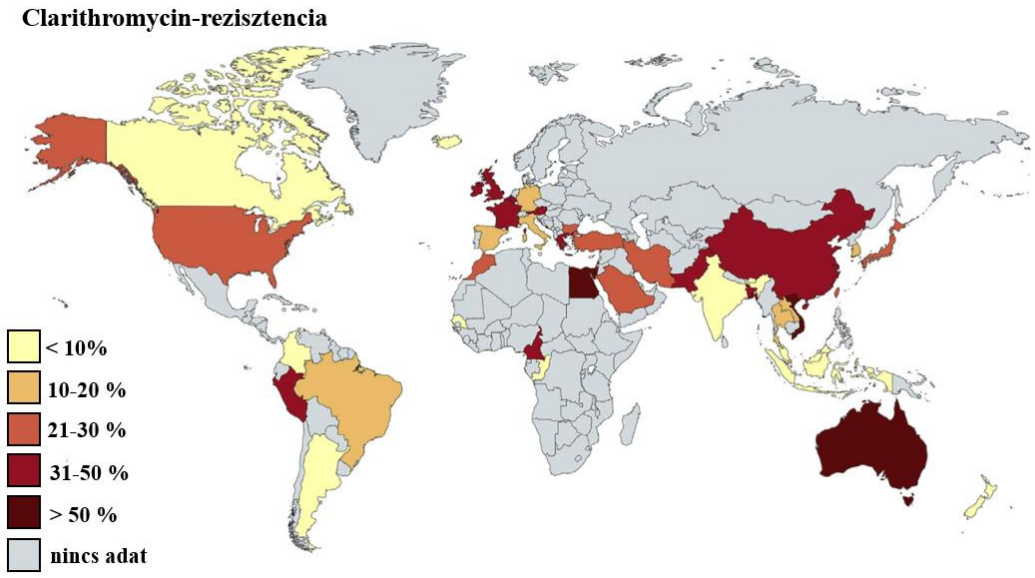
Az antibiotikumrezisztencia veszélye az eradikációra használt szerek közül elsősorban a clarithromycint, a metronidazolt és a levofloxacint érinti, az amoxicillin és a tetraciklin esetében lényegesen ritkább az előfordulása, így a terápiás jelentősége is kisebb.[22]

I./4.1. Clarithromycin-rezisztencia

A clarithromycin fehérjeszintézis-gátló szer, mely a bakteriális riboszóma nagy alegységéhez reverzibilisen kötődve elősegíti a peptidil-tRNS idő előtti felszabadítását az akceptor helyről, mellyel hatékonyan gátolja a peptidlánc megnyúlását.[178] A rezisztencia kialakulásáért a baktérium riboszómáinak 50S alegységén a 23S rRNS peptidil-transzferáz centrumának egyes kodonjain kialakuló pontmutációk felelősek, melyek képesek negatívan befolyásolni a gyógyszer riboszómákhoz való affinitását.[176,185] A három leggyakoribb pontmutáció az A2142G, A2142C, és az A2143G, melyeknél lényegesen alacsonyabb számban fordulnak elő az A2144T, T2717C, G1939A, T1942C és a C2694A mutációk.[176,186] Másik lehetséges mechanizmusa a clarithromycin kiválasztása efflux pumpa transzportfehérjék segítségével. Azonban úgy tűnik, hogy ez a folyamat csak a 23S rRNS mutáns törzsekben működik hatásosan, ezért feltehetően nem egy teljesen független rezisztencia mechanizmusról van szó, hanem az efflux pumpák általi kiválasztás az rRNS pontmutációi okozta rezisztenciával szinergikusan hat. [185,187]

A rezisztencia kifejlődésének hátterében az esetek egy részében korábbi clarithromycin-tartalmú protokollal végzett eradikációs kísérlet áll.[184] Ugyanakkor a nem eradikációs célból szedett clarithromycin, illetve a makrolid antibiotikumcsalád többi tagja között megfigyelhető keresztrezisztencia okán az egyéb makrolidok fogyasztása is nagymértékben hozzájárult a rezisztencia globális mértékű elterjedéséhez.[184,188] Bár a clarithromycin rezisztenciát a baktériumok átadhatják horizontális géntranszfer útján egymásnak egy adott *H. pylori* populáción belül, azonban jelenlegi ismereteink szerint ez a mechanizmus nem játszik szerepet a rezisztenciának a fertőzött személyek közötti terjedésében.[185,189–191]

Savoldi és munkatársai metaanalízisükben a WHO által definiált régiók szerint vizsgálták a rezisztencia prevalenciáját. Eredményeik alapján a primer rezisztencia előfordulása 15% felett alakult az Európai Régióban (18%; 95% CI, 16%-20%), a Kelet-Mediterrán Régióban (33%; 95% CI, 23%-44%) és a Nyugat-Csendes-óceáni Régióban (34%; 95% CI, 30%-38%). Az Amerikai Régióban és a Délkelet-ázsiai Régióban 10%-os rezisztenciaarányt regisztráltak (95% CI, 4%-16% és 5%-16%).[184]



3. ábra. A clarithromycin-rezisztencia prevalenciája országonként.
Összesített prevalencia a 2006 és 2016 közötti időszakból.
(Savoldi és munkatársai, *Gastroenterology*, 2018 ábrája)[183]

I./4.2. Más antibiotikumok elleni rezisztencia

A **metronidazol** elleni rezisztencia a legelterjedtebb, a primer rezisztencia aránya világszerte meghaladja a 15%-ot, Savoldi és munkatársai metaanalízise alapján Európában 56% (95% CI, 46%-66%), míg Amerikában 23% (95% CI, 2%-44%) között mozog.[176,184] A clarithromycinnel és metronidazollal szembeni elsődleges kombinált rezisztencia előfordulása Európában jelent kihívást, ugyanis itt 19% (95% CI, 0%-39%) a gyakorisága, míg a világ többi részén 10% alatt alakul.[184] Mechanizmusa összetett, ugyanis a baktérium a gyógyszer intracelluláris aktivációja okán több támadásponton is tud védekezni a hatása ellen. Indirekt módon a metronidazol aktivációját gátolhatja a szer sejtbe történő felvételének akadályozásával, vagy kiáramlásának fokozásával, illetve a nitroreduktáz enzimek aktivitásának csökkentésével, ugyanakkor direkt módon a reaktív oxigéngyököket semlegesítő mechanizmusok és a DNS javításáért felelős enzimek fokozott működésével a gyógyszer baktericid hatását védi ki.[176,186]

A **levofloxacin** a fluorokinolonok családjába tartozó, széles spektrumó antibiotikum, amelyet leginkább mentőterápia részeként alkalmaznak a *H. pylori* fertőzés kezelésében.[176] A rezisztencia hátterében a gyrA A vagy B alegységének (a D91 pozíció

G, N, A vagy Y, N87K és A88V) vagy a gyrB DNS-girázokat kódoló génszakasz (D481E vagy R484K) mutációit azonosították a rezisztens törzsekben.[176,186] Savoldi és munkatársai metaanalízise alapján a levofloxacinnal szembeni rezisztencia minden WHO-régióban 15% felett alakult, csak Európában bizonyult alacsonyabbnak (11%; 95% CI, 9%-13%).[184] Míg a clarithromycin-rezisztencia a gyermekek között magasabb, addig a levofloxacin esetében fordított tendencia figyelhető meg, ugyanis magasabb aránya az idősebb korosztályra jellemző.[176]

A béta-laktámok csoportjába tartozó **amoxicillin** ellen kialakuló rezisztencia főként a penicillinkötő fehérje 1A gén mutációihoz társul, míg a **tetraciklin** elleni rezisztenciáért többnyire a baktérium riboszómáinak kis alegységén (16S rRNS) található mutációk felelősek.[186] Az amoxicillinnel és a tetraciklinnel szembeni elsődleges rezisztencia mindenhol 10% alattinak bizonyult, kivéve a Kelet-Mediterrán Régiót, ahol az amoxicillin-rezisztencia elérte a 14%-ot (95% CI, 8%-20%).[184]

I./4.3. Heterorezisztencia

A rezisztens fertőzések az egyes kórokozók rezisztenciastátusza alapján két nagy csoportra bonthatóak. Amennyiben a baktériumpopuláción belül mindegyik baktérium rezisztens egy adott antibiotikummal szemben, homorezisztens fertőzéssel állunk szemben. Heterorezisztens fertőzés esetén az egyes baktériumok különböző rezisztenciastátusszal jellemezhetőek, azaz mind érzékeny, mind rezisztens egyedek megtalálhatóak a vizsgált populációban.[192–194] A régóta ismert jelenségre eleinte „heterogén antibiotikumrezisztenciaként” hivatkoztak, a heterorezisztencia fogalmát 1970-ben használták először az irodalomban.[192]

A heterorezisztencia evolúciós szempontból teoretikusan átmeneti állapotnak tekinthető, mely vagy a homorezisztenciához vezető út egy pontja, vagy éppen ellenkezőleg, a baktériumpopuláció tagjai számára rezisztens tulajdonságuk elvesztése a cél, mely az adott antibiotikum szelekciós nyomásának hiányában inkább hátrányt jelent számukra.[194,195] A heterorezisztens baktériumpopulációk származásuk alapján leginkább monoklonálisak, azaz egyedei ugyanabból a baktériumklónból erednek.[194,196] A leggyakoribb mechanizmusokat tekintve a **monoklonális heterorezisztencia** hátterében feltehetően az áll, hogy az antibiotikum szelekciós nyomása jelenlétében ugyanazon baktériumtörzs egyedeinek egy része spontán mutációval a számára kedvezőbb állapotba

differenciálódik vagy homorezisztens állapotból a szelekciós nyomás hiányában visszaalakul. A **poliklonális heterorezisztencia** leginkább rezisztens és érzékeny baktériumtörzsekkel történő koinfekció vagy szekvenciális infekció eredményeként alakulhat ki.[194] Ugyancsak elképzelhető, hogy egy monoklonális heterorezisztens populációból sorozatos nem-rezisztencia specifikus mutációk révén új törzs alakul ki egy gyomorban, így poliklonális heterorezisztenciát kialakítva. Ám előfordulhat az is, hogy a két különféle érzékeny törzset tartalmazó baktériumpopuláció in vivo antibiotikumnyomás alatti szelekciója csak az egyik törzsben eredményez rezisztenciamutációt, így poliklonális heterorezisztenciát hoz létre, de teoretikusan akár a két törzsön belül is lehetnek érzékeny és rezisztens baktériumok (két monoklonális heterorezisztens vagy egy monoklonális heterorezisztens és egy homorezisztens vagy egy monoklonális heterorezisztens és egy érzékeny törzs együttélése).[194,197]

A heterorezisztens baktériumpopulációk tovább oszthatóak a kórokozók intragasztrikus elhelyezkedése alapján: ***intra-niche* típusú**, ha az érzékeny és a rezisztens baktériumok ugyanabban a régióban, egymással keveredve helyezkednek el a gyomor nyálkahártyáján, illetve ***inter-niche* típusú**, ha a baktériumok rezisztenciastátuszuk szerint elkülönülve, a gyomor különböző anatómiai pontjain találhatóak meg.[193] Utóbbi típusa diagnosztikai szempontból kiemelkedő fontosságú, ugyanis a különböző rezisztenciastátuszú baktériumok nem egyenletes eloszlása könnyen az adott baktériumpopuláció antibiotikumrezisztenciájának alábecsléséhez vezethet.[193]

A *H. pylori* baktériumpopulációk esetében gyakori jelenség a heterorezisztencia, többek között leírták már a metronidazol, a clarithromycin, a tetracyclin, a ciprofloxacin és az amoxicillin esetében is.[193,198,199] Mindezek ellenére a fertőzés diagnózisát és kezelését tárgyaló szakmai irányelvek nem térnek ki a heterorezisztens fertőzések kérdéskörére. Klinikai relevanciája pedig jelentős, ugyanis ezen infekciók esetében a megfelelő vizsgálóeljárások hiánya a kórokozók rezisztenciájának alábecsléséhez vezethet, melyet helytelen terápiás döntés révén akár homorezisztens vagy multirezisztens fertőzések kialakulása is követhet.[194]

I./4.4. Az antibiotikumrezisztencia diagnózisa

Az antibiotikumrezisztencia vizsgálata a clarithromycin és a levofloxacin esetében kiemelt fontosságú, ugyanakkor az amoxicillin és a tetraciklin elleni rezisztencia

sokkal ritkábban fordul elő. A metronidazol esetében bár gyakran találnak rezisztens törzseket a vizsgálatok során, azonban sok esetben ezek rezisztenciája *in vivo* leküzdhető (pl. dózisemeléssel).[200] A rezisztens baktériumok azonosítására fenotípusos és genotípusos módszerek állnak rendelkezésünkre.[162]

I./4.4.1. A fenotípusos rezisztencia kimutatása

A rutin klinikai laboratóriumokban a *H. pylori* antibiotikumrezisztenciájának kimutatása az esetek nagy részében a baktérium tenyésztését követően elvégzett fenotípusos eljárásokon alapul, ilyen például a korongdiffúziós módszer és az Epszilométer-teszt (E-teszt), valamint az elsősorban referenciaként használt agardilúciós módszer.[176,178] Ugyan a tenyésztés alapú eljárások a rezisztenciavizsgálat arany standardjai, az eredmények egységességét számos faktor befolyásolhatja, akár a sejtek életképessége, a leoltás mérete, az inkubáció körülményei és a táptalaj jellemzői is.[178] A *H. pylori* tenyésztése speciális igényei okán nem kis kihívást jelent, ezért ezen eljárások csak jól felszerelt laboratóriumokban, megfelelő szakemberek bevonásával végezhetőek.[194] A klinikai használat során talán legnagyobb hátrányuk mégis az, hogy az baktériumok agarlemezre oltásától számítva 48-96 óra is eltelhet, ameddig az eredmények leolvashatóak lesznek.[178]

A **korongdiffúziós módszer** egyszerűsége és költséghatékonysága okán a rezisztencia vizsgálatának a legszélesebb körben elterjedt módja.[178] Az eljárás során közvetlenül a baktériummal beoltott agarlemezre egy antibiotikummal bevont korongot helyeznek és meghatározzák azon zóna méretét, melyen a kórokozó növekedése gátolt.[201]

Az **E-teszt** egy meghatározott antibiotikumkoncentrációs gradiensre kalibrált műanyag csík, mely az agarlemezre helyezve lehetővé teszi a baktériumok szaporodásának gátlásához szükséges minimális gátló koncentráció (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) mennyiségi meghatározását.[201] Az EUCAST („European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”) mindegyik terápia szempontjából releváns antibiotikum esetén meghatározta az érzékeny és rezisztens baktériumpopulációkat elkülönítő határértékeket, a makrolidok esetében 0,25 µg/ml vagy annál kisebb MIC érték érzékeny, míg 0,5 µg/ml feletti érték rezisztens fertőzést jelent.[202] Az eljárás alapján meghatározott MIC érték ellenőrzésére agardilúciós módszert használják.[201] Az európai szakmai konszenzus az E-teszt módszert javasolja a *H. pylori*

esetében az antibiotikumérzékenység vizsgálatára, ugyanis a korongdiffúziós eljárás esetében a helyes kiértékelés pontos határértékei még nincsenek meghatározva.[202]

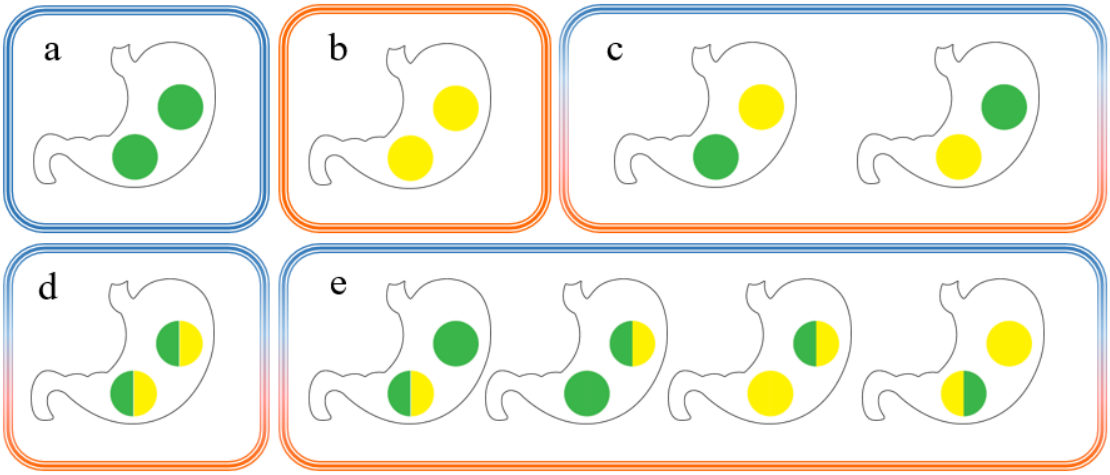
Az **agardilúciós módszer** megbízhatósága okán megfelelő referenciaként szolgálhat más eljárások pontosságának felmérésére.[178] Az eljárás további előnye, hogy ugyanazon a táptalajon egyszerre több baktériumtörzs vizsgálata is lehetséges.[194]

I./4.4.2. A genotípusos rezisztencia kimutatása

Az alternatívaként szolgáló nukleinsav alapú módszerek gyorsabb, reprodukálhatóbb és könnyebben szabványosítható eljárások, valamint ezekhez a vizsgált baktériumok életben tartása sem elvárás, ami jelentősen megkönnyíti a minta kezelését is.[178] Egyre szélesebb körben használják őket rutin diagnosztikában is, számos ilyen célra összeállított kit kereskedelmi forgalomban is elérhető már. A genotípusos rezisztencia kimutatását célzó eljárások alkalmazását limitálja, hogy a szélesebb körben elérhető eljárások nem mindegyik antibiotikum elleni rezisztencia vizsgálatát teszik lehetővé, valamint csak az ismert mutációk okozta rezisztencia kimutatására alkalmasak, az akár fenotípusos rezisztenciában is megnyilvánuló más rezisztencia mechanizmusok nem detektálhatóak velük.[200]

A **PCR-alapú eljárások** a leggyakrabban használt molekuláris technikák, a protokollok többnyire az amplikon analízisében különböznek egymástól. Mind baktériumtenyészeten, mind közvetlenül a betegből nyert minták széles spektrumán alkalmazhatóak, ugyanis különböző típusait adaptálták már friss, fagyasztott, FFPE vagy székletmintákhoz, illetve gyomornedvhez is.[194] Friss biológiai mintán alkalmazva használatukkal akár az endoszkópos vizsgálat napján eredményhez juthatunk.[194] Számos költséghatékony PCR-alapú módszert fejlesztettek ki néhány gyakoribb mutáció gyors és érzékeny detektálására, többnyire a clarithromycin, a levofloxacin és a tetraciklin esetében. Ilyen például a kereskedelmi forgalomban is elérhető Genotype HelicoDR assay a három leggyakoribb makrolidrezisztenciához köthető pontmutáció detektálása mellett a gyrA gént (N87K, D91G, D91N, D91Y) is vizsgálja a levofloxacin rezisztencia meghatározásához.[203] Ugyanakkor az amoxicillin és a metronidazol elleni rezisztencia ilyen módon történő vizsgálata elsősorban a rezisztencia hátterében álló mechanizmusok sokfélesége miatt sokkal összetettebb.[194]

A baktérium clarithromycin-rezisztenciájáért felelős három leggyakoribb pontmutációjának kimutatására ***in situ* hibridizáción alapuló eljárások** is elérhetőek. A pontmutációk fluoreszcens in situ hibridációval (FISH) történő detektálására alkalmas módszert Trebesius és munkatársai közölték 2000-ben, melynek kimagasló érzékenységét később számos tanulmány alátámasztotta.[204–207] Az eljárás a pontmutációk azonosítására fluoreszcensen jelölt oligonukleotid próbákat használ, labortechnikai előnye gyorsasága mellett az alacsony eszközigénye, kivitelezéséhez ugyanis nem szükséges a DNS izolálása vagy amplifikációja.[200] Formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintákon is megbízhatóan működik, mely lehetővé teszi rutinszerű használatát a patológiai laboratóriumokban is.[200,205,208] A FISH-eljárás unikalitását diagnosztikai szempontból az adja, hogy a molekuláris technikák jellemzőit (például a magas szenzitivitás, specificitás, kokkoid baktériumok detektálása) a kórokozók képi megjelenítése által sikeresen ötvözi a szövettani diagnosztika nyújtotta előnyökkel. Így a vizsgáló számára az elkészült metszeteken mind a baktériumok denzitása, mind egymáshoz és a gyomornyálkahártyához viszonyított helyzete látható, továbbá a különböző rezisztenciastátuszú baktériumok is elkülöníthetőek, melynek segítségével a heterorezisztens fertőzés altípusainak (intra-niche / inter-niche) diagnózisa is könnyen felállítható (4. ábra). Az eljárás korábban kereskedelmi forgalomban is elérhető volt.[200] Széles körben való elterjedését korlátozza, hogy kiértékeléséhez fluoreszcens mikroszkóp szükséges.



4. ábra. A FISH vizsgálat lehetséges eredményei (saját ábra)

Az ábra a *H. pylori* clarithromycin-rezisztenciájának vizsgálatára alkalmas FISH-eljárás lehetséges eredményeit mutatja azokban az esetekben, amikor mind az antrum-, mind a

corpus területén baktériumok találhatóak. Az ábrán látható körök a mintavétel helyeit (corpus /felső/ és antrum /alsó/), a kör színe az ott található baktériumok rezisztenciastátuszát jelöli (zöld=érzékeny, sárga=rezisztens). Érzékeny fertőzés esetén mindkét régióban kizárólag érzékeny baktériumok vannak jelen (**a**), homorezisztens fertőzés esetén mindkét régióban kizárólag rezisztens baktériumok (**b**), heterorezisztens fertőzés – interniche típus lehetséges kombinációi (**c**), heterorezisztens fertőzés – intraniche típus mindkét régióban (**d**), kevert intraniche és interniche heterorezisztens fertőzések lehetséges kombinációi (**e**).

A clarithromycin-rezisztenciáért felelős pontmutációk kimutatására peptid-nukleinsav („peptide nucleic acid", PNA) alapú FISH-eljárást (PNA-FISH) is leírtak.[209] Az eljárás során használt PNA-próbák magas affinitásuknak köszönhetően a DNS-próbáknál kevesebb nukleotidtartalommal is képesek hőstabil kötés létrehozására, így ellenállóbbak a nukleázokkal és proteázokkal szemben a reakció során.[200]

Az utóbbi években a baktérium genotípusos rezisztenciájának detektálására **újgenerációs szekvenáláson alapuló eljárásokat** („next generation sequencing", NGS) is közöltek.[194] Míg a klasszikus PCR-alapú módszerek csak korlátozott számú nukleotidot képesek pontosan megcélozni és nem képesek lefedni a rezisztenciával kapcsolatos genotípusok minden lehetséges szerkezeti változatát, addig az NGS-alapú eljárások sokkal átfogóbb képet képesek adni a baktérium genotípusáról. Ez különösen fontos az antibiotikumrezisztenciát kiváltó komplex genetikai változások nyomonkövetésére és lehetőséget ad új vagy ritka rezisztenciamechanizmusok feltárására is.[194]

II. CÉLKITŰZÉS

Vizsgálatunk elsődleges célja a clarithromycin-rezisztencia szövetminta alapú kimutatása által a heterorezisztens *H. pylori* fertőzések klinikopatológiai jellemzőinek meghatározása volt. Az ehhez használt módszerünk alapja, hogy a biopsziás mintákban a *H. pylori* baktérium kimutatására alkalmazható fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) eljárás lehetővé teszi a kórokozók clarithromycin-rezisztencia státuszának meghatározását is. A baktériumok képi megjelenítésének köszönhetően a kevert rezisztens fertőzés diagnózisa felállítható abban az esetben is, ha a rezisztens és érzékeny baktériumok egy biopsziás mintán belül egymással keveredve, közvetlenül egymás mellett helyezkednek el (*intraniche* heterorezisztencia). A heterorezisztens fertőzések gyakoriságát vizsgáló tanulmányok rendszerint csak a heterorezisztencia *interniche* típusának előfordulását mérték, vagyis a széles körben elterjedt vizsgálóeljárások valamelyikét alkalmazva a gyomor két különböző régiójából (antrum és corpus) vett szövetminta rezisztenciastátusza közötti különbséggel határozták meg a heterorezisztens fertőzések fogalmát.[196,198,210–213] Ugyanakkor mások az *intraniche* típus gyakoriságáról számoltak be.[206] A heterorezisztencia gyakoriságának ellenére a jelenleg érvényben lévő szakmai irányelvek nem adnak útmutatást a fertőzések ezen típusának diagnosztikájára és kezelésére sem.

Mindezek alapján a heterorezisztens fertőzések karakterizálásához a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. A clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések pontos kimutatásához olyan eljárásra volt szükségünk, melynek a baktériumok detektálásában mutatott magas szenzitivitása és specificitása lehetővé teszi a szövetmintában található összes kórokozó képi megjelenítését. Ennek okán szükséges volt az alkalmazott FISH-eljárás diagnosztikus teljesítményének meghatározása (érzékenység, specificitás, pozitív és negatív prediktív érték), illetve az azt befolyásoló szöveti tényezők kimutatása.
2. A FISH eljárás használatával a clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések valós gyakoriságának felmérése.

3. A clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések diagnózisát befolyásoló mintavételi és egyéb metodikai tényezők szerepének vizsgálata.
4. A clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések lehetséges kompartmentális típusainak vizsgálata és ezek egymáshoz viszonyított gyakoriságának meghatározása.
5. A clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések klinikopatológiai jellemzőinek vizsgálata, különös tekintettel a kialakulásukat befolyásoló lehetséges tényezőkre, azon belül is a gyógyszerfogyasztási előzmények szerepére a heterorezisztencia létrejöttében.
6. A clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések terápiás kimenetelének vizsgálata.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatainkat a II. Sz. Patológiai Intézet archívumából származó formalinban fixált, paraffinba ágyazott gyomorbiopsziás szövetmintákon végeztük. A vizsgálati protokoll a Helsinki Nyilatkozat (1975) etikai irányelveivel összhangban került felállításra. Tanulmányaink a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével zajlottak (#148/2007; 97#2012). A mintákat a következő intézetek küldték be szövettani vizsgálatra: a Semmelweis Egyetem klinikái közül az I. Sz. Sebészeti Klinika, az I. Sz. Belgyógyászati Klinika és az I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, illetve a Péterfy Sándor utcai Kórház és Rendelőintézet, a Mester utcai Rendelőintézet (Ferencvárosi Egészségügyi Központ), az Albert Schweizer Kórház, az Auróra utcai Rendelőintézet, a Semmelweis Kórház, a Jahn Ferenc Dél-pesti Kórház és Rendelőintézet, a Nyírő Gyula Kórház és a Pándy Kálmán Kórház.

III./1. Betegek és a minták szövettani feldolgozása

III./1.1. Beteganyag I. – Immunhisztokémia és FISH összehasonlítása

Retrospektív tanulmányunkban 2900 olyan beteg szövetmintáját vizsgáltuk, akik felső hasi panaszok miatt végzett gyomortükrözés során mintavételen estek át 2006 és 2008 között a beküldő intézetek valamelyikében. A betegcsoport 1200 férfiból és 1700 nőből állt, átlagéletkoruk 50,47 év volt [SD: ±20,52]. A tanulmány célkitűzéseinek megfelelően minden egyes beteg esetében *H. pylori* immunhisztokémia és FISH módszerek segítségével vizsgáltuk meg a felső endoszkópos vizsgálat során gyomorbiopsziás mintavételel eltávolított gyomornyálkahártya részleteket.

A biopsziás minták szövettani vizsgálata a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetében történt. A mintákat 10%-os formalinoldatban fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk. A patológiai feldolgozás során a szövetblokkokból 3-4 μm vastagságú metszeteket készítettünk és a minták rutin szövettani kiértékeléséhez H&E, Alciánkék-PAS, illetve módosított Giemsa festéseket használtunk. A gasztritisz osztályozását a módosított Sydney-klasszifikáció alapján végeztük.[105] A gasztritiszt tartalmazó minták közül azok az esetek minősültek aktívnak, amelyekben a neutrofil granulocyták megjelentek a hámsejtek között.[6]

Az eredmények kiértékeléséhez a gyulladás aktivitása és a nyálkahártya strukturális elváltozásainak megléte vagy hiánya alapján statisztikai kategóriákba soroltuk az eseteket. A kategóriák a következők voltak:

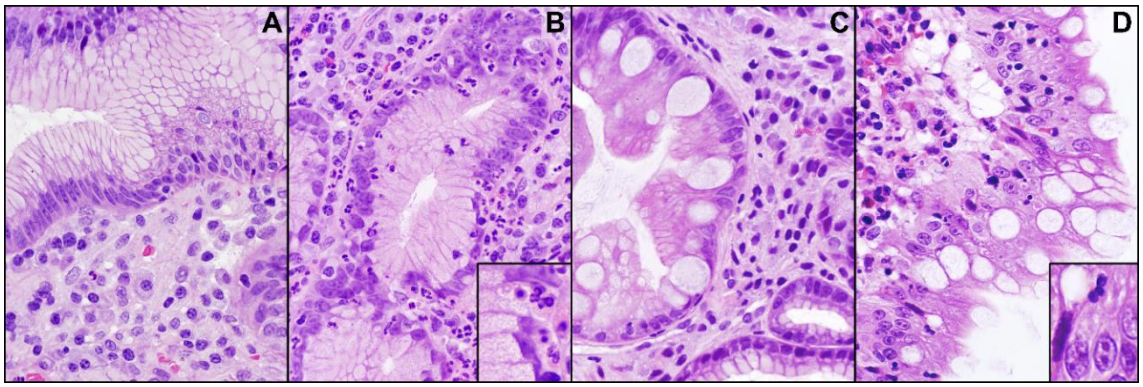
0: nincs krónikus gasztritisz a mintában /sine morbo/

1: krónikus gasztritisz aktivitás és strukturális elváltozás nélkül,

2: krónikus gasztritisz aktivitással, de strukturális elváltozás nélkül,

3: krónikus gasztritisz aktivitás nélkül, de strukturális elváltozással, és

4: krónikus gasztritisz aktivitással és strukturális elváltozással egyaránt.



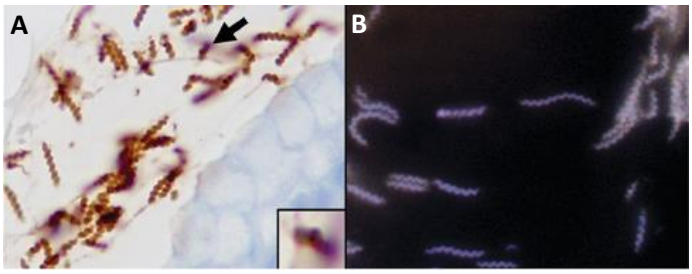
5. ábra. A tanulmány során a gasztritiszt tartalmazó mintáknál használt szövettani kategóriák reprezentatív képei. (Saját ábra, eredeti nagyítás: 600x).

A: 1. kategória – a nyálkahártya szerkezete megőrzött, intraepithelialis neutrofilek nincsenek jelen; **B:** 2. kategória – a nyálkahártya szerkezete megőrzött, intraepithelialis neutrofilek nagy számban láthatóak (beillesztett kép: a hámot infiltráló neutrofilek kinagyítva); **C:** 3. kategória – a nyálkahártya átalakult (intesztinális metaplázia figyelhető meg), neutrofilek intraepithelialisan nincsenek jelen, **D:** 4. kategória – a nyálkahártya átalakult (intesztinális metaplázia), intraepithelialis neutrofilek megfigyelhetőek (beillesztett kép: a hámot infiltráló neutrofil granulocita kinagyítva)

A nyálkahártya strukturális elváltozásaihoz soroltuk az intesztinális metaplázia, atrófia/preatrófia, erózió, fekély, foveoláris hiperplázia, hiperpláziás polip, diszplázia, karcinóma, limfoid follikulusok, illetve MALT-limfóma megjelenését.

A vizsgált 2900 mintából négy esetben *H. heilmannii*-fertőzés volt jelen a mintában. Ezek egyikében sem volt egyidejűleg *H. pylori* fertőzés is kimutatható, és minthogy a FISH *H.*

pylori fajspecifikus próbája nem jelöli a *H. heilmannii*-t, míg az immunhisztokémia kimutatja, így ezen fertőzéseket kizártuk a további elemzésekből (6. ábra).

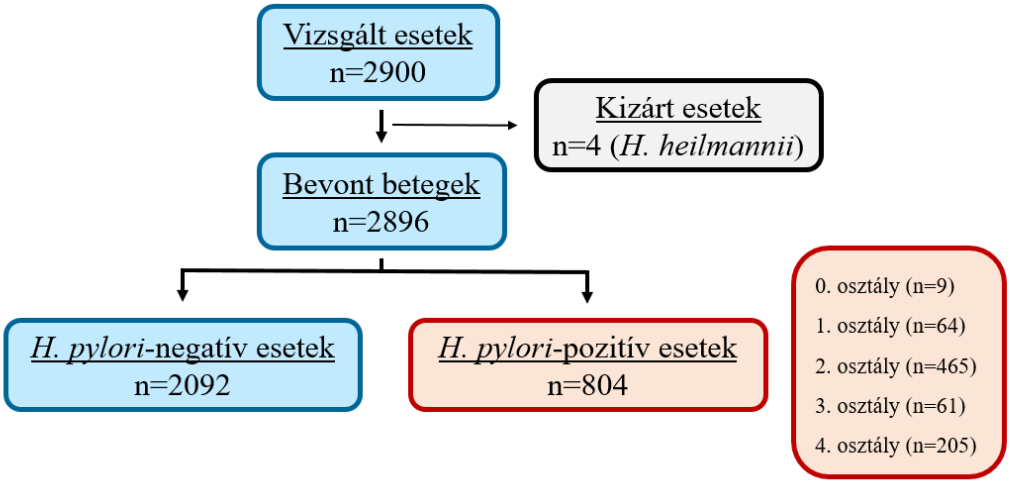


6. ábra. *H. heilmannii* kimutatása *Helicobacter* immunhisztokémiai és *H. pylori* fluoreszcens *in situ* hibridizációs módszerrel.

A) A baktériumok specifikus jelölődést mutatnak (barna szín), morfológiailag jól elkülöníthetőek a *H. pylori*-tól a sűrűbb csavarulatuk és valamivel nagyobb méretük alapján. Egyes trunkált alakjaik hasonlíthatnak *H. pylori*-ra (nyíl és beillesztett kép /A/); B) Specifikus fluoreszcens jel (zöld/vörös/sárga szín) nem detektálható, a baktériumokat a DAPI csatornán észlelhető autofluoreszcenciájuk jeleníti meg.

Rövidítések: *H. pylori=Helicobacter pylori*, *H. heilmannii=Helicobacter heilmannii*, DAPI="4',6-diamidino-2-phenylindole" ; Eredeti nagyítás: 1000x

A mintagyűjtés folyamata és az egyes statisztikai osztályokba sorolt betegek száma az 7. ábrán látható.



7. ábra. A vizsgált minták jellemzői és a statisztikai osztályok eseteinek számai.

Rövidítések: *H. pylori=Helicobacter pylori*, *H. heilmannii=Helicobacter heilmannii*

III./1.2. Beteganyag II. – A heterorezisztencia vizsgálata

A retrospektív keresztmetszeti vizsgálatot olyan betegek szövetmintáin végeztük, akik 2005 és 2017 között felső endoszkópiás beavatkozáson és többszörös biopsziás mintavételen estek át a Semmelweis Egyetem I. Sz. Sebészeti Klinikáján vagy a Ferencvárosi Egészségügyi Központban. A minták szövettani feldolgozása és vizsgálata a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetében történt.

A tanulmányba azon betegeket válogattuk be, akiknek a patológiai feldolgozás során mind az antrum, mind a corpus területéről vett biopsziás mintájuk immunhisztokémiailag *H. pylori*-pozitív volt, valamint az FFPE-szövetblokkjuk rendelkezésre állt és elegendő mintát tartalmazott további vizsgálatok végzésére. A betegek kórelőzményét a Semmelweis Egyetem /Medsol rendszer/, és a II. Sz. Patológiai Intézet /Medrec szoftver/ elektronikus nyilvántartásából gyűjtöttük ki. Azon betegek, akiknek anamnesztikus adatai a korábbi eradikációs kezelésről hiányosnak bizonyultak, kizárásra kerültek a vizsgálatból.

A feltételeknek 305 beteg (175 nő és 130 férfi) felelt meg, átlagéletkoruk 54,66 év volt [SD: ±14,88] volt. A biopsziás mintavételt megelőzően összesen 53 beteg részesült *H. pylori* eradikációs kezelésben (17,38%), közülük 35 betegnek (66,04%) kettő vagy több eradikációs kísérlet is szerepelt a kórelőzményében. Azon betegek esetében, akik a kezelést követően kontrollvizsgálaton vettek részt, az alkalmazott eradikációs terápia sikerességének meghatározásához a 6 hét elteltével végzett ^{13}C-UBT vizsgálat vagy a kontroll biopsziás minta szövettani eredményét használtuk. Amennyiben az UBT teszt vagy a szövetmintán végzett *H. pylori* immunhisztokémia negatív volt, a kezelést sikeresnek tekintettük.

III./1.3. Immunhisztokémiai vizsgálat

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz minden szövetblokkból három darab, 4-4 µm vastagságú friss metszetet készítettünk, melyeket Superfrost UltraPlus® (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Németország) tárgylemezekre helyeztünk. A mintákon deparaffinálást követően hőfeltárást végeztünk Tris-EDTA puffer közegben (pH 9,0), majd 1:350 arányban hígított, B0471 poliklonális nyúl anti-*Helicobacter pylori* elsődleges antitesttel (Dako, Glostrup, Dánia) történő inkubáció következett 32 percig 42°C hőmérsékleten Ventana 320 vagy Ventana Benchmark XT

immunfestő automatában. A reakció előhívása iView illetve UltraView DAB Detection Kittel (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ, Egyesült Államok) történt a gyártó előírásainak megfelelően. Háttérfestésnek hematoxylint és kékítő (bluing) reagenst használtunk. Minden futtatásnál egy, a primer antitesttel nem kezelt gyomor szövetminta szolgált negatív kontrollként.

A baktériumdenzitás szemikvantitatív osztályozása során az eseteket enyhe (1+; alacsony baktériumsűrűség, elszórt *H. pylori* eloszlási mintázat), mérsékelt (2+; mérsékelt baktériumsűrűség, kis *H. pylori* csoportok), vagy súlyos (3+; nagy baktériumsűrűség, nagy *H. pylori* csoportok/mezők) kategóriákba osztottuk.

III./2. Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH)

III./2.1. A FISH reakció protokollja

A rutin festések és az immunhisztokémia utáni harmadik metszés során a FISH vizsgálathoz mindegyik paraffinba ágyazott szövetblokkból egy-egy, friss, 4 µm-es metszetet készítettünk, majd 65°C-on 10 másodpercig forró lapon melegítve Superfrost UltraPlus® (Thermo Fisher Scientific, Gerhard Menzel GmbH&Co., Braunschweig, Németország) tárgylemezre rögzítettük. A deparaffinálás során a mintákat kétszer 30 másodpercig xilolba, majd kétszer 30 másodpercig 96%-os etanolba merítettük. Ezt követően a metszeteket levegőn száradni hagytuk, majd antigénfeltáró oldatban (Vector Antigen Unmasking Solution, Katalógusszám: H-3300, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Egyesült Államok), 400 W teljesítményen, 10 percig mikrohullámú sütőben kezeltük. A hőfeltárást követően a metszeteket háromszor desztillált vízben mostuk, majd szobahőmérsékleten száradni hagytuk. A FISH reakcióhoz BACTFish H. pylori Combi Kit-et (Izinta Kft., Budapest, Magyarország) használtunk a gyártó előírásának megfelelően. A próbamix hozzáadása után a metszeteket nedves kamrában 46°C hőmérsékleten, 90 percig hibridizáltuk. A poszthibridizációs mosás (15 perc, 46°C), után a metszeteket DAPI (4′,6′-diamidino-2-fenilindol) fluoreszcens magfestő anyagot tartalmazó fedőanyaggal (Vectashield with DAPI, Katalógusszám: H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, Egyesült Államok) fedtük.

III./2.2. A FISH reakcióhoz használt próbamix összetétele

A BACTFish H. pylori Combi Kit próbamixében specifikus oligonukleotid próbák találhatóak, melyek a baktérium rRNS-ének meghatározott szakaszaihoz kötődnek (1. táblázat). A kórokozó detektálására szolgál a zöld fluorokrómmal jelölt *H. pylori*-specifikus próba, mely a 16S rRNS fajspecifikus szakaszához kötődik (Hpy-1, fluoreszcein izotiocionát /FITC/ jelöléssel). A próbamixben a clarithromycin-rezisztencia kimutatására háromféle narancs-vörös fluoreszcenciával (Cy3) jelölt próba található, melyek a rezisztenciáért felelős három leggyakoribb pontmutáció (ClaR1: A2143G; ClaR2: A2144G; ClaR3: A2143C) valamelyikéhez kötődnek a 23S rRNS peptidil-transzferáz régiójában. A rezisztencia kimutatására szolgáló próbák nem-specifikus kötődésének kivédésére a próbamix tartalmaz még egy jelöletlen próbát (ClaWT), mely a 23S rRNS megfelelő régiójának vad típusú szekvenciájához kötődik.

1. táblázat. A BactFISH H. pylori Combi Kit próbamix összetétele.

Próba neve	Leírás	Célrégió	Célzott mutáció	A próba szekvenciája
Hpy-1	*H. pylori*-specifikus próba	16S rRNA	-	5′-CACACCTGACTGACTATCCCG-3′
ClaR1	Cla-rezisztencia specifikus próba	23S rRNA	A2143G * (A2142G)	5′-CGGGGTCTTCCCGTCTT-3′
ClaR2	Cla-rezisztencia specifikus próba	23S rRNA	A2144G * (A2143G)	5′-CGGGGTCTCTCCGTCTT-3′
ClaR3	Cla-rezisztencia specifikus próba	23S rRNA	A2143C * (A2142C)	5′-CGGGGTCTTGCCGTCTT-3′
ClaWT	Cla-érzékenyre specifikus, a rezisztencia mutációk jellemző helyén a vad típusú szekvenciához kötődik	23S rRNA	-	5′-CGGGGTCTTTCCGTCTT-3′

* E két mutációs hely genomiális pozícióját eredetileg 2058 és 2059-ként számozták az *Escherichia coli* 23S rRNS-szekvencia alapján, melyet a későbbiekben a *H. pylori* 23S rRNS-szekvencia 2143-as és 2144-es pozícióira változtattak. A *H. pylori* genom bázissorend számozásának felülvizsgálata után ezek jelenleg a 2142-es és 2143-as pozíciókként ismertek.[214]

III./2.3. A FISH reakció eredményének kiértékelése

A reakciókat Leica DM-RXA epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, többnyire 63x nagyítású, 0,9 NA értékű Leica HCX PL FLUOTAR 63X/0.90 CORR száraz objektívvel és szükség szerint 100x nagyítású, 1,3 NA értékű Leica PL FLUOTAR 100X/1.30 olajimmerziós objektívvel. A reakciók kiértékeléséhez a mikroszkóp DAPI (gerjesztés 355–425 nm, emisszió >470 nm, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország), Spectrum Green (gerjesztés 460–500 nm, emisszió 512–542 nm, Vysis, Downers Grove, IL, Egyesült Államok) és Spectrum Orange (gerjesztés 540–578 nm, emisszió 564–612 nm, Vysis, Downers Grove, IL, Egyesült Államok) szűrőit használtuk. A fluoreszcens képeket a Pieper FK-7512-IQ (Pieper GmbH, Schwerte, Németország) és Leica DFC365 FX monokróm kamerával vizsgáltuk. Minden elkészült reakcióról fotódokumentáció készült a Leica CW4000 FISH Visualisation and Documentation Software (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Wetzler, Németország) segítségével.

A clarithromycinre érzékeny baktériumok csak a Hpy-1 fajspecifikus próbával jelölődnek, ezért zöld színben jelennek meg. A rezisztens baktériumok a Hpy-1 fajspecifikus próbával, valamint az rRNS-ükön megjelent pontmutáció függvényében az egyik rezisztenciára specifikus próbával is jelölődnek, így a próbák zöld és vörös fluoreszcenciája együttesen sárga színt eredményez a zöld, vörös és kék csatornák összetett képén.

Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelésénél már ismertetett módon, a baktériumdenzitás szemikvantitatív kiértékelése alapján az eseteket enyhe (1+), közepes (2+) és magas (3+) csoportokba soroltuk.

III./2.4. A FISH reakció protokollja a korábban Giemsa-festett metszeteken

Vizsgálatunk során voltak olyan esetek, amelyek rutin szövettani kiértékelésként használt Giemsa-festéssel *H. pylori*-pozitívak voltak, azonban a FISH reakció negatív eredményt adott. Mivel a FISH vizsgálathoz már a harmadik metszési körben, a szövetblokkok egy mélyebb metszési síkjából készült a metszet, feltettük, hogy a minta elfaragódásával és így a benne megtalálható hámfelszín csökkenésével az ott elhelyezkedő baktériumok száma is csökkent a mintában és ezért kisebb eséllyel láthatóak a fluoreszcens képeken. Ugyancsak ismert volt, hogy a *H. pylori* baktériumok gyakran gócos elhelyezkedésűek, így egy felszínesebb síkban jelenlévő góc baktériumai kifaragódhatnak a mintából. Ennek igazolására FISH reakciót végeztünk az eredetileg Giemsával festett tárgylemezeken azon esetekben, ahol a festések eredménye eltért egymástól. A folyamat során először a fedőlemezt eltávolítottuk, majd a fedetlen szövetmintát egy finom műanyaghálóval (Flow-Mesh, Katalógusszám: Z377619, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok) és FBS szilikon ragasztóval (Material Vegyipari Szövetkezet, Budapest, Magyarország) szorosan az üvegfelületre rögzítettük, hogy megakadályozzuk a szövet elmozdulását a hőfeltárás illetve a további lépések során a bevonat nélküli üveglemezen. A FISH reakciót a továbbiakban a fent ismertetett módon végeztük. Azokat az eseteket, amelyekben az ismételt FISH vizsgálattal baktériumokat láttunk, *H. pylori*-pozitívnak tekintettük az eredmények összesítése során.

III./2.5. A Helicobacter heilmannii-fertőzés diagnózisa

A *Helicobacter heilmannii*-pozitív *(H. heilmannii)* eseteket kizártuk a statisztikai elemzésekből. A *H. heilmannii* diagnózisához a következő paramétereknek kellett teljesülniük: (1) a *H. heilmannii*-nak megfelelő speciális morfológiai megjelenés (a *H. pylori* baktériumnál hosszabb, szorosabban tekeredő spirális alak), (2) pozitív *Helicobacter* immunhisztokémiai reakció, és (3) negatív *H. pylori* FISH reakció.

III./3. Statisztikai analízis

A FISH vizsgálat diagnosztikai értékét vizsgáló tanulmányunkban az elsődleges célunk az volt, hogy meghatározzuk az eljárás érzékenységét, specificitását, valamint pozitív és negatív prediktív értékét. Másodlagos célunk volt annak a vizsgálata, hogy a mintában jelenlévő szöveti jellemzők befolyásolják-e az eljárás érzékenységét a fertőzés

diagnózisában. A kategorikus változók összehasonlításához Khi-négyzet próbát használtunk, valamint amennyiben a minta alacsony elemszáma indokolta, Fisher-egzakt próbát végeztünk. A többszörös összehasonlításokhoz a Holm-Bonferroni-féle post-hoc eljárást alkalmaztuk. A McNemar-tesztet alkalmaztuk a Giemsa festés, az immunhisztokémia és a FISH alcsoporton vagy statisztikai osztályon belüli páronkénti összehasonlítására. Az azonos festési módszerrel kapott eredményeket a különböző statisztikai osztályok között úgy hasonlítottuk össze, hogy az egyes osztályokban az adott festéssel kapott eredményeket minden lehetséges kombinációban párokba állítottuk, és összehasonlítottuk egymással Khi-négyzet és/vagy Fisher-egzakt teszt használatával. Ezt követően, az ezen nem-független összehasonlításokkal kapott p-értékeket a Holm-Bonferroni-módszerrel rangsoroltuk és meghatároztuk valós értéküket. A statisztikai kiértékelés során kétoldalas próbákat használtunk, és a kapott eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05. Ez alól kivétel a Holm-Bonferroni eljárás volt, melynek során a pontosabb $p<0,01$ értéket használtuk. A statisztikai elemzést a Statistica 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) és az SPSS Statistics for Windows ver. 23 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) szoftverekkel végeztük.

A clarithromycin-heterorezisztens fertőzést elemző tanulmányunkban a következő változókat vizsgáltuk: nem (férfi/nő), életkor (években), clarithromycin-rezisztencia státusz (érzékeny/homorezisztens/heterorezisztens), az endoszkópos vizsgálat során talált elváltozások (GERD, erozív gastritis, peptikus fekély, gyomor polip jelenléte/hiánya), a szövettani vizsgálat során talált elváltozások (krónikus gasztritis, aktivitás jelenléte/hiánya, a gyomornyálkahártya szerkezeti elváltozásainak jelenléte/hiánya, valamint a baktériumok denzitása [1+/2+/3+]), eradikációs kezelés az anamnézisben (nincs/egy/kettő vagy több), és a mintavételt követő eradikációs kezelés sikeressége (clarithromycin tartalmú kezelés/ clarithromycint nem tartalmazó kezelés; sikeres/ sikertelen). Mivel a különböző *H. pylori* okozta nyálkahártya elváltozások száma túl alacsony volt ahhoz, hogy az egyes elváltozásokat statisztikailag külön-külön elemezni tudjuk, ezért ezeket a nyálkahártya "szerkezeti (strukturális) elváltozásai" néven gyűjtöttük össze, ami az alábbiak bármelyikének jelenlétére/hiányára utal: intesztinális metaplázia, hiperpláziás polip, nyálkahártya-atrófia/preatrófia, erózió, foveoláris hiperplázia, limfoid follikulus, MALT-limfóma, diszplázia, gyomorkarcinóma, fekély.

Az adatok kezelését és a statisztikai elemzést az R szoftver 3.5.1-es verziójával végeztük. A kiértékelés során a következő kétoldalú statisztikai teszteket alkalmaztuk: Fisher-egzakt teszt, Khi-négyzet teszt, McNemar-teszt, Kruskal-Wallis-teszt és Spearman-rangkorreláció. A különbségeket $p<0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

IV. EREDMÉNYEK

IV./1. Az immunhisztokémia és a FISH eljárás diagnosztikai értékének vizsgálata

IV./1.1. Szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív értékek

A vizsgálatba bevont 2896 beteg mintájának értékelése során immunhisztokémiával 795 esetben (27,5%), míg FISH eljárással 788 esetben (27,2%) találtunk *H. pylori* pozitivitást (2. táblázat). Rotimi és munkatársai közleménye alapján[126] az immunhisztokémiai vizsgálatot tekintettük referenciának a FISH eljárás diagnosztikus teljesítményének értékeléséhez, míg az immunhisztokémia szenzitivitásának és specificitásának meghatározásához fordított módon jártunk el: itt a FISH eljárással kapott eredményeket vettük kiindulási pontnak. Egy esetet akkor tekintettünk *H. pylori*-pozitívnak, ha az immunhisztokémia vagy FISH-reakció közül bármelyik pozitív eredményt adott, ez alapján vizsgálatunkban összesen 804 *H. pylori*-pozitív esetet találtunk (27,8%). A FISH-vizsgálat szenzitivitása 98%-ot, a specificitása pedig 99,6%-ot ért el, míg pozitív és negatív prediktív értéke 98,9% és 99,2% volt. Az immunhisztokémia esetében az érzékenység 98,8%, a specificitás pedig 99,2% volt, az eljárás pozitív és negatív prediktív értéke 98,0% és 99,6%-nak bizonyult.

2. táblázat. Az immunhisztokémia és FISH eredmények összesítése.
A két eljárással eltérő eredményt adó esetek száma és az ezekben a mintákban talált baktériumok denzitása a Megjegyzés oszlopban található. Rövidítések:
FISH=fluoreszcens in situ hibridizáció

Összes eset	Immunhisztokémia	FISH	Megjegyzés
2986	795 pozitív	779 pozitív	
		16 negatív	1+: 15 , 2+: 1
	2101 negatív	9 pozitív	1+: 9
		2092 negatív	

IV./1.2. A kifaragódás szerepének vizsgálata a FISH eljárás diagnosztikus értékének csökkenésében

A vizsgált minták között összesen 56 olyan eset volt, melyeknél a rutin diagnosztika során használt módosított Giemsa-festés, az immunhisztokémia és a FISH-eljárás különböző eredményt adott. Mivel a baktérium köztudottan a nyálkahártya felszínén helyezkedik el, feltételeztük, hogy az egyes festési eljárások érzékenységét befolyásolhatja a festésre készült szövetmetszet szövetblokkon belüli mélysége. Ugyanis például a FISH-eljáráshoz használt metszetek a rutin diagnosztikai feldolgozásra és az immunhisztokémiai vizsgálatra szánt metszeteket követően, csak a harmadik metszési körben készültek el, így a baktériumok szövetblokkból történő „kifaragódása" befolyásolhatja a módszer érzékenységét. Mivel a Giemsa-festett metszetek a minta esetenként még több gyomornyálkahártyát tartalmazó, korábban metszett síkjából származtak, valamint a FISH-reakció elvégzése Giemsa-festést követően technikailag megvalósítható volt, a baktériumok kifaragódásának igazolására ezeken a fedőlemez eltávolítása után FISH-vizsgálatot végeztünk. Az újrafestett minták eredményei a 3. táblázatban láthatóak.

3. táblázat. A Giemsa-festett metszeteken végzett FISH reakciók eredményei.
Rövidítések: IHC=immunhisztokémia, FISH=fluoreszcens in situ hibridizáció

n/összes	Módosított Giemsa-festés	IHC	FISH	Új reakciót követően FISH-pozitív
22/56	+	-	-	0/22
6/56	+	+	-	3/6
2/56	-	-	+	0/2
22/56	-	+	-	6/22
4/56	-	+	+	2/4

IV./1.3. Az aktivitás, a nyálkahártyaszerkezeti változások és a baktériumdenzitás szerepe az immunhisztokémia és a FISH-vizsgálat diagnosztikus teljesítményében

Az immunhisztokémia és a FISH diagnosztikus teljesítményének felmérése során vizsgáltuk a mintában található szövettani elváltozások szerepét is. Az aktivitás jelenléte

és a nyálkahártya strukturális elváltozásai alapján felállított statisztikai csoportokban kapott eredményeket a 4. táblázat foglalja össze. A két vizsgálóeljárás diagnosztikus teljesítménye között egyik statisztikai osztályban vagy ezek kombinációiban sem találtunk szignifikáns különbséget (4. táblázat). Mind az immunhisztokémia, mind a FISH-eljárás érzékenysége többnyire elérte, illetve meghaladta a 90%-ot, ennél alacsonyabb szenzitivitás csak a krónikus gasztritiszt nélkülöző mintákban (0. osztály), illetve az aktivitás nélküli, de strukturális elváltozással rendelkező krónikus gasztritiszt tartalmazó mintákban (3. osztály, FISH 86,9%, 4. táblázat) volt megfigyelhető. Azonban McNemar-teszttel itt sem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az immunhisztokémia érzékenységével összehasonlítva (86,9% vs 95,1%, p=0,226563).

4. táblázat. A vizsgált festési eljárások érzékenységének összehasonlítása a különböző statisztikai osztályokban és ezek kombinációiban.

A szenzitivitás-értékek összehasonlításához kétoldalas McNemar-tesztet használtunk.

Rövidítések: IHC=immunhisztokémia, FISH=fluoreszcens in situ hibridizáció

***H. pylori*-pozitív esetek (n=804)**			**Szenzitivitás (%)**		**p-érték**
Statisztikai osztályok		**n**	**IHC**	**FISH**	
A mintában nem volt kimutatható krónikus gasztritisz	**0**	9	88,9%	88,9%	1,000000
Krónikus gasztritisz aktivitás és strukturális elváltozás nélkül	**1**	64	98,4%	93,8%	0,375000
Krónikus gasztritisz aktivitással, strukturális elváltozás nélkül	**2**	465	99,4%	100%	0,250000
Krónikus gasztritisz aktivitás nélkül, strukturális elváltozással	**3**	61	95,1%	86,9%	0,226563
Krónikus gasztritisz aktivitással és strukturális elváltozással	**4**	205	99,5%	98,5%	0,625000
1+3 osztály kombinációja		125	96,8%	90,4%	0,076813
2+4 osztály kombinációja		670	99,4%	99,6%	1,000000
1+2 osztály kombinációja		529	99,2%	99,2%	1,000000

3+4 osztály kombinációja		266	98,5%	95,9%	0,118469
1+2+3+4 osztály kombinációja		795	99,0%	98,1%	0,210040
0+1+2+3+4 osztály kombinációja		804	98,9%	98,0%	0,229523

Mindkét eljárás érzékenysége enyhe, de statisztikailag szignifikáns csökkenést mutatott az aktivitás nélküli statisztikai osztályok (1. és 3. osztály) és az aktív gasztritiszt tartalmazó esetek összehasonlítása során (2. és 4. osztály), (1&3 osztály és 2&4 osztály: 96,8% és 99,4%; p=0,0245 az immunhisztokémia esetében, és 90,4% és 99,6%; $p=4{,}26\times10^{-8}$ a FISH esetében).

5. táblázat. A baktériumok denzitásának megoszlása a vizsgált festési eljárások és statisztikai osztályok szerint.

Rövidítések: IHC=immunhisztokémia, FISH=fluoreszcens in situ hibridizáció

		A baktériumok denzitása (szemikvantitatív kiértékelés alapján)			
	n	**+**	**++**	**+++**	**IHC/FISH**
Összes *H. pylori*-pozitív (IHC)	795	24,8% (197)	45,9% (365)	29,3% (233)	IHC
Összes *H. pylori*-pozitív (FISH)	788	26,1% (208)	42,9% (337)	31% (243)	FISH
1. statisztikai osztály	63/64	43,8% (28)	48,4% (31)	6,3% (4)	IHC
	60/64	51,6% (33)	35,9% (23)	6,3% (4)	FISH
2. statisztikai osztály	462/465	17,2% (80)	49,2% (229)	32,9% (153)	IHC
	465/465	19,8% (92)	44,3% (206)	35,9% (167)	FISH
3. statisztikai osztály	58/61	65,6% (40)	26,2% (16)	3,3% (2)	IHC
	53/61	55,7% (34)	21,3% (13)	9,8% (6)	FISH
4. statisztikai osztály	204/205	20,5% (42)	42,9% (88)	36,1% (74)	IHC
	202/205	21,5% (44)	45,4% (93)	31,7% (65)	FISH

Ezért a festési technikák egyes statisztikai osztályokban mutatott *H. pylori* detektálási képességét egy másik eljárással is megvizsgáltuk. Ehhez egy adott festés teljesítményét Khi-négyzet / Fisher-egzakt teszt segítségével hasonlítottuk össze az osztályok minden lehetséges kombinációjában. Az így kapott, a többszörös összehasonlítás miatt nem független és ezért nem pontos p-értékeket a Holm-Bonferroni-módszerrel rangsoroltuk, pontosítottuk, illetve meghatároztuk valós szignifikanciájukat. Amennyiben ez azt mutatta, hogy statisztikailag szignifikáns különbség észlelhető egy adott festés egyes osztályokban mutatott diagnosztikus teljesítménye között, kivéve pl. az 1. és 3., valamint a 2. és 4. osztályokat, akkor az aktivitás szerepe feltételezhető, ha az 1. és 2., valamint 3. és 4. osztályok nem különböznek szignifikánsan, akkor pedig a nyálkahártya strukturális elváltozásaié. Ilyen szabályszerűséget azonban egyik vizsgált eljárás esetében sem találtunk.

Bár az aktivitás csak csekély mértékben befolyásolta az immunhisztokémia és a FISH teljesítményét, az 1+, 2+, 3+ *H. pylori* denzitások eloszlása (5. táblázat) erősen korrelált az aktivitás jelenlétével vagy hiányával. Ugyanis míg a bakteriális denzitás-értékek nem mutattak jelentős különbséget az aktivitás nélküli osztályok (1. és 3. osztály), valamint az aktív osztályok (2. és 4. osztály) között, a kombinációk felcserélésével mindkét diagnosztikus eljárás esetén szignifikáns különbségeket találtunk ($p<0,0001$ mind az immunhisztokémia, mind a FISH szerint; $p<0,01$ Holm-Bonferroni módszerrel a többszörös összehasonlításhoz). Ennek megfelelően az 1+ denzitásfokozat szignifikánsan gyakrabban fordult elő az aktivitást nem mutató betegeknél (1. és 3. osztály) mindkét eljárás vizsgálatánál ($p<0,0001$, az immunhisztokémia és a FISH esetében is), ez az aktivitásfüggő mintázat megfigyelhető volt a Holm-Bonferroni-eljárással végzett többszörös összehasonlítások során is (nem volt különbség az 1. és 3., valamint a 2. és 4. osztály összehasonlítása között, de minden más kombinációban $p\leq0,0002$ az immunhisztokémia és $p<0,0001$ a FISH esetében.) (5. táblázat)

A gyomornyálkahártya szerkezeti elváltozásainak jelenléte csak korlátozottan befolyásolta a vizsgált eljárások diagnosztikai teljesítményét. A strukturális elváltozásokkal rendelkező és anélküli esetek (1. és 2. osztály, illetve 3. és 4. osztály, 4. táblázat) összehasonlítása az immunhisztokémia érzékenységét illetően nem mutatott szignifikáns különbséget (99,2%, illetve 98,5%, $p=0,4520$). A FISH eljárás

szenzitivitásában egy enyhe, diagnosztikai pontosság szempontjából nem jelentős, de statisztikailag szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető (98,0% vs. 95,9%, p=0,0017).

IV./2. A clarithromycin-heterorezisztens fertőzések vizsgálata

IV./2.1. A betegek clarithromycin-rezisztencia státusza és a heterorezisztens fertőzések mintavételi hely szerinti rezisztenciamintázata

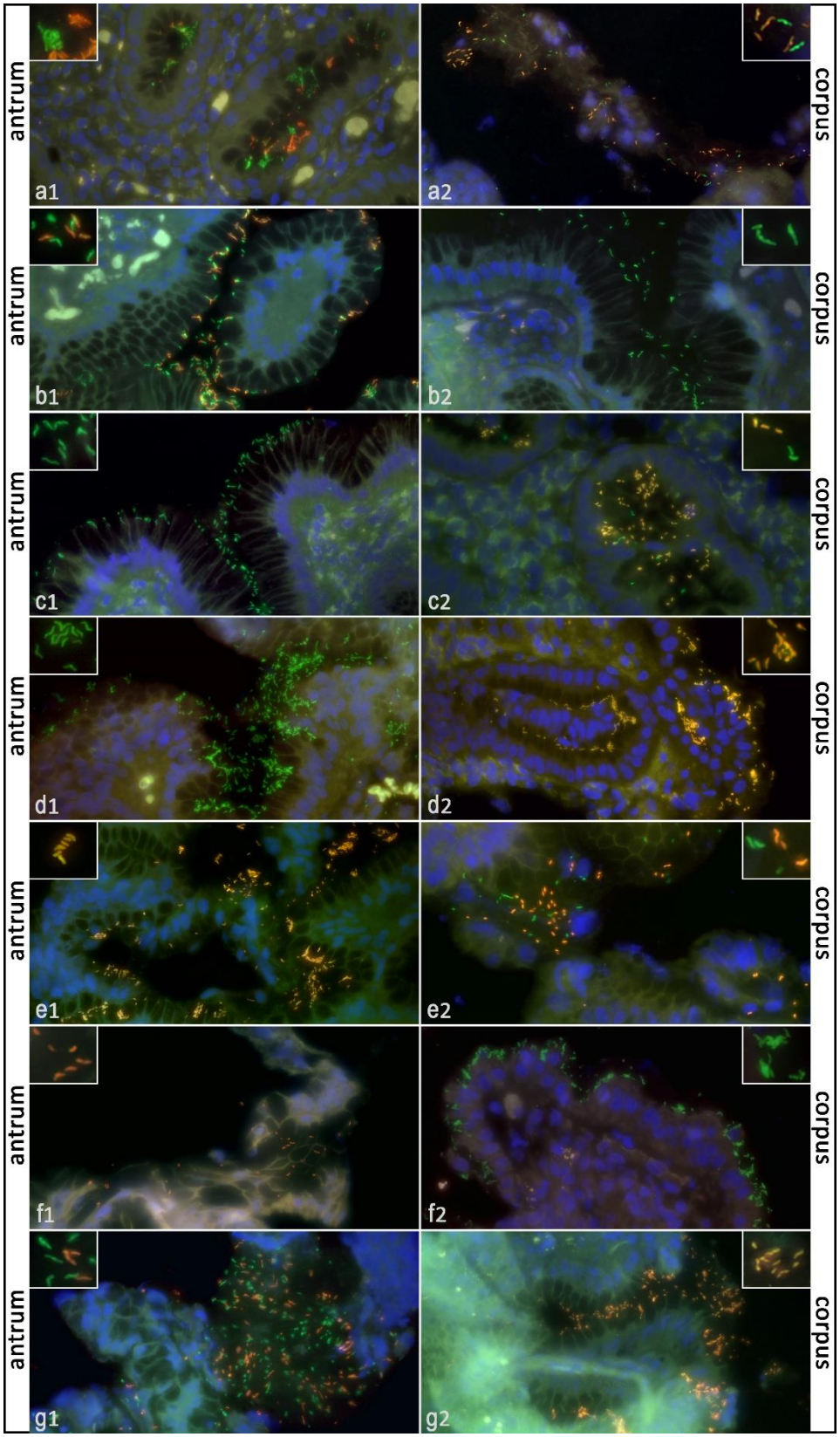
A vizsgálat során FISH-módszer használatával összesen 305 beteg clarithromycin-rezisztencia státuszát határoztuk meg. Az antrum és a corpus területéről vett biopsziás mintákon külön-külön végeztük el a reakciót, majd az összesített eredmények alapján a betegeket clarithromycin-érzékeny, homorezisztens és -heterorezisztens csoportba soroltuk. Vizsgálatunk során összesen 232 beteg esetében (76,1%) clarithromycin-érzékeny, míg 73 beteg esetében (23,9%) clarithromycin-rezisztens fertőzést találtunk. Ez utóbbi csoportból rezisztenciaspecifikus próbával jelölődött kórokozót 65 esetben (21,3%) tartalmaztak az antrumból származó és 64 esetben (21%) a corpusból származó minták. Az összes rezisztens eset közül 35 esetben homorezisztens (11,5%) és 38 esetben heterorezisztens (12,5%) fertőzés volt jelen.

A heterorezisztens betegek antrum- és corpusmintákra bontott eredményeit és a lehetséges kombinációk megoszlását az összes heterorezisztens eset arányában a 8. ábra és a 6. táblázat tartalmazza. Csaknem az összes heterorezisztens betegnek volt legalább egy olyan biopsziás mintája, amelyben mind clarithromycin-érzékeny, mind clarithromycin-rezisztens kórokozók megfigyelhetőek voltak. Az összesen 38 heterorezisztens betegből 18 esetben (47,4%) különbözött az antrumból és a corpusból származó biopsziás minták rezisztenciastátusza.

6. A heterorezisztens esetek megoszlása

A clarithromycin-heterorezisztens esetek öszesítése az antrum és a corpus területéről vett biopsziás minták eredményei szerint és az egyes kombinációk aránya az összes heterorezisztens fertőzéshez képest. Rövidítések: Cla= clarithromycin

Mintavétel helye	**Cla-rezisztencia státusz**	n és % az összes heterorezisztens eset között
Antrum	érzékeny	2 (5,26%)
Corpus	homorezisztens	
Antrum	homorezisztens	1 (2,63%)
Corpus	érzékeny	
Antrum	érzékeny	6 (15,79%)
Corpus	heterorezisztens	
Antrum	heterorezisztens	8 (21,05%)
Corpus	érzékeny	
Antrum	homorezisztens	1 (2,63%)
Corpus	heterorezisztens	
Antrum	heterorezisztens	0 (0,0%)
Corpus	homorezisztens	
Antrum	heterorezisztens	20 (52,63%)
Corpus	heterorezisztens	



8. ábra. A *Helicobacter pylori* clarithromycin-érzékenységi FISH-teszt eredményeit bemutató reprezentatív képek.

A különböző sorok az ugyanattól a betegtől nyert antrum (1) és corpus (2) szövetminták rezisztencia-státuszának különböző kombinációit ábrázolják (egymást követő betűkkel jelölve a leggyakoribbtól /A/ a kevésbé gyakoriig /G/); **A**: mindkét minta heterorezisztens, **B**: heterorezisztens-érzékeny, **C**: érzékeny-heterorezisztens, **D**: érzékeny-homorezisztens, **E**: homorezisztens-heterorezisztens, **F**: homorezisztens-érzékeny, **G**: heterorezistens-homorezisztens. A "G" sor egy olyan lehetséges kombinációt mutat, amely nem volt megtalálható a végső kohorszban (a megjelenített képek egy olyan esetből származnak, amelyet a vizsgálatból kizártak, mivel a korábbi eradikációs státuszra vonatkozó klinikai adatok nem voltak elegendőek). A betoldások az adott kép reprezentatív baktériumait mutatják további háromszoros nagyításban. Eredeti nagyítás: 630x.
Rövidítések: *H. pylori=Helicobacter pylori*.

IV./2.2. A betegek klinikopatológiai jellemzői és a rezisztenciacsoportok közötti különbségek

A homo- és heterorezisztens fertőzéseket összesítve a clarithromycin-rezisztencia szignifikánsan gyakrabban fordult elő nők esetében (29,1%), mint férfiaknál (16,9%) ($p<0,001$, Fisher-egzakt teszt). A három rezisztenciacsoportban vizsgálva is szignifikáns különbséget találtunk a nemek arányában ($p=0,0346$; 3x2 Fisher-egzakt teszt). Míg a fogékony csoportot kiegyensúlyozott férfi-női arány jellemezte (83%:71%), a homorezisztens alcsoport pedig erős női túlsúlyt mutatott (7%:15%), addig a heterorezisztens fertőzöttek mérsékelt női túlsúllyal (10%:14%) egy köztes csoportot képviseltek a kettő között (homorezisztens-érzékeny: $p=0,027$; míg a heterorezisztens-érzékeny és a heterorezisztens-homorezisztens összehasonlítások nem mutattak szignifikáns különbséget, $p=0,165$ és $p=0,457$; Fisher-egzakt teszt).

Az endoszkópos és szövettani elváltozások közül a GERD és a peptikus fekélybetegség prevalenciájában találtunk különbséget a három rezisztenciacsoport között. A peptikus fekélybetegség csak fogékony fertőzésben szenvedőknél fordult elő, a rezisztens csoportokban nem ($p=0,02513$; Fisher-egzakt teszt), míg a homo- és heterorezisztens fertőzöttek között e tekintetben nem volt különbség. A GERD szignifikánsan gyakoribb volt a rezisztens baktériummal fertőzöttekben (74,6% érzékeny vs. 87,7% rezisztens; $p=0,023$; Fisher-egzakt teszt). A három alcsoportot együttesen

vizsgálva is szignifikáns különbséget találtunk (74,6% érzékeny vs. 91,4% homorezisztens vs. 84,2% heterorezisztens; p=0,045; 3x2 Fisher-egzakt teszt). A GERD rezisztenciacsoportok közötti megoszlása a női túlsúlyhoz hasonlóan alakult, ugyanis a refluxbetegség előfordulása a homorezisztens fertőzésekben volt a leggyakoribb és a fogékony esetekre volt a legkevésbé jellemző, míg a heterorezisztens fertőzésben szenvedők itt is egy köztes csoportot alkottak (homorezisztens-érzékeny: p=0,030; a heterorezisztens-érzékeny és a heterorezisztens-homorezisztens összehasonlítások azonban nem mutattak szignifikáns különbséget, p=0,482 és p=0,226; Fisher-egzakt teszt). A betegek klinikopatológiai jellemzőit és a rezisztenciacsoportok közötti különbségeket a 7. táblázat mutatja be.

7. táblázat. Klinikopatológiai adatok, endoszkópos és szövettani diagnózisok megoszlása a teljes betegpopulációban és rezisztenciacsoportokra bontva.

Megjegyzés: Az érzékeny, homo- és heterorezisztens betegek közötti különbségek kiértékeléséhez Fisher-egzakt tesztet végeztünk 3x2 felbontású kontingenciatáblázat használatával. A három vizsgált csoport közötti életkorkülönbségek kiértékeléséhez Kruskal-Wallis tesztet végeztünk.

Rövidítések: Cla=clarithromycin, GERD=gasztroözofageális refluxbetegség

	Összes	**Cla-érzékeny**	**Cla-homorezisztens**	**Cla-heterorezisztens**	***p***
	n (%) vagy medián (SD)	n (%) vagy medián (SD)	n (%) vagy medián (SD)	n (%) vagy medián (SD)	
Összes	305 (100%)	232 (76,07%)	35 (11,48%)	38 (12,46%)	-
Nem					
férfi	130 (42,62%)	108 (46,55%)	9 (25,71%)	13 (34,21%)	0,0346
nő	175 (57,38%)	124 (53,45%)	26 (74,29%)	25 (65,79%)	
Életkor (év)	54,66 (±14,88)	54,83 (±15,27)	54,74 (±13,08)	53,55 (±14,29)	0,9112

Endoszkópos diagnózisok					
GERD	237 (77,70%)	173 (74,57%)	32 (91,43%)	32 (84,21%)	0,0448
Erozív gasztritisz	26 (8,52%)	22 (9,48%)	2 (5,71%)	2 (5,26%)	0,6841
Peptikus fekély	20 (6,56%)	20 (8,62%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,0251
Gyomorpolip	5 (1,64%)	3 (1,29%)	0 (0,0%)	2 (5,26%)	0,2162
Szövettani diagnózisok					
Aktív krónikus gasztritisz	276 (90,49%)	211 (90,95%)	33 (94,29%)	32 (84,21%)	0,3526
Intesztinális metaplázia	63 (20,66%)	52 (21,41%)	7 (20,0%)	4 (10,53%)	0,2763
Karcinóma	3 (0,98%)	2 (0,86%)	0 (0,0%)	1 (2,63%)	0,5613

IV./2.3. Az antrumból és corpusból vett szövetminták eltérései a különböző rezisztenciacsoportokban

Mind a teljes betegpopulációban, mind a fogékony és a heterorezisztens fertőzésben szenvedő betegcsoportokban a baktériumok denzitása gyenge pozitív korrelációt mutatott az antrum és a corpus területéről vett biopsziás minták között (8. táblázat). A homorezisztens esetekben a vizsgált gyomorrégiók baktériumsűrűsége a mérsékelten pozitív korrelációs együttható alapján nagyobb hasonlóságot mutatott egymással (8. táblázat). A szemikvantitatív kiértékelés alapján 1+ és a magasabb (2+ vagy 3+) denzitásértékkel bíró minták összehasonlítása alapján a magasabb baktériumsűrűség szignifikánsan gyakrabban volt megfigyelhető az antrumból származó mintákban (összes beteg, p=0,041; Fisher-egzakt teszt).

A gyulladás aktivitása többnyire az antrumra lokalizálódott mind az összes betegminta, mind az érzékeny és heterorezisztens betegcsoport vizsgálata alapján (8. táblázat). Szintén az antrum volt a preferált régió ezen csoportok azon eseteiben is,

amelyekben az aktivitás csak az egyik régiót érintette (8. táblázat). A homorezisztens fertőzöttekben gyakrabban volt jelen aktív gyulladás mindkét vizsgált régióban, mint a heterorezisztens fertőzésben szenvedő betegekben (8. táblázat).

A gyomornyálkahártya *H. pylori* fertőzéshez köthető strukturális elváltozásai antrális túlsúlyt mutattak mind a teljes betegcsoportban, mind az érzékeny és homorezisztens esetekben (8. táblázat). Azon heterorezisztens fertőzésben szenvedő betegek, akik a nyálkahártya strukturális elváltozásával rendelkeztek, annak helyét illetően a két vizsgált gyomorrégió között nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget, de a tendencia hasonló volt a többi csoportban tapasztaltakhoz (8. táblázat). A gyulladás aktivitása esetén megfigyeltekhez hasonló antrális predominancia volt jellemző a teljes betegcsoport, illetve az érzékeny és homorezisztens fertőzöttek azon eseteiben, amelyekben csak az egyik gyomorrégióban volt jelen strukturális elváltozás (8. táblázat).

8. táblázat. A baktériumdenzitás, a gyulladásos aktivitás és a *H. pylori*-hoz kapcsolt strukturális elváltozások megoszlása a teljes betegcsoportban és a különböző rezisztenciastátuszú fertőzések esetén.

a: Spearman-rangkorreláció, b: McNemar-teszt, c: Fisher-egzakt teszt.

Jelmagyarázat: A+/A-: az adott változó pozitív / negatív az antrum területéről vett biopsziás mintában, C+/C-: az adott változó pozitív / negatív a corpus területéről vett biopsziás mintában, csak A/C: az aktivitás vagy a strukturális elváltozás csak az antrumból / corpusból vett biopsziás mintában figyelhető meg.

Rövidítések: Cla=clarithromycin, A=antrum, C=corpus

	Összes		**Cla-érzékeny**		**Cla-homorezisztens**		**Cla-heterorezisztens**	
<u>A baktériumok denzitása</u>								
Antrum	1+: 67	ρ=0,4657	1+: 54	ρ=0,4488	1+: 4	ρ=0,5867	1+: 9	ρ=0,4365
	2+: 111	p<0,001[a]	2+: 81	p<0,001[a]	2+: 15	p<0,001[a]	2+: 15	p=0,006[a]
	3+: 127		3+: 97		3+: 16		3+: 14	
Corpus	1+: 90		1+: 70		1+: 6		1+: 14	
	2+: 113		2+: 80		2+: 12		2+: 13	
	3+: 102		3+: 74		3+: 17		3+: 11	

A gyulladás aktivitása								
A+C+	209/305	p<0,001[b]	160/232	p<0,001[b]	29/35	p=0,3711[b]	20/38	p=0,0433[b]
A-C+	10/305		7/232		1/35		2/38	
A+C-	62/305		48/232		4/35		1/38	
A-C-	24/305		17/232		1/35		6/38	
csak A	62/305	p<0,001[c]	48/232	p<0,001[c]	4/35	p=0,3565[c]	1/38	p=0,0248[c]
csak C	10/305		7/232		1/35		2/38	
A nyálkahártya strukturális elváltozásai								
A+C+	36/305	p<0,001[b]	32/232	p<0,001[b]	2/35	p=0,412[b]	2/38	p=0,2207[b]
A-C+	10/305		9/232		0/35		1/38	
A+C-	62/305		51/232		6/35		5/38	
A-C-	197/305		140/232		27/35		30/38	
csak A	62/305	p<0,001[c]	51/232	p<0,001[c]	6/35	p=0,25[c]	5/38	p=0,1997[c]
csak C	10/305		9/232		0/35		1/38	

IV./2.4. A betegek eradikációs anamnézise

A betegek kórtörténetének elemzése során azt találtuk, hogy a mintavételt megelőző eradikációs kísérlet szignifikánsan gyakrabban fordult elő a rezisztens fertőzésben szenvedőkben, mint a fogékony betegeknél (érzékeny: 8,6% vs. homorezisztens: 65,7% vs. heterorezisztens: 26,3%; homorezisztens-érzékeny: p<0,001; heterorezisztens-érzékeny: p=0,00329; Khi-négyzet teszt). A homorezisztens fertőzöttek esetében szignifikánsan gyakrabban szerepelt eradikációs kísérlet az anamnézisben, mint a heterorezisztens betegcsoport tagjainál (p<0,001; Khi-négyzet teszt).

Hasonló tendencia volt megfigyelhető a korábbi eradikációs kísérletek számának vizsgálata során is, ugyanis mind a homorezisztens, mind a heterorezisztens betegek szignifikánsan gyakrabban estek át kettő vagy több kezelésen, mint az érzékeny fertőzésben szenvedők (érzékeny: 3,5% vs. homorezisztens: 54,3% vs. heterorezisztens: 21%; p<0,001 mindkét esetben). Ez az arány tehát a homorezisztens fertőzötteken belül a csoport több mint felét jelenti, szemben a heterorezisztens alcsoporttal, amelynek mindössze egyötöde esett át több eradikációs kísérleten. A rezisztenciacsoportok eradikációs anamnézisét a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat. A clarithromycin-érzékeny, -homorezisztens és -heterorezisztens betegek eradikációs anamnézisének összehasonlítása.

Rövidítések: Cla=clarithromycin, CI (OR)=az esélyhányados konfidencia-intervalluma, HeteroR=clarithromycin-heterorezisztens, HomoR= clarithromycin-homorezisztens

	Cla-érzékeny	**Cla-homorezisztens**	**Cla-heterorezisztens**
Nem volt korábbi eradikációs kísérlet	212 (91,38%)	12 (34,29%)	28 (73,68%)
Érzékeny vs. HomoR	p<0,001	CI (OR): 8,16-51,12	
Érzékeny vs. HeteroR	p=0,0036	CI (OR): 1,42-9,48	
HomoR vs. HeteroR	p<0,001	CI (OR): 0,06-0,57	
Egy korábbi eradikációs kísérlet	12 (5,17%)	4 (11,43%)	2 (5,26%)
Érzékeny vs. HomoR	p=0,2403	CI (OR): 0,12-1,92	
Érzékeny vs. HeteroR	p=1,0000	CI (OR): 0,21-9,40	
HomoR vs. HeteroR	p=0,4177	CI (OR): 0,31-27,02	
Kettő vagy több korábbi eradikációs kísérlet	8 (3,45%)	19 (54,29%)	8 (21,05%)
Érzékeny vs. HomoR	p<0,001	CI (OR): 0,01-0,09	
Érzékeny vs. HeteroR	p<0,001	CI (OR): 0,04-0,45	
HomoR vs. HeteroR	p=0,004	CI (OR): 1,44-14,31	

IV./2.5. A sikeres eradikációk aránya

A mintavételt követő eradikációs terápiák sikerének arányát azon betegek körében elemeztük, akik esetében a kapott kezelés részletes adatai és a terápia végét követő UBT-vizsgálat vagy kontroll biopsziás mintavétel eredményei rendelkezésre álltak. Összesen 109 beteg (70 clarithromycin érzékeny, 20 -homorezisztens és 19 -heterorezisztens) esetében voltak a terápia részletei elérhetőek.

Jelentős eltérés volt a három rezisztenciacsoport között a clarithromycin-tartalmú eradikációs kezelés eredményében. Ezen kezelési sémák használatával a sikeresen eradikált esetek aránya az érzékeny betegcsoportban 93% (57/61) volt, míg a

homorezisztens betegek körében mindössze 15% (2/13) (p<0,0001; Fisher-egzakt teszt). Ugyanakkor a heterorezisztens esetekben 60% (6/10) volt a sikeres eradikációk aránya.

A clarithromycint nem tartalmazó kezelések egyes rezisztenciacsoportokban elért eredményei között nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést, melyet befolyásolhattak az alcsoportok alacsony esetszámai is. A vizsgált betegek mintavételt követő eradikációs kezelésének részletei a 10. táblázatban láthatóak.

10. táblázat. A sikeres eradikációs kezelések aránya a clarithromycin-érzékeny, -homorezisztens és -heterorezisztens fertőzésekben.

A különböző rezisztenciastátuszú fertőzések kezelési eredményeit Fisher-egzakt teszttel hasonlítottuk össze.

Rövidítések: Cla=clarithromycin, CI (OR)=az esélyhányados konfidencia-intervalluma, HeteroR=clarithromycin-heterorezisztens, HomoR=clarithromycin-homorezisztens

	Sikeres	Sikertelen	Össze-hasonlítások	*p*	CI (OR)	
	eradikáció				Alsó	Felső
	Cla-tartalmú kezelés					
Homorezisztens	2	11	*HomoR vs. HeteroR*	p=0,0393	1,1535	59,0051
Heterorezisztens	6	4	*HeteroR vs. Érzékeny*	p=0,0112	0,0208	0,5326
Érzékeny	57	4	*HomoR vs. Érzékeny*	p<0,0001	0,0021	0,0784
	Nem Cla-tartalmú kezelés					
Homorezisztens	3	4	*HomoR vs. HeteroR*	p=1,0000	0,0867	5,1272
Heterorezisztens	3	6	*HeteroR vs. Érzékeny*	p=0,3469	0,0352	1,7748
Érzékeny	6	3	*HomoR vs. Érzékeny*	p=0,6145	0,0488	2,8841

V. MEGBESZÉLÉS

A *H. pylori* több szempontból is a „legsikeresebb” humán patogén baktériumok között tartható számon. Egyrészt mindamellett, hogy bizonyított a szerepe olyan súlyos megbetegedések kialakulásában, mint a peptikus fekély, gyomorrák vagy a gyomor MALT-limfómája, a fertőzés általában hosszú évekig tünetmentes marad és tovább fertőz. Ez utóbbiban figyelemreméltó a sikere, hiszen a világ népességének több mint fele *H. pylori* hordozó, mely jelentős globális terhet jelent az egészségügy számára. Mégis ez az a kórokozó, amely ugyan mintegy 100 ezer éve kísér minket, de a modern orvostudomány korában nincs 40 éve, hogy ismerjük.[215] A paradoxon egyik magyarázata, hogy a korábban bakteriális kolonizációra alkalmatlannak hitt gyomor savas környezetében él – ott, ahol sokáig senki sem kereste. Pontosabban ott volt a kutatók szeme előtt, hiszen a kutyák gyomrában jelen lévő spirális baktériumokról Bizzozero számolt be először 1893-ban, de 1906-ban már humán gyomorban is felfedezték őket.[5] Ettől függetlenül leírták a humán gyomor ureáz aktivitását is, de ezt sokáig nem bakteriális eredetűnek vélték, a spirális baktériumokat pedig a szájflórából származó kontaminációnak gondolták.[5] Még a felső endoszkópos mintavételek elterjedésével is sokáig rejtve maradhatott a patológusok előtt, hiszen a biopsziás minták vizsgálatára használt hagyományos festési eljárásokkal csak akkor látható, ha célzottan keresik is.

Elterjedtségéhez hozzájárul, hogy bár kóroki szerepének felfedezése óta számos terápiás lehetőséget dolgoztak ki eradikálására, ezek sikerét képes különböző rezisztenciamechanizmusok kifejlesztésével hatékonyan csökkenteni. A baktérium kezelésére korábban leghatásosabbnak talált és ezért leggyakrabban alkalmazott antibiotikum a makrolidok közé tartozó clarithromycin. Ez a bakteriális riboszómák 50S alegységének 23S rRNS-én hatva a kórokozó fehérjeszintézisét gátolja, azonban hatásosságát csökkentik, illetve meggátolják az rRNS specifikus pontmutációi. A clarithromycin-rezisztens fertőzések magas aránya világméretű problémát jelent a *H. pylori* eradikációjában. A WHO antibiotikumrezisztens kórokozókról készített kutatásprioritási listáján a clarithromycin-rezisztens *H. pylori* fertőzés a legproblémásabb, közösségben szerzett, nem-mikobakteriális fertőzésként szerepel, így kiemelt fontosságú problémaként és kutatási célpontként van számon tartva.[216] Ennek ellenére a clarithromycin-rezisztens *H. pylori* fertőzések számos aspektusa még ma sem

kellőképpen ismert, és különösen keveset tudunk a rezisztens esetek jelentős hányadát kitevő heterorezisztens infekciókról.

Az utóbbi években számos tanulmány vizsgálta a baktérium szöveti kimutatására alkalmazott festési eljárások diagnosztikus pontosságát.[141,217–219] A legmagasabb érzékenységgel és specificitással rendelkező eljárásnak az immunhisztokémia bizonyult. Glickmann és munkatársai eredményei alapján a konvencionális festési eljárások megbízhatatlanok az alacsony baktériumdenzitással járó esetekben, ugyanis ezekben a kórokozók többnyire a mélyen fekvő oxintikus mirigyekben vagy éppen a parietalis sejtek kanalikulusaiban helyezkednek el.[220] Ugyan több tanulmány is vizsgálta a *H. pylori* FISH-módszer teljesítményét a clarithromycin-rezisztenciáért felelős pontmutációk kimutatásában,[205,207] de eddig nem volt olyan vizsgálat, mely a technikának a kórokozó jelenlétének detektálásában mutatott hatékonyságát értékelte volna. Mindezek alapján munkánk során az immunhisztokémiát referenciaként alkalmazva 2896 beteg felső endoszkópos beavatkozás során nyert gyomorbiopsziás mintáján vizsgáltuk a FISH-eljárás diagnosztikus értékét.

Eredményeink alapján mindkét eljárás kimagasló teljesítménnyel mutatta ki a baktérium jelenlétét, a szenzitivitás, specificitás, a pozitív és negatív prediktív értékek az immunhisztokémia és a FISH esetében is 98% vagy afelett alakult.

Ugyanakkor közismert, hogy baktériumhoz kapcsolt bizonyos gyomornyálka-hártya-elváltozásoknak kiemelt jelentőségük van a szövettani diagnózis felállításában. Ilyen például a neutrofil granulociták infiltrációja, mely jellemzően a kórokozó által kolonizált gyomor hámsejtjei között előfordulva a krónikus gasztritisz aktivitását jelzi. A fertőzés által fenntartott gyulladás másik meghatározó jellemzője a gyomornyálkahártya felépítésének torzulása, szerkezeti elváltozásainak jelenléte. Ezeket figyelembe véve, tanulmányunk során vizsgáltuk a gyulladás aktivitásának és a *H. pylori*-asszociált strukturális elváltozások jelenlétének a diagnosztikus pontosságot befolyásoló szerepét. Eredményeink alapján egyik tényező sem befolyásolta diagnosztikus szempontból számottevően a két módszer pontosságát (4. táblázat).

A diagnosztikus eljárások teljesítményének legfőbb akadálya a kimutatásra váró entitás csökkent mennyisége. A vizsgálatban résztvevő közel 3000 beteg szövetmintájában a baktériumok denzitása és a gyulladás aktivitása között erős pozitív korrelációt találtunk, mely alapján az aktivitás hiánya egyben alacsonyabb

baktériumsűrűséggel is társul. Ennek ellenére tanulmányunkban - az aktivitás jelenlétéhez vagy hiányához hasonlóan - a mintában található baktériumsűrűség sem befolyásolta számottevően a két eljárás diagnosztikus teljesítményét.

Ugyan a baktériumok mennyisége statisztikai értelemben nem, de egyedi esetekben képes volt befolyásolni az IHC és a FISH diagnosztikus eredményét. Köztudott, hogy a *H. pylori* jelenléte egyenetlen eloszlást mutat, minthogy egyesével elszórva, vagy foltokban, gócos elhelyezkedésben figyelhető meg a gyomor nyálkahártyáján, különösen a kórokozók alacsonyabb száma esetén.[221,222] Az immunhisztokémiai és FISH eljárásokkal eltérő eredményt adó 25 eset elemzése során (2. táblázat Megjegyzés oszlop) 24 esetben (96,0%) csak 1+ baktériumdenzitást találtunk, vagyis a kórokozók csak elszórtan vagy kisebb fókuszokban voltak jelen. Az egyik ilyen mintában mindössze három baktérium volt detektálható, méghozzá az immunhisztokémiai vizsgálathoz egy tárgylemezre rögzített három szöveti lemetszés közül is csak az egyikben. Ezekben az esetekben feltehetően a szövetblokk ismételt metszése során a kisebb baktériumcsoportok egyszerűen hol megjelentek bizonyos metszési síkokban, hol kifaragódtak a mintából. Szintén ez lehet a magyarázata a rutin diagnosztika során negatív, majd két vizsgálóeljárással diszkrepáns eredményt adó esetek módosított Giemsa-festett metszetén megismételt FISH-reakciók magas negativitási arányának (20/28, 71,43%). Ezen esetek közé tartozott ráadásul négy olyan eset is, amelyben az eredeti FISH-reakció eredménye pozitív volt. Tehát ugyanazon vizsgálóeljárással ugyanazon minta eltérő metszési síkjai eltérő eredményt adtak. Mindezek alátámasztják, hogy a baktériumok szétszórt elrendeződése révén bármely gyomornyálkahártyát tartalmazó metszési síkban megjelenhetnek különálló baktériumok vagy kisebb baktériumfókuszok, de ugyanígy el is tűnhetnek, ami még a legmagasabb teljesítményű vizsgálóeljárások érzékenységét is befolyásolhatja. Az ilyen esetek előfordulását többszörös mintavétellel és az egyes mintákból származó több metszet vizsgálatával lehet hatékonyan csökkenteni.

A mintában található felszíni epitélium csökkent mennyisége szintén befolyásolhatja a szöveti diagnosztika eredményét. Vizsgálatunk során a szövetmetszetek három metszési körben készültek, elsőként rutin diagnosztikai célokra, ezt követően az immunhisztokémiára, míg a FISH-vizsgálatra csak a harmadikként. Az ismételt metszések a szövetblokk mélyebb rétegeiből származó mintákban a felszíni hámréteg,

vagyis a kórokozó preferált helyének kifaragódását, mennyiségének csökkenését eredményezhették. Ez magyarázhatja, hogy az ismételt metszések után gyakran már az ideálisnál mélyebb szövetréteget vizsgáló FISH-eljárás az immunhisztokémiához képest enyhén (de statisztikailag nem szignifikánsan) alacsonyabb érzékenységet mutatott. Feltehetően ebben az esetben a mintavételezési hiba egyik speciális fajtájával állunk szemben, nem a módszer csökkent analitikai érzékenységével.

Bizonyos tekintetben a FISH-eljárás alkalmazása nagyobb diagnosztikai pontosságot eredményez, mint az általunk referenciaként használt immunhisztokémia. Ugyanis a *H. pylori* kimutatására alkalmazott immunhisztokémia keresztreakciót ad a *Helicobacter* genus többi tagjával. Ez általában nem okoz gondot, mivel a *H. heilmannii* morfológiája némiképp eltérő, de egyes speciális esetekben (pl. amikor nem a teljes baktérium kerül a metszési síkba) félrevezetheti a vizsgálót, különösen ha az ilyen téren nem rendelkezik kellő gyakorlattal. FISH esetében a próbamixben található oligonukleotid próba a 16S rRNS *H. pylori*-fajspecifikus régiójához kötődik, így használatával a gyomorbiopsziákban olykor megjelenő *H. heilmannii* esetén negatív eredményt kapunk.[204]

A *H. pylori* FISH-módszer alkalmazásának vitathatatlan előnye és elsődleges alkalmazási területe a fertőzés clarithromycin-rezisztencia státuszának meghatározása.[223,224] A clarithromycin az elsővonalban használt terápiás protokollok egy alapgyógyszere, így az ellene kiakult antibiotikumrezisztencia vizsgálata nagy terápiás jelentőséggel bír.[22,173] A nemzetközi ajánlások szerint amennyiben egy adott populációban a clarithromycin-rezisztencia előfordulása a 15%-ot eléri, a kezelést megelőzően a rezisztencia-vizsgálat elvégzése szükséges vagy más antibiotikumtartalmú, elsővonalban használható protokoll alkalmazása ajánlott.[22,173,193]

A clarithromycin-rezisztens fertőzések jelentős része heterorezisztens, azaz mind clarithromycin-érzékeny, mind -rezisztens kórokozók jelen vannak a gyomorban. A rezisztencia meghatározásában mutatott magas érzékenysége mellett a FISH-eljárás alkalmas a heterorezisztens fertőzések diagnózisára is, ugyanis használata során a kórokozók képi megjelenítése lehetővé teszi az érzékeny és rezisztens kórokozók kimutatását egy mintán belül is. A heterorezisztencia két fajtája ismert, attól függően, hogy a rezisztens és érzékeny baktériumok egy biopsziás mintán belül egymással keveredve, közvetlenül egymás mellett helyezkednek el (*intraniche* heterorezisztencia)

vagy ha két gyomorrész rezisztenciája különbözik egymástól (*interniche* heterorezisztencia - pl. rezisztens fertőzés az antrumban és érzékeny a corpusban vagy érzékeny az antrumban és rezisztens a corpusban).

Munkánk során a heterorezisztens fertőzések karakterizálásának érdekében olyan eseteket vizsgáltunk, amelyekben mind az antrum, mind a corpus területéről vett biopsziás minták *H. pylori*-pozitívak voltak és a betegek eradikációs anamnézise rendelkezésünkre állt. Tudomásunk szerint munkánk egyike a legnagyobb clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzést vizsgáló tanulmányoknak, és ezek között az első olyan, amely felnőtt betegek esetében a FISH-módszert alkalmazta a genotípusos rezisztencia meghatározására.[225]

Más tanulmányokkal összhangban, beteganyagunkban mi is a heterorezisztens fertőzések magas arányát találtuk.[196,198,210–213,226] Azonban az eredmények pontos összevetését nehezíti, hogy más tanulmányokban többnyire olyan vizsgálóeljárásokat alkalmaztak, melyek csak az *interniche* típusú heterorezisztencia kimutatását tették lehetővé, és figyelmen kívül hagyták az *intraniche* típusú heterorezisztencia lehetőségét.[196,198,210–213,226] Mindazonáltal ezek a vizsgálatok rámutattak arra, hogy a rezisztenciatesztet mind az antrumból, mind a corpusból vett biopsziás mintán célszerű elvégezni. Saját vizsgálatunk során a rezisztens betegek több mint felében (38/73; 52%) heterorezisztens fertőzést mutattunk ki, melyből igen magas volt az *intraniche* típusú heterorezisztencia aránya (35/38; 92%; 7. táblázat). Előfordulása gyomorrégiótól függetlennek bizonyult, gyakran volt fellelhető mind az antrumból, mind a corpusból származó biopsziás mintákban (20/35, 57%; 7. táblázat).

A legtöbb heterorezisztenciát vizsgáló közlemény az általunk tapasztaltnál alacsonyabb előfordulási gyakoriságról számol be.[210,211,226] Ez a különbség nem magyarázható teljességgel a diagnózishoz használt módszerek eltéréséből, ugyanis több tanulmány is leírta, hogy a PCR-alapú vizsgálómódszerekkel és az E-teszt alkalmazásával is lehetséges az egy mintán belül jelenlévő, különböző rezisztencia-státuszú baktériumok kimutatása.[227–231] Azonban mivel a klinikai gyakorlat csak a rezisztens és érzékeny fertőzések megkülönböztetést igényli, az *intraniche* típusú heterorezisztencia vizsgálata nem vált rutinszerű gyakorlattá a mikrobiológiai laboratóriumokban. Ez a klinikai megközelítés lehet az oka annak is, hogy a tanulmányok többsége csak az *interniche* típusú heterorezisztencia gyakoriságára vonatkozóan közöl adatot, ezáltal alábecsülve a

heterorezisztens fertőzések valós arányát. Magasabb prevalenciát mutató eredményeink összhangban voltak azokkal a vizsgálatokkal, amelyek az *intraniche* heterorezisztencia lehetőségével is számoltak.[206,230]

Ugyanakkor felmerül a kérdés, hogy pontosan mennyivel csökken a heterorezisztens fertőzések aránya abban az esetben, amennyiben olyan módszert alkalmazunk, amely az intraniche típust nem mutatja ki. Az összes heterorezisztens eset mintegy 55%-a (21/38) egyik biopsziás mintájában sem tartalmazott tisztán érzékeny fertőzést, de valamelyik régiójában kevert rezisztens populáció volt jelen (antrum/corpus rezisztencia státusz: 1 homorezisztens / heterorezisztens, 0 heterorezisztens / homorezisztens, 20 heterorezisztens / heterorezisztens). Mindezek alapján az a megközelítés, amely csak az *interniche* heterorezisztencia típust veszi figyelembe, kevesebb, mint a felére csökkenti a heterorezisztens fertőzések arányát.

A klinikai gyakorlat során előfordul, hogy a felső endoszkópos vizsgálat alkalmával biopsziás mintavétel csak az antrális régióból történik, vagy a rezisztenciavizsgálatot csak az antrumból származó mintából kérik a gasztroenterológusok. Ennek megfelelően megvizsgáltuk, hogy hány rezisztens, illetve heterorezisztens eset kapna téves diagnózist a FISH-vizsgálat során, ha csak az antrális minták eredményeit vesszük figyelembe. Az összes heterorezisztens esetből nyolc olyan volt (21%), melyben az antrumban csak érzékeny, míg a corpusban rezisztens baktériumpopuláció volt jelen (két homorezisztens és hat heterorezisztens). Mindezek alapján elmondható, hogy minden ötödik rezisztens eset rejtve maradhat ezzel a megközelítéssel, és érzékeny fertőzés diagnózisát kapja kézhez a klinikus. Hasonló eredménnyel jár, amennyiben fordítottan járunk el és csak a corpusból származó mintákon történik rezisztenciavizsgálat. Saját beteganyagunkban ugyanis kilenc olyan heterorezisztens eset is volt (24%, egy homorezisztens és nyolc heterorezisztens antrumminta), melyben az antrumban rezisztens, de a corpusban tisztán érzékeny baktériumpopuláció volt jelen. Ez a kiegyensúlyozott antrum-corpus arány ellentmond néhány korábbi közleménynek, amelyben a clarithromycin-rezisztencia előfordulását gyomorrégiótól függően eltérőnek találták, így egyes szerzők szerint magasabb a corpusban[232,233], a fundusban[212,225], illetve az antrumban.[211]

Más tekintetben mi is megfigyeltünk különbségeket a két vizsgált intragasztrikus régió között (8. táblázat). Az antrum és a corpus baktériumdenzitása

rezisztenciacsoporttól függően gyengén vagy közepesen korrelált egymással, de az összes eset vizsgálata során az antrumból vett mintákban gyakoribb volt a magasabb, szemikvantitatív meghatározás alapján 2+/3+ nagyságú baktériumsűrűség. A gyulladás aktivitásának jelei mindkét gyomorrégió mintáiban gyakoriak voltak, jelenléte az antrumban szignifikánsan gyakoribb volt azon esetekben, melyekben csak az egyik gyomorrégió volt érintett. A fertőzéshez köthető nyálkahártya-elváltozások (beleértve az atrófiát, intesztinális metapláziát) szintén túlnyomórészt az antrális régióban fordultak elő. Ezek a megfigyelések jól illeszkednek ahhoz az általánosan elfogadott elképzeléshez, hogy a fertőzés által kiváltott krónikus gyulladás szövődményei elsősorban az antrumot érintik.[234]

A regionális különbségeket rezisztenciacsoportok szerint vizsgálva azt találtuk, hogy a fogékony és heterorezisztens fertőzöttekben a gyulladás aktivitása az antrumra volt jellemző, míg ez az antrális túlsúly a homorezisztens esetekben nem volt megfigyelhető. Ennek hátterében az állhat, hogy a homorezisztens fertőzések esetén gyakrabban volt jelen aktivitás mindkét gyomorrégióban egyszerre, valamint ebben a csoportban találtuk a legmagasabb korrelációt az antrum és a corpus baktériumsűrűsége között is. A betegek kórtörténetének elemzése alapján a homorezisztencia valószínűsíthetően korábbi sikertelen eradikációs kísérletek következménye. A folyamatos szelekciós nyomás következtében a homorezisztens baktériumpopulációk magasabb életképességre tehettek szert, melynek köszönhetően a corpust is kolonizálni tudták, méghozzá az antrális régiót megközelítő baktériumsűrűséggel.

Mindemellett az ismételt eradikációs kezelések és a PPI-k hosszútávú alkalmazása a savtermelés csökkenését eredményezheti a corpusban, mely hozzájárulhat a *H. pylori* ezirányú terjedéséhez és így a corpus-domináns gasztritisz és atrófia kialakulásához.[235] Ugyanakkor vizsgálatunk során nem figyeltünk meg összefüggést a corpus magasabb szintű bakteriális kolonzációja és az atrófia jelenléte között, melynek hátterében az érintett esetek alacsony száma állhat. Mint az immunhisztokémia és a FISH diagnosztikus értékét vizsgáló tanulmányunk eredményei mutatták, a magasabb baktériumdenzitás és a gyulladás aktivitása szorosan összefügg egymással, mely a homorezisztens fertőzöttek corpusmintájában gyakrabban megjelenő aktivitás hátterében is állhat.

A három rezisztenciacsoport között a GERD és a peptikus fekély előfordulásában figyeltünk meg szignifikáns különbségeket. Az endoszkópos vizsgálatok eredményei

alapján a GERD leginkább a homorezisztens fertőzöttekre volt jellemző és prevalenciája szignifikánsan alacsonyabb volt az érzékeny fertőzésben szenvedőkben, míg a heterorezisztens csoportban közepes arányban fordult elő. A vizsgált betegcsoportban a peptikus fekélyt kizárólag a fogékony fertőzésekben találtunk. Eredményünk ellentmond néhány korábbi tanulmánynak, melyekben nem figyeltek meg statisztikailag szignifikáns különbséget a peptikus fekély gyakoriságában a clarithromycin-érzékeny és rezisztens fertőzésben szenvedők között.[236–238]

A korábbi vizsgálatoknak megfelelően, a vizsgált betegcsoportban a clarithromycin-rezisztens esetek aránya szignifikánsan magasabb volt nőkben, mint férfiakban.[239,240]

A rezisztencia előfordulásában megfigyelt nemi különbséget pontosítva, a vizsgált betegcsoportban a homorezisztens esetek számában volt a legnagyobb a különbség a férfiak és nők között, ennek megfelelően hasonló nemi eltérést mutatott a kettő vagy több korábbi eradikációs kísérleten átesettek aránya. Az anamnesztikus adatok elemzése során a heterorezisztens csoportban a korábbi eradikációs események számát tekintve kisebb volt a nemi diszkrepancia, míg az érzékeny fertőzésben szenvedők kórtörténetében jellemzően nem szerepelt korábbi eradikációs kísérlet. Mindezek alapján homorezisztencia leginkább a sikertelen eradikációs kísérletek következményeként jöhet létre, míg a heterorezisztencia kialakulásában elsődlegesen más etiológiai tényező állhat, például a clarithromycin nem eradikációs célú alkalmazása vagy többszörös fertőződés.[196–198,210–213,226] Az utóbbi okozta heterorezisztencia azonban elsősorban azokban a földrajzi régiókban fordul elő, melyekben mind a *H. pylori* fertőzés, mind a clarithromycin rezisztencia kimagasló arányban van jelen a társadalomban.[197]

Több korábbi tanulmány igazolta a nők magasabb makrolidfogyasztását, beleértve az eradikációs és az egyéb célú felhasználást is.[188,241] Ezek alapján a más tanulmányoktól eltérő módszertan és az esetleges földrajzi eltérések mellett a magasabb nem-eradikációs célú clarithromycin-fogyasztás is hozzájárulhat a heterorezisztens esetek nők körében tapasztalt magasabb arányához vizsgálatunkban.[198,210,211,226]

A clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések optimális eradikációs protokollját illetően jelenleg nincs érvényben lévő szakmai iránymutatás. Eredményeink De Francesco és munkatársai közleményével összhangban azt mutatják, hogy a heterorezisztens esetek a clarithromycin-tartalmú eradikációs terápia hatásfokát illetően

egy külön alcsoportot képviselnek, melyben clarithromycin alkalmazása esetén a fertőzés gyógyulási aránya közepesnek mondható (10. táblázat).[231] Ugyanis míg a homorezisztens csoportban a clarithromycin-alapú kezelés legnagyobbrészt eredménytelennek bizonyult, a heterorezisztens esetek többsége (bár az érzékeny fertőzötteknél kisebb arányban) sikeres eradikáción esett át clarithromycin-tartalmú protokoll használatával. Mindenesetre eredményeink felhívják a figyelmet a clarithromycin alkalmazásának lehetőségére a heterorezisztens fertőzések kezelésében akár pl. négyes kombináció egyik elemeként. Azonban hatékonyságának pontos meghatározására, valamint a megfelelő kezelési séma kidolgozására és prediktív faktorok keresésére további prospektív tanulmányok lennének szükségesek. Mivel ez a rezisztenciacsoport a clarithromycin-rezisztens betegek mintegy felét teszi ki, elengedhetetlen lenne a jövőben az optimális kezelési stratégia meghatározása a heterorezisztens fertőzések eradikációjához is.

A heterorezisztens fertőzések karakterisztikáját vizsgáló tanulmányunk egyik legfőbb limitációja a retrospektív karaktere. Ugyan a vizsgálat több mint 300 beteg bevonásával zajlott, az esetek különböző szempontok szerinti felosztása alacsony esetszámokat eredményezett egyes alcsoportokban, mely egyes összehasonlításoknál releváns eredmények hiányát vagy alacsony statisztikai erőt eredményezett. Több más, a genotípusos rezisztencia diagnosztikájában használt eljáráshoz hasonlóan, az alkalmazott FISH-eljárás pontosságát is csökkenti, hogy csak a 23S rRNS három leggyakoribb pontmutációját mutatja ki, ezáltal nem képes a kevésbé gyakori, ugyancsak clarithromycin-rezisztenciát okozó elváltozások detektálására.[242–245] Bár itt érdemes megjegyezni, hogy azért e három pontmutáció kimutatása terjedt el általánosan, mivel ezek felelősek a fenotípusos clarithromycin-rezisztenciát mutató esetek több, mint 90%-áért.[246] Másik limitáló tényező, hogy az ezekkel az eljárásokkal kimutatott genotípusos rezisztencia nem minden esetben manifesztálódik fenotípusos rezisztenciában is.[231,244,247,248] Jüttner és munkatársai vizsgálata alapján azonban a FISH-eljárás és az E-teszt közel azonos eredményt adott a gasztroenterológiai gyakorlatban, a néhány diszkrepáns eset hátterében feltehetően a heterorezisztens esetekben előforduló mintavételi hibák állhatnak.[205]

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy majd 3000 beteg szövetmintáján vizsgálva a fertőzés kimutatásában a FISH-eljárás diagnosztikus teljesítménye az ismerten magas érzékenységű immunhisztokémiai vizsgálattal

megegyező. Ezek az eredmények is alátámasztották a FISH-eljárás alkalmasságát a heterorezisztens fertőzések diagnózisára és patológiai jellemzőik feltárására. A vizsgálat során ugyanannak a betegnek a *H. pylori*-pozitív antrum és a corpus területéről vett biopsziás mintájában található kórokozók clarithromycin-rezisztencia státuszát határoztuk meg. Eredményeink alapján a rezisztens esetek több mint fele a heterorezisztens csoportba tartozott, továbbá ezek túlnyomó többségében egyik vagy mindkét vizsgált gyomorrégióban *intraniche* típusú heterorezisztens baktériumpopuláció volt jelen. A baktériumok rezisztenciastátuszának heterogenitása alátámasztja a többszörös biopsziás mintavétel és a rezisztenciateszt elvégzésének szükségességét mindegyik szövetmintán. Mindezek alapján elmondható, hogy a clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések mind klinikai, mind patológiai jellemzőikben egy különálló alcsoportot képviselnek, amely számos tekintetben köztes tulajdonságokat mutat az érzékeny és homorezisztens csoportokhoz képest. Az esetek kórtörténetének elemzése alapján a homorezisztens fertőzésekkel ellentétben a heterorezisztencia kialakulása nem a korábbi eradikációs kísérletek következménye, hanem valószínűsíthetően a nem-eradikációs célú makrolid használat áll a hátterében. Ugyanakkor a mintavételt követő eradikációs terápiák hatékonyságának elemzése alapján a heterorezisztens fertőzések többsége sikeresen kezelhető volt clarithromycin-tartalmú terápiás protokoll alkalmazásával. A heterorezisztens fertőzések optimális kezelési stratégiájának meghatározásához azonban további prospektív klinikai vizsgálatok elvégzése is szükséges.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A *H. pylori* clarithromycin rezisztencia FISH teszt az arany standardnak tartott immunhisztokémiához hasonlóan magas szenzitivitású és specificitású a *H. pylori* baktériumok detektálásában, ezáltal alkalmas a *H. pylori* fertőzések megbízható szöveti kimutatására.
2. A *H. pylori* clarithromycin rezisztencia FISH eljárás diagnosztikus pontosságát az olyan szöveti tényezők, mint a gyulladásos aktivitás hiánya vagy a baktérium okozta nyálkahártyaléziók jelenléte csak kevéssé befolyásolják.
3. A *H. pylori* baktériumok gócos, illetve elszórt elhelyezkedése a gyomornyálkahártyán kis baktériumszám mellett még az olyan nagy érzékenységű szöveti alapú vizsgálóeljárások esetén is álnegatív eredményre vezethetnek, mint az immunhisztokémia vagy a FISH, melynek esélyét a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően történő többszörös mintavételezéssel és az egyes mintákból származó több metszet vizsgálatával lehet hatékonyan csökkenteni.
4. A *H. pylori* clarithromycin rezisztencia FISH eljárással vizsgált 305 beteg körében 73 *H. pylori* fertőzés (23,9%) bizonyult clarithromycin rezisztensnek, melyek között a homo- és heterorezisztens *H. pylori* fertőzések aránya 35:38 volt, tehát a heterorezisztencia 52% gyakorisággal fordult elő a clarithromycin rezisztens *H. pylori* fertőzések körében.
5. A 38 heterorezisztens beteg közül 18 esetben (47,4%) különbözött az antrumból és a corpusból származó biopsziás minták érzékeny/homo-/heterorezisztens beosztás szerinti rezisztenciastátusza, a leggyakoribb azonban (20 eset, 52,6%) az egyszerre mindkét régión belül heterorezisztens státuszú fertőzés (*intraniche* heterorezisztencia) jelenléte volt.
6. Az *intraniche* heterorezisztencia detektálása és az ezt lehetővé tévő FISH-módszer használatának jelentőségét mutatja, hogy az *intraniche* típus meghatározására nem alkalmas módszerek használata esetén kevesebb mint a felére csökkenne a kimutatott heterorezisztens fertőzések aránya.

7. Amennyiben csak a gyomor egyik régiójából történik biopsziás mintavétel, úgy a *H. pylori* fertőzések több mint ötödében rejtve maradhat a clarithromycin-rezisztencia diagnózisa.
8. A clarithromycin-fogékony *H. pylori* fertőzések között kiegyensúlyozott a férfi-nő arány, a homorezisztens alcsoport erős női túlsúlyt mutat, a heterorezisztens fertőzések pedig egy köztes csoportot képviselnek.
9. A clarithromycinre fogékony és heterorezisztens fertőzöttekben a gyulladás aktivitása az antrumra volt jellemző, míg ez az antrális dominancia a homorezisztens esetekben nem volt megfigyelhető.
10. Peptikus fekélyt kizárólag a clarithromycinre fogékony fertőzésekben találtunk, viszont a GERD leginkább a homorezisztens fertőzöttekre volt jellemző és prevalenciája szignifikánsan alacsonyabb volt az érzékeny fertőzésben szenvedőkben, míg a heterorezisztens csoportban köztes arányban fordult elő.
11. A betegek kórtörténetének és gyógyszerszedési anamnézisének elemzése alapján a clarithromycin homorezisztencia valószínűleg a korábbi sikertelen eradikációs kísérletek következménye, míg a heterorezisztens fertőzések a korábbi nem-eradikációs célú makrolid használattal állhatnak összefüggésben.
12. A clarithromycinre fogékony *H. pylori* fertőzésekben a clarithromycin-alapú kezeléssel sikeresen eradikált esetek aránya 90% felettinek, míg a homorezisztens csoportban nagyon alacsonynak (15%) bizonyult, viszont a heterorezisztens esetek többsége (bár az érzékeny fertőzötteknél kisebb arányban; 60%) sikeres eradikáción esett át clarithromycin-tartalmú protokoll használatával.
13. Összefoglalva elmondható, hogy a clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések klinikopatológiai, mikrobiológiai és terápiás jellemzőiket tekintve egy különálló alcsoportot képviselnek, amely számos tekintetben köztes tulajdonságokat mutat az érzékeny és homorezisztens csoportokhoz képest.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A világszinten mintegy 4,4 milliárd embert érintő *H. pylori* fertőzés kezelésének egyik alapszere a clarithromycin, azonban hatékonysága az ellene kialakuló rezisztencia gyakorisága miatt az utóbbi években nagymértékben csökkent. A rezisztens fertőzések kétfelé bonthatóak aszerint, hogy a gyomrot kolonizáló baktériumok mindegyike hordozza-e a clarithromycin-rezisztenciáért felelős pontmutációk valamelyikét (homorezisztens fertőzés), vagy érzékeny és rezisztens baktériumok is megfigyelhetőek (heterorezisztens fertőzés). Utóbbi tovább osztható az érzékeny és rezisztens baktériumok egymáshoz viszonyított helyzete alapján, ugyanis ha azok egymással keverednek, akkor *intraniche* típusú, ha pedig egymástól elkülönülve helyezkednek el, akkor az *interniche* típusú heterorezisztenciáról beszélünk. Munkánk során elsődleges célunk volt a heterorezisztens fertőzések klinikopatológiai jellemzőinek meghatározása. Vizsgálatainkhoz a *H. pylori* FISH eljárást használtuk a clarithromycin-rezisztens kórokozók detektálására, mely eljárás unikalitását az adja, hogy a baktériumok képi megjelenítésének köszönhetően alkalmas a heterorezisztens fertőzések kimutatására és annak altípusainak elkülönítésére is. Ugyan a *H. pylori* FISH-technika magas szenzitivitása ismert a rezisztencia diagnózisában, maguk a baktériumok kimutatásában mutatott diagnosztikus értékét mindeddig nem vizsgálták. Ezért a *H. pylori* FISH-t a baktérium szöveti diagnózisában ismerten legmagasabb érzékenységű eljárással, az immunhisztokémiával hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján a két módszer hasonló diagnosztikus értékkel bír a kórokozók kimutatásában, melyet nem befolyásol számottevően a mintában jelenlévő gyulladás súlyossága vagy a baktériumok alacsonyabb sűrűsége sem. Antrumból és corpusból származó biopsziás minták FISH vizsgálata alapján a rezisztens *H. pylori* fertőzések több mint fele heterorezisztens, melyek túlnyomó többsége az *intraniche* típusba sorolható. A heterorezisztencia hátterében nem korábbi clarithromycin-alapú eradikációs kísérletek, hanem egyéb makrolid-terápiák állnak, így kezelésükben felmerülhet clarithromycin alkalmazása is. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések mind klinikai, mind patológiai szempontból egy közbenső kategóriát képviselnek az érzékeny és homorezisztens infekciók között. Eredményeink iránymutatást adhatnak a heterorezisztencia etiológiájának pontosabb megértéséhez és az optimális diagnosztikai és kezelési stratégiájának kidolgozásához is.

VIII. SUMMARY

Clarithromycin is one of the essential therapeutic agents for *H. pylori* infection, which affects around 4.4 billion people worldwide, but its effectiveness has declined significantly in recent years due to the the emerging prevalence of resistance. Resistant infections can be divided into two categories, depending on whether all the bacteria colonising the stomach carry any one of the point mutations responsible for clarithromycin resistance (homo-resistant infection) or whether both susceptible and resistant bacteria are present (hetero-resistant infection). The latter can be further subdivided into other types according to the location of the susceptible and resistant bacteria relative to each other. Accordingly, if they are mixed together, the heteroresistance is of the intraniche type, and if they are spacially separated, it is referred to as interniche heteroresistance. The primary objective of our work was to determine the clinicopathological characteristics of the heteroresistant infections. For our studies, we used the *H. pylori* FISH method for the detection of clarithromycin-resistant bacteria. This method is unique in that it has the ability to visualize the bacteria, thereby to detect the heteroresistant infections and to distinguish their subtypes as well. Although the high sensitivity of *H. pylori* FISH technique is known in the diagnosis of resistance, its diagnostic value in the detection of the bacteria themselves has not been investigated yet. Therefore, we compared *H. pylori* FISH with immunohistochemistry, the most sensitive technique known in the tissue-based diagnostics of the bacterium. Our results suggest that the two methods have similar diagnostic value in detecting *H. pylori*, which is not substantially affected by the severity of inflammation present in the sample or by the low bacterial density. FISH analysis of biopsy specimens from antrum and corpus shows that more than half of the resistant *H. pylori* infections are heteroresistant, the vast majority of which are of the *intraniche* type. The heteroresistance is not due to previous clarithromycin-based eradication attempts but to other macrolide therapies, and thus the use of clarithromycin for non-eradication purposes should be considered. In conclusion, clarithromycin-heteroresistant *H. pylori* infections represent an intermediate category between susceptible and homoresistant infections, both clinically and pathologically. Our results may also help to better understand the aetiology of heteroresistance and to develop optimal diagnostic and treatment strategies.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Rappin G. Contribution a l'étude des bactéries de la bouche a l'état normal et dans la fièvre typhoide. A. Parent, Paris, 1881:68.
2. Krienitz W. (1906) Ueber das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi. Dtsch Med Wochenschr, 32(22): 872
3. Freedberg AS, Barron LE. (1940) The presence of spirochetes in human gastric mucosa. Am J Dis Dis, 7: 443-445.
4. Doenges JL. (1938) Spirochetes in Gastric Glands of Macacus rhesus and Humans without Definite History of Related Disease. Proc Soc Exp Biol Med, 38: 536–538.
5. Buckley MJ, O'Morain CA. (1998) Helicobacter biology--discovery. Br Med Bull, 54(1): 7-16.
6. Warren JR, Marshall B. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet, 1(8336): 1273-1275.
7. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. (2014) Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer Lett, 345(2): 196-202.
8. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 61. IARC, Lyon, 1994:1-241.
9. Marshall B. (2008) Helicobacter pylori--a Nobel pursuit? Can J Gastroenterol, 22(11): 895-896.
10. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. (2014) Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter, 19 Suppl 1: 1-5.
11. Crowe SE. (2019) Helicobacter pylori Infection. N Engl J Med, 380(12): 1158-1165.
12. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. (2017) Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology, 153(2): 420-429.
13. Zabala Torrres B, Lucero Y, Lagomarcino AJ, Orellana-Manzano A, George S, Torres JP, O'Ryan M. (2017) Review: Prevalence and dynamics of Helicobacter pylori infection during childhood. Helicobacter, 22(5): e12399.

14. Park JS, Jun JS, Seo JH, Youn HS, Rhee KH. (2021) Changing prevalence of Helicobacter pylori infection in children and adolescents. Clin Exp Pediatr, 64(1): 21-25.
15. Muhsen K, Lagos R, Reymann MK, Graham DY, Pasetti MF, Levine MM. (2014) Age-dependent association among Helicobacter pylori infection, serum pepsinogen levels and immune response of children to live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. PLoS One, 9(1): e83999.
16. Oleastro M, Pelerito A, Nogueira P, Benoliel J, Santos A, Cabral J, Lopes AI, Ramalho PM, Monteiro L. (2011) Prevalence and incidence of Helicobacter pylori Infection in a healthy pediatric population in the Lisbon area. Helicobacter, 16(5):363-372.
17. Tamássy K, Simon L, Francis M. (1995) Helicobacter pylori infekció magyarországi epidemiológiája (szeroepidemiológiai összehasonlító tanulmány) [Epidemiology of Helicobacter pylori infection in Hungary (comparative sero-epidemiologic study)]. Orv Hetil, 136(26): 1387-91.
18. Fürész J, Lakatos S, Németh K, Fritz P, Simon L, Kacserka K. (2004) The prevalence and incidence of Helicobacter pylori infections among young recruits during service in the Hungarian Army. Helicobacter, 9(1): 77-80.
19. Iszlai E, Kiss E, Toldy E, Agoston S, Sipos B, Vén L, Rácz F, Szerafin L. (2003) Helicobacter pylori szeroprevalencia és anti-CagA pozitivitás Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében [Seroprevalence of Helicobacter pylori infection and anti-CagA positivity in the county Szabolcs-Szatmár-Bereg]. Orv Hetil, 144(35): 1713-1718.
20. Buzás GM, Lotz G, Schneider F, Józan J. (2013) A Helicobacter pylori-fertőzés epidemiológiája Ferencvárosban. Retrospektív endoszkópos tanulmány, 1997-2012 [Changing prevalence of Helicobacter pylori infection in the 9th district of Budapest. A retrospective endoscopic study, 1997-2012]. Orv Hetil, 154(23): 900-907.
21. Bálint L, Tiszai A, Kozák G, Dóczi I, Szekeres V, Inczefi O, Ollé G, Helle K, Róka R, Rosztóczy A. (2019) Epidemiologic characteristics of Helicobacter pylori infection in southeast Hungary. World J Gastroenterol, 25(42): 6365-6372.
22. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, Bazzoli F, Gasbarrini A, Atherton J, Graham DY, Hunt R, Moayyedi P, Rokkas T,

Rugge M, Selgrad M, Suerbaum S, Sugano K, El-Omar EM; European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. (2017) Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut, 66(1): 6-30.

23. Quaglia NC, Dambrosio A. (2018) Helicobacter pylori: A foodborne pathogen? World J Gastroenterol, 24(31): 3472-3487.
24. Mladenova I, Durazzo M. (2018) Transmission of Helicobacter pylori. Minerva Gastroenterol Dietol, 64(3): 251-254.
25. Guevara B, Cogdill AG. (2020) Helicobacter pylori: A Review of Current Diagnostic and Management Strategies. Dig Dis Sci, 65(7): 1917-1931.
26. Yokota S, Konno M, Fujiwara S, Toita N, Takahashi M, Yamamoto S, Ogasawara N, Shiraishi T. (2015) Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intraspousal, Helicobacter pylori Infection in Japan Determined by Mutilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting. Helicobacter, 20(5): 334-342.
27. Kubota-Aizawa S, Matsubara Y, Kanemoto H, Mimuro H, Uchida K, Chambers J, Tsuboi M, Ohno K, Fukushima K, Kato N, Yotsuyanagi H, Tsujimoto H. (2021) Transmission of Helicobacter pylori between a human and two dogs: A case report. Helicobacter, 26(3): e12798.
28. Camilo V, Sugiyama T, Touati E. (2017) Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter, 22(Suppl. 1): e12405.
29. Hage N, Renshaw JG, Winkler GS, Gellert P, Stolnik S, Falcone FH. (2015) Improved expression and purification of the Helicobacter pylori adhesin BabA through the incorporation of a hexa-lysine tag. Protein Expr Purif, 106: 25-30.
30. Montecucco C, Rappuoli R. (2001) Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. Nat Rev Mol Cell Biol, 2(6): 457-466.
31. Roesler BM, Rabelo-Gonçalves EM, Zeitune JM. (2014) Virulence Factors of Helicobacter pylori: A Review. Clin Med Insights Gastroenterol, 7: 9-17.
32. Ansari S, Yamaoka Y. (2019) Helicobacter pylori Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. Toxins (Basel), 11(11): 677.
33. Li Q, Liu J, Gong Y, Yuan Y. (2016) Serum VacA antibody is associated with risks of peptic ulcer and gastric cancer: A meta-analysis. Microb Pathog, 99: 220-228.

34. Lekmeechai S, Su YC, Brant M, Alvarado-Kristensson M, Vallström A, Obi I, Arnqvist A, Riesbeck K. (2018) Helicobacter pylori Outer Membrane Vesicles Protect the Pathogen From Reactive Oxygen Species of the Respiratory Burst. Front Microbiol, 9: 1837.
35. Bornschein J, Kandulski A, (2010) Selgrad M, Malfertheiner P. From gastric inflammation to gastric cancer. Dig Dis, 28(4-5): 609-614.
36. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. (2002) N Engl J Med, 347(15): 1175-1186.
37. Venerito M, Malfertheiner P. (2015) Preneoplastic conditions in the stomach: always a point of no return? Dig Dis, 33(1): 5-10.
38. Lanas A, Chan FKL. (2017) Peptic ulcer disease. Lancet, 390(10094): 613-624.
39. Sipponen P, Varis K, Fräki O, Korri UM, Seppälä K, Siurala M. Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. (1990) A clinical follow-up study of 454 outpatients. Scand J Gastroenterol, 25(10): 966-973.
40. Kinoshita H, Hayakawa Y, Koike K. (2017) Metaplasia in the Stomach-Precursor of Gastric Cancer? Int J Mol Sci, 18(10): 2063.
41. Rugge M, Meggio A, Pennelli G, Piscioli F, Giacomelli L, De Pretis G, Graham DY. (2007) Gastritis staging in clinical practice: the OLGA staging system. Gut, 56(5): 631-636.
42. Jessurun J. (2021) Helicobacter pylori: an evolutionary perspective. Histopathology, 78(1): 39-47.
43. Shah SC, Gawron AJ, Mustafa RA, Piazuelo MB. (2020) Histologic Subtyping of Gastric Intestinal Metaplasia: Overview and Considerations for Clinical Practice. Gastroenterology, 158(3): 745-750.
44. Giroux V, Rustgi AK. (2017) Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. Nat Rev Cancer, 17(10): 594-604.
45. Shichijo S, Hirata Y, Sakitani K, Yamamoto S, Serizawa T, Niikura R, Watabe H, Yoshida S, Yamada A, Yamaji Y, Ushiku T, Fukayama M, Koike K. (2015) Distribution of intestinal metaplasia as a predictor of gastric cancer development. J Gastroenterol Hepatol, 30(8): 1260-1264.

46. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J, Ter Borg F, de Vries RA, Bruno MJ, van Dekken H, Meijer J, van Grieken NC, Kuipers EJ. (2010) The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. Gastrointest Endosc, 71(7): 1150-1158.
47. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 68(6): 394-424.
48. Plummer M, Franceschi S, Vignat J, Forman D, de Martel C. (2015) Global burden of gastric cancer attributable to Helicobacter pylori. Int J Cancer, 136(2): 487-490.
49. Chen HN, Wang Z, Li X, Zhou ZG. (2016) Helicobacter pylori eradication cannot reduce the risk of gastric cancer in patients with intestinal metaplasia and dysplasia: evidence from a meta-analysis. Gastric Cancer, 19(1): 166-175.
50. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P, Robotis I, Margantinis G. (2007) The long-term impact of Helicobacter pylori eradication on gastric histology: a systematic review and meta-analysis. Helicobacter, 12 Suppl 2: 32-38.
51. Wang J, Xu L, Shi R, Huang X, Li SW, Huang Z, Zhang G. (2011) Gastric atrophy and intestinal metaplasia before and after Helicobacter pylori eradication: a meta-analysis. Digestion, 83(4): 253-260.
52. Ansari S, Gantuya B, Tuan VP, Yamaoka Y. (2018) Diffuse Gastric Cancer: A Summary of Analogous Contributing Factors for Its Molecular Pathogenicity. Int J Mol Sci, 19(8): 2424.
53. Worthley DL, Phillips KD, Wayte N, Schrader KA, Healey S, Kaurah P, Shulkes A, Grimpen F, Clouston A, Moore D, Cullen D, Ormonde D, Mounkley D, Wen X, Lindor N, Carneiro F, Huntsman DG, Chenevix-Trench G, Suthers GK. (2012) Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. Gut, 61(5): 774-779.
54. Tacheci I, Repak R, Podhola M, Benesova L, Cyrany J, Bures J, Kohoutova D. (2021) Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) - A Helicobacter-opposite point. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 50-51: 101728.
55. Yamaoka Y. (2018) How to eliminate gastric cancer-related death worldwide? Nat Rev Clin Oncol, 15(7): 407-408.

56. Zucca E, Bertoni F, Stathis A, Cavalli F. (2008) Marginal zone lymphomas. Hematol Oncol Clin North Am, 22(5): 883-901.
57. Sagaert X, De Wolf-Peeters C, Noels H, Baens M. (2007) The pathogenesis of MALT lymphomas: where do we stand? Leukemia, 21(3): 389-396.
58. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. (1991) Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet, 338(8776): 1175-1176.
59. Stolte M, Eidt S. (1989) Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to Campylobacter pylori? J Clin Pathol, 42(12): 1269-1271.
60. Wyatt JI, Rathbone BJ. (1988) Immune response of the gastric mucosa to Campylobacter pylori. Scand J Gastroenterol. 23:sup142: 44-49.
61. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD. (1994) Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N Engl J Med, 330(18): 1267-1271.
62. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC. (1994) Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. Br Heart J, 71(5): 437-439.
63. Gravina AG, Zagari RM, De Musis C, Romano L, Loguercio C, Romano M. (2018) Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. World J Gastroenterol, 24(29): 3204-3221.
64. Ayada K, Yokota K, Hirai K, Fujimoto K, Kobayashi K, Ogawa H, Hatanaka K, Hirohata S, Yoshino T, Shoenfeld Y, Matsuura E, Oguma K. (2009) Regulation of cellular immunity prevents Helicobacter pylori-induced atherosclerosis. Lupus, 18(13): 1154-1168.
65. Roubaud Baudron C, Letenneur L, Langlais A, Buissonnière A, Mégraud F, Dartigues JF, Salles N; Personnes Agées QUID Study. (2013) Does Helicobacter pylori infection increase incidence of dementia? The Personnes Agées QUID Study. J Am Geriatr Soc, 61(1): 74-78.
66. Huang WS, Yang TY, Shen WC, Lin CL, Lin MC, Kao CH. (2014) Association between Helicobacter pylori infection and dementia. J Clin Neurosci, 21(8): 1355-1358.

67. Kountouras J, Boziki M, Gavalas E, Zavos C, Grigoriadis N, Deretzi G, Tzilves D, Katsinelos P, Tsolaki M, Chatzopoulos D, Venizelos I. (2009) Eradication of Helicobacter pylori may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. J Neurol, 256(5): 758-767.
68. Kountouras J, Boziki M, Gavalas E, Zavos C, Deretzi G, Chatzigeorgiou S, Katsinelos P, Grigoriadis N, Giartza-Taxidou E, Venizelos I. (2010) Five-year survival after Helicobacter pylori eradication in Alzheimer disease patients. Cogn Behav Neurol, 23(3): 199-204.
69. Kountouras J, Tsolaki F, Tsolaki M, Gavalas E, Zavos C, Polyzos SA, Boziki M, Katsinelos P, Kountouras C, Vardaka E, Tagarakis GI, Deretzi G. (2016) Helicobacter pylori-related ApoE 4 polymorphism may be associated with dysphagic symptoms in older adults. Dis Esophagus, 29(7): 842.
70. Doulberis M, Kotronis G, Gialamprinou D, Polyzos SA, Papaefthymiou A, Katsinelos P, Kountouras J. (2021) Alzheimer's disease and gastrointestinal microbiota; impact of Helicobacter pylori infection involvement. Int J Neurosci, 131(3): 289-301.
71. Blecker U, Renders F, Lanciers S, Vandenplas Y. (1991) Syncopes leading to the diagnosis of a Helicobacter pylori positive chronic active haemorrhagic gastritis. Eur J Pediatr, 150(8): 560-561.
72. Muhsen K, Cohen D. (2008) Helicobacter pylori infection and iron stores: a systematic review and meta-analysis. Helicobacter, 13(5): 323-340.
73. Hudak L, Jaraisy A, Haj S, Muhsen K. (2017) An updated systematic review and meta-analysis on the association between Helicobacter pylori infection and iron deficiency anemia. Helicobacter, 22(1): e12330.
74. Yuan W, Li Yumin, Yang Kehu, Ma Bin, Guan Quanlin, Wang D, Yang L. (2010) Iron deficiency anemia in Helicobacter pylori infection: meta-analysis of randomized controlled trials. Scand J Gastroenterol, 45(6): 665-676.
75. Qu XH, Huang XL, Xiong P, Zhu CY, Huang YL, Lu LG, Sun X, Rong L, Zhong L, Sun DY, Lin H, Cai MC, Chen ZW, Hu B, Wu LM, Jiang YB, Yan WL. (2010) Does Helicobacter pylori infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. World J Gastroenterol, 16(7): 886-896.

76. Ozkasap S, Yarali N, Isik P, Bay A, Kara A, Tunc B. (2013) The role of prohepcidin in anemia due to Helicobacter pylori infection. Pediatr Hematol Oncol, 30(5): 425-431.
77. Senkovich O, Ceaser S, McGee DJ, Testerman TL. (2010) Unique host iron utilization mechanisms of Helicobacter pylori revealed with iron-deficient chemically defined media. Infect Immun, 78(5): 1841-1849.
78. Yokota S, Toita N, Yamamoto S, Fujii N, Konno M. (2018) Positive relationship between a polymorphism in Helicobacter pylori neutrophil-activating protein a gene and iron-deficiency anemia. Helicobacter, 18(2): 112-116.
79. De Leest HT, Steen KS, Bloemena E, Lems WF, Kuipers EJ, Van de Laar MA, Bijlsma JW, Janssen M, Houben HH, Kostense PJ, Boers M, Dijkmans BA. (2009) Helicobacter pylori eradication in patients on long-term treatment with NSAIDs reduces the severity of gastritis: a randomized controlled trial. J Clin Gastroenterol, 43(2): 140-146.
80. Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB; British Society of Gastroenterology. (2011) Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. Gut, 60(10): 1309-1316.
81. Borkent MV, Beker JA. (1988) Treatment of ulcerative reflux oesophagitis with colloidal bismuth subcitrate in combination with cimetidine. Gut, 29(3): 385-389.
82. Schütze K, Hentschel E, Dragosics B, Hirschl AM. (1995) Helicobacter pylori reinfection with identical organisms: transmission by the patients' spouses. Gut, 36(6): 831-833.
83. Labenz J, Blum AL, Bayerdörffer E, Meining A, Stolte M, Börsch G. (1997) Curing Helicobacter pylori infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. Gastroenterology, 112(5): 1442-1447.
84. Xie T, Cui X, Zheng H, Chen D, He L, Jiang B. (2013) Meta-analysis: eradication of Helicobacter pylori infection is associated with the development of endoscopic gastroesophageal reflux disease. Eur J Gastroenterol Hepatol, 25(10): 1195-1205.
85. Yaghoobi M, Farrokhyar F, Yuan Y, Hunt RH. (2010) Is there an increased risk of GERD after Helicobacter pylori eradication?: a meta-analysis. Am J Gastroenterol, 105(5): 1007-1013.

86. Fukuchi T, Ashida K, Yamashita H, Kiyota N, Tsukamoto R, Takahashi H, Ito D, Nagamatsu R. (2005) Influence of cure of Helicobacter pylori infection on gastric acidity and gastroesophageal reflux: study by 24-h pH monitoring in patients with gastric or duodenal ulcer. J Gastroenterol, 40(4): 350-360.
87. Rubenstein JH, Inadomi JM, Scheiman J, Schoenfeld P, Appelman H, Zhang M, Metko V, Kao JY. (2014) Association between Helicobacter pylori and Barrett's esophagus, erosive esophagitis, and gastroesophageal reflux symptoms. Clin Gastroenterol Hepatol, 12(2): 239-245.
88. Yucel O. (2019) Interactions between Helicobacter pylori and gastroesophageal reflux disease. Esophagus, 16(1): 52-62.
89. Solnick JV, Vandamme P. Taxonomy of the Helicobacter Genus. (Chapter 5) In: Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL (szerk.), Helicobacter pylori: Physiology and Genetics. ASM Press, Washington DC, 2001: 39-51.
90. Parte AC. (2014) LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Nucleic Acids Res, 42(Database issue): D613-D616.
91. Dent JC, McNulty CA, Uff JC, Wilkinson SP, Gear MW. (1987) Spiral organisms in the gastric antrum. Lancet, 2(8550): 96.
92. Heilmann KL, Borchard F. (1991) Gastritis due to spiral shaped bacteria other than Helicobacter pylori: clinical, histological, and ultrastructural findings. Gut, 32(2): 137-140.
93. Bento-Miranda M, Figueiredo C. (2014) Helicobacter heilmannii sensu lato: an overview of the infection in humans. World J Gastroenterol, 20(47): 17779-17787.
94. Debongnie JC, Donnay M, Mairesse J. (1995) Gastrospirillum hominis ("Helicobacter heilmanii"): a cause of gastritis, sometimes transient, better diagnosed by touch cytology? Am J Gastroenterol, 90(3): 411-416.
95. Debongnie JC, Donnay M, Mairesse J, Lamy V, Dekoninck X, Ramdani B. (1998) Gastric ulcers and Helicobacter heilmannii. Eur J Gastroenterol Hepatol, 10(3): 251-254.
96. Takigawa H, Yuge R, Masaki S, Otani R, Kadota H, Naito T, Hayashi R, Urabe Y, Oka S, Tanaka S, Chayama K, Kitadai Y. (2021) Involvement of non-Helicobacter pylori helicobacter infections in Helicobacter pylori-negative gastric MALT

lymphoma pathogenesis and efficacy of eradication therapy. Gastric Cancer, 24(4): 937-945.

97. Nakamura M, Øverby A, Michimae H, Matsui H, Takahashi S, Mabe K, Shimoyama T, Sasaki M, Terao S, Kamada T, Yanaka A, Iwamoto J, Tanabe S, Tari A, Nasu S, Suzuki H, Yamagata Murayama S. (2020) PCR analysis and specific immunohistochemistry revealing a high prevalence of non-Helicobacter pylori Helicobacters in Helicobacter pylori-negative gastric disease patients in Japan: High susceptibility to an Hp eradication regimen. Helicobacter, 25(5): e12700.
98. Morgner A, Bayerdörffer E, Neubauer A, Stolte M. Malignant tumors of the stomach. (2000) Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and Helicobacter pylori. Gastroenterol Clin North Am, 29(3): 593-607.
99. Stolte M, Bayerdörffer E, Morgner A, Alpen B, Wündisch T, Thiede C, Neubauer A. (2002) Helicobacter and gastric MALT lymphoma. Gut, 50 Suppl 3: III19-III24.
100. Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Baele M, Meyns T, Decostere A, Ducatelle R. (2009) Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. Clin Microbiol Rev, 22(2): 202-223.
101. De Groote D, van Doorn LJ, Ducatelle R, Verschuuren A, Haesebrouck F, Quint WG, Jalava K, Vandamme P. (1999) 'Candidatus Helicobacter suis', a gastric helicobacter from pigs, and its phylogenetic relatedness to other gastrospirilla. Int J Syst Bacteriol, 49: 1769-1777.
102. Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, Smet A, Vandamme P, Ducatelle R. (2011) Non-Helicobacter pylori Helicobacter species in the human gastric mucosa: a proposal to introduce the terms H. heilmannii sensu lato and sensu stricto. Helicobacter, 16(4): 339-340.
103. Potters HV, Loffeld RJ, Stobberingh E, van Spreeuwel JP, Arends JW. (1987) Rapid staining of Campylobacter pyloridis. Histopathology, 11(11): 1223.
104. Selgrad M, Kandulski A, Malfertheiner P. (2009) Helicobacter pylori: diagnosis and treatment. Curr Opin Gastroenterol, 25(6): 549-556.
105. Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. (2001) Can J Gastroenterol, 15(9): 591-598.

106. Sipponen P, Price AB. (2011) The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. J Gastroenterol Hepatol, 26 Suppl 1: 31-34.
107. Tytgat GN. (1991) The Sydney System: endoscopic division. Endoscopic appearances in gastritis/duodenitis. J Gastroenterol Hepatol, 6(3): 223-234.
108. Misiewicz JJ. (1991) The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. J Gastroenterol Hepatol, 6(3): 207-208.
109. Price AB. (1991) The Sydney System: histological division. J Gastroenterol Hepatol, 6(3): 209-222.
110. Goodwin CS. (1991) The Sydney System: microbial gastritis. J Gastroenterol Hepatol, 6(3): 235-237.
111. Strickland RG. (1991) The Sydney System: auto-immune gastritis. J Gastroenterol Hepatol, 6(3): 238-243.
112. Sipponen P, Kekki M, Siurala M. (1991) The Sydney System: epidemiology and natural history of chronic gastritis. J Gastroenterol Hepatol, 6(3): 244-251.
113. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. (1996) Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol, 20(10): 1161-1181.
114. Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, Areia M, Leja M, Esposito G, Garrido M, Kikuste I, Megraud F, Matysiak-Budnik T, Annibale B, Dumonceau JM, Barros R, Fléjou JF, Carneiro F, van Hooft JE, Kuipers EJ, Dinis-Ribeiro M. (2019) Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019. Endoscopy, 51(4): 365-388.
115. Palmer ED. (1954) Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. Gastroenterology, 27(2): 218-220.
116. Graham DY, Klein PD, Evans DJ Jr, Evans DG, Alpert LC, Opekun AR, Boutton TW. (1987) Campylobacter pylori detected noninvasively by the 13C-urea breath test. Lancet, 1(8543): 1174-1177.
117. O'Connor HJ, Wyatt JI, Dixon MF, Axon AT. (1986) Campylobacter like organisms and reflux gastritis. J Clin Pathol, 39(5): 531-534.

118. Rollason TP, Stone J, Rhodes JM. (1984) Spiral organisms in endoscopic biopsies of the human stomach. J Clin Pathol, 37(1): 23-26.
119. Madan E, Kemp J, Westblom TU, Subik M, Sexton S, Cook J. (1988) Evaluation of staining methods for identifying Campylobacter pylori. Am J Clin Pathol, 90(4): 450-453.
120. McNulty CA, Watson DM. (1984) Spiral bacteria of the gastric antrum. Lancet, 1(8385): 1068-1069.
121. Haqqani MT, Langdale-Brown B. (1988) Campylobacter pylori--acridine orange stain and ultraviolet fluorescence. Histopathology, 12(4): 456-457.
122. Musumeci, G. (2014) Past, present and future: overview on histology and histopathology. J Histol Histopathol 1(1): 5.
123. Gray SF, Wyatt JI, Rathbone BJ. (1986) Simplified techniques for identifying Campylobacter pyloridis. J Clin Pathol, 39(11): 1279.
124. Rathbone BJ, Wyatt JI, Heatley RV. (1986) Campylobacter pyloridis--a new factor in peptic ulcer disease? Gut, 27(6): 635-641.
125. Loffeld RJ, Stobbering E, Flendrig JA, Arends JW. (1990) Presence of Helicobacter pylori in patients with non-ulcer dyspepsia revealing normal antral histological characteristics. Digestion**,** 47: 29-34.
126. Rotimi O, Cairns A, Gray S, Moayyedi P, Dixon MF. (2000) Histological identification of Helicobacter pylori: comparison of staining methods. J Clin Pathol, 53(10): 756-759.
127. Montgomery EA, Martin DF, Peura DA. (1988) Rapid diagnosis of Campylobacter pylori by Gram's stain. Am J Clin Pathol, 90(5): 606-609.
128. Ramírez-Ramos A, León-Barúa R, Gilman R, Spira W, Recavarren S, Watanabe J, Stephensen C, Cok J, Quevedo N, Rodríguez Ulloa C, Barredo C, Gómez H. (1986) Detección del Campylobacter pilórico en pacientes con enfermedades gastroduodenales [Detection of pyloric Campylobacter in patients with gastroduodenal diseases]. Acta Gastroenterol Latinoam, 16(1): 9-22.
129. von Wulffen H, Heesemann J, Bützow GH, Löning T, Laufs R. (1986) Detection of Campylobacter pyloridis in patients with antrum gastritis and peptic ulcers by culture, complement fixation test, and immunoblot. J Clin Microbiol, 24(5): 716-720.

130. Van Horn KG, Dworkin BM. (1990) Direct gram stain and urease test to detect Helicobacter pylori. Diagn Microbiol Infect Dis, 13(6): 449-452.
131. Faoagali JL, Troughton D, Aitken J, Gwynne JF. (1986) Campylobacter-like organisms in gastric biopsies: a Christchurch study. N Z Med J, 99(795): 50-52.
132. Guglielmetti P, Quaranta S, Figura N, Fanteria E, Rossolini A, Camarri E. (1987) Confronto di metodiche per l'identificazione di "Campylobacter pylori" in biopsie gastriche di pazienti con dispepsia [Comparison of methods for the identification of Campylobacter pylori in gastric biopsies of patients with dyspepsia]. Quad Sclavo Diagn, 23(3): 251-256.
133. Walters LL, Budin RE, Paull G. (1986) Acridine-orange to identify Campylobacter pyloridis in formalin fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. Lancet, 1(8471): 42.
134. Pinkard KJ, Harrison B, Capstick JA, Medley G, Lambert JR. (1986) Detection of Campylobacter pyloridis in gastric mucosa by phase contrast microscopy. J Clin Pathol, 39(1): 112-113.
135. Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Gupta SC. (1994) The Loeffler's methylene blue stain: an inexpensive and rapid method for detection of Helicobacter pylori. J Gastroenterol Hepatol, 9(5): 512-513.
136. Fennerty MB, Sampliner RE, McGee DL, Hixson LJ, Garewal HS. (1992) Intestinal metaplasia of the stomach: identification by a selective mucosal staining technique. Gastrointest Endosc, 38(6): 696-698.
137. Ogasawara K, Nakajima S, Sato H, Sasaki T. (2020) Helicobacter pylori Eradication Using Laser Endoscope and Methylene Blue. Laser Ther, 29(1): 19-27.
138. Genta RM, Robason GO, Graham DY. (1994) Simultaneous visualization of Helicobacter pylori and gastric morphology: a new stain. Hum Pathol, 25(3): 221-226.
139. Alkhamiss AS. (2020) Evaluation of Better Staining Method among Hematoxylin and Eosin, Giemsa and Periodic Acid Schiff-Alcian Blue for the Detection of Helicobacter pylori in Gastric Biopsies. Malays J Med Sci, 27(5): 53-61.
140. Richardson, R. (2006) Interview: Chance favours the prepared mind. The Lancet 368: S46-S47.
141. Yantiss RK, Lamps LW. (2012) To stain or not to stain...That remains the question. Am J Clin Pathol, 137(3): 343-345.

142. Lash RH, Genta RM. (2016) Routine Anti-Helicobacter Immunohistochemical Staining is Significantly Superior to Reflex Staining Protocols for the Detection of Helicobacter in Gastric Biopsy Specimens. Helicobacter, 21(6): 581-585.
143. Jonkers D, Stobberingh E, de Bruine A, Arends JW, Stockbrügger R. (1997) Evaluation of immunohistochemistry for the detection of Helicobacter pylori in gastric mucosal biopsies. J Infect, 35(2): 149-154.
144. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS. (1994) Coccoid forms of Helicobacter pylori in the human stomach. Am J Clin Pathol, 102(4): 503-507.
145. Akashi T, Isomoto H, Matsushima K, Kamiya M, Kanda T, Nakano M, Onoyama T, Fujii M, Akada J, Akazawa Y, Ohnita K, Takeshima F, Nakao K, Urano Y. (2019) A novel method for rapid detection of a Helicobacter pylori infection using a γ-glutamyltranspeptidase-activatable fluorescent probe. Sci Rep, 9(1): 9467.
146. Bah A, Saraga E, Armstrong D, Vouillamoz D, Dorta G, Duroux P, Weber B, Froehlich F, Blum AL, Schnegg JF. (1995) Endoscopic features of Helicobacter pylori-related gastritis. Endoscopy, 27(8): 593-596.
147. Cho JH, Chang YW, Jang JY, Shim JJ, Lee CK, Dong SH, Kim HJ, Kim BH, Lee TH, Cho JY. (2013) Close observation of gastric mucosal pattern by standard endoscopy can predict Helicobacter pylori infection status. J Gastroenterol Hepatol, 28(2): 279-284.
148. Dore MP, Pes GM. (2021) What Is New in Helicobacter pylori Diagnosis. An Overview. J Clin Med, 10(10): 2091.
149. Mohan BP, Khan SR, Kassab LL, Ponnada S, Mohy-Ud-Din N, Chandan S, Dulai PS, Kochhar GS. (2021) Convolutional neural networks in the computer-aided diagnosis of Helicobacter pylori infection and non-causal comparison to physician endoscopists: a systematic review with meta-analysis. Ann Gastroenterol, 34(1): 20-25.
150. Nakashima H, Kawahira H, Kawachi H, Sakaki N. (2018) Artificial intelligence diagnosis of Helicobacter pylori infection using blue laser imaging-bright and linked color imaging: a single-center prospective study. Ann Gastroenterol, 31(4): 462-468.

151. Bang CS, Lee JJ, Baik GH. (2020) Artificial Intelligence for the Prediction of Helicobacter Pylori Infection in Endoscopic Images: Systematic Review and Meta-Analysis Of Diagnostic Test Accuracy. J Med Internet Res, 22(9): e21983.
152. Redéen S, Petersson F, Jönsson KA, Borch K. (2003) Relationship of gastroscopic features to histological findings in gastritis and Helicobacter pylori infection in a general population sample. Endoscopy, 35(11): 946-950.
153. Cho JH, Jeon SR, Jin SY. (2020) Clinical applicability of gastroscopy with narrow-band imaging for the diagnosis of Helicobacter pylori gastritis, precancerous gastric lesion, and neoplasia. World J Clin Cases, 8(14): 2902-2916.
154. Ierardi E, Losurdo G, Mileti A, Paolillo R, Giorgio F, Principi M, Di Leo A. (2020) The Puzzle of Coccoid Forms of Helicobacter pylori: Beyond Basic Science. Antibiotics (Basel), 9(6): 293.
155. Seo JH, Park JS, Rhee KH, Youn HS. (2015) Limitations of urease test in diagnosis of pediatric Helicobacter pylori infection. World J Clin Pediatr, 4(4): 143-147.
156. Marshall BJ, Warren JR, Francis GJ, Langton SR, Goodwin CS, Blincow ED. (1987) Rapid urease test in the management of Campylobacter pyloridis-associated gastritis. Am J Gastroenterol, 82(3): 200-210.
157. Uotani T, Graham DY. (2015) Diagnosis of Helicobacter pylori using the rapid urease test. Ann Transl Med, 3(1): 9.
158. O'Connor A. (2021) The Urea Breath Test for the Noninvasive Detection of Helicobacter pylori. Methods Mol Biol, 2283: 15-20.
159. Syrjänen K, Eskelinen M, Peetsalu A, Sillakivi T, Sipponen P, Härkönen M, Paloheimo L, Mäki M, Tiusanen T, Suovaniemi O, DiMARIO F, Fan ZP. (2019) GastroPanel® Biomarker Assay: The Most Comprehensive Test for Helicobacter pylori Infection and Its Clinical Sequelae. A Critical Review. Anticancer Res, 39(3): 1091-1104.
160. Atherton JC, Spiller RC. (1994) The urea breath test for Helicobacter pylori. Gut, 35(6): 723-725.
161. Sánchez-Delgado J, Gené E, Suárez D, García-Iglesias P, Brullet E, Gallach M, Feu F, Gisbert JP, Calvet X. (2011) Has H. pylori prevalence in bleeding peptic ulcer been underestimated? A meta-regression. Am J Gastroenterol, 106(3): 398-405.

162. Mégraud F, Lehours P. (2007) Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev, 20(2): 280-322.
163. Kalali B, Formichella L, Gerhard M. (2015) Diagnosis of Helicobacter pylori: Changes towards the Future. Diseases, 3(3): 122-135.
164. Agréus L, Kuipers EJ, Kupcinskas L, Malfertheiner P, Di Mario F, Leja M, Mahachai V, Yaron N, van Oijen M, Perez Perez G, Rugge M, Ronkainen J, Salaspuro M, Sipponen P, Sugano K, Sung J. (2012) Rationale in diagnosis and screening of atrophic gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. Scand J Gastroenterol, 47(2): 136-147.
165. Godbole G, Mégraud F, Bessède E. (2020) Review: Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter, 25 Suppl 1: e12735.
166. Szymczak A, Ferenc S, Majewska J, Miernikiewicz P, Gnus J, Witkiewicz W, Dąbrowska K. (2020) Application of 16S rRNA gene sequencing in Helicobacter pylori detection. PeerJ, 8: e9099.
167. Qiu E, Jin S, Xiao Z, Chen Q, Wang Q, Liu H, Xie C, Chen C, Li Z, Han S. (2021) CRISPR-based detection of Helicobacter pylori in stool samples. Helicobacter, 26(4): e12828.
168. Zullo A, Germanà B, Galliani E, Iori A, De Pretis G, Manfredi G, Buscarini E, Guarnieri G, Cannizzaro R, Buonocore MR, Monica F. (2021) Real-time EndoFaster improves Helicobacter pylori detection in chronic active gastritis. J Clin Pathol. 0: 1-3.
169. Cazzato M, Esposito G, Galli G, Pilozzi E, Lahner E, Corleto VD, Zullo A, Di Giulio E, Annibale B. (2021) Diagnostic Accuracy of EndoFaster® and Narrow-Band Imaging Endoscopy in Patients with Impaired Gastric Acid Secretion: A Real-Time Prospective Study. Gastroenterol Res Pract, 2021: 6616334.
170. George LL, Borody TJ, Andrews P, Devine M, Moore-Jones D, Walton M, Brandl S. (1990) Cure of duodenal ulcer after eradication of Helicobacter pylori. Med J Aust, 153(3): 145-149.
171. Bazzoli F, Pozzato P. (1997) Therapy of H. pylori infection. J Physiol Pharmacol, 48 Suppl 4: 39-46.

172. Papastergiou V, Georgopoulos SD, Karatapanis S. (2014) Treatment of Helicobacter pylori infection: Past, present and future. World J Gastrointest Pathophysiol, 5(4): 392-399.
173. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. (2017) ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection. Am J Gastroenterol, 112(2): 212-239.
174. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, Jones NL, Render C, Leontiadis GI, Moayyedi P, Marshall JK. (2016) The Toronto Consensus for the Treatment of Helicobacter pylori Infection in Adults. Gastroenterology, 151(1): 51-69.
175. Leung WK, Graham DY. (2000) Clarithromycin for Helicobacter pylori infection. Expert Opin Pharmacother, 1(3): 507-514.
176. Alba C, Blanco A, Alarcón T. (2017) Antibiotic resistance in Helicobacter pylori. Curr Opin Infect Dis, 30(5): 489-497.
177. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. (2016) Helicobacter pylori and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. Helicobacter, 21(5): 349-363.
178. Arslan N, Yılmaz Ö, Demiray-Gürbüz E. (2017) Importance of antimicrobial susceptibility testing for the management of eradication in Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol, 23(16): 2854-2869.
179. Peterson WL, Graham DY, Marshall B, Blaser MJ, Genta RM, Klein PD, Stratton CW, Drnec J, Prokocimer P, Siepman N. (1993) Clarithromycin as monotherapy for eradication of Helicobacter pylori: a randomized, double-blind trial. Am J Gastroenterol, 88(11): 1860-1864.
180. Graham DY. (1995) Clarithromycin for treatment of Helicobacter pylori infections. Eur J Gastroenterol Hepatol, 7 Suppl 1: S55-58.
181. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bell D, Bianchi Porro G, Deltenre M, Forman D, Gasbarrini G, Jaup B, Misiewicz JJ, Pajares J, Quina M, Rauws E. (1998) Current European concepts in the management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht Consensus Report. The European Helicobacter Pylori Study Group (EHPSG). Eur J Gastroenterol Hepatol, 9(1): 1-2.
182. Hunt R, Thomson AB. Canadian Helicobacter pylori consensus conference. Canadian Association of Gastroenterology. (1998) Can J Gastroenterol, 12(1): 31-41.

183. Xingyu Yao, Shiyu Xiao, Liya Zhou. (2021) Integrative proteomic and metabolomic analyses reveal the mechanism by which bismuth enables Helicobacter pylori eradication. Helicobacter, 26(6):e12846.
184. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. (2018) Prevalence of Antibiotic Resistance in Helicobacter pylori: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. Gastroenterology, 155(5): 1372-1382.e17.
185. Francesco VD, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. (2011) Mechanisms of Helicobacter pylori antibiotic resistance: An updated appraisal. World J Gastrointest Pathophysiol, 2(3): 35-41.
186. Hu Y, Zhang M, Lu B, Dai J. (2016) Helicobacter pylori and Antibiotic Resistance, A Continuing and Intractable Problem. Helicobacter, 21(5) :349-363.
187. Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Muraoka H, Saito Y, Matsuzaki J, Hibi T. (2010) Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. J Gastroenterol Hepatol, 25 Suppl 1: S75-79.
188. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y; Study Group participants. (2013) Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut, 62(1): 34-42.
189. Israel DA, Lou AS, Blaser MJ. (2000) Characteristics of Helicobacter pylori natural transformation. FEMS Microbiol Lett, 186(2): 275-280.
190. Nishizawa T, Suzuki H. (2014) Mechanisms of Helicobacter pylori antibiotic resistance and molecular testing. Front Mol Biosci, 1:19.
191. Fernandez-Gonzalez E, Backert S. (2014) DNA transfer in the gastric pathogen Helicobacter pylori. J Gastroenterol, 49(4): 594-604.
192. El-Halfawy OM, Valvano MA. (2015) Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. Clin Microbiol Rev, 28(1): 191-207.
193. Matteo MJ, Granados G, Olmos M, Wonaga A, Catalano M. (2008) Helicobacter pylori amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates. J Antimicrob Chemother, 61(3): 474-477.

194. Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. (2021) Helicobacter pylori infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 18(9): 613-629.
195. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. (2019) Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. Nat Rev Microbiol, 17(8): 479-496.
196. Farzi N, Behzad C, Hasani Z, Alebouyeh M, Zojaji H, Zali MR. (2019) Characterization of clarithromycin heteroresistance among Helicobacter pylori strains isolated from the antrum and corpus of the stomach. Folia Microbiol (Praha), 64(2): 143-151.
197. Ben Mansour K, Fendri C, Battikh H, Garnier M, Zribi M, Jlizi A, Burucoa C. (2016) Multiple and mixed Helicobacter pylori infections: Comparison of two epidemiological situations in Tunisia and France. Infect Genet Evol, 37: 43-48.
198. Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. (2003) Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant Helicobacter pylori isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. Helicobacter, 8(3): 202-206.
199. Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Tytgat GN, van der Ende A, Dankert J. (1996) Heterogeneity in susceptibility to metronidazole among Helicobacter pylori isolates from patients with gastritis or peptic ulcer disease. J Clin Microbiol, 34(9): 2158-2162.
200. Mégraud F, Bénéjat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. (2015) Molecular Approaches to Identify Helicobacter pylori Antimicrobial Resistance. Gastroenterol Clin North Am, 44(3): 577-596.
201. Smith SM, O'Morain C, McNamara D. (2014) Antimicrobial susceptibility testing for Helicobacter pylori in times of increasing antibiotic resistance. World J Gastroenterol, 20(29): 9912-9921.
202. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. http://www.eucast.org.
203. Miendje Deyi VY, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Lepage P, Reynders M. (2011) Practical use of GenoType® HelicoDR, a molecular test for Helicobacter pylori detection and susceptibility testing. Diagn Microbiol Infect Dis, 70(4): 557-560.

204. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M, Heesemann J, Haas R. (2000) Rapid and specific detection of Helicobacter pylori macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. Gut, 46(5): 608-614.
205. Jüttner S, Vieth M, Miehlke S, Schneider-Brachert W, Kirsch C, Pfeuffer T, Lehn N, Stolte M. (2004) Reliable detection of macrolide-resistant Helicobacter pylori via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue. Mod Pathol, 17(6): 684-689.
206. Rüssmann H, Adler K, Haas R, Gebert B, Koletzko S, Heesemann J. (2001) Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured Helicobacter pylori by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol, 39(11): 4142-4144.
207. Demiray-Gürbüz E, Yılmaz Ö, Olivares AZ, Gönen C, Sarıoğlu S, Soytürk M, Tümer S, Altungöz O, Şimşek İ, Perez Perez GI. (2016) Rapid identification of Helicobacter pylori and assessment of clarithromycin susceptibility from clinical specimens using FISH. J Pathol Clin Res, 3(1): 29-37.
208. Yilmaz O, Demiray E, Tümer S, Altungöz O, Yörükoğlu K, Soytürk M, Simşek I. (2007) Detection of Helicobacter pylori and determination of clarithromycin susceptibility using formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens by fluorescence in situ hybridization. Helicobacter, 12(2): 136-141.
209. Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Figueiredo C, Keevil CW, Azevedo NF, Vieira MJ. (2011) PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of Helicobacter pylori. BMC Microbiol, 11: 101.
210. Bilgilier C, Stadlmann A, Makristathis A, Thannesberger J, Kastner MT, Knoflach P, Steiner P, Schöniger-Hekele M, Högenauer C, Blesl A, Datz C, Huber-Schönauer U, Schöfl R, Wewalka F, Püspök A, Mitrovits N, Leiner J, Tilg H, Effenberger M, Moser M, Siebert F, Hinterberger I, Wurzer H, Stupnicki T, Watzinger N, Gombotz G, Hubmann R, Klimpel S, Biowski-Frotz S, Schrutka-Kölbl C, Graziadei I, Ludwiczek O, Kundi M, Hirschl AM, Steininger C; Austrian Helicobacter Study Group of the Austrian Society of Gastroenterology and Hepatology. (2018) Prospective multicentre clinical study on inter- and intrapatient genetic variability

for antimicrobial resistance of Helicobacter pylori. Clin Microbiol Infect, 24(3): 267-272.

211. Selgrad M, Tammer I, Langner C, Bornschein J, Meißle J, Kandulski A, Varbanova M, Wex T, Schlüter D, Malfertheiner P. (2014) Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of Helicobacter pylori infection. World J Gastroenterol, 20(43): 16245-16251.
212. Marzio L, Cellini L, Amitrano M, Grande R, Serio M, Cappello G, Grossi L. (2011) Helicobacter pylori isolates from proximal and distal stomach of patients never treated and already treated show genetic variability and discordant antibiotic resistance. Eur J Gastroenterol Hepatol, 23(6): 467-472.
213. Rimbara E, Noguchi N, Tanabe M, Kawai T, Matsumoto Y, Sasatsu M. (2005) Susceptibilities to clarithromycin, amoxycillin and metronidazole of Helicobacter pylori isolates from the antrum and corpus in Tokyo, Japan, 1995-2001. Clin Microbiol Infect, 11(4): 307-311.
214. Mégraud F. (1998) Epidemiology and mechanism of antibiotic resistance in Helicobacter pylori. Gastroenterology, 115(5): 1278-1282.
215. Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, Bernhöft S, Hale J, Suerbaum S, Mugisha L, van der Merwe SW, Achtman M. (2012) Age of the association between Helicobacter pylori and man. PLoS Pathog, 8(5): e1002693.
216. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N; WHO Pathogens Priority List Working Group. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis, 18(3): 318-327.
217. Smith SB, Snow AN, Perry RL, Qasem SA. (2012) Helicobacter pylori: to stain or not to stain? Am J Clin Pathol, 137(5): 733-738.
218. Hartman DJ, Owens SR. (2012) Are routine ancillary stains required to diagnose Helicobacter infection in gastric biopsy specimens? An institutional quality assurance review. Am J Clin Pathol, 137(2): 255-260.

219. Panarelli NC, Ross DS, Bernheim OE, Landzberg ZB, Schuetz AN, Jenkins SG, Landzberg BR, Jessurun J, Yantiss RK. (2015) Utility of ancillary stains for Helicobacter pylori in near-normal gastric biopsies. Hum Pathol, 46(3): 397-403.
220. Glickman JN, Noffsinger A, Nevin DT, Ray M, Lash RH, Genta RM. (2015) Helicobacter infections with rare bacteria or minimal gastritis: Expecting the unexpected. Dig Liver Dis, 47(7): 549-555.
221. Engstrand L, Rosberg K, Hübinette R, Berglindh T, Rolfsen W, Gustavsson S. (1992) Topographic mapping of Helicobacter pylori colonization in long-term-infected pigs. Infect Immun, 60(2): 653-656.
222. Misra V, Misra S, Dwivedi M, Singh UP, Bhargava V, Gupta SC. (2000) A topographic study of Helicobacter pylori density, distribution and associated gastritis. J Gastroenterol Hepatol, 15(7): 737-743.
223. Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ, Bosques-Padilla FJ. (2014) A review of Helicobacter pylori diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. World J Gastroenterol, 20(6): 1438-1449.
224. Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. (2014) Helicobacter pylori infection - recent developments in diagnosis. World J Gastroenterol, 20(28): 9299-9313.
225. Caristo E, Parola A, Rapa A, Vivenza D, Raselli B, Dondi E, Boldorini R, Oderda G. (2018) Clarithromycin resistance of Helicobacter pylori strains isolated from children' gastric antrum and fundus as assessed by fluorescent in-situ hybridization and culture on four-sector agar plates. Helicobacter, 13(6): 557-563.
226. Kao CY, Lee AY, Huang AH, Song PY, Yang YJ, Sheu SM, Chang WL, Sheu BS, Wu JJ. (2014) Heteroresistance of Helicobacter pylori from the same patient prior to antibiotic treatment. Infect Genet Evol, 23: 196-202.
227. Maeda S, Yoshida H, Matsunaga H, Ogura K, Kawamata O, Shiratori Y, Omata M. (2000) Detection of clarithromycin-resistant helicobacter pylori strains by a preferential homoduplex formation assay. J Clin Microbiol, 38(1): 210-214.
228. van der Ende A, van Doorn LJ, Rooijakkers S, Feller M, Tytgat GN, Dankert J. (2001) Clarithromycin-susceptible and -resistant Helicobacter pylori isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. J Clin Microbiol, 39(7): 2648-2651.

229. Burucoa C, Garnier M, Silvain C, Fauchère JL. (2008) Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to Helicobacter pylori. J Clin Microbiol, 46(7): 2320-2326.
230. Sun L, Talarico S, Yao L, He L, Self S, You Y, Zhang H, Zhang Y, Guo Y, Liu G, Salama NR, Zhang J. (2018) Droplet Digital PCR-Based Detection of Clarithromycin Resistance in Helicobacter pylori Isolates Reveals Frequent Heteroresistance. J Clin Microbiol, 56(9): e00019-18.
231. De Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, Morini S, Panella C, Vaira D. (2010) Phenotypic and genotypic Helicobacter pylori clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. J Antimicrob Chemother, 65(2): 327-332.
232. Ayala G, Galván-Portillo M, Chihu L, Fierros G, Sánchez A, Carrillo B, Román A, López-Carrillo L, Silva-Sánchez J; Study Group. (2011) Resistance to antibiotics and characterization of Helicobacter pylori strains isolated from antrum and body from adults in Mexico. Microb Drug Resist, 17(2): 149-155.
233. Yousfi MM, Reddy R, Osato MS, Graham DY. (1996) Is antrum or corpus the best site for culture of Helicobacter pylori? Helicobacter, 1(2): 88-91.
234. Bayerdörffer E, Lehn N, Hatz R, Mannes GA, Oertel H, Sauerbruch T, Stolte M. (1992) Difference in expression of Helicobacter pylori gastritis in antrum and body. Gastroenterology, 102(5): 1575-1582.
235. Moayyedi P, Wason C, Peacock R, Walan A, Bardhan K, Axon AT, Dixon MF. (2000) Changing patterns of Helicobacter pylori gastritis in long-standing acid suppression. Helicobacter, 5(4): 206-214.
236. Duck WM, Sobel J, Pruckler JM, Song Q, Swerdlow D, Friedman C, Sulka A, Swaminathan B, Taylor T, Hoekstra M, Griffin P, Smoot D, Peek R, Metz DC, Bloom PB, Goldschmidt S, Parsonnet J, Triadafilopoulos G, Perez-Perez GI, Vakil N, Ernst P, Czinn S, Dunne D, Gold BD. (2004) Antimicrobial resistance incidence and risk factors among Helicobacter pylori-infected persons, United States. Emerg Infect Dis, 10(6): 1088-1094.
237. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, Stoppino G, Cea U, Pace A, Zotti M, Morini S, Panella C, Ierardi E. (2007) Prevalence of

primary clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains over a 15 year period in Italy. J Antimicrob Chemother, 59(4): 783-785.

238. Xia HX, Buckley M, Keane CT, O'Morain CA. (1996) Clarithromycin resistance in Helicobacter pylori: prevalence in untreated dyspeptic patients and stability in vitro. J Antimicrob Chemother, 37(3): 473-481.
239. De Francesco V, Giorgio F, Ierardi E, Zotti M, Neri M, Milano A, Varasano V, Luzza F, Suraci E, Marmo R, Marone A, Manta R, Mirante VG, de Matthaeis M, Pedroni A, Manes G, Pallotta S, Usai P, Liggi M, Gatto G, Peri V, Sacco R, Bresci G, Monica F, Hassan C, Zullo A. (2011) Primary clarithromycin resistance in Helicobacter pylori: the Multicentric Italian Clarithromycin Resistance Observational (MICRO) study. J Gastrointestin Liver Dis, 20(3): 235-239.
240. Fasciana T, Calà C, Bonura C, Di Carlo E, Matranga D, Scarpulla G, Manganaro M, Camilleri S, Giammanco A. (2015) Resistance to clarithromycin and genotypes in Helicobacter pylori strains isolated in Sicily. J Med Microbiol, 64(11): 1408-1414.
241. Schröder W, Sommer H, Gladstone BP, Foschi F, Hellman J, Evengard B, Tacconelli E. (2016) Gender differences in antibiotic prescribing in the community: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother, 71(7): 1800-1806.
242. Liu M, Douthwaite S. (2002) Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA. Antimicrob Agents Chemother, 46(6): 1629-1633.
243. Webber MA, Piddock LJ. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother, 51(1): 9-11.
244. Mamelli L, Amoros JP, Pagès JM, Bolla JM. (2003) A phenylalanine-arginine beta-naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of Campylobacter to macrolides. Int J Antimicrob Agents, 22(3): 237-241.
245. Kocazeybek B, Sakli MK, Yuksel P, Demirci M, Caliskan R, Sarp TZ, Saribas S, Demiryas S, Kalayci F, Cakan H, Uysal HK, Gareayaghi N, Ergin S, Erzin YZ, Bal K, Tascı İ, Tokman HB. (2019) Comparison of new and classical point mutations associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains isolated from dyspeptic patients and their effects on phenotypic clarithromycin resistance. J Med Microbiol, 68(4): 566-573.

246. Marques AT, Vítor JMB, Santos A, Oleastro M, Vale FF. (2020) Trends in Helicobacter pylori resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches. Microb Genom, 6(3): e000344.
247. Oleastro M, Ménard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthélémy P, Mégraud F. (2003) Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori. J Clin Microbiol, 41(1): 397-402.
248. Morris JM, Reasonover AL, Bruce MG, Bruden DL, McMahon BJ, Sacco FD, Berg DE, Parkinson AJ. (2005) Evaluation of seaFAST, a rapid fluorescent in situ hybridization test, for detection of Helicobacter pylori and resistance to clarithromycin in paraffin-embedded biopsy sections. J Clin Microbiol, 43(7): 3494-3496.

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Kocsmár É*, Szirtes I*, Kramer Z, Szijártó A, Bene L, Buzás GM, Kenessey I, Bronsert P, Csanadi A, Lutz L, Werner M, Wellner UF, Kiss A, Schaff Z, Lotz G. (*megosztott első szerzők)
Sensitivity of Helicobacter pylori detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity.
Helicobacter. 2017 Aug;22(4). doi: 10.1111/hel.12387. Epub 2017 Apr 12.
PMID: 28402048.
Impakt faktor: 4,123 50%

Kocsmár É, Kocsmár I, Buzás GM, Szirtes I, Wacha J, Takáts A, Hritz I, Schaff Z, Rugge M, Fassan M, Kiss A, Lotz G
Helicobacter pylori heteroresistance to clarithromycin in adults - new data by in situ detection and improved conception
Helicobacter. 2020 Feb;25(1):e12670. doi: 10.1111/hel.12670. Epub 2019 Nov 8.
PMID: 31701608
Impakt faktor: 5,753

Az értekezés témájától független közlemények:

Kocsmár É, Buzás GM, Szirtes I, Kocsmár I, Kramer Z, Szijártó A, Fadgyas-Freyler P, Szénás K, Rugge M, Fassan M, Kiss A, Schaff Z, Röst G, Lotz G.
Primary and secondary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and mathematical modeling of the role of macrolides.
Nat Commun. 2021 Apr 15;12(1):2255. doi: 10.1038/s41467-021-22557-7.
PMID: 33859206
Impakt faktor: 14,919

Kocsmár É*, Lotz G*, Kiss A, Hoerner M, Petrova E, Freudenberg N, Csanádi Á, Kulemann B, Werner M, Bronsert P, Wellner UF. (*megosztott első szerzők)
Prognostic impact of tumor budding and EMT in periampullary adenocarcinoma: A quantitative approach
J Cancer. 2020 Sep 17;11(22):6474-6483. doi: 10.7150/jca.46093. eCollection 2020.
Impakt faktor: 4,207

Kocsmár É, Kocsmár I, Szalai L, Lendvai G, Szijártó A, Schaff Z, Kiss A, Kovalszky I, Papp G, Lotz G.
Cross-testing of major molecular markers indicates distinct pathways of tumorigenesis in gastric adenocarcinomas and synchronous gastrointestinal stromal tumors.
Sci Rep. 2020 Dec 17;10(1):22212. doi: 10.1038/s41598-020-78232-2.
PMID: 33335133
Impakt faktor: 4,379

Petrovics R, Söveges B, Egyed A, Knorr G, Kormos A, Imre T, Török G, Zeke A, Kocsmár É, Lotz G, Kele P, Németh K.
A rapid and concise setup for the fast screening of FRET pairs using bioorthogonalized fluorescent dyes.
Org Biomol Chem. 2018 Apr 25;16(16):2997-3005.
PMID: 29629719.
Impakt faktor: 3,49

Enderle-Ammour K, Wellner U, Kocsmar E, Kiss A, Lotz G, Csanadi A, Bader M, Schilling O, Werner M, Bronsert P.
Three-dimensional reconstruction of solid tumors: Morphological evidence for tumor heterogeneity.
Pathologe, 2018 Dec;39(Suppl 2):231-235. doi: 10.1007/s00292-018-0529-4.
Impakt faktor: 0,546

Kocsmár É, Kocsmár I, Karczub J, Istók R, Kiss A, Schaff Z, Lotz G.
Clinicopathological Characterization and Autopsy based Classification of the Cancer of Unknown Primary Origin (CUP) Syndrome.
Magy Onkol. 2019 Jun 21;63(2):75-84. Epub 2019 Apr 7.
PMID: 31225530
Impakt faktor: 0,197

Lotz G, Smuk G, Kocsmár É, Kocsmár I, Tímár J.
Predictive Diagnostics of the Programmed Cell Death Receptor 1 (PD-1) - Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Inhibitory Therapies.
Magy Onkol. 2019 Sep 18;63(3):183-191. Epub 2019 Aug 30.
PMID: 31533137
Impakt faktor: 0,197

Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B, Székely E, Varga M, Kocsmár É, Kenessey I, Beöthe T, Süle N, Majoros A, Szendrői A, Nyírády P, Kiss A, Riesz P, Lotz G.
Development and Initial Testing of a Modified UroVysion-Based Fluorescence In Situ Hybridization Score for Prediction of Progression in Bladder Cancer.
Am J Clin Pathol. 2020 Jan 2;153(2):274-284. doi: 10.1093/ajcp/aqz165.
PMID: 31732739 DOI: 10.1093/ajcp/aqz165
Impakt faktor: 2,493

Smuk G, Pajor G, Szuhai K, Morreau H, Kocsmár I, Kocsmár É, Pajor L, Kajtár B, Sárosi V, Lotz G, Tornóczky T.
Attenuated Isolated 3' Signal: A Highly Challenging Therapy Relevant ALK FISH Pattern in NSCLC.
Lung Cancer. 2020 May;143:80-85. doi: 10.1016/j,.lungcan.2020.03.007. Epub 2020 Mar 10.
PMID: 32272316 DOI: 10.1016/j.lungcan.2020.03.007
Impakt faktor: 5,705

Jewel Ju Ea Kim, Ildikó Kocsmár, György Miklós Buzás, Ildikó Szirtes, Orsolya Rusz, Csaba Diczházi, Attila Szijártó, István Hritz, Zsuzsa Schaff, András Kiss, Éva Kocsmár*, Gábor Lotz*
Efficacy of Clarithromycin Depends on the Bacterial Density in Clarithromycin-Heteroresistant *Helicobacter pylori* Infections: An In Situ Detected Susceptibility and Quantitative Morphometry-Based Retrospective Study.
Pathol Oncol Res. 2021 Jun 29;27:1609863. doi: 10.3389/pore.2021.1609863. eCollection 2021.
Impakt faktor: 3,201

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Mindazoknak, akik a tudományos munkámban és az értekezés elkészítésében segítségemre voltak.

Elsőként köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Lotz Gábornak**, aki egyetemi hallgatói éveim és doktori tanulmányaim alatt a közös kutatómunkánk során mindvégig támogatott.

Kiváló meglátásaival és szakértő kritikáival nyújtott segítsége mellett számos lehetőséget adott a munkám bemutatására és a tudományos életben való érvényesülésre is. A kutatómunka iránt mutatott lelkesedése és tisztelete által egy olyan kutatói szemléletet sajátíthattam el, amely az orvosi pályám során is mindig új kérdések és válaszok keresését jelenti majd.

Külön köszönetemet fejezem ki **Prof. Dr. Tímár József** és **Prof. Dr. Kiss András** Igazgató Uraknak, hogy a II. Sz. Patológiai Intézet volt és jelenlegi vezetőiként lehetőséget biztosítottak számomra az Intézetben a kutatómunkám elvégzésére és figyelemmel kísérték azt.

Szeretném kiemelten megköszönni a szakmai támogatását és tanácsait **Prof. Dr. Schaff Zsuzsa** akadémikus asszonynak.

Külön köszönet illeti a testvéremet, **Dr. Kocsmár Ildikót**, akivel tudományos diákkörös éveink óta igazi csapatként dolgoztunk együtt, támogatása és éles meglátásai nélkül nem jöhettek volna létre azok a tanulmányok, amelyekre most büszke lehetek. Önzetlen segítségéért nem lehetek elég hálás.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Szirtes Ildikónak** a közös munkáért. Tőle mindig kérdezhettem, szakértelme nagy segítség volt számomra az évek során.

Köszönettel tartozom a doktori munkám során született tanulmányokban való segítségért és a klinikai szemléletű kritikáért **Prof. Dr. Szijártó Attilának**, **Dr. Buzás György Miklósnak**, **Dr. Hritz Istvánnak** és **Dr. Wacha Juditnak**.

Szeretném megköszönni **Dr. Gyöngyösi Benedeknek** az értekezés házi bírálatában végzett alapos munkáját és a biztató szavait.

Köszönettel tartozom **Dr. Szalai Lucának**, **Dr. Jakab Ákosnak és Dr. Kim Yu Eanak** a tudományos diákkörösként végzett kimagasló munkájukért.

Köszönet illeti még az immunhisztokémiai és FISH vizsgálatok elvégzésében nyújtott technikai segítségéért **Horváth Csillát**, **Pekár Zoltánné Magdit**, **Dr. Sklánitzné Samodai Erikát** és **Kovács Erzsébetet**.

Örökké hálás leszek a **Szüleimnek** a töretlen támogatásukért a tanulmányaimban és a céljaim elérésében. Biztatásuk nélkül sosem mertem volna nagyot álmodni. Köszönet illeti még a **Barátaimat** a támogatásukért és a türelmükért, kiemelve **Hahn-Keresztesi Dórát**, aki mindemellett a grafikai ábrák elkészítésében is mindig segítségemre volt.