



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM

AUTOREFERAT

(do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego załącznik 2)

Opis dorobku i osiągnięć naukowych, zawodowych i dydaktycznych

ELŻBIETA KARCZEWSKA

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII FARMACEUTYCZNEJ
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

KRAKÓW 2017

SPIS TREŚCI

1. INFORMACJE PODSTAWOWE.....	3
1.1 Imię i nazwisko.....	3
1.2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe	3
1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu	3
2. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI.....	4
2.1. Wykaz cyklu publikacji stanowiących podstawę habilitacji.....	4
2.2. Tematyka prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego.....	4
2.2.1 Wprowadzenie w tematykę badawczą	5
2.2.1.1. Cel naukowy	7
2.2.1.2. Omówienie wyników badań	10
2.3. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji	43
3. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE.....	44
3.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora.....	44
3.1.1. Wykaz prac opublikowanych w czasopiśmie naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora	47
3.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	48
3.2.1. Wykaz prac opublikowanych w czasopiśmie naukowych po uzyskaniu stopnia doktora	56
3.3. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach.....	59
3.3.1 Granty KBN/MNiSW/NCN.....	60
3.3.2 Inne (poza KBN) granty dofinansowywane ze środków krajowych, z subwencji fundacji.....	60
3.3.3 Projekty finansowane ze środków Uczelni.....	60
3.4. Współpraca naukowa	61
3.5. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych.....	62
3.6. Szkolenia.....	62
4. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I ORGANIZACYJNA.....	63
4.1. Osiągnięcia dydaktyczne.....	63
4.1.1. Opieka naukowa nad studentami.....	63
4.1.2. Opieka naukowa nad doktorantami.....	64
4.2. Osiągnięcia organizacyjne.....	64
4.2.1 Udział w pracach organizacyjnych na rzecz Uczelni.....	64
5. OTRZYMANE NAGRODY I WYRÓŻNIENIA.....	64
6. CZŁONKOSTWO W ORGANIZACJACH ORAZ TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH.....	64
7. PIŚMIENNICTWO.....	65

1. INFORMACJE PODSTAWOWE

1.1. Imię i nazwisko: ELŻBIETA KARCZEWSKA

1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Dyplom magistra biologii: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, 1977.

Dyplom doktora nauk przyrodniczych: Akademia Medyczna im. Mikołaja Kopernika w Krakowie na podstawie rozprawy doktorskiej pt: Patogenetyczne właściwości szczepów *Escherichia coli* wyosobnionych z żółci. Promotor - prof. dr hab. med. Piotr Heczko. 1991.

Dyplom pierwszego stopnia specjalizacji w zakresie mikrobiologii: Wydział Zdrowia i Opieki Społecznej, Urząd Miasta Krakowa, tytuł. Mikrobiolog, 1988.

1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1978-1979	Instytut Mikrobiologii Akademii Medycznej w Krakowie, Zakład Mikrobiologii wolontariat
1979-1993	Instytut Mikrobiologii Akademii Medycznej w Krakowie, Zakład Mikrobiologii młodszy asystent, starszy asystent wykładowca
1991-1992	Department of Medicine, University of California, Irvine zatrudnienie w projekcie dotyczącym badań nad patogennością szczepów <i>Helicobacter pylori</i>
1994-2001	Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek w Krakowie Asystent
1995-2001	Katedra Fizjologii, Wydział Lekarski UJ CM asystent naukowo-techniczny
2001-2011	Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny UJ CM Adiunkt
2011- do chwili obecnej	Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny UJ CM Starszy wykładowca

2. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI (art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

Diagnostyka i rekomendowane schematy leczenia zakażenia *Helicobacter pylori* wobec problemu narastającej oporności szczepów na leki stosowane w terapii empirycznej.

2.1. Wykaz monotematycznego cyklu publikacji stanowiących podstawę habilitacji

- P-1.** Karczewska E, Klesiewicz K, Nowak P, Sito E, Skiba I, Zwolińska-Wcisło M, Mach T, Budak A. Empirical versus targeted treatment of *Helicobacter pylori* infections in southern Poland according to the results of local antimicrobial resistance monitoring. W: Bruna Maria Roesler, redaktor. Trends in *Helicobacter pylori* Infection. Wydawnictwo Intech, Rijeka 2014, rozdz. 12, 321-347. [online]
<http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/46485.pdf> [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

Praca oryginalna

Rozdział Monografii Zagranicznej

- P-2.** Karczewska E, Klesiewicz K, Wojtas-Bonior I, Skiba I, Sito E, Czajewski K, Zwolińska-Wcisło M, Budak A. Levofloxacin resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients in southern Poland, between 2006–2012. Acta Pol Pharm. 2014, 71(3):477-483. [online]
http://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2014/3/477.pdf [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 0,737; pkt. MNiSW: 15

- P-3.** Karczewska E, Klesiewicz K, Skiba I, Wojtas-Bonior I, Sito E, Czajewski K, Zwolińska-Wcisło M, Budak A. Variability in prevalence of *Helicobacter pylori* strains resistant to clarithromycin and levofloxacin in Southern Poland. Gastroenterol Res Pract. 2012, Article ID 418010, 7 pages. [online]
<https://www.hindawi.com/journals/grp/2012/418010/> [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 1,615; pkt. MNiSW: 15

- P-4.** Karczewska E, Wojtas-Bonior I, Sito E, Zwolińska-Wcisło M, Budak A. Primary and secondary *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin in the southern part of Poland. Pharmacol Rep. 2011, 63(3):799-807. [online] http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2011/3_799.pdf [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 2,445; pkt. MNiSW: 25

- P-5.** Karczewska E, Wojtas I, Sito E, Trojanowska D, Budak A, Zwolińska-Wcisło M, Wilk A. Assessment of co-existence of *Helicobacter pylori* and *Candida* fungi in diseases of the upper gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol. 2009, 60(Suppl 6):33-39. [online]
http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_09_s6/pdf/33_12_09_s6_article.pdf [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 1,489; pkt. MNiSW: 24

- P-6.** Konturek SJ, Starzyńska T, Konturek PC, Karczewska E, Marlicz K, Ławniczak M, Jaroszewicz-Heigelman H, Bielański W, Hartwich A, Ziemniak W, Hahn EG. *Helicobacter*

pylori and CagA status, serum gastrin, interleukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2002, 37(8):891-8.

IF: 1,847; pkt. MNiSW: 10

- P-7. Karczewska E, Konturek JE, Konturek PC, Cześnikiewicz M, Sito E, Bielański W, Kwiecień N, Obtulowicz W, Ziemniak W, Majka J, Hahn EG, Konturek SJ. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci. 2002, 47(5):978-86.

IF: 1,438; pkt. MNiSW: 9

Analiza bibliometryczna w/w prac, przeprowadzona przez Bibliotekę Medyczną UJ CM (z dn. 22.10.2016 r.) według listy Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania, wykazała następującą łączną ich punktację (Zał. 7, 8):

Sumaryczny Impact Factor = 9,571

Punkty KBN/MNiSW = 98

Badania naukowe opisane w publikacjach stanowiących podstawę habilitacji prowadzone były w oparciu o środki finansowe uzyskane z grantów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, [K/PBW/000768 (NN404547640 2011), 4P05B050B], a także w ramach projektów finansowanych ze środków Uczelni (badań własnych i programu statutowego). We wszystkich wymienionych byłam kierownikiem (Zał 4, cz. II, pkt G). W pracach od 1-4 byłam autorem korespondującym.

Udział własny w powstanie każdej pracy wchodzącej w monotematyczny cykl publikacji stanowiących podstawę habilitacji został szczegółowo opisany w **Zał. 4, cz. I.**

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego załączono oświadczenia współautorów wszystkich prac wchodzących w skład monotematycznego cyklu publikacji, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie (Zał. 6).

2.2. Wprowadzenie w tematykę badawczą, omówienie celu naukowego oraz osiągniętych wyników przedstawionych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego

2.2.1. Wprowadzenie w tematykę badawczą prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego.

W 2005 roku Barry J. Marshall i Robin J. Warren otrzymują nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Nagroda została przyznana za udowodnienie związku odkrytych przez nich bakterii *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) z zapaleniem błony śluzowej żołądka i chorobą wrzodową. Wyniki swoich badań publikują w czasopiśmie Lancet w 1984 roku, w pracy pt. *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Od tej pory zaczyna się mówić o bakteryjnym podłożu choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy.

Jednocześnie upada koncepcja fizjologa Karola Schwarza zakładająca, że owrzodzenie błony śluzowej żołądka jest wyłącznie wynikiem zaburzenia wzajemnej równowagi pomiędzy czynnikami agresji w postaci zwiększonej ilości kwasu solnego lub pepsyny, które uszkadzają błonę śluzową, a jej zdolnościami ochronnymi, czyli barierą śluzówkową. Schwarz wiedział, że wydzielany w żołądku kwas solny nie tylko bierze udział w trawieniu, ale produkowany w nadmiarze pod wpływem stresu może być przyczyną uszkodzeń błony śluzowej, a w konsekwencji wrzodu trawiennego. Był autorem teorii „no acid, no ulcer” czyli „nie ma wrzodu bez kwasu”. Powstawanie choroby wrzodowej łączono więc głównie z nadmiernym

wydzielaniem kwasu żołądkowego. Teoria stresowo-kwasowej etiologii wrzodu trawiennego utrzymywała się blisko 70 lat, mimo iż nie potrafiono wyjaśnić dlaczego u pewnych osób z chorobą wrzodową wykrywa się prawidłową ilość wydzielanego kwasu, a przy jego zwiększonym wydzielaniu nie zawsze dochodzi do powstania wrzodu. Samoistne gojenie się wrzodów, jak również częsta ich nawrotowość to także problemy, które pozostawały wówczas bez wyjaśnienia.

Barierę śluzówkową zapewnia śluz wytwarzany przez komórki nabłonka, fosfolipidy, prostaglandyny oraz obfity przepływ krwi przez błonę śluzową. Zaburzenie równowagi pomiędzy czynnikami obronnymi (protektorynymi) a czynnikami agresywnymi prowadzi do uszkodzeń błony śluzowej, nadżerek i wrzodów. Do czynników agresywnych, poza pobudzającymi wydzielanie kwasu solnego (gastryna, histamina układ cholinergiczny), zalicza się pepsynę, wolne rodniki tlenowe, niesterydowe leki przeciwzapalne (NLPZ), kwasy żółciowe oraz drobnoustroje takie jak *H. pylori*, wirus cytomegalii, czy grzyby. Uszkodzenie bariery śluzówkowej odgrywa więc istotną rolę w powstawaniu owrzodzeń. Obecnie spośród wielu czynników biorących udział w etiologii choroby wrzodowej najczęściej wymienia się *H. pylori* i NLPZ.

U wszystkich zakażonych, *H. pylori* wywołuje przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka typu B. Zmiany zapalne mogą prowadzić do atrofii i metaplazji nabłonka oraz spadku wydzielania soku żołądkowego. W konsekwencji zmian morfologicznych może dochodzić do choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy oraz, rzadziej, raka żołądka. *H. pylori* przez długotrwałą stymulację układu immunologicznego może także indukować rozwój chłoniaka typu MALT (*mucosa-associated lymphatic tissue*). Jednak u większości zakażonych poza zmianami histologicznymi o typie przewlekłego zapalenia, nie dochodzi do zmian w czynności żołądka. Jedynie u około 15% zakażonych rozwija się wrzód trawienny (u 90% wrzód dwunastnicy, natomiast u 70% wrzód żołądka), a u 2% może dojść do rozwoju raka żołądka. Do czasu wykrycia związku pomiędzy chorobą wrzodową a zakażeniem *H. pylori*, leczenie wrzodów polegało na stosowaniu środków silnie hamujących wydzielanie żołądkowe, takich jak inhibitory pompy protonowej (PPI, ang. *proton pump inhibitor*) czy antagoniści receptorów histaminowych H₂, które skutecznie goiły wrzody, ale nie eliminowały infekcji. Dopiero odkrycie Warrena i Marshalla potwierdziło związek pomiędzy *H. pylori* a chorobą wrzodową, co przyczyniło się do wprowadzenia leków przeciwbakteryjnych w terapii wrzodów. Ponieważ potwierdzono, że skuteczność eradykacji w wyniku stosowania jednego leku jest niska, zaczęły pojawiać się różne propozycje terapii wielolekowej.

Opracowaniem metod skojarzonego leczenia farmakologicznego zakażeń *H. pylori* zajmuje się grupa międzynarodowych ekspertów (EHS - *European Helicobacter Study Group*) oraz grupy robocze Wytyczne obowiązujące w Europie, dotyczące diagnostyki i leczenia zakażenia *H. pylori*, są publikowane jako Maastricht Consensus Report. W Polsce obowiązują zalecenia Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG-E).

Polskie rekomendacje opracowywane przez Grupę Roboczą PTG-E działającą od 1994 roku były pierwszymi w Europie oraz drugimi na świecie po wytycznych amerykańskich. Zostały opublikowane w 1996 roku. Następne cztery polskie uzgodnienia dotyczące postępowania w zakażeniu *H. pylori* pochodzą z roku 2000, 2004, 2008 i 2014.

Europejskie zalecenia EHS publikowane były kolejno w latach 1997, 2000, 2005, 2012 i 2016 (sierpień).

Aktualnie w Polsce powinny być stosowane zalecenia Grupy Roboczej PTG-E z 2014 roku oraz najnowsze rekomendacje europejskie EHS z 2016 roku. Badania przedstawione w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe prowadzone były zgodnie z obowiązującymi w danym czasie rekomendacjami PTG-E i EHS.

Za najbardziej skuteczne postępowanie terapeutyczne, które daje najwyższy odsetek eradykacji *H. pylori* uważa się 10 lub 14 dniową empiryczną terapię skojarzoną, obejmującą dwa antybiotyki lub antybiotyk i jeden z chemioterapeutyków w połączeniu z lekiem zmniejszającym wydzielanie kwasu solnego w żołądku (Inhibitor Pompy Protonowej-IPP, antagoniści receptorów histaminowych H₂) i/lub sole bizmutu działające cytoprotekcyjnie, chroniące błonę śluzową żołądka.

Dotychczas rekomendowane schematy leczenia zakażenia *H. pylori* zawierają trzy grupy leków. Leki przeciwbakteryjne (antybiotyki i chemioterapeutyki), antysekrecyjne (inhibitory pompy protonowej-IPP lub antagoniści receptorów histaminowych H₂) oraz leki cytoprotekcyjne (sole bizmutu). Zalecane modele leczenia zostaną przedstawione w omówieniu wyników badań zawartych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego.

Rekomendowane leki o działaniu antybakteryjnym to klarytromycyna, metronidazol, amoksycylina, tetracyklina, lewofloksacyna i rifabutyna. Wykazują dobrą dyspersję w żołądku i dwunastnicy, posiadają zdolność penetracji do warstwy śluzu oraz absorpcji do błony śluzowej żołądka.

Stale narastająca oporność *H. pylori* na stosowane w terapii zakażenia antybiotyki i chemioterapeutyki, stanowi poważny problem terapeutyczny wymagający ciągłego monitorowania, celem doboru odpowiedniego schematu leczenia przeciwbakteryjnego. Znajomość częstości występowania pierwotnej i wtórnej oporności szczepów *H. pylori* na leki przeciwbakteryjne w danym kraju czy regionie, decyduje o ich zastosowaniu w leczeniu zakażenia. Jednym z najważniejszych czynników wpływających na skuteczność leczenia jest więc wrażliwość bakterii na stosowane leki.

Gwarancją skutecznej eradykacji zakażenia *H. pylori* jest dobór odpowiedniej metody diagnostycznej potwierdzającej i identyfikującej zakażenie oraz zastosowanie odpowiedniego modelu leczenia, z uwzględnieniem wyniku monitorowania oporności *H. pylori* na leki w danym regionie.

W 1994 roku *Internal Agency for Research in Cancer* przy Światowej Organizacji Zdrowia uznaje *H. pylori* za karcinogen klasy I. Od tej pory *H. pylori* wymienia się także jako jeden z czynników biorących udział w powstawaniu raka żołądka. Dzisiaj wiemy już, że silnie immunogenna proteina CagA, (ang. *cytotoxin associated protein A*, 120-145 kDa), kodowana przez gen *cagA* znajdujący się w obszarze wyspy patogenności PAI (ang. *cytotoxin associated gene A pathogenicity island*), produkowana przez około 50-60% szczepów *H. pylori*, może oddziaływać na procesy fizjologiczne komórek gospodarza, co skutkuje powstawaniem zmian atroficzných, a w konsekwencji doprowadza do rozwoju choroby nowotworowej. Cechy onkogenne białka CagA zostały potwierdzone w badaniach prowadzonych na modelu zwierzęcym (2008r.)

Odkrycie *H. pylori* oraz poznanie patomechanizmu zakażenia stworzyło nadzieję na możliwość skutecznego leczenia choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Minimalnie zwiększyło także szanse na walkę z rakiem żołądka poprzez eradykację wczesnego zakażenia.

2.2.1.1. Cel naukowy badań przedstawionych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego

Celem prowadzonych badań było:

- Opracowanie procedury badania mikrobiologicznego biopsjatu pobranego z błony śluzowej żołądka oraz materiału pobranego z kieszonek dziąsłowych w kierunku izolacji i identyfikacji *H. pylori*. Badane materiały kliniczne pochodziły od pacjentów

z chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego, a także od pacjentów z chorobami przyzębia.

Powyższe badania rozpoczęłam, kiedy w Polsce nie było zdefiniowanej, rutynowej diagnostyki zakażenia *H. pylori*. Badania dały mi podstawę do wprowadzenia w przyszłej działalności naukowej, prawidłowej identyfikacji zakażenia na podstawie badania mikrobiologicznego materiałów klinicznych.

- Badanie obecności *H. pylori* w jamie ustnej i próba odpowiedzi na pytanie, czy jama ustna może być źródłem reinfekcji żołądka. Badania te były szczególnie istotne dla poznania epidemiologii zakażenia *H. pylori* oraz w poszukiwaniu rezerwuaru i źródeł zakażenia.
- Identyfikacja szczepów patogennych *H. pylori*, produkujących silnie immunogenną białko CagA (ang. *cytotoxin associated protein A*) i wakuolizującą toksynę VacA (ang. *vacuolating cytotoxin A*), przy użyciu metod serologicznych i genetycznych.

Badania podjęto w celu ewentualnego zastosowania tej metody w przypadku każdego potwierdzonego zakażenia *H. pylori*, ponieważ osoby zakażone szczepami patogennymi typu CagA+, VacA+, znajdują się w grupie ryzyka rozwoju zmian nowotworowych żołądka w przyszłości.

- Opracowanie własnej, nieinwazyjnej metody oznaczania obecności przeciwciał IgG anti-CagA w surowicy i ślinie, przy użyciu immunoenzymatycznego testu ELISA, z zastosowaniem jako antygeny rekombinowanego białka CagA, które otrzymałam od dr. Harry'ego Kleanthousa z OraVax Inc. (Cambridge, MA, USA).

Test był jedną z metod pośredniej identyfikacji szczepów *H. pylori* CagA+, na podstawie wykrywanych przeciwciał anti-CagA w badanej surowicy pacjenta, zakażonego szczepem *H. pylori* CagA+.

Obecnie dostępne są już komercyjne testy wykrywające przeciwciała anti-CagA w badanej surowicy.

Dodatni wynik testu potwierdzający obecność przeciwciał anti-CagA w surowicy pacjenta, jest bardzo ważną informacją kliniczną pomocną dla lekarza w dalszej diagnostyce oraz przed przystąpieniem do eradykacji zakażenia

Znaczenie patogennych szczepów *H. pylori*, zwłaszcza typu (CagA+) w patomechanizmie zakażenia, uzasadnia celowość dążenia do zwalczania tych zakażeń.

- Wprowadzenie do badań własnych oznaczania lekowrażliwości szczepów *H. pylori*.

Należy zaznaczyć, że antybiogram dla szczepów *H. pylori* nie był wówczas wykonywany w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej.

Test lekowrażliwości umożliwiał zastosowanie terapii celowanej, zgodnej z wynikami antybiogramu, co w przypadku zakażenia szczepami opornymi na rekomendowane leki, w większości przypadków gwarantowało dobry efekt terapeutyczny. Wprowadzony później ilościowy test lekowrażliwości z użyciem pasków nasasyconych lekiem w gradiencie stężeń (E-test), wyznaczający wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustroju (MIC - ang. *minimal inhibitory concentration*), umożliwił monitorowanie narastania lekooporności szczepów *H. pylori* na antybiotyki i chemioterapeutyki stosowane w leczeniu zakażenia.

- Monitorowanie zakażeń o etiologii *H. pylori* w Małopolsce oraz monitorowanie narastania oporności szczepów na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia wg obowiązujących rekomendacji EHS (ang. *European Helicobacter Study Group*) i PTG-E (Polskie Towarzystwo Gastroenterologiczne).

Badania prowadzone były w celu obserwacji zmian profilu lekowrażliwości *H. pylori* w ciągu kilkunastu lat, co umożliwiło dokonanie wyboru prawidłowego modelu leczenia warunkującego eradykację zakażenia.

- W związku z ciągłym narastaniem oporności szczepów *H. pylori* na leki zalecane w terapii empirycznej, celem badań było także uzasadnienie ewentualnego wprowadzenia antybiogramu przed zastosowaniem pierwszego leczenia, z uwzględnieniem aktualnych wyników monitorowania oporności *H. pylori* na leki w danym regionie. Według zaleceń PTG-E oraz Raportu Maastricht, badanie mikrobiologiczne i antybiogram należy wykonać dopiero po dwukrotnym niepowodzeniu terapii, w celu prowadzenia dalszego leczenia zgodnie z wynikami testu lekowrażliwości.

Przedstawione powyżej cele prowadzonych badań naukowych, realizowałam od kilkunastu lat a ostatni z nich czyli monitorowanie narastania oporności szczepów *H. pylori* na leki stosowane w terapii zakażenia kontynuuję. Przedstawienie wyników badań uzyskiwanych na przestrzeni dłuższego okresu czasu daje czytelny obraz dotyczący kształtowania się udziału zakażenia w danej populacji czy też oceny dynamiki narastania lub spadku oporności na leki w danym regionie, w tym przypadku w rejonie Małopolski. W związku z tym wyniki badań przedstawione w cyklu siedmiu publikacji stanowiących podstawę habilitacji omawiane będą od pracy najstarszej czyli **P-7**. Publikacja wyników monitorowania była i jest ważną informacją dla lekarzy z tego regionu dotyczącą m.in. wyłączenia z empirycznego leczenia zakażenia *H. pylori* klarytromycyny gdyż ilość szczepów opornych na ten lek w Małopolsce przekracza 20%.

Wobec powyższego problemu, w cyklu publikacji zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego znajdują się także dwie starsze prace, które pozwolą na ocenę rozwoju diagnostyki zakażenia *H. pylori* oraz monitorowania lekooporności szczepów, na przestrzeni kilkunastu lat.

Zakres przeprowadzonych badań obejmował:

- Diagnostykę zakażenia *H. pylori*.
 - ✓ Badanie mikrobiologiczne, antybiogram
 - ✓ Badania serologiczne
 - ✓ Badania genetyczne
- Identyfikację patogennych szczepów *H. pylori*, wyznaczenie ewentualnych markerów zakażenia.
- Badania epidemiologiczne.
- Monitorowanie zakażeń o etiologii *H. pylori* w Małopolsce oraz monitorowanie dynamiki narastania oraz spadku oporności szczepów na leki stosowane w terapii empirycznej, prowadzonej wg obowiązujących w danym czasie rekomendacji EHS i PTG-E.

Badania przedstawione w cyklu prac stanowiących podstawę habilitacji prowadzone były w ramach różnych projektów badawczych i uzyskały zgodę komisji bioetycznej. Wszystkie osoby biorące udział w badaniach wyraziły pisemną i świadomą zgodę na ich przeprowadzenie.

Procedura badania mikrobiologicznego i hodowli szczepów *H. pylori* oraz wykonanie antybiogramu metodą ilościową z zastosowaniem plastikowych pasków nasasyconych antybiotykiem w gradiencie stężeń (E-test) została opisana w pracy P-4.

Badania prowadzono każdorazowo wobec szczepu wzorcowego *H. pylori* ATCC 43504.

2.2.1.2. Omówienie osiągniętych wyników badań przedstawionych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego

P-7. Karczewska E, Konturek JE, Konturek PC, Cześnikiewicz M, Sito E, Bielański W, Kwiecień N, Obtulowicz W, Ziemniak W, Majka J, Hahn EG, Konturek SJ. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci. 2002, 47(5):978-86.

IF: 1,438; pkt. MNiSW: 9

Wprowadzenie

Pomimo, iż bakterię *H. pylori* wyizolowano z materiału klinicznego około 35 lat temu, to jednak patomechanizm zakażenia, przyczyny reinfekcji, czy drogi przenoszenia bakterii nadal nie są do końca poznane. Wymienia się drogę zakażenia oralno-oralną, fekalno-oralną i gastryczno-oralną (1). Wykrycie obecności bakterii w kale, ściekach i wodzie pitnej potwierdza hipotezę fekalno-oralną (2). Możliwość wstecznej transmisji bakterii z żołądka do jamy ustnej, gdzie może dochodzić do kolonizacji płytki nazębnej i dziąsłowej, potwierdza natomiast hipoteza gastryczno-oralna (3, 4, 5). Istnieją także badania sugerujące, że *H. pylori* należy do fizjologicznej flory jamy ustnej żyjąc w komensalizmie z gospodarzem (6, 7). Pozostaje to w sprzeczności z częściej wysuwaną hipotezą, że obecność tych bakterii w jamie ustnej może być spowodowana refluksem żołądkowo-przełykowym, czy regurgitacją. Nasuwa się więc pytanie, czy jama ustna jest pierwotnym rezerwuarem *H. pylori*, z którego następuje transmisja i kolonizacja dalszych odcinków przewodu pokarmowego, miejscem przejściowym zasiedlania i tymczasowej transmisji, czy też wtórnym rezerwuarem powstającym podczas trwającej choroby refluksowej.

Wszystko, co do tej pory wiemy na temat *H. pylori* potwierdza, że błona śluzowa żołądka jest niszą ekologiczną dla tej bakterii (8). Dowody potwierdzające przeżywanie *H. pylori* poza żołądkiem są bardzo nieliczne. Badaniem przez wiele już lat źródłem zakażenia jest woda pitna i biofilm bakteryjny, ale nadal obecność tych bakterii nie została potwierdzona w hodowli i badaniu mikrobiologicznym próbek wody czy biofilmu (9). Hipotetycznie *H. pylori* może się dostawać do przewodu pokarmowego ze środowiska zewnętrznego przez jamę ustną, stanowiącą główne wrota transmisji bakterii do dalszych odcinków przewodu pokarmowego, ale drobnoustroje obecne w jamie ustnej mogą także stanowić zagrożenie dla drugiego człowieka. Źródłem zakażenia może być więc w tym przypadku ślina lub przedmioty, które miały kontakt ze śliną (10).

Ponieważ jama ustna jest ekosystemem zasiedlanym przez wiele różnych gatunków bakterii, potwierdzenie obecności *H. pylori* w hodowli, w materiale takim jak ślina czy kamień nazębny sprawia wiele trudności. *H. pylori* należy do bakterii wybrednych i wymagających. Różnorodność metod prowadzenia hodowli, identyfikacji bakterii oraz różnych grup badanych, może tłumaczyć rozbieżności w wynikach prezentowanych przez różne ośrodki naukowe. Największą czułość wykazuje test oparty na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz jego modyfikacja, nested-PCR wykrywający w ślinie i biopatach błony śluzowej żołądka geny 16S rRNA (11, 12,).

Kolonizacja populacji ludzkiej przez *H. pylori* jest procesem skomplikowanym, o różnych drogach transmisji bakterii, a w związku z tym, różnych źródłach zakażenia, wpływających na poziom rozpowszechnienia bakterii (13, 14, 15). Za główną drogę transmisji uważa się jednak zakażenie przenoszone bezpośrednio z człowieka na człowieka (16).

Do momentu odkrycia *H. pylori* badania patogenyzy wrzodu trawiennego nie wyjaśniały przyczyn jego nawrotowości. Poznanie chorobotwórczości tych bakterii i ich roli w patomechanizmie zakażenia, zmianach w wydzielaniu żołądkowym i epidemiologii, częściowo wyjaśniły ten problem. W wielu badaniach zaczęto udowadniać tezę, że obecność *H. pylori* w jamie ustnej zwiększa ryzyko reinfekcji (17). Stomatolodzy podkreślają związek złej higieny jamy ustnej z zakażeniem *H. pylori* i skłonnością do reinfekcji żołądka. Obecność bakterii w jamie

ustnej nie musi jednak stanowić dowodu na to, że jama ustna jest rezerwuarem zakażenia dla dalszych części przewodu pokarmowego, mimo iż wiadomo, że bakterie te do przewodu pokarmowego dostają się ze środowiska zewnętrznego właśnie przez jamę ustną.

Cel badań

- Wprowadzenie badania mikrobiologicznego biopłatów błony śluzowej żołądka pobranych podczas gastroskopii, do monitorowania zakażeń *H. pylori*, na terenie Małopolski
- Wybór metody diagnostycznej przydatnej w monitorowaniu skuteczności leczenia zakażenia *H. pylori*
- Ponieważ w badaniach używano różnych metod diagnostycznych identyfikujących zakażenie *H. pylori*, podjęto próbę ich porównania i oceny wobec nieinwazyjnego testu oddechowego (UBT, ang. *Urea Breath Test*) stanowiącego złoty standard diagnostyczny, czyli metodę referencyjną będącą punktem odniesienia dla innych używanych testów.
- Badanie obecności *H. pylori* w jamie ustnej i próba odpowiedzi na pytanie, czy jama ustna może być źródłem reinfekcji żołądka.
- Skoro jama ustna stanowi wrota zakażenia, badania miały także dać odpowiedź na pytanie, czy ślina może być materiałem diagnostycznym służącym do wykrywania infekcji *H. pylori*, biorąc pod uwagę, że wykrywanie przeciwciał IgA w ślinie to test nieinwazyjny, mogący mieć zastosowanie w diagnostyce zakażenia w populacji dzieci.

Omówienie wyników

Badania prowadzono w grupie 329 pacjentów z objawami dyspepsji, w przedziale wiekowym 31-60 lat. W badaniu gastroskopowym i histologicznym potwierdzono zapalenie błony śluzowej żołądka (N=257), wrzody żołądka (N=15) i wrzody dwunastnicy (N=57).

W każdym przypadku podczas gastroskopii pobierano biopłaty błony śluzowej żołądka z części odźwiernikowej i trzonu w celu wykonania badania mikrobiologicznego w kierunku obecności *H. pylori*. Biopłaty pobierano także w celu identyfikacji zakażenia w szybkim teście ureazowym (test CLO) oraz do badań genetycznych z użyciem metody PCR dla potwierdzenia genów kodujących 16S rRNA.

Jednocześnie od każdego pacjenta pobierano materiał z kieszonek dziąsłowych i ślinę w celu wykonania badania mikrobiologicznego oraz potwierdzenia obecności przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w nadsączu odwirowanej śliny.

Dodatkowo dla materiału z kieszonek dziąsłowych oraz biopłatów pobranych przed i po leczeniu od 30 spośród badanych pacjentów, wykonano badanie genetyczne PCR – 16S rRNA. Badania genetyczne wykonane zostały w University of Erlangen-Nuremberg w Niemczech w ramach współpracy naukowej.

W surowicy krwi pobranej od pacjentów badano obecność przeciwciał IgG anty-*H. pylori* przy użyciu immunoenzymatycznego testu ELISA, (EIAGEN HP IgG test, Clone Systems, Włochy).

Przeciwciała IgG anty-CagA w surowicy oznaczano za pomocą wystandaryzowanego testu ELISA (wg Perez-Perez) z modyfikacją własną, używając jako antygeny rekombinowanego białka rCagA otrzymanego od dr. H. Kleanthousa z OraVax Inc. Cambridge, MA, USA.

U wszystkich badanych osób aktualnie toczącą się infekcję *H. pylori* wykrywano szybkim, nieinwazyjnym, ureazowym testem oddechowym C¹³UBT (*Urea Breath Test*). Zakażenie potwierdzono u 276/329 pacjentów, co stanowi 83,9% badanych osób.

Pacjenci z potwierdzonym zakażeniem *H. pylori* otrzymywali siedmiodniową terapię trójkową (omeprazol, klarytromycyna, metronidazol).

Cztery tygodnie po zakończonym leczeniu 164 spośród 276 pacjentów odbyło kontrolną wizytę lekarską i otrzymało zalecenie powtórzenia testu oddechowego UBT wraz z powtórным badaniem wszystkich materiałów pobranych z jamy ustnej oraz krwi. Pobrane materiały badano ponownie w kierunku obecności *H. pylori* i odpowiednich przeciwciał, jak opisano powyżej. Podczas badania kontrolnego po czterech tygodniach nie wykonywano gastroskopii.

Niezależnie od wyników przeprowadzonej terapii, pacjenci byli proszeni o następną wizytę kontrolną i badanie sześć miesięcy po zakończeniu leczenia w celu wykluczenia reinfekcji.

Na podstawie wyników testu C¹³UBT w drugim badaniu, czyli po czterech tygodniach od przeprowadzonej terapii, potwierdzono, że liczba osób zakażonych *H. pylori* zmniejszyła się z 83,9% do 13,4%. W badaniu kontrolnym po sześciu miesiącach zakażenie potwierdzono u 21,6% osób. Stwierdzono brak istotności statystycznej pomiędzy drugim i trzecim badaniem.

Ze względu na długi okres utrzymywania się przeciwciał IgG anty-*H. pylori* we krwi pacjentów po terapii (od kilku miesięcy do roku), dodatni wynik testu oznaczający obecność w badanej surowicy przeciwciał IgG anty *H. pylori* nie musi wskazywać na aktywne zakażenie. W badanej grupie osób wyniki testu ELISA w grupie przed leczeniem oraz w grupach: cztery tygodnie i sześć miesięcy po leczeniu były zbliżone (87,5%, 87,2% i 83,8%). Stwierdzono brak istotności statystycznej pomiędzy wynikami przed i po leczeniu. **Wyniki testu ELISA u badanych osób przed leczeniem okazały się być bardzo zbliżone do wyników urazowego testu oddechowego C¹³UBT wykonywanego u pacjentów przed zastosowaniem terapii.**

Porównując wyniki badania mikrobiologicznego biopłatów błony śluzowej żołądka z wynikami urazowego testu oddechowego C¹³UBT potwierdzono brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wynikami obydwu testów przed leczeniem (odpowiednio: 78,2%, i 83,9%) i po sześciu miesiącach (11,7% i 21,6%). W obydwu testach różnica pomiędzy wynikami przed i po leczeniu jest istotna.

W badaniu mikrobiologicznym śliny przed leczeniem rzadziej stwierdzana była obecność *H. pylori*, niż wynikało to z badania C¹³UBT, czyli obecności *H. pylori* w żołądku (odpowiednio 50% i 83,9%). Odsetek zakażonych spada po czterech tygodniach (23,8%), a po sześciu miesiącach minimalnie wzrasta (35,1%). Różnice statystycznie istotne potwierdzono jedynie pomiędzy wynikami badania przed leczeniem i cztery tygodnie po leczeniu.

Częstość występowania przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w ślinie w zestawieniu z wynikami C¹³UBT przed leczeniem to odpowiednio 76,8% i 83,9%. Potwierdzono brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wynikami obydwu testów. Cztery tygodnie i sześć miesięcy po leczeniu częstość wyników dodatnich dla IgA anty-*H. pylori* spada do odpowiednio: 53,7 i 56,8%. Różnice pomiędzy wynikami badania przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w ślinie przed i po leczeniu nie są jednak statystycznie istotne.

Obecność przeciwciał IgG anty-CagA w surowicy potwierdzono u 62,2% badanych. W najwyższym odsetku (66,7%) występowały w surowicy pochodzącej od pacjentów z wrzodem dwunastnicy. Obecność przeciwciał anty-CagA w surowicy i ślinie potwierdzono testem western blot (Helico Blot 2.0, Genelab Diagnostics). Nie u wszystkich badanych przeciwciała występowały jednocześnie w surowicy i ślinie.

Wartość diagnostyczną oznaczania poziomu przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w ślinie określono odnosząc się do badania mikrobiologicznego biopłatów oraz badania mikrobiologicznego śliny. Czulość i swoistość testu oszacowano odpowiednio na 79,1% i 44,6%; trafność na 71,7%.

Te same parametry określono dla wykrywania *H. pylori* w badaniu mikrobiologicznym biopłatów pochodzących z błony śluzowej żołądka; czułość i swoistość oszacowano odpowiednio na 93% i 100%, trafność na 94,3%.

W przypadku badania mikrobiologicznego śliny czułość oszacowano na 51,5%, swoistość na 57,8%, a trafność na 52,5%.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, najbardziej zbliżone wyniki potwierdzające obecność lub brak *H. pylori* w żołądku przed i po leczeniu otrzymano w teście oddechowym C¹³UBT i badaniu mikrobiologicznym biopłatów błony śluzowej żołądka.

W ramach badania kontrolnego po czterech tygodniach od zakończenia leczenia nie planowano i nie wykonywano gastroskopii. Testem kontrolnym był urezowy test oddechowy C¹³UBT, który jest zalecany do monitorowania skuteczności leczenia. Efekt terapii przedstawiają więc wyniki testu przeprowadzonego po czterech tygodniach i sześciu miesiącach po leczeniu. Wyniki C¹³UBT potwierdziły eradykację *H. pylori* u 80% badanych już po czterech tygodniach.

W wynikach badań mikrobiologicznych biopłatów oraz w wynikach testu oddechowego C¹³UBT wykonanych po sześciu miesiącach nie wykazano statystycznie istotnych różnic.

Nie stwierdzono także statystycznie istotnych różnic pomiędzy wynikami testu C¹³UBT po czterech tygodniach i po sześciu miesiącach od zakończenia leczenia, można więc wnioskować, że nie doszło do nawrotów zakażenia czy reinfekcji.

Przy braku możliwości wykonania C¹³UBT, metodą alternatywną jest zatem badanie mikrobiologiczne biopłatów błony śluzowej żołądka pobranych podczas gastroskopii, w przypadku kiedy istnieją wskazania do wykonania gastroskopii, a badany zgadza się na leczenie eradykacyjne.

Potwierdzona w hodowli obecność *H. pylori* w ślinie, czy też materiale pochodzącym z kieszonek dziąsłowych nasuwa przypuszczenie, iż jama ustna mogłaby być źródłem reinfekcji żołądka po przeprowadzonej skutecznie eradykacji *H. pylori* w żołądku.

U żadnej jednak z badanych osób z potwierdzoną przed leczeniem infekcją *H. pylori* w żołądku i potwierdzoną infekcją *H. pylori* jamie ustnej utrzymującą się jeszcze po czterech tygodniach po leczeniu ale jednoczesnym braku *H. pylori* w żołądku, po sześciu miesiącach nie stwierdzono reinfekcji żołądka. Jest zatem mało prawdopodobne, aby po eradykacji *H. pylori* w żołądku, jama ustna mogła być źródłem ponownego zakażenia. Być może ilość bakterii w jamie ustnej, kolonizujących kieszonki dziąsłowe czy płytkę nazębną oraz ślinę po leczeniu, jest za mała, aby doszło do kolonizacji żołądka (18). W celu potwierdzenia tej hipotezy badania należałoby kontynuować na większej grupie osób.

W przypadku opisywanych badań, do trzeciego badania, czyli sześć miesięcy po leczeniu zgłosiło się tylko 65 osób spośród wezwanych.

Ocena wartości diagnostycznej badania mikrobiologicznego materiałów pochodzących z jamy ustnej (ślina, materiał z kieszonek dziąsłowych), względem C¹³UBT jako testu referencyjnego, wykazała niską czułość, swoistość i trafność testu. Nasuwa się wniosek, iż badanie mikrobiologiczne wyżej wymienionych materiałów może być jedynie testem uzupełniającym.

Wysokie wartości w tej ocenie uzyskała hodowla *H. pylori* z biopłatów błony śluzowej żołądka (90-100%), a nieco niższe – oznaczanie przeciwciał IgA anti-*H. pylori* w ślinie (70-80%). Częstość występowania dodatnich wyników IgA anti-*H. pylori* w ślinie przed

leczeniem zbliżona jest do wyników urazowego testu oddechowego C¹³UBT u tych samych pacjentów. Potwierdzono brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wynikami przeprowadzonych testów. Można zatem wnioskować, iż wykrywanie przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w teście immunoenzymatycznym ELISA może być metodą alternatywną w stosunku do testu C¹³UBT dla wykrywania zakażenia przed zastosowaniem terapii. Nie wykazano bowiem statystycznie istotnych różnic pomiędzy poziomem IgA anty-*H. pylori* w ślinie przed i po leczeniu.

Ślina, ze względu na łatwość pobierania i przechowywania może być dobrym materiałem diagnostycznym dla wykrywania zakażenia *H. pylori*, szczególnie kiedy inne materiały, takie jak biopiat czy surowica nie mogą być z różnych przyczyn pobrane lub badane. Według Patel *i wsp.*, czułość i swoistość testu ELISA użytego w celu oznaczenia poziomu IgA anty-Hp w ślinie, to odpowiednio 76% i 61%. Wyniki te są więc zbliżone do uzyskanych w badaniach własnych.

Należy pamiętać, iż obecność przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w ślinie może świadczyć o obecności *H. pylori* zarówno w żołądku, jak i w jamie ustnej. Ponieważ przed leczeniem wyniki obydwu przeprowadzonych testów (IgA anty-*H. pylori* w ślinie i C¹³UBT) w tej samej grupie badanych osób były zbliżone, natomiast po leczeniu odsetek pacjentów z podwyższonym poziomem przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w ślinie pozostawał wysoki (53,7%) w porównaniu z C¹³UBT (13,4%), można wnioskować, że stosowane leczenie jest skuteczniejsze w stosunku do infekcji *H. pylori* w żołądku.

Należy także wziąć pod uwagę możliwość przenoszenia szczepów *H. pylori* z żołądka do jamy ustnej, która w takim przypadku mogłaby być miejscem tymczasowej transmisji zwrotnej z żołądka u pacjentów z potwierdzoną chorobą refluksową lub regurgitacją treści pokarmowej (19). Na podstawie uzyskanych wyników badań genetycznych stwierdzono, iż u niewielkiego odsetka badanych z zakażeniem *H. pylori* w żołądku przy równoczesnym jego braku w jamie ustnej, po leczeniu nastąpiła eradykacja w żołądku, ale infekcję można było wykryć w jamie ustnej. Można zatem przyjąć, że jama ustna staje się tylko przejściowym rezerwuarem *H. pylori* pochodzenia pokarmowego, o ile istnieją w niej odpowiednie warunki do kolonizacji, np. zmiany zapalne w przyzębiu. Na podstawie badań można wnioskować, iż przy dobrej higienie jamy ustnej, mimo zakażenia *H. pylori* w żołądku, nie stwierdza się *H. pylori* ani w ślinie, ani w kieszonkach dziąsłowych. Traktując jednak jamę ustną jako źródło zakażenia dla otoczenia, należałoby wziąć pod uwagę leczenie infekcji *H. pylori* w kieszonkach dziąsłowych przy współistniejących zmianach przyzębia.

Badanie poziomu IgA anty-*H. pylori* w ślinie także może służyć do monitorowania leczenia, ale przy uzyskanym wyniku dodatnim należy zawsze wziąć pod uwagę możliwość infekcji *H. pylori* w jamie ustnej, w jamie ustnej i w żołądku lub tylko w żołądku. Jak wynika z badań prowadzonych przez innych autorów, u 2%-7% pacjentów z zakażeniem *H. pylori* wzrost poziomu przeciwciał dotyczy wyłącznie klasy IgA (20, 21).

Obecność przeciwciał IgA anty-CagA w surowicy czy ślinie, przy braku komercyjnego testu ELISA wykrywającego przeciwciała anty-CagA, można potwierdzić za pomocą metody western blot. Wykrywanie tych przeciwciał jest bardzo ważne, gdyż jak wynika z badań, pacjenci zakażeni szczepami *H. pylori* CagA+ narażeni są na zwiększone ryzyko wystąpienia wrzodu dwunastnicy, czy nawet raka żołądka.

W badaniu genetycznym wykonanym metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) – 16S rRNA dla śliny, materiału z kieszonki dziąsłowych oraz biopiatów przed leczeniem, potwierdzono obecność *H. pylori* w biopiatkach pobranych z części antralnej żołądka (95%), trzonu żołądka (90%) i kieszonki dziąsłowych (35%) oraz po leczeniu, odpowiednio w: 25%, 20%, 10% przypadków.

Wnioski

- Monitorowanie zakażenia *H. pylori* w latach 1997-1999 na terenie Małopolski potwierdziło wysoki odsetek zakażeń w badanej grupie wiekowej 31-60 lat (83,9%).
- Wyniki badań mikrobiologicznych, serologicznych i genetycznych potwierdziły obecność *H. pylori* w jamie ustnej, co nie dowodzi, że jama ustna jest źródłem reinfekcji żołądka po jego skutecznym leczeniu eradykacyjnym.
- Ślina może być ważnym materiałem diagnostycznym badanym w kierunku obecności przeciwciał IgA anty-*H. pylori*, ale jedynie przed rozpoczęciem leczenia zakażenia. Nie potwierdzono zasadności badania poziomu przeciwciał IgA anty-*H. pylori* w ślinie w monitorowania skuteczności leczenia.
- Badania potwierdziły możliwość stosowania w monitorowaniu leczenia jedynie ureazowego testu oddechowego UBT a także badania mikrobiologicznego biopsatów błony śluzowej żołądka przy braku dostępności testu oddechowego UBT i przy istniejących wskazaniach do gastroskopii.

P-6. Konturek SJ, Starzyńska T, Konturek PC, **Karczewska E**, Marlicz K, Ławniczak M, Jaroszewicz-Heigelman H, Bielański W, Hartwich A, Ziemniak W, Hahn EG. *Helicobacter pylori* and CagA status, serum gastrin, interleukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2002, 37(8):891-8.

IF: 1,847; pkt. MNiSW: 10

Wprowadzenie

Od wielu lat Polska zaliczana jest do krajów podwyższonego ryzyka zachorowania na jeden z najczęstszych na świecie nowotworów przewodu pokarmowego, którym jest rak żołądka (22). W 1994 roku *Internal Agency for Research in Cancer* przy Światowej Organizacji Zdrowia uznaje *Helicobacter pylori* za karcinogen klasy I. Od tej pory *Helicobacter pylori* wymieniany jest jako jeden z czynników biorących udział w powstawaniu raka żołądka, obok czynników środowiskowych, genetycznych oraz diety. Powstaje wiele prac doświadczalnych i przeglądowych opisujących zmiany w fizjologii komórek eukariotycznych wywoływanych infekcją *H. pylori* (23, 24, 25).

Rozwój raka żołądka w przebiegu zakażenia przez *H. pylori* związany jest z szeregiem zmian histologicznych w błonie śluzowej żołądka, określanych jako „kaskada Correi”. Bezpośrednio po zakażeniu dochodzi do rozwoju ostrego stanu zapalnego (*acute gastritis*), który przechodzi w przewlekłe aktywne zapalenie błony śluzowej żołądka (*chronic active gastritis*). U pewnej części zakażonych (ok. 50%) może ono przejść w zanikowe zapalenie błony śluzowej (*chronic atrophic gastritis*) i metaplastję. U 8% zakażonych pojawiają się zmiany dysplastyczne, a tylko u 1-2% na skutek przewlekłej infekcji *H. pylori* rozwija się gruczolakorak żołądka (26). Powstawanie i rozwój zmian nowotworowych z towarzyszącym zakażeniem *H. pylori* uzależnione jest od czynników wirulencji bakterii oraz od czynników immunologicznych i genetycznych gospodarza.

Ryzyko rozwoju raka żołądka związanego z zakażeniem *H. pylori* podwyższają czynniki patogenności bakterii. Najważniejsze z nich to wakuolizująca cytotoksyna VacA (ang. *vacuolating cytotoxin A*) oraz silnie immunogenne białko CagA, będące produktem genu *cagA* (ang. *cytotoxin associated gene A*), który jest markerem tzw. wyspy patogenności *cagPAI* (ang. *cytotoxin associated gene A pathogenicity island*). Patogenność *H. pylori* zależy poza tym od licznych białek

umożliwiających bakterii przetrwanie w kwaśnym środowisku żołądka, adhezję do komórek gospodarza oraz przełamywanie jego obronnych mechanizmów immunologicznych. Wyspa patogenności *cagPAI* zawiera geny biorące udział w procesie kolonizacji i modulacji odpowiedzi zapalnej, a także geny kodujące bakteryjny system sekrecyjny umożliwiający translokację białka CagA do komórek nabłonka gospodarza. Prowadzi to do aktywacji przewodzenia sygnałów w komórkach i w efekcie do zaburzenia ich funkcji, między innymi proliferacji, apoptozy i uwalniania mediatorów. Potwierdzono, że zakażenie szczepami CagA+ w niektórych populacjach zwiększa ryzyko choroby wrzodowej oraz atrofii błony śluzowej i raka żołądka (27). W oparciu o obecność lub brak ekspresji genów *vacA* i *cagA* szczepy *H. pylori* zostały podzielone na szczepy o dużej (Typ I) i małej patogenności (Typ II)

Analiza genotypowa i fenotypowa ekspresji genu *cagA* i *vacA* umożliwia wyodrębnienie dwóch głównych typów szczepów *H. pylori*. Do typu I (fenotypowo CagA+, VacA+) należą szczepy posiadające gen *cagA* kodujący białko CagA, jak i gen *vacA* dla toksyny wakuolizującej VacA. Najprawdopodobniej zakażenie szczepem typu I wiąże się z częstszym występowaniem wrzodu trawiennego, atroficznego zapalenia żołądka oraz raka żołądka. Do typu II (fenotypowo CagA-, VacA-) zalicza się szczepy nie zawierające genu kodującego CagA, ale gen *vacA* który ulega ekspresji, przy czym powstająca toksyna wakuolizująca nie jest aktywna. U chorych zakażonych szczepami typu II choroba ma łagodniejszy przebieg, w postaci zapalenia błony śluzowej żołądka. Najczęściej jednak zakażenia szczepami typu II przyjmują postać bezobjawową. Wyodrębniono jeszcze typ pośredni szczepów *H. pylori*, w których ekspresja obydwu genów jest niezależna.

Liczne badania epidemiologiczne dowodzą, że ludzie zainfekowani szczepami *H. pylori* produkującymi aktywną cytotoksynę VacA i białko immunogenne CagA obarczeni są wyższym ryzykiem rozwoju choroby nowotworowej. Wykazano, że uszkodzenie DNA komórek błony śluzowej żołądka jest bardziej nasilone przy zakażeniu szczepem *H. pylori* CagA+ (28). Ponadto *H. pylori* aktywuje geny powiązane z karcynogenezą, m.in. geny kodujące białko p53 (ang. *tumor suppressor protein*), białko p52 (ang. *cell cycle inhibitor*), cyklooksygenazę 2 (COX2) - kluczowy enzym w produkcji prostaglandyn, fosfolipazę A, czy też białko regulujące cykl komórkowy-cyklinę D1 (24). Najistotniejsze dla procesu nowotworzenia jest immunogenne białko CagA. Gen kodujący to białko znajduje się w genomie około 60% klinicznych szczepów *H. pylori*. Produkowane przez te szczepy białko CagA, po translokacji do komórek gospodarza, reaguje z białkami, powodując m.in. zmiany w ruchliwości i proliferacji komórek nabłonka, a wpływając na osłabienie połączeń między nimi zmienia strukturę nabłonka. Prowadzi to do chronicznej infekcji powiązanej ze stanem zapalnym oraz uszkodzaniem komórek gospodarza, co zwiększa ryzyko choroby nowotworowej. Liczne badania wskazują także na udział CagA w rozwoju metaplastji i dysplastji, czego konsekwencją jest nowotwór tkanki nabłonkowej żołądka (25). Cechy onkogenne białka CagA zostały potwierdzone w badaniach prowadzonych na modelu zwierzęcym (29).

Gen *vacA* występujący prawie u wszystkich szczepów *H. pylori*, z których połowa tylko wytwarza toksynę wakuolizującą VacA, ma strukturę mozaikową, a ekspresja toksyny zależy od typu sekwencji sygnałowej (s1a, s1b, s1c, s2) i regionu środkowego (m1, m2). Szczepy o największej wirulencji to szczepy o genotypie s1m1 wytwarzające największą ilość toksyny, natomiast najmniejszą ilość toksyny produkują szczepy o genotypie s2m2. Szczepy toksynotwórcze mają więc genotyp *cagA+/vacA s1* (30).

Infekcja *H. pylori* stymuluje także wytwarzanie cytokin prozapalnych m.in. interleukiny 1 β (IL-1 β), interleukiny 8 (IL-8), interleukiny 6 (IL-6) oraz TNF α (ang. *tumor necrosis factor α*). Opisany został polimorfizm genów kodujących cytokiny (IL-1 β , TNF α , IL-10, IFN- γ i in.), które mają wpływ na nasilenie odpowiedzi zapalnej, co ma ścisły związek z powstawaniem raka żołądka (31). Interleukina 8 jest silnym czynnikiem chemotaktycznym i aktywującym neutrofile, co prowadzi do rozwoju procesu zapalnego i uszkodzenia oraz zniszczenia komórek nabłonkowych.

Podczas trwającego zakażenia *H. pylori* dochodzi także do zmian wydzielania żołądkowego gastryny, histaminy i somatostatyny. Kiedy kolonizacja bakterii obejmuje część antralną żołądka, zmniejsza się uwalnianie somatostatyny, co powoduje zwiększone wydzielanie gastryny i kwasu solnego. Bakterie pobudzają także komórki ECL (ang. *enterochromaffin-like*) powodując wzrost syntezy histaminy i zwiększoną produkcję jonów wodorowych. Dodatkowo pod wpływem bakteryjnej metylotransferazy dochodzi do powstania N- α -metylohistaminy stymulującej uwalnianie gastryny z komórek G. Prowadzi to do proliferacji i zaniku błony śluzowej żołądka, śmierci komórek nabłonkowych, dysplazji i rozwoju raka żołądka (32).

Kolonizacja nabłonka żołądka przez *H. pylori* wywołuje miejscową i uogólnioną odpowiedź immunologiczną. Wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom bakterii stosowane jest w rutynowej diagnostyce zakażeń. Traktując immunogenną proteinę CagA jako biomarker silnie związany z ryzykiem zachorowania na raka żołądka, zasadnym wydaje się stosowanie prostego, nieinwazyjnego i taniego testu immunoenzymatycznego ELISA wykrywającego przeciwciała IgG anty-CagA w surowicy, w celu wczesnego wykrywania zakażenia szczepem chorobotwórczym *H. pylori*. Inwazyjne metody oparte na badaniu endoskopowym nie są przydatne w masowych badaniach przesiewowych i nie są zalecane u dzieci.

Zastosowanie dwóch testów nieinwazyjnych, immunoenzymatycznego testu ELISA wykrywającego przeciwciała IgG anty CagA oraz ureazowego testu oddechowego mogłoby być cennym narzędziem diagnostycznym wykrywającym jednocześnie aktywne zakażenie *H. pylori* oraz typ szczepu określający jego patogenność. Wynik badania potwierdzający zakażenie szczepem o zwiększonej wirulencji, produkującym onkoproteinę CagA, mógłby być wskazaniem do leczenia eradykacyjnego (33).

Cel badań

- Oznaczenie poziomu przeciwciał IgG anty-CagA w surowicy pacjentów z rakiem żołądka (GC) oraz w grupie kontrolnej pacjentów z objawami dyspepsji, bez raka żołądka. Badania wykonano używając wystandaryzowanego testu ELISA wg Perez-Perez z modyfikacją własną, w którym jako antygeny użyto rekombinowanego białka rCagA otrzymanego z OraVax Inc. Cambridge, MA, USA.
- Oznaczenie i porównanie poziomu interleukiny 8 (IL-8) w surowicy badanych z rakiem żołądka i w grupie kontrolnej (komercyjny test Biosource Europe S.A., Belgia).
- Badania wstępne dotyczące poziomu gastryny w korelacji z infekcją *H. pylori* CagA+ u pacjentów z GC prowadzone pod kątem wyznaczenia ewentualnych markerów choroby nowotworowej żołądka.

Wszyscy badani mieli oznaczony poziom przeciwciał IgG anty-*H. pylori* w surowicy metodą immunoenzymatyczną ELISA, testem komercyjnym (EIAGEN H.PYLORI IgG, Clone Systems, Włochy) w celu potwierdzenia zakażenia.

Badania prowadzone były zespołowo, koordynowałam i brałam udział w badaniach serologicznych dotyczących oznaczania we wszystkich surowicach poziomu przeciwciał IgG anty-*H. pylori* oraz IgG anty-CagA metodą ELISA z modyfikacją własną a także w oznaczaniu poziomu IL-8.

Nie brałam udziału w oznaczaniu poziomu gastryny i pH żołądka.

Badania prowadzone były przy współpracy z Kliniką Gastroenterologii Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie, skąd otrzymywaliśmy materiał do badań wraz z diagnozą pacjentów i wynikiem badania histopatologicznego oraz informacjami dotyczącymi wieku i płci badanych.

Omówienie wyników

Przebadano materiał diagnostyczny pochodzący od 337 pacjentów z rakiem żołądka oraz 337 pacjentów z wykluczonym rakiem żołądka, ale z objawami dyspepsji w podobnej grupie wiekowej (20 do 70 lat).

W grupie pacjentów z GC odsetek badanych z dodatnim wynikiem testu na obecność przeciwciał IgG anti-*H. pylori* był istotnie wyższy (90,8%), niż w grupie kontrolnej (79,2%). Przeciwciała IgG anti-CagA w grupie z rakiem żołądka potwierdzono u 58% badanych tj. dwa razy częściej, niż w grupie kontrolnej (25,2%). Poziom IL-8 w surowicy powyżej wartości odcięcia (1,77 pg/ml) występował u prawie wszystkich osób z grupy z GC (99,7%), natomiast tylko w kilku przypadkach w grupie kontrolnej (0,3%). Poziom gastryny w surowicy powyżej wartości odcięcia (38,88 pM/l) stwierdzono w większej ilości przypadków w grupie z GC (48%), niż w grupie kontrolnej (8,3%). Silną korelację pomiędzy poziomem gastryny w surowicy i pH żołądka zaobserwowano u badanych z GC, natomiast słabą w grupie kontrolnej.

Jak wynika z badań, każdy z analizowanych indywidualnie parametrów oznaczonych dla pacjentów z GC wykazuje znaczną różnicę w porównaniu z wynikami dla poszczególnych parametrów oznaczonych dla pacjentów z objawami dyspepsji bez raka żołądka.

Analiza wieloczynnikowa poziomu gastryny w surowicy, IgG anti-*H. pylori* i IgG anti-CagA oraz wartości pH żołądka wykazała, że tylko gastryna i immunogenne białko CagA mają istotny wpływ na rozwój raka żołądka (OR>1 w regresji logistycznej).

Gastryna jest czynnikiem silnie stymulującym proliferację komórek nabłonka błony śluzowej w całym przewodzie pokarmowym, a także zwiększającym żołądkowe wydzielanie kwasu solnego (34). Wynika z tego, że poziom gastryny u chorych na raka żołądka z zakażeniem *H. pylori* CagA+ może być markerem choroby nowotworowej i mieć znaczenie w jej rokowaniu.

Wnioski

- Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają wysoką częstość zakażenia *H. pylori* w populacji polskiej. Wśród chorych z potwierdzonym rakiem żołądka (90,8%) odsetek zakażonych jest wyższy niż w grupie kontrolnej pacjentów z objawami dyspepsji bez raka żołądka (79,2%).
- Zakażenie żołądka szczepami *H. pylori* produkującymi immunogenną białko CagA (*H. pylori* CagA+) może zwiększać ryzyko rozwoju raka żołądka.
- Badania potwierdzają że poziom gastryny u chorych z GC (*gastric cancer*) oraz zakażenie szczepami *H. pylori* CagA+ to dwa markery mające znaczenie w rokowaniu choroby nowotworowej żołądka.

Zastosowanie wyników badań

Z uwagi na większą wirulencję szczepów *H. pylori*, w których potwierdza się ekspresję immunogennego białka CagA oraz znaczenie białka CagA w patomechanizmie zakażenia, należałoby wprowadzić rutynową diagnostykę w kierunku identyfikacji szczepów typu I (CagA+) w celu podejmowania uzasadnionej decyzji przeprowadzenia bezwzględnej eradykacji zakażenia *H. pylori*.

- P-5. Karczewska E, Wojtas I, Sito E, Trojanowska D, Budak A, Zwolińska-Wcisło M, Wilk A.** Assessment of co-existence of *Helicobacter pylori* and *Candida* fungi in diseases of the upper gastrointestinal tract. J Physiol Pharmacol. 2009, 60(Suppl 6):33-39. [online] http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_09_s6/pdf/33_12_09_s6_article.pdf [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 1,489; pkt. MNiSW: 24

Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Candida*, stanowiąc naturalną florę saprofityczną, bytują w obrębie jamy ustnej, gardła i jelita grubego u większości zdrowych osób, pozostając w równowadze biologicznej z bakteriami przewodu pokarmowego. Przełyk, żołądek oraz jelito cienkie stanowią dla nich jedynie drogę pasażu. U chorych podwyższonego ryzyka stała kolonizacja grzybicza może przyczynić się do rozwoju zmian patologicznych. Do grzybiczego zakażenia przewodu pokarmowego dochodzi głównie na drodze endogennej. Możliwe jest także zakażenie egzogenne wraz ze stałym pokarmem zakażonym grzybami (35, 36). W ostatnich latach zaczęto zwracać uwagę na fakt, że zakażenie *H. pylori* może być czynnikiem ułatwiającym grzybom kolonizację błony śluzowej żołądka (36, 37). Badania potwierdzają, że najczęściej występującymi gatunkami grzybów w żołądku są *Candida albicans*, (*C. albicans*), *C. krusei*, *C. tropicalis* oraz *C. glabrata*.

Zakłada się, że niskie pH żołądka nie stanowi przeszkody dla przeżycia oraz patogennego działania grzybów z rodzaju *Candida*. Badania *in vitro* wykazały zdolność gatunków: *C. albicans* oraz *C. tropicalis* do wzrostu w środowisku o pH równym 2, a *C. lusitaniae* przy pH o wartości 3. Jest to zgodne z obserwacjami innych autorów, którzy opisali przypadki pacjentów z wrzodami żołądka umiejscowionymi w części przedodźwiernikowej, ze stwierdzoną jednocześnie wysoką kolonizacją grzybów przy bardzo niskim pH. Zjawisko to wskazuje na istnienie sprawnego, nie do końca poznanego mechanizmu, który umożliwia grzybom z rodzaju *Candida* bytowanie w niskim pH, jakie występuje w żołądku (32,38.).

Wydzielane przez *C. albicans* enzymy proteolityczne oraz fosfolipazy i lizofosfolipazy determinują zjadliwość szczepów. Proteaza asparaginianowa SAP (ang. *secretory aspartic proteinase*) hydrolizuje wiele ważnych białek gospodarza takich jak kolagen, keratynę, immunoglobuliny (IgA), czy hemoglobinę. Upośledza przez to procesy obronne gospodarza oraz bierze udział w rozwoju stanu zapalnego oraz stymulacji cytokin prozapalnych. Zjadliwość szczepu zależy od ilości wytwarzanego enzymu. Proteazy asparaginianowe SAP 1-3 uczestniczą najprawdopodobniej w zakażeniach błon śluzowych, natomiast SAP 4-6 w zakażeniach układowych. *C. albicans* oprócz enzymów wydziela także toksynę (kandydalizynę) występującą u szczepów wirulentnych, która wykazuje aktywność cytotoksyczną oraz aktywuje układ odpowiedzi immunologicznej wspomagając nasilenie procesu zapalnego (39).

Wykazano, że kolonizacja grzybicza wrzodów żołądka występuje u około 50% populacji chorych z wrzodem żołądka, wydłużając czas gojenia się wrzodów i wpływając na utrzymywanie się objawów klinicznych (38, 40). Potwierdzono także, że szczepy grzybów izolowane z wrzodów żołądka wykazują silniejszą aktywność proteolityczną w porównaniu do szczepów izolowanych od pacjentów z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej. Najprawdopodobniej ma to wpływ na gojenie się niszy wrzodowej (41), a grzybicza kolonizacja wrzodów jest zjawiskiem wtórnym, towarzyszącym lokalnej patologii w żołądku (38)

Cel badań

- Analiza współwystępowania zakażenia *H. pylori* oraz grzybów z rodzaju *Candida* u pacjentów z objawami klinicznymi ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego
- Wykazanie zależności pomiędzy wirulencją szczepów *H. pylori* wyizolowanych z materiału diagnostycznego a nasileniem zmian zapalnych w obrębie górnego odcinka przewodu pokarmowego w grupie badanych osób.
- Próba wykazania znaczenia kolonizacji błony śluzowej żołądka przez grzyby *Candida* w patogenezie chorób żołądka i dwunastnicy przy współwystępowaniu z *H. pylori*

Omówienie wyników

Badaniami objęto grupę 158 osób w wieku od 15 do 80 lat, które nigdy wcześniej nie były leczone z powodu zakażenia *H. pylori*. U wszystkich badanych osób występowały objawy kliniczne ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Wyniki badań endoskopowych oraz histologicznych stanowiły kryteria diagnostyczne, na podstawie których kwalifikowano pacjentów do jednej z utworzonych grup (Grupa I: wrzód żołądka, Grupa II: wrzód dwunastnicy, Grupa III: wrzody żołądka i dwunastnicy - PUD [ang. *peptic ulcer disease*], Grupa IV: metaplasja jelitowa w żołądku, Grupa V: dyspepsja bezwrzodowa - NUD [ang. *non-ulcer dyspepsia*]).

Do grupy VI zaliczono pacjentów u których nie potwierdzono żadnych zmian w badaniu endoskopowym oraz pacjentów z nadżerkami lub bez nadżerek, z zapaleniem przełyku, zapaleniem żołądka lub zapaleniem dwunastnicy.

Do badań genetycznych włączono 58 szczepów *H. pylori* wyizolowanych z błony śluzowej żołądka, badanych na obecność genu *cagA* oraz alleli genu *vacA* (s1, s2, m1, m2) przy użyciu metody PCR.

Zakażenie *H. pylori* potwierdzono u 97 (61%) badanych osób, natomiast grzyby z rodzaju *Candida* u 27 (17%), z czego 20 wyizolowanych szczepów zidentyfikowano jako *C. albicans*, a 7 jako *Candida* spp. Analizując wyniki posiewu ilościowego w kierunku grzybów *Candida* wykazano, że wszyscy pacjenci posiadali nieistotną patologicznie liczbę grzybów w żołądku ($<10^3$ CFU/ml).

Potwierdzono 128 (81%) przypadków NUD, 18 (11%) wrzodów dwunastnicy oraz 12 (8%) wrzodów żołądka.

Współwystępowanie *H. pylori* oraz grzybów z rodzaju *Candida* (grupa *H. pylori*+ *Candida*+) w żołądku odnotowano u 18 (11%) pacjentów.

U 79 (50%) osób stwierdzono obecność *H. pylori* bez współwystępowania grzybów *Candida* (grupa *H. pylori*+ *Candida*-) w żołądku, natomiast grzyby z rodzaju *Candida* bez współwystępowania *H. pylori* stwierdzono u 9 (6%) pacjentów (grupa *H. pylori*- *Candida*+

U 52 (33%) osób nie stwierdzono zakażenia żadnym z powyższych mikroorganizmów (grupa *H. pylori*- *Candida*-).

Przeprowadzono analizę zależności pomiędzy rozpoznaniem klinicznym a zakażeniem lub brakiem zakażenia *H. pylori* i/lub grzybami.

Porównując grupy badanych bez zakażenia *H. pylori* lub *Candida* (grupa *H. pylori*- *Candida*-) z grupą zakażonych tylko *H. pylori* (grupa *H. pylori*+ *Candida*-) wykazano, że NUD (*non-ulcer dyspepsia*) występuje istotnie częściej w grupie bez zakażeń (grupa *H. pylori*- *Candida*-)

($p=0,024$). Taką samą zależność wykazano porównując grupy niezakażonych i zakażonych obydwoma drobnoustrojami jednocześnie ($p=0,002$).

Wrzód dwunastnicy występował częściej (poziom zbliżony do istotności statystycznej, $p=0,068$) w grupie chorych zakażonych tylko *H. pylori* w porównaniu do grupy bez zakażenia *H. pylori* i *Candida* (grupa *H. pylori*– *Candida*–).

Wrzody żołądka istotnie częściej występowały w grupie z jednoczesnym zakażeniem *H. pylori* i *Candida* (grupa *H. pylori*+ *Candida*+) w porównaniu do grupy zakażonej tylko *H. pylori* (tab. 4a, $p=0,007$) oraz do grupy bez zakażenia *H. pylori* i *Candida* (grupa *H. pylori*– *Candida*–) ($p=0,001$).

W pozostałych przypadkach nie wykazano różnic istotnych statystycznie w częstości występowania wyżej wymienionych chorób w poszczególnych grupach zakażeń.

Stosując metodę PCR zbadano 58 szczepów *H. pylori* na obecność genu *cagA* oraz alleli genu *vacA* (s1, s2, m1, m2). W jednym szczepie allel s nie został zamplifikowany za pomocą zastosowanych primerów, dlatego analizie poddano 57 szczepów *H. pylori*.

Obecność genu *cagA* potwierdzono u 30 (53%) spośród 57 badanych szczepów. Najczęściej występującymi allelami genu *vacA* były: s1 (w 34 szczepach – 60%) oraz m2 (w 40 szczepach – 70%). Allel s2 stwierdzono u 23 szczepów (40%), natomiast m1 u 17 szczepów (30%).

W badanych szczepach wykazano obecność trzech spośród czterech możliwych kombinacji alleli genu *vacA*, a mianowicie: s1m1 (17 przypadków – 30%), s1m2 (17 przypadków – 30%) oraz s2m2 (23 przypadki – 40%). Nie stwierdzono obecności szczepów o genotypie s2m1.

Dwadzieścia siedem szczepów *H. pylori* (48%), posiadało genotyp odpowiadający za zwiększoną wirulencję szczepu [*cagA*+, s1m1 – 15 (27%), *cagA*+, s1m2 – 12 (21%)]. Allel s1 istotnie częściej występował z genem *cagA*+, a allel s2 z *cagA*– ($p<0,001$). Spośród alleli typu m, m1 był silnie skorelowany z *cagA*+, a m2 z *cagA*–.

Porównując częstość występowania genotypów *cagA* i *vacA* w grupach chorych z dyspepsią bezwrzodową (NUD) oraz z chorobą wrzodową żołądka/dwunastnicy (PUD – *peptic ulcer disease*), wykazano różnice istotne statystycznie tylko w przypadku genu *cagA* ($p=0,045$), który istotnie częściej występował u chorych z PUD.

Analizując te grupy oddzielnie wykazano, że u pacjentów z PUD znacznie częściej występował allel s1 w porównaniu z allelem s2 ($p=0,006$), allel m2 w porównaniu z allelem m1 ($p=0,025$) oraz gen *cagA*+ w porównaniu z *cagA*– ($p=0,006$).

W przypadku pacjentów z NUD wykazano korelację jedynie z allelem m2 ($p<0,001$).

Spośród 57 pacjentów, od których wyizolowano szczepy *H. pylori* i dla których określono genotypy (*cagA*, *vacA*), metaplastę jelitową w żołądku na podstawie wyniku badania histopatologicznego stwierdzono u 5 (9%) z nich. Szczepy izolowane od tych pacjentów posiadały następujące genotypy: *cagA*+, s1m1 (4 przypadki), *cagA*–, s1m1 (1 przypadek).

W przeprowadzonych badaniach podjęto także wstępną próbę wykazania znaczenia kolonizacji błony śluzowej żołądka przez grzyby *Candida* w patogenezie chorób żołądka i dwunastnicy.

Należy zaznaczyć, iż kolonizacja to obecność grzybów w materiałach pobranych od pacjentów w ilości nieistotnej patologicznie i niewywołującej zakażenia oraz klinicznych objawów infekcji grzybiczej. Badania prowadzone przez Scotta i Katzenstein (42, 43) potwierdzają wzrastającą ilość takich przypadków (odpowiednio: 16% i 33%). Zjawisko to wydaje się być niepokojące, gdyż kolonizacja może prowadzić do rozwoju infekcji grzybiczej nie tylko u osób z grup ryzyka, u których występują czynniki sprzyjające, ale także u osób zdrowych.

W badaniach potwierdzono obecność grzybów z rodzaju *Candida* w żołądku u 27 (17%) pacjentów z objawami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego. Jednak u wszystkich pacjentów grzyby te występowały w stężeniu nieistotnym patologicznie ($<10^3$ CFU/ml). Pomimo, iż u tych osób nie można mówić o występowaniu grzybicy, to jednak sama obecność grzybów w żołądku, nawet w małej ilości, może wpływać na uszkodzenie nabłonka i zmiany w śluzówce wywoływane przez enzymy proteolityczne produkowane przez blastokonidia, czy też zarodniki grzybów.

W przeprowadzonych badaniach znaczenie występowania grzybów w błonie śluzowej żołądka rozpatrywano także w aspekcie ich współwystępowania z *H. pylori*, co prawdopodobnie może wpływać na nasilenie zmian zapalnych (32). Współwystępowanie *Candida* i *H. pylori* potwierdzono u 18 (11%) badanych. U 11 (61%) osób rozpoznano NUD, u 5 (28%) wrzód żołądka, a u 2 (11%) wrzód dwunastnicy. Podobnie, w badaniach przeprowadzonych przez Zwolińską-Wcisło i wsp. w grupie 63 chorych, w 10% przypadków wykazano współwystępowanie w żołądku grzybów z rodzaju *Candida* i *H. pylori*.

Antybiotykoterapia oraz leczenie zakażenia *H. pylori* sprzyja, jak wiadomo, nasileniu kolonizacji przez grzyby z rodzaju *Candida*. Podobne objawy kliniczne występujące w zakażeniu *H. pylori* oraz *Candida* mogą stać się powodem zastosowania kolejnego cyklu terapii przeciw *H. pylori* przy niepowodzeniu leczenia pierwszego rzutu. W takim przypadku może dojść do nasilenia objawów klinicznych wywoływanych przez *Candida*. Brak wskazań do identyfikacji grzybów z rodzaju *Candida* w zakażeniach *H. pylori* może prowadzić do błędnej interpretacji objawów, a w sprzyjających okolicznościach do rozwoju infekcji grzybiczej.

Występowanie grzybów (bez obecności *H. pylori*) stwierdzono u 9 pacjentów, u których w 8 (89%) przypadkach rozpoznano NUD, a w jednym (11%) wrzód żołądka. Prawdopodobnie obecność grzybów *Candida* w żołądku tych pacjentów była następstwem stosowania leków m.in. z grupy inhibitorów pompy protonowej (PPI – *proton pump inhibitor*) lub blokerów receptora H_2 , które zaburzając równowagę mikrobiologiczną mogły przyczynić się do rozwoju kolonizacji grzybiczej przewodu pokarmowego. Nie bez znaczenia pozostaje wiek pacjentów (średnia wieku tej grupy chorych – 52 lata), który obok wielu czynników, stanowi ryzyko rozwoju kandydozy (35).

Analizując (test χ^2) zależność pomiędzy częstością występowania wybranych chorób górnego odcinka przewodu pokarmowego w grupach z zakażeniem *H. pylori* i/lub *Candida* oraz bez tego zakażenia wykazano, że same grzyby nie odgrywały istotnej roli w ich powstawaniu, co mogło wynikać z ich małej ilości ($<10^3$ CFU/ml).

Jak wiadomo, zakażenie *H. pylori* predysponuje do rozwoju wrzodu dwunastnicy. U badanych pacjentów zależność pomiędzy zakażeniem tylko *H. pylori*, w porównaniu do grupy nie zakażonej *H. pylori* ani *Candida*, a częstością występowania wrzodów dwunastnicy była na poziomie zbliżonym do istotności statystycznej ($p=0,068$).

W grupie z jednoczesnym zakażeniem *H. pylori* i *Candida*, wrzód żołądka występował istotnie częściej, niż w grupie bez zakażenia tymi drobnoustrojami oraz zakażonej tylko *H. pylori* (odpowiednio: $p=0,001$, $p=0,007$).

Można zatem wnioskować, że na rozwój choroby wrzodowej żołądka mogą mieć wpływ obydwa czynniki występujące równocześnie.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że dyspepsja bezwrzodowa (NUD) występowała znacznie częściej w grupie bez jednoczesnego zakażenia *H. pylori* i *Candida*, niż z zakażeniem tylko *H. pylori* oraz *H. pylori* i *Candida* jednocześnie.

Można zatem sądzić, że u części pacjentów zakażonych *H. pylori* dochodzi do rozwoju groźniejszych schorzeń niż NUD, natomiast u osób nie zakażonych dominuje dyspepsja bezwrzodowa.

Na stopień zmian patologicznych w żołądku mają wpływ zarówno cechy gospodarza, jak również stopień toksyczności szczepu *H. pylori* (44).

Jak wiadomo, szczepy *cagA*⁺ mogą zwiększać ryzyko rozwoju choroby wrzodowej, jak również raka żołądka. Wykazano, że u zakażonych szczepami *cagA*⁺ występują silniejsze zmiany zapalne w błonie śluzowej żołądka (45,46,47,23). W badaniach Lage i wsp. 91,7% pacjentów z chorobą wrzodową oraz 73% chorych z zapaleniem żołądka było zakażonych szczepami *H. pylori cagA*⁺ (48).

W przeprowadzonych badaniach 72% pacjentów z chorobą wrzodową było zakażonych szczepem *H. pylori* posiadającym gen *cagA*, który istotnie częściej występował u chorych z grupy PUD, niż z NUD (44%) ($p=0,045$).

Badania przeprowadzone w wielu krajach potwierdziły, że u osób zakażonych szczepami *H. pylori cagA*⁺ częściej dochodziło do rozwoju zmian zanikowych w żołądku oraz metaplastacji jelitowej (zastąpienia prawidłowej błony śluzowej trzonu lub części przedodźwiernikowej żołądka przez komórki nabłonka jelitowego), niż w przypadku infekcji *H. pylori cagA*⁻ (44).

W przeprowadzonych badaniach metaplastację jelitową stwierdzono u pięciu pacjentów. Wszyscy zakażeni byli szczepami *H. pylori s1m1*, spośród których czterech posiadało gen *cagA*. Być może genotyp *cagA*⁺, *s1m1* jest czynnikiem ryzyka rozwoju metaplastacji jelitowej.

Wiadomo, że występowanie genu *cagA* jest silnie związane z obecnością sekwencji sygnałnej *vacA s1*, natomiast u większości szczepów *cagA*⁻ stwierdza się obecność allelu *s2* (47). Potwierdzają to przeprowadzone przez nas badania, które wykazały, że gen *cagA* występował w obecności allelu *s1* w 90% przypadków, a 74% szczepów *cagA*⁻ posiadało allel *s2* ($p<0,001$).

Badania przeprowadzone w wielu krajach dowodzą, iż szczepy *H. pylori* produkujące immunogenne białko CagA oraz toksynę wakuolizującą VacA (z ekspresją genów *cagA* i *vacA*; tzw. typ I) są bardziej chorobotwórcze i częściej izolowane od chorych z wrzodem trawiennym. Mogą wywoływać zanik błony śluzowej żołądka, a w konsekwencji metaplastację jelitową i dysplazję.

Badając zależność pomiędzy genotypami *cagA* i *vacA* a rozpoznaniem klinicznym, w naszej grupie chorych wykazano, że u pacjentów zakażonych szczepami *H. pylori* o genotypie *cagA*⁺, *vacA s1* istnieje większe prawdopodobieństwo rozwoju choroby wrzodowej w porównaniu do pacjentów zakażonych szczepami *cagA*⁻, *vacA s2*. Może to oznaczać, że część pacjentów z NUD zakażona szczepami o genotypie *cagA*⁺, *vacA s1* znajduje się w grupie zwiększonego ryzyka rozwoju PUD w przyszłości.

Wnioski

- Badania monitorowania zakażenia *H. pylori* na terenie Małopolski prowadzone w latach 2005-2008 potwierdziły spadek zakażenia w stosunku do lat ubiegłych do 61%.
- W przeprowadzonych badaniach wykazano wysoki odsetek zakażeń szczepami o większej patogenności (48% szczepów *H. pylori* o genotypie *cagA*⁺, *s1m1/s1m2*). Może to stanowić zagrożenie zwiększoną zachorowalnością na takie choroby jak wrzód żołądka, wrzód dwunastnicy czy rak żołądka.
- Wykazany związek pomiędzy współwystępowaniem *H. pylori* i *Candida* a wrzodem żołądka może wskazywać na ich synergistyczne działanie i udział w patogenezie tej choroby, mimo iż grzyby *Candida* występowały w niewielkich ilościach, co znalazło potwierdzenie w badaniach ilościowych.

- W przypadku, gdy grzyby z rodzaju *Candida* występowały pod nieobecność *H. pylori*, ich związku z występowaniem wrzodów żołądka lub dwunastnicy nie udało się potwierdzić.
- Wykazano zależność pomiędzy występowaniem choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy-PUD (*peptic ulcer disease*), a genotypem *cagA+*, *vacA s1*, warunkującym większą wirulencję szczepów *H. pylori*. Pacjenci z NUD (*non-ulcer dyspepsia*) zakażeni szczepami *H. pylori cagA+*, *vacA s1*, są więc prawdopodobnie w grupie ryzyka rozwoju PUD w przyszłości.
- Przeprowadzone badania potwierdzają związek pomiędzy wirulencją szczepów *H. pylori* a nasileniem zmian patologicznych w górnym odcinku przewodu pokarmowego.

Wprowadzenie do prac P-4, P-3, P-2, P-1

Badania epidemiologiczne prowadzone na całym świecie potwierdzają, że około 50% ludności zakażonej jest bakterią *H. pylori*. Jak wynika z wielośrodkowych badań przeprowadzonych w Polsce w latach 2000-2003, odsetek tych zakażeń sięgał wówczas około 84% w populacji ludzi dorosłych, a w populacji dzieci do 18 roku życia odsetek ten wynosił 32%. Udowodnienie roli *H. pylori* w zapaleniu żołądka i chorobie wrzodowej było wielkim przełomem w gastroenterologii. Do leczenia tych zakażeń zaczęto wprowadzać leki przeciwbakteryjne. Ponieważ wykazano, że skuteczność eradykacji *H. pylori* w wyniku stosowania tylko jednego leku jest niska, wprowadzono terapię wielolekową.

Jak pisałam już we wprowadzeniu w tematykę badawczą prac zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego, opracowaniem skojarzonego leczenia farmakologicznego zakażeń *H. pylori* zajmuje się grupa międzynarodowych ekspertów (EHSG – *European Helicobacter Study Group*) oraz grupy robocze. Wytyczne obowiązujące w Europie, dotyczące diagnostyki i leczenia zakażenia *H. pylori*, są publikowane jako Maastricht Consensus Reports. W Polsce obowiązują zalecenia Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG-E).

Aktualnie w Polsce powinny być stosowane wytyczne Grupy Roboczej PTG-E z 2014 roku, które rekomendują terapię empiryczną, a dopiero po nieskutecznej terapii drugiego rzutu, wykonanie antybiogramu i leczenie celowane. Wyjątek stanowią regiony z udokumentowaną, przekraczającą 20% ilością szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę w których zaleca się przed włączeniem klarytromycyny do leczenia wykonanie antybiogramu dla wyizolowanego szczepu. Jeśli to nie jest możliwe klarytromycyna nie może być stosowana w tym regionie.

Badania przedstawione w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe prowadzone były zgodnie z obowiązującymi w danym czasie rekomendacjami PTG-E i EHSG.

Dotychczas rekomendowane schematy leczenia zakażenia *H. pylori* opierają się na trzech grupach leków: przeciwbakteryjnych (antybiotykach i chemioterapeutykach), antysekrecyjnych (inhibitorach pompy protonowej – IPP lub antagonistach receptorów histaminowych H₂) oraz lekach cytoprotekcyjnych (solach bizmutu).

Za najbardziej skuteczne postępowanie terapeutyczne, które daje najwyższy odsetek eradykacji *H. pylori*, uważa się 10- lub 14-dniową empiryczną terapię skojarzoną, obejmującą dwa antybiotyki lub antybiotyk i jeden z chemioterapeutyków w połączeniu z lekiem hamującym wydzielanie kwasu solnego przez blokowanie pompy wodorowo-potasowej w komórkach okładzinowych żołądka (Inhibitor Pompy Protonowej – IPP) i/lub sole bizmutu działające toksycznie na *H. pylori* i cytoprotekcyjnie w stosunku do błony śluzowej żołądka oraz wpływające na gojenie się niszy wrzodowej.

Rekomendowane leki o działaniu antybakteryjnym to klarytromycyna, stosowana w leczeniu zakażeń *H. pylori* od 1994 roku, metronidazol/tynidazol (chemioterapeutyki nitroimidazolowe), amoksycylina, tetracyklina, lewofloksacyna i rifabutyna. Wykazują one dobrą dyspersję w żołądku i dwunastnicy, posiadają zdolność penetracji do warstwy śluzu oraz absorpcji do błony śluzowej żołądka.

Klarytromycyna to antybiotyk z grupy makrolidów, wykazujący działanie bakteriostatyczne przez hamowanie biosyntezy białka na poziomie podjednostki 50S rybosomu. Miejscem docelowym działania klarytromycyny jest domena V podjednostki 23S rRNA rybosomu komórki bakteryjnej, co skutkuje zatrzymaniem procesu elongacji i uszkodzeniem biosyntezy białek. Wykazuje stabilność w środowisku kwaśnym (51).

Antybiotyk ten jest najczęściej stosowany w eradykacji *H. pylori* w połączeniu z metronidazolem lub amoksycyliną.

Amoksycylina to półsyntetyczna penicylina działająca bakteriobójczo przez blokowanie aktywności transpeptydaz (tzw. białka wiążące penicyliny, PBPs – *penicillin binding proteins*), które biorą udział w syntezie peptydoglikanu. Powoduje to zahamowanie biosyntezy ściany komórkowej bakterii (51).

Amoksycylina jest stosowana w eradykacji *H. pylori* w skojarzeniu z klarytromycyną lub metronidazolem. Wykazuje dobrą stabilność w soku żołądkowym.

Tetracyklina jest antybiotykiem o działaniu bakteriostatycznym. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego polega na wiązaniu się leku z podjednostką 16S rRNA rybosomu. Uniemożliwia to wiązanie aminoacylo-tRNA do miejsca A na rybosomie, co prowadzi do zahamowania syntezy białek i wzrostu bakterii (51)

Tetracyklina stosowana jest w terapii zakażeń szczepami *H. pylori* opornymi na inne leki, takie jak klarytromycyna czy metronidazol. Jest alternatywą w przypadku leczenia osób uczulonych na penicyliny. Tetracyklina wykazuje aktywność w niskim pH.

Metronidazol to chemioterapeutyk należący do syntetycznych, heterocyklicznych związków – nitroimidazoli. Po wnikięciu do wnętrza komórki bakteryjnej, przy niskim potencjale oksydoredukcyjnym, ulega redukcji przez nitroreduktazy, a jego zredukowana forma powoduje rozerwanie nici DNA, prowadząc do śmierci komórki. (51). Wykazuje synergizm z antybiotykami β-laktamowymi (amoksycylina).

W leczeniu zakażeń *H. pylori*, metronidazol stosowany jest najczęściej w leczeniu skojarzonym z amoksycyliną lub klarytromycyną, solami bizmutu lub tetracykliną. Metronidazol jest stabilny w soku żołądkowym.

Lewofloksacyna należy do III generacji fluorochinolonów (naftyrydynochinolony), bakteriobójczych chemioterapeutyków o szerokim spektrum działania. Głównym miejscem ich docelowego działania jest gyraza; enzym biorący udział w syntezie DNA. Mechanizm działania bakteriobójczego lewofloksacyny polega na blokowaniu replikacji DNA bakterii przez zahamowanie aktywności topoizomerazy II (gyrazy) i topoizomerazy IV. Topoizomeraza II (*gyrA*, *gyrB*) odpowiedzialna jest za negatywny superskręt helisy DNA. Działanie bakteriobójcze lewofloksacyny wobec *H. pylori* polega na hamowaniu gyrazy kodowanej przez gen *gyrA* (51).

Wykazuje działanie synergistyczne z inhibitorami pompy protonowej.

W 2012 roku lewofloksacyna została wprowadzona do podstawowych schematów leczenia zakażeń *H. pylori* zalecanych przez EHSg. We wcześniejszych rekomendacjach EHSg z 2005 roku i PTG-E z 2008 roku zawarta jest jedynie informacja o możliwości zastosowania lewofloksacyny w terapii trzeciego rzutu leczenia zakażenia *H. pylori*.

Biorąc pod uwagę łatwe nabywanie oporności bakterii na fluorochinolony (mutacje punktowe), lek ten powinno się stosować tylko w uzasadnionych przypadkach.

Rifabutyna to pochodna rifamycyny, zarezerwowana głównie do leczenia wielolekoopornych prątków gruźlicy. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego tego leku wobec *H. pylori* i innych bakterii polega na hamowaniu podjednostki β DNA-zależnej polimerazy RNA, kodowanej przez gen *rpoB* (51).

Rifabutyna wykazuje stabilność w kwaśnym środowisku żołądka. Może powodować leukopenię lub trombocytopenię.

Jako lek zarezerwowany do leczenia gruźlicy, rifabutyna powinna być stosowana jedynie w szczególnych przypadkach z uwagi na szybkie narastanie oporności na ten preparat wśród szczepów *Mycobacterium* spp. EHSG w swoich rekomendacjach z lat 2005 i 2012 proponuje rifabutynę jako lek trzeciego rzutu w zakażeniach *H. pylori*.

Najczęstszą przyczyną niepowodzenia leczenia eradykacyjnego jest oporność szczepów *H. pylori* na rekomendowane antybiotyki i chemioterapeutyki, a szczególnie na klarytromycynę. Stosowanie tych leków w leczeniu innych zakażeń spowodowało wzrost oporności szczepów *H. pylori*.

Bardzo ważne w zalecanym przez PTG-E i EHSG monitorowaniu narastania oporności na dany lek jest oznaczanie oporności pierwotnej i wtórnej bakterii.

Oporność pierwotna na leki przeciwbakteryjne występuje przed rozpoczęciem terapii eradykacyjnej, natomiast wtórna nabywana jest w trakcie trwania kuracji antybiotykowej przez szczepy uprzednio wrażliwe.

Należy wspomnieć także o oporności wykrywanej po nieskutecznej terapii eradykacyjnej (ang. *post-treatment resistance*), gdy lekowrażliwość szczepu *H. pylori* przed wprowadzeniem leczenia nie była znana.

Badania przedstawione w publikacjach 4, 3, 2, 1, stanowiących część osiągnięcia naukowego, prowadzone były zgodnie z obowiązującymi w danym czasie rekomendacjami PTG-E i EHSG (PTG-E z lat 2008 i 2014 oraz EHSG z lat 2005 i 2012).

Zalecenia Grupy Roboczej Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG-E) z 2008 roku.

Zgodnie z powyższymi wytycznymi obowiązywały następujące schematy leczenia zakażenia *H. pylori*

10-14 dniowa terapia pierwszego rzutu:

IPP + amoksycylina + metronidazol

lub

IPP + klarytromycyna + metronidazol

lub

IPP + amoksycylina + klarytromycyna.

W przypadku braku efektów terapeutycznych po zastosowaniu terapii pierwszego rzutu, zalecano:

14- dniowy trójskładnikowy schemat leczenia drugiego rzutu:

IPP + 2 antybiotyki,

lub czteroskładnikowy:

IPP + amoksycylina + metronidazol + tetracyklina

lub

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

Leczenie trzeciego wyboru:

Według zaleceń PTG-E z roku 2008 oraz Raportu Maastricht-III z roku 2005, po dwukrotnym niepowodzeniu terapii oraz przy bezwzględnych wskazaniach do eradykacji zakażenia *H. pylori*, pacjenta należy skierować do specjalistycznego ośrodka, wykonać badanie mikrobiologiczne oraz antybiogram dla wyizolowanego szczepu, a następnie leczyć zgodnie z wynikiem badania lekowrażliwości.

PTG-E w swoich zaleceniach z roku 2008 wskazuje, iż wobec narastającej w Polsce oporności na klarytromycynę (28% wg PTG-E-2008; dane z 2005 roku) antybiotyk ten nie powinien być stosowany w terapii pierwszego rzutu w połączeniu z amoksycyliną w klasycznym leczeniu trójkowym. Zalecany schemat trójkowy obejmuje IPP z amoksycyliną i metronidazolem w postaci leczenia 14-dniowego.

PTG-E (2008) zaleca także rozważenie wprowadzenia w trzecim rzucie leczenia lewofloksacyny w połączeniu z amoksycyliną.

Według Raportu Maastricht-III z roku 2005, 14-dniowa standardowa terapia trójkowa pierwszego rzutu (IPP, amoksycylina i klarytromycyna lub metronidazol) jest skuteczniejsza, niż terapia 7-dniowa, zalecana w rekomendacjach wcześniejszych (PTG-E 2004).

Raport Maastricht-III z roku 2005 zaleca powyższą terapię jako leczenie pierwszego wyboru w populacjach, w których częstość oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę jest mniejsza, niż 15 – 20%.

W przypadku, gdy odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol jest w danej populacji niższy niż 40%, zalecana jest terapia złożona z IPP, klarytromycyny i metronidazolu.

Jeżeli odsetek szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę przekracza w danej populacji 15 – 20% i nie jest możliwe przed rozpoczęciem leczenia wykonanie antybiogramu dla wyizolowanego szczepu *H. pylori*, to zgodnie z powyższymi zaleceniami, klarytromycyna powinna być wykluczona z terapii.

W zaleceniach tych rekomendowane jest także ciągłe monitorowanie częstości występowania szczepów *H. pylori* opornych na stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki w różnych rejonach geograficznych celem doboru odpowiedniego schematu leczenia przeciwbakteryjnego.

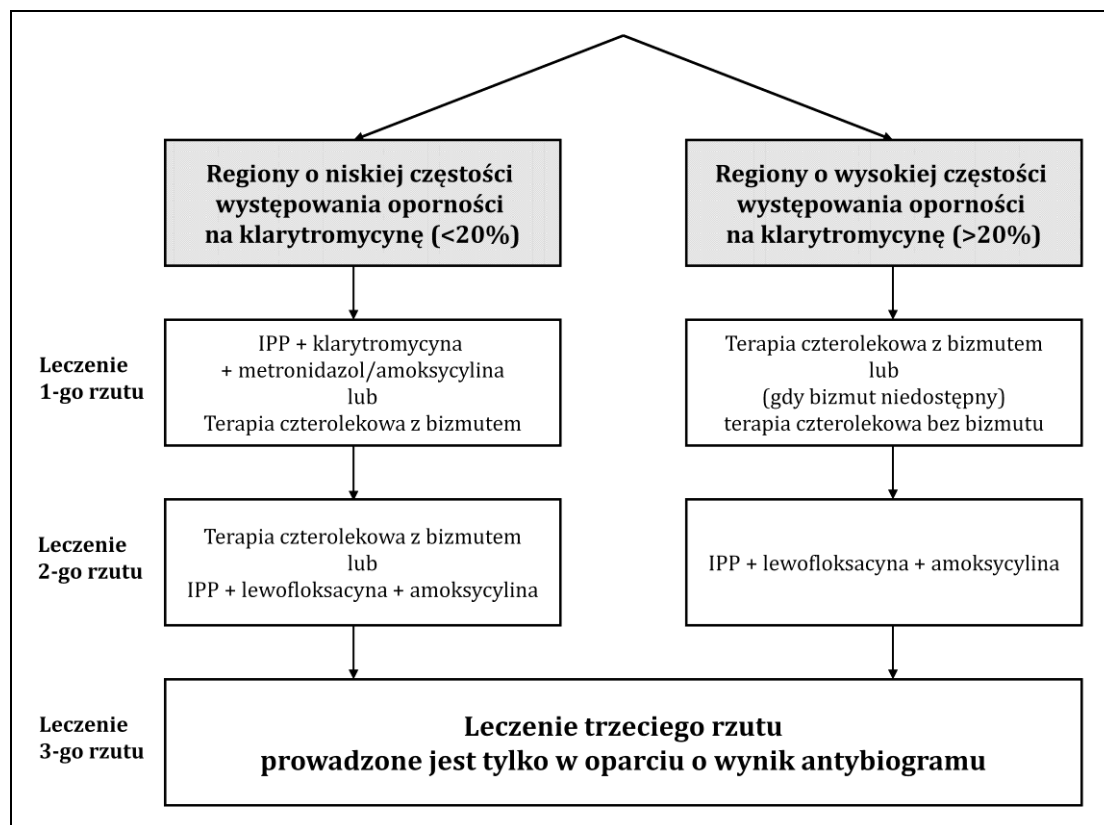
Według powyższych zaleceń, czteroskładnikowe leczenie z preparatem bizmutu stanowi akceptowaną terapię pierwszego rzutu i pozostaje najlepszym rozwiązaniem dla leczenia drugiego rzutu. W przypadku braku dostępności soli bizmutu, Raport Maastricht-III z roku 2005 zaleca terapię złożoną z IPP, amoksycyliny lub tetracykliny i metronidazolu.

Zalecenia Europejskiej Grupy Badawczej zawarte w Maastricht IV/Florence Consensus Report (4. Raport Uzgodnieniowy), wydane w 2012 roku, dotyczące zakażeń wywołanych przez *Helicobacter pylori*

W Raporcie Maastricht IV z roku 2012 najważniejszą zmianą w stosunku do poprzedniej edycji rekomendacji Europejskiej Grupy Roboczej z roku 2005, jest zalecenie zróżnicowanego leczenia

zakażenia w zależności od częstości występowania w danym regionie szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę.

Poniższa rycina przedstawia schematy leczenia dla regionów, w których odsetek szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę jest niski lub wysoki.



Schemat leczenia zakażenia *H. pylori* uwzględniający podział na regiony o niskiej i wysokiej częstości występowania szczepów opornych na klarytromycynę, na podstawie schematu z wytycznych EHS 2012 (54).

W regionach o wysokiej częstości występowania szczepów opornych na klarytromycynę (>20%) nie zaleca się stosowania tego antybiotyku bez uprzedniego wykonania testu wrażliwości szczepu na ten lek. Zalecana jest terapia czterolekowa z bizmutem lub bez bizmutu, w przypadku gdy nie jest dostępny. W związku z tym zaleca się stałe regionalne monitorowanie oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę, która jest jednym z podstawowych antybiotyków stosowanych w leczeniu zakażeń *H. pylori*. Bez monitorowania narastania oporności szczepów *H. pylori* na leki nie jest możliwe zastosowanie się do powyższych zaleceń.

Narastająca oporność klinicznych szczepów *H. pylori* na antybiotyki i chemioterapeutyki uważana jest za jeden z głównych czynników wpływających na skuteczność terapii eradykacyjnej. Wykazano, że niepowodzenia terapeutyczne związane są z opornością na klarytromycynę oraz w mniejszym stopniu na metronidazol. W przypadku szczepów wrażliwych na klarytromycynę, stopień eradykacji sięga 87,8%. Odnotowano spadek stopnia eradykacji do 18,3%, gdy szczepy są odporne na ten antybiotyk. Wrażliwość na metronidazol zapewnia sukces terapeutyczny w 97% przypadków, a oporność na ten chemioterapeutyk obniża efektywność eradykacji o 25%.

Raport Maastricht IV z roku 2012 zaleca, by w leczeniu drugiego rzutu w regionie o wysokiej częstości występowania szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę, przy braku efektów

leczenia pierwszego rzutu, zastosować schemat trójkowy z lewofloksacyną, amoksycyliną i IPP. W regionie o niskiej częstości występowania szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę (<20%), w pierwszym rzucie leczenia zalecany jest standardowy schemat trójkowy z klarytromycyną lub terapię poczwórną z solami bizmutu.

Po niepowodzeniu i braku efektów leczenia pierwszego rzutu zalecana jest terapia czterolekowa drugiego rzutu z bizmutem lub trójkowa z lewofloksacyną. Terapia trzeciego rzutu powinna być prowadzona zgodnie z wynikiem antybiogramu. Jeśli oznaczenie lekowrażliwości nie jest możliwe, dopuszcza się terapię empiryczną z rifabutyną.

Dane dotyczące wrażliwości szczepów *H. pylori* na zalecane w terapii leki powinny być systematycznie uaktualniane przez monitorowanie narastania oporności szczepów na stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki. Obserwowany znaczny wzrost odsetka opornych szczepów *H. pylori* może stanowić w przyszłości poważny problem terapeutyczny.

Rozpoczęcie terapii celowanej według wykonanego wcześniej antybiogramu, jako leczenia pierwszego rzutu, umożliwiłoby jednak uzyskiwanie szybszych efektów terapeutycznych bez dodatkowych obciążeń pacjenta, wynikających z wielokrotnego leczenia oraz ograniczyłoby zjawisko narastania oporności szczepów *H. pylori* na stosowane leki. Każde kolejne leczenie zwiększa ryzyko selekcji szczepów opornych, co w konsekwencji prowadzić może w niedalekiej przyszłości do braku możliwości eradykacji zakażenia. W Polsce ocena lekowrażliwości szczepów *H. pylori* jest wykonywana jednak tylko w kilku ośrodkach, dlatego nie jest to badanie powszechnie dostępne.

Wydaje się, że niniejsze badania prowadzone na terenie Małopolski przyczyniły się do poprawy stanu wiedzy na temat oporności klinicznych szczepów *H. pylori* w tym regionie, a co za tym idzie, dały możliwość wyboru prawidłowego modelu leczenia zgodnie z wynikami oceny oporności bakterii na klarytromycynę i metronidazol oraz lewofloksacynę.

Cel badań

- Monitorowanie zakażenia oraz narastania lub spadku oporności *H. pylori* na leki stosowane w terapii.
- Ocena pierwotnej i wtórnej oporności szczepów *H. pylori*, izolowanych od pacjentów z rejonu Małopolski, na klarytromycynę, metronidazol, amoksycylinę, i lewofloksacynę.
- Wykrywanie wielolekoopornych szczepów *H. pylori*.
- Wykrywanie mechanizmu oporności na klarytromycynę, uwarunkowanego mutacjami punktowymi w genie 23S rRNA. Badania te prowadzono na klinicznych szczepach *H. pylori* za pomocą metody genetycznej PCR-RLFP. Wprowadzenie tej metody jako badania rutynowego może przyspieszyć decyzję lekarza co do wyboru modelu leczenia, umożliwiając pominięcie sporządzania antybiogramu.
- Możliwość szerszej analizy zjawiska pierwotnej i wtórnej oporności klinicznych szczepów *H. pylori* wyizolowanych od pacjentów z rejonu Małopolski.
- Uzasadnienie znaczenia celowanej terapii zakażeń *H. pylori* wobec narastającej oporności tych bakterii na klarytromycynę, lewofloksacynę oraz utrzymującej się na wysokim poziomie oporności na metronidazol, a także wobec pojawiania się szczepów *H. pylori* wielolekoopornych.

P-4. Karczewska E, Wojtas-Bonior I, Sito E, Zwolińska-Wcisło M, Budak A. Primary and secondary *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin, metronidazole, amoxicillin and levofloxacin in the southern part of Poland. *Pharmacol Rep.* 2011, 63(3):799-807. [online] http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2011/3_799.pdf [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 2,445; pkt. MNiSW: 25

Cel badań

- Ocena pierwotnej i wtórnej oporności szczepów *H. pylori*, wyizolowanych od dorosłych pacjentów z regionu Małopolski, głównie Krakowa i okolic, na stosowane w eradykacji zakażenia leki przeciwbakteryjne (amoksycylina, metronidazol, klarytromycyna oraz lewofloksacyna).
- Monitorowanie narastania/spadku oporności *H. pylori* na leki stosowane w terapii.

Badaniami objęto pacjentów, zgłaszających się do poradni gastrologicznej w Krakowie z objawami dyspepsji, w okresie od grudnia 2006 roku do grudnia 2008 roku. Dziewięćdziesięciu z tych pacjentów nigdy nie było leczonych w związku z zakażeniem *H. pylori*, natomiast u pozostałych 25 potwierdzono brak efektów terapeutycznych stosowanego wcześniej leczenia.

Wycinki błony śluzowej żołądka, pobrane z trzonu i antrum podczas gastrokopii, transportowano do pracowni mikrobiologicznej na podłożu Portagerm Pylori (bioMerieux Polska sp. z o.o.). Po homogenizacji w szklanych, jałowych moździerzach, materiał wysiewano na podłoże Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (bioMerieux Polska sp. z o.o.) oraz Schaedler Agar z dodatkiem 5% krwi baraniej i suplementem selekcyjnym DENT (Oxoid, Argentia, Polska). Hodowlę inkubowano w warunkach mikroaerofilnych, w temperaturze 37°C przez okres od 2 do 10 dni.

Wyizolowano 115 szczepów *H. pylori*.

Oznaczenie lekowrażliwości szczepów *H. pylori* na amoksycylinę, metronidazol, klarytromycynę oraz lewofloksacynę wykonywano metodą ilościową z zastosowaniem plastikowych pasków nasasyconych antybiotykiem w gradiencie stężeń (E-test, bioMerieux Polska sp. z o.o.). Test wykonywano w celu oznaczenia minimalnego stężenia leku hamującego wzrost bakterii (MIC ang. *minimal inhibitory concentration*), wartości podawano w mg/l.

Badania prowadzono wobec szczepu wzorcowego *H. pylori* ATCC 43504.

W kategoryzacji szczepów na wrażliwe i odporne, w oparciu o obowiązujące w tym czasie wytyczne, dla szczepów opornych przyjęto następujące wartości graniczne MIC:

amoksycylina	> 1 mg/l
metronidazol	> 4 mg/l
klarytromycyna	≥ 1 mg/l
lewofloksacyna	1 mg/l

Omówienie wyników

Amoksycylina

Wszystkie badane szczepy *H. pylori* były wrażliwe na amoksycylinę. Wzrost większości szczepów (95% izolowanych od chorych przed leczeniem i 80% od pacjentów po leczeniu)

hamowany był przy wartości $MIC \leq 0,016$ mg/l. Nieco wyższe wartości MIC, będące wciąż w zakresie wrażliwości na amoksycylinę, zanotowano tylko dla 5% izolatów od pacjentów przed leczeniem oraz aż dla 20% szczepów *H. pylori* wyizolowanych od pacjentów po leczeniu.

Wyniki potwierdzają, że szczepy *H. pylori* nadal pozostają wrażliwe na amoksycylinę, jednak niepokojące wydaje się przesunięcie MIC dla amoksycyliny w kierunku wyższych wartości, zwłaszcza wobec szczepów izolowanych od pacjentów po leczeniu.

Może to oznaczać pojawienie się w przyszłości szczepów opornych na ten lek, co znacznie obniżyłoby efektywność leczenia zakażeń *H. pylori*.

Metronidazol

Odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol wynosił 44%. Pierwotna i wtórna oporność na ten chemioterapeutyk sięgała odpowiednio 37% oraz 72% ($p = 0,002$). Wysoką oporność na metronidazol ($MIC \geq 256$ µg/ml) odnotowano dla 20% oraz 44% szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów odpowiednio przed i po leczeniu.

Zbliżone wyniki uzyskano w ogólnopolskich badaniach przeprowadzonych w okresie od 2001 do 2004 roku, w których pierwotna oporność na metronidazol wynosiła 41%, a wtórna 68%. Łączna oporność na ten chemioterapeutyk sięgała natomiast 46% (49)

Klarytromycyna

Łącznie 34% szczepów *H. pylori* było opornych na klarytromycynę, a odsetek izolatów cechujących się wtórną opornością był znamienne wyższy od odsetka szczepów pierwotnie opornych (80% vs 21%, $p < 0,001$). Wartość $MIC \leq 0,016$ mg/l wykazano dla 74% szczepów izolowanych od pacjentów przed leczeniem oraz dla 20% po leczeniu. Dla pozostałych szczepów odnotowano wartości MIC w zakresie od 0,38 do 64 mg/l, które odpowiadały średniej wrażliwości lub oporności.

W badaniach przeprowadzonych w różnych ośrodkach w Polsce (Warszawa, Płock, Rzeszów, Sanok, Katowice) w latach 2001-2004, łącznie 28% szczepów *H. pylori* było opornych na klarytromycynę. Pierwotna oporność na ten antybiotyk była niemal taka sama, jak w omawianych badaniach własnych i sięgała 22%, natomiast zanotowano mniejszy odsetek szczepów wykazujących wtórną oporność – 54%. Wyniki pierwotnej oporności na klarytromycynę, uzyskane w ośrodkach biorących udział w badaniach, znacznie różniły się w zależności od regionu, jak również pomiędzy dorosłymi i dziećmi (49).

Konsensus Maastricht III 2005 zaleca wykluczenie stosowania klarytromycyny lub wykonanie antybiogramu przed wprowadzeniem jej do leczenia eradykacyjnego, jeżeli pierwotna oporność *H. pylori* na klarytromycynę w danej populacji jest wyższa niż 15%-20%. Zgodnie z powyższymi danymi, w Polsce, a zwłaszcza w regionie Małopolski, nie powinno się stosować klarytromycyny w terapii zakażenia *H. pylori* bez wstępnej oceny lekowrażliwości.

Wykazano, że oporność na klarytromycynę jest niemal równoznaczna z niepowodzeniem terapii eradykacyjnej (50). Z tego względu powinno się oznaczać wrażliwość na ten lek przed każdorazowym wprowadzeniem go do terapii.

Jednoczesna oporność na metronidazol i klarytromycynę

Podwójna oporność na metronidazol oraz klarytromycynę została potwierdzona u 23% (27/115) szczepów *H. pylori*. Odsetek szczepów wykazujących pierwotną oraz wtórną oporność na te leki wynosił odpowiednio 13% (12/90) i 60% (15/25).

Lewofloksacyna

Oporność na lewofloksacynę potwierdzono u 5% szczepów *H. pylori*, a pierwotna i wtórna oporność na ten lek wynosiła odpowiednio 2% oraz 16% ($p = 0,006$). Aktywność lewofloksacyny wobec badanych szczepów była dość wysoka, większość szczepów (89%

izolowanych od pacjentów przed leczeniem oraz 76% po leczeniu) wykazywała wartości MIC z zakresu od 0,032 mg/l do 0,125 mg/l.

Biorąc pod uwagę dużą rozpiętość w wartościach MIC dla lewofloksacyny wobec badanych szczepów *H. pylori* można przypuszczać, że w przyszłości odsetek szczepów opornych na ten lek będzie się zwiększał.

Jednoczesna oporność na metronidazol, klarytromycynę i lewofloksacynę

Na uwagę zasługuje fakt, że łącznie 4% (5/115) szczepów *H. pylori* charakteryzowało się opornością jednocześnie na trzy leki – metronidazol, klarytromycynę oraz lewofloksacynę. Odsetek izolatów z pierwotną oraz wtórną opornością na te leki wynosił odpowiednio 1% (1/90) oraz 16% (4/25).

Duże obawy dotyczące skuteczności eradykacji zakażeń *H. pylori* w przyszłości budzi pojawianie się szczepów wielolekoopornych z podwójną i potrójną opornością.

Przeprowadzone badania mają pewne ograniczenia wynikające z braku informacji na temat wrażliwości badanych szczepów *H. pylori* pochodzących od pacjentów będących już po nieskutecznym pierwszym, czy nawet drugim leczeniu, zanim zastosowano kolejną terapię. Być może wykazany w badaniach wysoki odsetek szczepów o wtórnej oporności na klarytromycynę czy metronidazol mógł być spowodowany tym, że część pacjentów już przed rozpoczęciem leczenia była zakażona szczepami opornymi.

Pięciu spośród badanych 25 pacjentów po leczeniu, przeszło dwie, a jeden pacjent, trzy nieskuteczne terapie.

Wnioski

- Wysoki odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol i klarytromycynę, podstawowe leki stosowane w terapii zakażeń *H. pylori*, oraz pojawianie się izolatów wielolekoopornych z podwójną i potrójną opornością, wskazuje na konieczność zastąpienia leczenia empirycznego pierwszego rzutu leczeniem celowanym. Mogłoby to wpłynąć na poprawę efektywności leczenia i ograniczyć narastanie oporności szczepów.

P-3. Karczewska E, Klesiewicz K, Skiba I, Wojtas-Bonior I, Sito E, Czajewski K, Zwolińska-Wcisło M, Budak A. Variability in prevalence of *Helicobacter pylori* strains resistant to clarithromycin and levofloxacin in Southern Poland. *Gastroenterol Res Pract.* 2012, Article ID 418010, 7 pages. [online]
<https://www.hindawi.com/journals/grp/2012/418010/> [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

Wprowadzenie

Głównym mechanizmem nabywania oporności bakterii na lewofloksacynę są mutacje. Dotyczą one genów odpowiedzialnych za syntezę gyrazy DNA i topoizomerazy IV oraz białka biorącego udział w czynnym usuwaniu leku z komórki (51).

H. pylori należy do bakterii, które szybko rozwijają oporność podczas leczenia lewofloksacyną. Wysokie zużycie fluorochinolonów w wielu innych zakażeniach poza przewodem pokarmowym to jedna z głównych przyczyn narastania oporności szczepów *H. pylori* na lewofloksacynę. Potwierdzają to publikowane wyniki badań prowadzonych w różnych regionach świata (52).

W 2012 roku lewofloksacyna została włączona do podstawowych schematów leczenia zakażeń *H. pylori*. Szybkie narastanie oporności na ten lek wywołuje obawy o możliwość zmniejszenia

efektywności leczenia empirycznego z udziałem lewofloksacyny, choć wprowadzenie tego leku do terapii zakażeń *H. pylori* budziło wiele nadziei na zwiększenie skuteczności leczenia.

Oporność klinicznych szczepów *H. pylori* na klarytromycynę wynika przede wszystkim z mutacji punktowych, obejmujących jedną lub kilka par zasad, w obrębie jednego genu. Mutacje te polegają na tranzykcji adeniny do guaniny (pozycja 2142 lub 2143) lub transwersji adeniny do cytozyny (pozycja 2142) w genie 23S rRNA (mutacje te znajdują się w domenie V 23S rRNA, która ma wpływ na drugorzędową strukturę 23S rRNA), prowadząc do modyfikacji miejsca docelowego, a co za tym idzie, zmniejszenia wiązania klarytromycyny do rybosomu (51, 53).

Najczęściej spotykane mutacje to A2143G, A2142G lub A2142C. Częstość ich występowania różni się w zależności od regionu geograficznego. Badania przeprowadzone w 12 ośrodkach na całym świecie (w tym w Polsce) wykazały, że w szczepach *H. pylori* opornych na klarytromycynę dominuje mutacja A2143G (69,8%).

Mutacje te można wykryć stosując metodę Real-time PCR i PCR-RFLP, co umożliwia uzyskanie wyniku w ciągu kilku godzin, zanim zostanie wprowadzona terapia eradykacyjna.

Cel badań

- Narastająca oporność *H. pylori* na stosowane w leczeniu antybiotyki i chemioterapeutyki staje się poważnym problemem terapeutycznym, a obowiązujące rekomendacje polskie PTG-E i europejskie EHSG zalecają ciągłe monitorowanie lekowrażliwości. Celem przedstawionych badań było więc porównanie pierwotnej i wtórnej oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę (izolowanych w latach 2006-2008) i lewofloksacynę (2009-2011).

Omówienie wyników

Badaniami objęto 220 pacjentów z objawami dyspepsji, zgłaszających się do poradni gastrologicznej w Krakowie. Stu pięćdziesięciu trzech pacjentów nigdy wcześniej nie było leczonych w związku z zakażeniem *H. pylori*, natomiast u pozostałych 67 potwierdzono brak efektu terapeutycznego stosowanego wcześniej leczenia. W badaniu mikrobiologicznym obecność *H. pylori* potwierdzono u 51 (23%; 51/220) badanych.

W latach 2009-2011, 22% (11/51) szczepów *H. pylori* było opornych na klarytromycynę a pierwotna i wtórna oporność na ten lek wynosiła odpowiednio 19% (8/43) i 38% (3/8). Oporność na lewofloksacynę potwierdzono u 16% (8/51) szczepów *H. pylori*, a pierwotna i wtórna oporność to odpowiednio 12% (5/43) i 38% (3/8).

W latach 2006-2008 łącznie 34% (39/115) szczepów *H. pylori* było opornych na klarytromycynę, a odsetek izolatów o wtórnej oporności był znamienne wyższy w porównaniu do pierwotnie opornych (80% 20/25 vs 21%, 19/90 $p < 0.001$). Wartość $MIC \leq 0,016$ mg/l wykazano dla 74% szczepów izolowanych od pacjentów przed leczeniem oraz tylko dla 20% po leczeniu. Dla pozostałych szczepów odnotowano wartości MIC w zakresie od 0,38 do 64 mg/l, co odpowiadało średniej wrażliwości lub oporności.

Oporność na lewofloksacynę potwierdzono u 5% (6/115) szczepów *H. pylori*, a pierwotna i wtórna oporność na ten lek wynosiła odpowiednio 2% (2/90) oraz 16% (4/25) ($p = 0,002$). Aktywność lewofloksacyny wobec badanych szczepów była dosyć wysoka, z przewagą wartości MIC od 0,032 mg/l do 0,125 mg/l dla 89% oraz 76% szczepów izolowanych od pacjentów, odpowiednio przed i po leczeniu.

Powyższe wyniki badań dotyczące monitorowania oporności na klarytromycynę i lewofloksacynę (2006-2008) były już publikowane w pracy P4. W omawianej publikacji zostały

przytoczone dla porównania z wynikami uzyskanymi w badaniach późniejszych (2009-2011), w celu wykazania narastania lub spadku oporności szczepów w tych latach.

Badania monitorowania oporności *H. pylori* prowadzone na terenie Małopolski potwierdzają wzrastającą oporność szczepów na lewofloksacynę oraz malejącą oporność na klarytromycynę w danym okresie czasu (2009-2011), w porównaniu z wynikami z lat poprzednich.

Pomimo istotnego zmniejszenia liczby szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę ($p < 0,05$), ich odsetek nadal utrzymuje się na wysokim poziomie (powyżej 20%), co uzasadnia konieczność stałego monitorowania wrażliwości na ten lek. Spadek odsetka szczepów opornych mógł być skutkiem mniejszego zużycia klarytromycyny na rzecz lewofloksacyny. Dzięki prowadzonym w Małopolsce badaniom opisywanym powyżej, istniała możliwość celowanego leczenia prowadzonego zgodnie z wynikiem antybiogramu. W przypadku braku możliwości oznaczenia lekowrażliwości, do leczenia włączano lewofloksacynę, co mogło przyczynić się do zahamowania narastania oporności na klarytromycynę.

Oporność na lewofloksacynę w ciągu 5 lat wzrosła z 5% do 16%. W 2012 roku lek ten został wprowadzony do podstawowych schematów leczenia zakażeń *H. pylori* zalecanych przez EHSZ jako leczenie drugiego rzutu (54). W rekomendacjach EHSZ z 2005 roku i PTG-E z 2008 roku istnieje jedynie informacja o możliwości zastosowania lewofloksacyny w terapii trzeciego rzutu leczenia zakażenia *H. pylori* (55,56)

Wysoka skuteczność terapii zakażeń *H. pylori* z użyciem lewofloksacyny mogła być przyczyną częstszego stosowania tego leku w ostatnich latach, zwłaszcza w regionach, gdzie oporność szczepów na klarytromycynę przekraczała 20%. Poza tym fluorochinolony stosowane są powszechnie w zakażeniach dróg moczowych oraz dróg oddechowych, co zdecydowanie mogło się przyczynić do wzrostu oporności szczepów *H. pylori* na lewofloksacynę.

Wnioski

- Wyniki przeprowadzonych badań uzasadniają potrzebę ciągłego monitorowania lekooporności *H. pylori* na leki stosowane w terapii empirycznej.
- Wykazano szybki wzrost oporności na lewofloksacynę, co uzasadnia obawy związane ze stosowaniem tego leku w terapii empirycznej pierwszego rzutu. Opcja taka jest sporadycznie stosowana, mimo iż pozostaje w sprzeczności z rekomendacjami.
- Jednocześnie potwierdzono spadek oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę w stosunku do lat ubiegłych, ale odsetek tych szczepów pozostaje nadal na wysokim poziomie przekraczającym 20% i wyklucza stosowanie tego leku w przypadku braku możliwości wykonania testu wrażliwości dla wyizolowanych szczepów.
- Badania potwierdzają szybką zmienność wrażliwości/oporności szczepów *H. pylori* na lewofloksacynę i klarytromycynę.

P-2. Karczewska E, Klesiewicz K, Wojtas-Bonior I, Skiba I, Sito E, Czajewski K, Zwolińska-Wcisła M, Budak A. Levofloxacin resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients in southern Poland, between 2006–2012. *Acta Pol Pharm.* 2014, 71(3):477-483. [online] http://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2014/3/477.pdf [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

IF: 0,737; pkt. MNiSW: 15

Cel badań

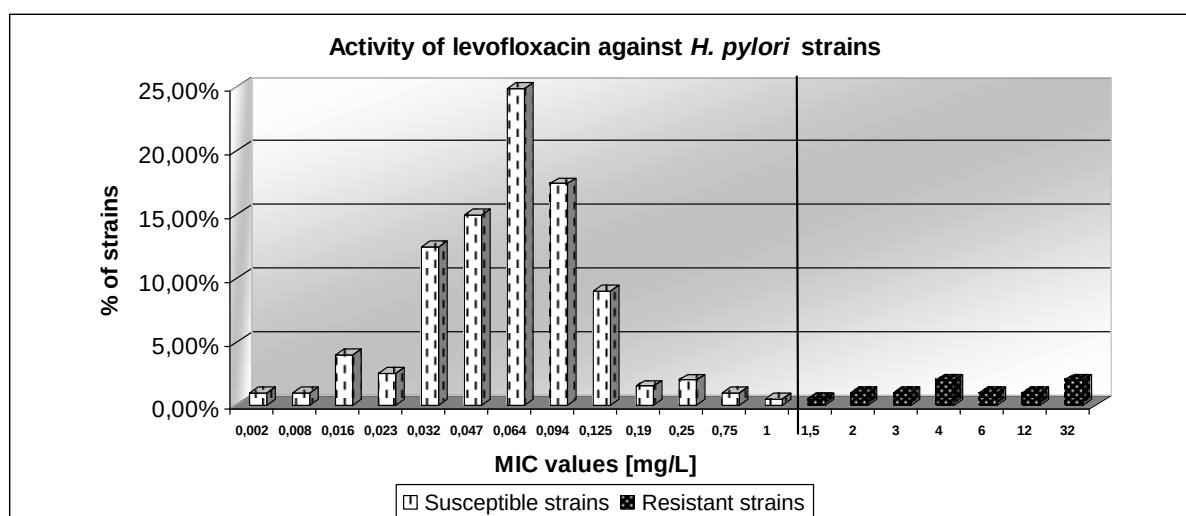
Przesłanką do podjęcia badań oceny wrażliwości na lewofloksacynę szczepów *H. pylori* izolowanych w Polsce w latach 2006-2012, była potrzeba ciągłego monitorowania narastania oporności na ten lek, zwłaszcza dla szczepów pochodzących od pacjentów z regionu Małopolski, w którym potwierdzony jest wysoki odsetek szczepów opornych na klarytromycynę (> 20%).

Omówienie wyników

Badanie mikrobiologiczne wykonywane w kierunku obecności *H. pylori* w biopsatach błony śluzowej pobranych podczas gastroskopii z antrum i trzonu żołądka przeprowadzono w grupie 811 pacjentów z objawami dyspepsji i wskazaniami do gastroskopii, zgłaszających się do poradni gastrologicznej w Krakowie. Zakażenie *H. pylori* potwierdzono u 210 (25.9%) badanych.

Wyizolowane w badaniu mikrobiologicznym szczepy w większości pobrano od pacjentów w okresie przed pierwszym leczeniem zakażenia *H. pylori* (81%, 171/210), natomiast 19% (39/210) szczepów wyizolowano od badanych, którzy przeszli już jedną, nieskuteczną terapię. Interpretacji wyników dokonywano zgodnie z EUCAST Clinical Breakpoint Table 2011, dla *H. pylori* (57).

Aktywność lewofloksacyny wobec badanych szczepów wyrażoną w MIC przedstawia poniższy wykres. Szczepy, dla których potwierdzono wartości MIC powyżej 1 mg/l przyjęto jako oporne.



Wśród badanych szczepów *H. pylori* 8,10% (17/210) wykazało oporność na lewofloksacynę.

W grupie pacjentów przed leczeniem wyizolowano 5,85% (10/171) szczepów opornych na lewofloksacynę, natomiast wśród szczepów wyizolowanych od pacjentów po leczeniu oporność potwierdzono w 17,95% (7/39) przypadków.

Przeprowadzono także analizę wielolekooporności badanych szczepów *H. pylori*.

U 11 spośród opornych na lewofloksacynę szczepów potwierdzono także oporność na inne leki stosowane w terapii zakażenia *H. pylori*. Wyniki zamieszczono w poniższej tabeli.

Lek	Liczba opornych szczepów <i>H. pylori</i>
lewofloksacyna	6
lewofloksacyna + klarytromycyna	1
lewofloksacyna + metronidazol	2
lewofloksacyna + klarytromycyna + metronidazol	8
Wszystkie	17

Wnioski

- Jak wynika z badań, częstość szczepów *H. pylori* opornych na lewofloksacynę pochodzących od pacjentów z regionu Małopolski jest niska, dlatego wprowadzenie tego fluorochinolonu do terapii zakażeń *H. pylori* może zwiększyć odsetek eradykacji zakażenia.
- Mała liczba szczepów opornych na lewofloksacynę potwierdza, że wprowadzenie potrójnej terapii z lewofloksacyną w drugim rzucie leczenia stanowi dobrą alternatywę w leczeniu zakażeń *H. pylori*, zwłaszcza w regionach o wysokiej częstości szczepów opornych na klarytromycynę (> 20%).
- Badania wykazały jednak, że wśród szczepów *H. pylori* opornych na lewofloksacynę pojawiają się także szczepy odporne dodatkowo na klarytromycynę lub metronidazol oraz na klarytromycynę i metronidazol jednocześnie. W związku z tym należy podkreślić konieczność ciągłego monitorowania narastania oporności szczepów na lewofloksacynę mimo niskiego, potwierdzonego w badaniach odsetka szczepów opornych na ten lek.

W czasie wykonywanych badań obowiązywały rekomendacje polskie PTG-E 2008 i wytyczne Europejskie Maastricht IV /Florence Consensus Report 2012.

P-1. Karczewska E, Klesiewicz K, Nowak P, Sito E, Skiba I, Zwolińska-Wcisło M, Mach T, Budak A. Empirical versus targeted treatment of *Helicobacter pylori* infections in southern Poland according to the results of local antimicrobial resistance monitoring. W: Bruna Maria Roesler, redaktor. Trends in *Helicobacter pylori* Infection. Wydawnictwo Intech, Rijeka 2014, rozdz. 12, 321-347. [online] <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/46485.pdf> [dostęp: 16 stycznia 2017r.]

Wprowadzenie

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na skuteczność terapii zakażenia *H. pylori*, o czym pisałam już wcześniej, jest wrażliwość bakterii na stosowane w leczeniu antybiotyki oraz chemioterapeutyki. Narastanie oporności szczepów *H. pylori* stanowi poważny problem terapeutyczny wynikający z obniżenia skuteczności klinicznej leczenia empirycznego obowiązującego do tej pory w eradykacji tego zakażenia. Wskazuje to i uzasadnia potrzebę wprowadzenia oceny lekowrażliwości szczepów *H. pylori* izolowanych z zakażeń przed zastosowaniem leczenia, a nie jak zaleca PTG-E, dopiero po nieskutecznej terapii drugiego rzutu lub w przypadku kiedy ilość szczepów w danym regionie opornych na klarytromycynę przekracza 20%.

Przestrzeganie tych zasad oraz zaleceń zawartych w rekomendacjach PTG-E oraz EHSB wymaga prowadzenia ciągłego, regionalnego monitorowania narastania oporności szczepów izolowanych z zakażeń *H. pylori*.

Wprowadzenie terapii celowanej wg wykonanego wcześniej antybiogramu lub odpowiednich badań genetycznych identyfikujących oporność na klarytromycynę w czasie krótszym, niż wykonanie antybiogramu, mogłoby przyspieszyć decyzję lekarza co do wyboru modelu leczenia. Umożliwiłoby także uzyskiwanie szybszych efektów terapeutycznych, bez dodatkowych obciążeń pacjenta wynikających z wielokrotnego leczenia.

Zagrożenie narastania oporności oraz możliwość obniżenia skuteczności klinicznej leczenia empirycznego zakażenia *H. pylori* stanowiło przyczynę podjęcia powyższego tematu badawczego.

Cel badań

- Kontynuacja badań dotyczących monitorowania zakażeń o etiologii *H. pylori* w Małopolsce oraz monitorowanie narastania oporności szczepów na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia według obowiązujących rekomendacji EHSB i PTG-E.

Badania prowadzone były w celu obserwacji zmian profilu lekowrażliwości *H. pylori*, co umożliwi dokonywanie wyboru prawidłowego modelu leczenia warunkującego eradykację zakażenia.

- Uzasadnienie znaczenia celowanej terapii zakażeń *H. pylori* wobec narastającej oporności tych bakterii na klarytromycynę i lewofloksacynę oraz utrzymującej się na wysokim poziomie oporności na metronidazol, a także wobec pojawiania się szczepów *H. pylori* wielolekoopornych.
- Identyfikacja gatunku *H. pylori* przy użyciu metod genetycznych (16S rRNA, *ureB*, *ureC*, *vacA*).
- Wykrywanie metodami genetycznymi obecności genu *cagA* kodującego immunogenne białko CagA będące jednym z wyznaczników patogenności bardziej chorobotwórczych szczepów *H. pylori*.
- Wykrywanie w klinicznych szczepach *H. pylori* mechanizmu oporności na klarytromycynę, związanego z mutacjami punktowymi w genie 23S rRNA, metodą genetyczną PCR-RLFP. Wprowadzenie tej metody jako rutynowo wykonywanego badania mogłoby przyspieszyć decyzję lekarza co do wyboru modelu leczenia z pominięciem sporządzania antybiogramu.

Omówienie wyników

Od listopada 2010 roku do czerwca 2013 zbadano 316 pacjentów (190 kobiet oraz 154 mężczyzn) z chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego i wskazaniami do gastroskopii. Materiał do badań stanowiły wycinki błony śluzowej z trzonu i antrum żołądka pobrane podczas gastroskopii od pacjentów zgłaszających się do poradni gastrologicznych na terenie Krakowa.

Z pobranego od pacjentów materiału klinicznego wyizolowano 73 szczepy *H. pylori*, których obecność w pobranych biopsjach błony śluzowej żołądka została potwierdzona przez szybki test urazowy po wykonanej gastroskopii oraz w badaniu mikrobiologicznym biopsatów. Na podstawie uzyskanych wyników można przyjąć, że częstość występowania zakażenia w tym okresie na terenie Małopolski wynosiła 23,1% (73/316).

W poniższej tabeli zestawiono wyniki lekooporności badanych szczepów *H. pylori* na antybiotyki i chemioterapeutyki rekomendowane w leczeniu zakażenia.

Lek przeciwbakteryjny	Liczba szczepów opornych N (%) (n = 73)
Klarytromycyna	17 (23.3)
Metronidazol	29 (39.7)
Lewofloksacyna	9 (12.3)
Amoksycylina	1 (1.4)
Tetracyklina	0 (0)

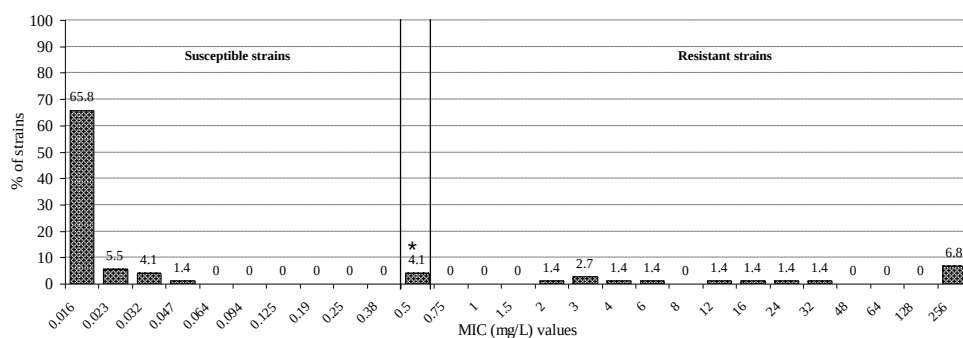
W badaniach potwierdzono obecność jednego szczepu opornego na amoksycylinę. Oporność szczepów *H. pylori* na amoksycylinę jest bardzo rzadka, a w regionie Małopolski opisana po raz pierwszy. Wszystkie szczepy były wrażliwe na tetracyklinę.

Wśród badanych szczepów wykazano obecność podwójnej i potrójnej oporności na antybiotyki/chemioterapeutyki. Wyniki zestawiono w tabeli.

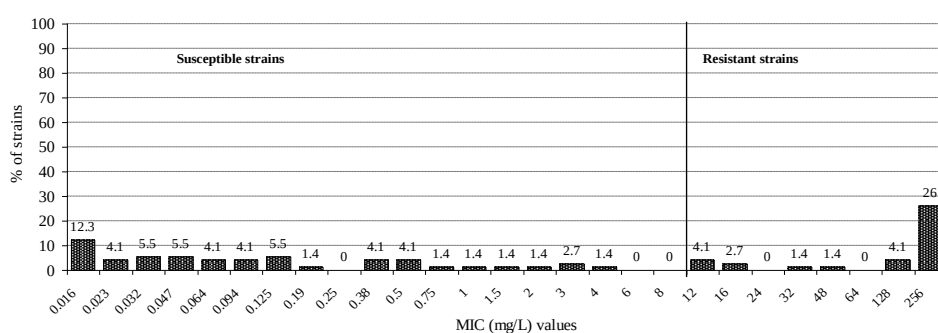
Lek przeciwbakteryjny		Liczba szczepów opornych N (%) (n = 73)
Szczepy oporne na jeden lek	Klarytromycyna	6 (8.2)
	Metronidazol	16 (21.9)
	Lewofloksacyna	4 (5.4)
Szczepy oporne na dwa leki	Klarytromycyna + metronidazol	9 (12.3)
	Metronidazol + lewofloksacyna	3 (4.1)
	Klarytromycyna + lewofloksacyna	1 (1.4)
Szczepy oporne na cztery leki	Klarytromycyna + metronidazol + lewofloksacyna + amoksycylina	1 (1.4)

Wśród szczepów o podwójnej oporności, najwięcej (12,3%) było opornych jednocześnie na klarytromycynę i metronidazol. Poczwórną oporność potwierdzono dla jednego szczepu (1,4%), który był oporny na klarytromycynę, metronidazol, lewofloksacynę i amoksycylinę.

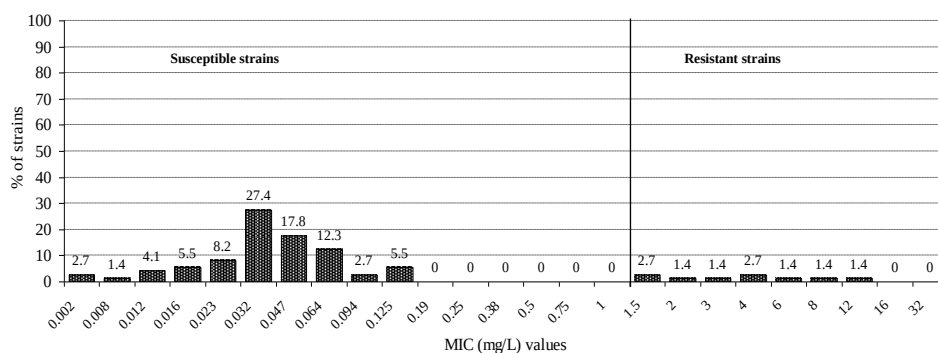
Ponadto wykonano analizę rozkładu wartości MIC dla klarytromycyny (Ryc. 1), metronidazolu (Ryc. 2), lewofloksacyny (Ryc. 3), amoksycyliny (Ryc. 4) i tetracykliny (Ryc. 5). Potwierdzono dynamiczny wzrost oporności *H. pylori* na monitorowane leki. Wyniki przedstawiono na wykresach.



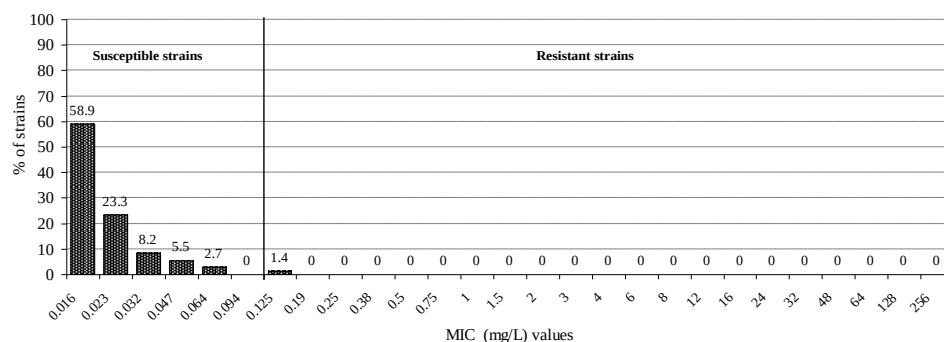
Ryc. 1. Rozkład wartości MIC klarytromycyny dla szczepów *H. pylori* (graniczne wartości kliniczne wg EUCAST: oporne: MIC > 0,5 mg/l; wrażliwe: MIC ≤ 0,25 mg/l); * szczepy, dla których wartości MIC wynosiły 0,5 mg/l uważane są za oporne na klarytromycynę zgodnie z wynikami badania PCR-RFLP.



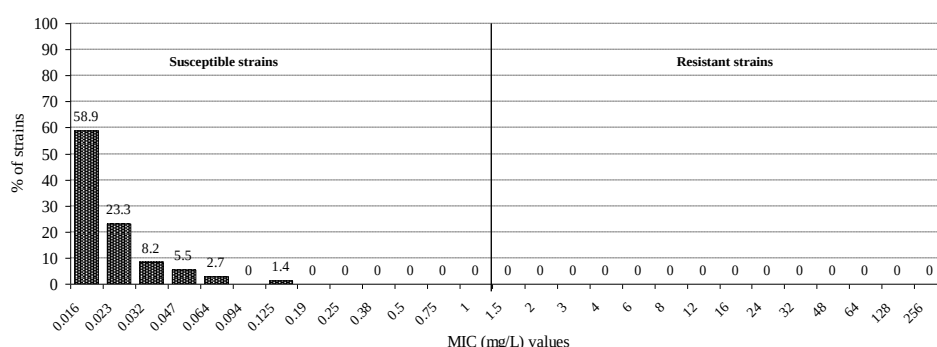
Ryc.2. Rozkład wartości MIC metronidazolu dla szczepów *H. pylori* (graniczne wartości kliniczne wg EUCAST: oporne: MIC > 8 mg/l; wrażliwe: MIC ≤ 8 mg/l).



Ryc.3. Rozkład wartości MIC lewofloksacyny dla szczepów *H. pylori* (graniczne wartości kliniczne wg EUCAST: oporne: MIC > 1 mg/l; wrażliwe: MIC ≤ 1 mg/l).



Ryc.4. Rozkład wartości MIC amoksycyliny dla szczepów *H. pylori* (graniczne wartości kliniczne wg EUCAST: oporne: MIC > 0,12 mg/l; wrażliwe: MIC ≤ 0,12 mg/l).



Ryc.5. Rozkład wartości MIC tetracykliny dla szczepów *H. pylori* (graniczne wartości kliniczne wg EUCAST: oporne: MIC > 1 mg/l; wrażliwe: MIC ≤ 1 mg/l).

Należy podkreślić, że badania potwierdziły także obecność szczepów o wysokiej oporności na klarytromycynę (6,8%; MIC ≥ 256mg/l) i metronidazol (26%; MIC ≥ 256mg/l).

Narastanie oporności na klarytromycynę wynika prawdopodobnie z nadmiernego stosowania makrolidów w leczeniu wielu zakażeń, zwłaszcza dróg oddechowych. Częste stosowanie klarytromycyny i metronidazolu w leczeniu zakażeń *H. pylori* może być także przyczyną pojawiania się szczepów opornych jednocześnie na obydwa te leki.

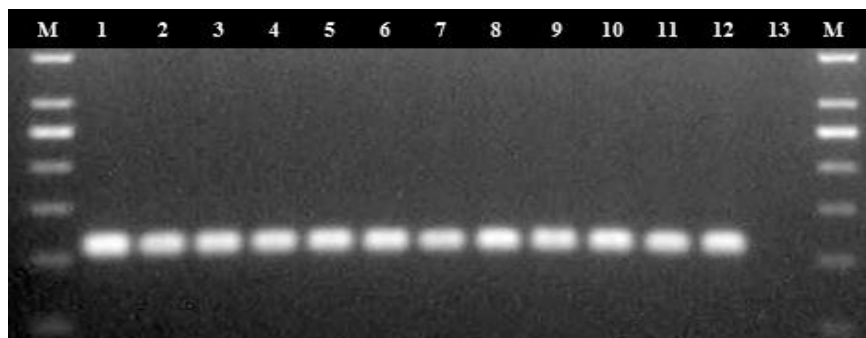
Potwierdzono także wzrost oporności badanych szczepów *H. pylori* na lewofloksacynę w stosunku do lat ubiegłych (5% w latach 2006-2008 vs 12,3%).

Wyniki badań potwierdzają potrzebę ciągłego lokalnego monitorowania narastania oporności szczepów *H. pylori* na leki stosowane w terapii tego zakażenia. Ponadto w celu przeprowadzenia skutecznego leczenia, z uwagi na ciągły i dynamiczny wzrost oporności, uzasadnione wydaje się wprowadzenie leczenia celowanego.

W celu potwierdzenia identyfikacji wyizolowanych szczepów *H. pylori* do gatunku, zbadano obecność genów: 16S rRNA, *ureB*, *ureC* oraz *vacA* przy użyciu metody PCR.

Wszystkie badane szczepy *H. pylori* (73) wykazały obecność genu 16S rRNA oraz *ureC*. Produkt reakcji PCR dla genu *vacA* wielkości 229 bp otrzymano dla 89% (65/73) badanych szczepów *H. pylori*. Prawdopodobnie u 11% (8/73) uległ on translokacji.

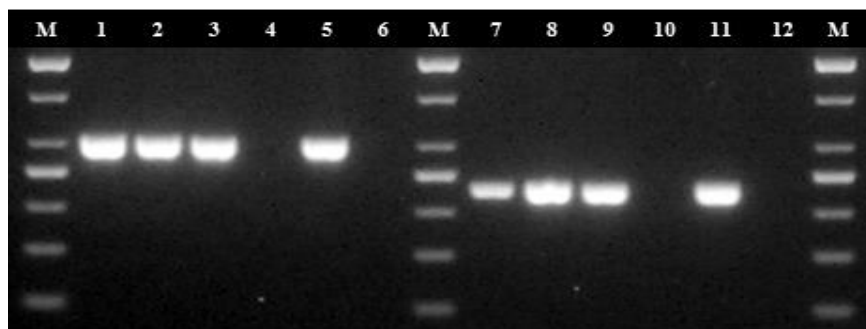
Poniższe zdjęcie przedstawia wyniki dla przykładowych próbek oraz szczepu wzorcowego *H. pylori* J99.

**Produkty genu 16S rRNA dla wybranych szczepów *H. pylori***

Ścieżki 1-11 szczepy badane, Ścieżka 12-szczep wzorcowy J99, Ścieżka 13-kontrola negatywna, M - marker wielkości DNA (O'GeneRuler 50bp DNA Ladder, Thermo Scientific, USA)

Metodą PCR dokonano także analizy patogenności wszystkich szczepów poprzez ocenę obecności genu *cagA* kodującego immunogenne białko *CagA*.

Produkt reakcji PCR dla genu *cagA* otrzymano dla 80,8% (59/73) szczepów, co potwierdza ich zwiększoną patogenność.

**Produkty genu *cagA* oraz *vacA* dla wybranych szczepów *H. pylori*.**

Ścieżki 1-3- szczepy kliniczne *H. pylori cagA+*, Ścieżka 4 - szczep kliniczny *cagA*-ujemny, Ścieżka 5 - kontrola pozytywna, Ścieżka 6-kontrola negatywna, Ścieżki 7-9 - szczepy kliniczne *H. pylori*, u których wykryto gen *vacA*, Ścieżka 10 - szczep kliniczny, dla którego nie wykryto genu *vacA*, Ścieżka 11 - kontrola pozytywna - szczep wzorcowy *H. pylori* J99, Ścieżka 12 - kontrola negatywna, M - marker wielkości DNA (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific)

Mechanizm oporności na klarytromycynę wykrywano metodą PCR-RFLP, umożliwiającą potwierdzenie obecności mutacji punktowych: A2143G, A2142G oraz A2142C w genie 23S rRNA.

Reakcje PCR-RFLP przeprowadzono dla szczepów wzorcowych: ATCC 700684 (szczep z mutacją A2143G powodującą oporność na klarytromycynę) ATCC 43504 (szczep wrażliwy na klarytromycynę), oraz dla szczepów klinicznych.

W celu oznaczenia obecności mutacji A2143G oraz A2142G przeprowadzono reakcję PCR z wykorzystaniem następujących starterów:

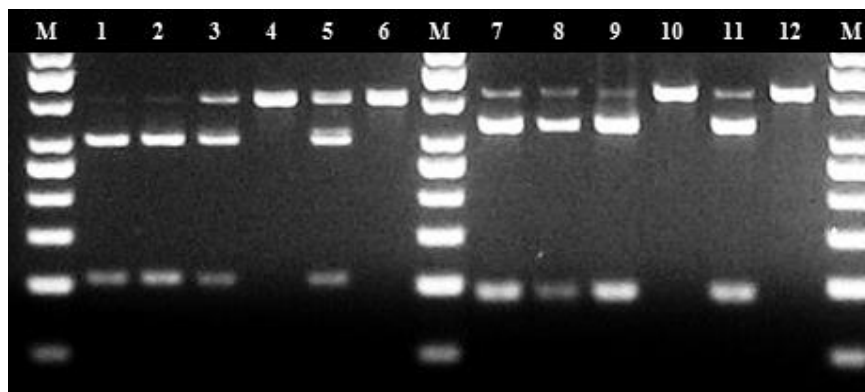
K1: 5'CCACAGCGATGTGGTCTCAG oraz

K2: 5'CTCCATAAGAGCCAAAGCCC

Mutację A2143G potwierdzono dla 12 (70,6%) spośród 17 szczepów opornych na klarytromycynę, natomiast A2142G dla 3 (17,6%) szczepów. Dla 2 (11,8%) szczepów nie wykryto żadnej z 3 badanych mutacji. Najprawdopodobniej w przypadku tych szczepów mamy

do czynienia z innym rodzajem mechanizmu oporności np. A2115G, G2141A, C2147G, T2190, czy też mechanizmem związanym z systemem pomp wyrzutu leku.

Obecności mutacji A2143G i A2142G nie potwierdzono w żadnym ze szczepów wrażliwych.



Analiza obecności mutacji A2143G oraz A2142G.

Ścieżki 1-4 wynik trawienia enzymem Eco31I szczepów klinicznych opornych na klarytromycynę, Ścieżka 5-kontrola dodatnia - szczep *H. pylori* ATCC 700684 z mutacją A2143G, Ścieżka 6 - kontrola ujemna, Ścieżki 7-10 wynik trawienia enzymem BbsI szczepów klinicznych opornych na klarytromycynę, Ścieżka 11 - kontrola dodatnia (szczep *H. pylori* z mutacją A2142G, Ścieżka 12 - kontrola ujemna, M - marker wielkości DNA (O'GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific).

Przedstawione wyniki, dotyczące częstości występowania szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę na terenie Małopolski (23,3%), mają bardzo istotne znaczenie w podejmowaniu decyzji przy wyborze modelu leczenia zakażenia *H. pylori* w tym regionie. Według aktualnie obowiązujących zasad, jeżeli oporność szczepów *H. pylori* na klarytromycynę w danej populacji jest wyższa niż 20%, nie zaleca się stosowania tego antybiotyku bez uprzednio wykonanego testu wrażliwości.

W związku z powyższym zaleca się stałe, regionalne monitorowanie oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę, która stanowi jeden z podstawowych antybiotyków stosowanych w leczeniu zakażeń *H. pylori*.

ZALECENIE wynikające z przeprowadzonych badań:

NA TERENIE MAŁOPOLSKI NIE ZALECA SIĘ STOSOWANIA KLARYTROMYCYNY W LECZENIU ZAKAŻENIA *H. PYLORI* BEZ UPRZEDNIO WYKONANEGO TESTU WRAŻLIWOŚCI SZCZEPU NA TEN LEK, GDYŻ CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA SZCZEPÓW OPORNYCH NA KLARYTROMYCYNĘ W TYM REGIONIE JEST WIĘKSZA NIŻ 20%.

Wnioski

- Brak monitorowania narastania oporności i konkretnych danych, dotyczących częstości występowania szczepów *H. pylori* opornych na klarytromycynę czy też inny rekomendowany lek, uniemożliwia terapię celowaną i wykonywanie antybiogramu wcześniej, niż po niepowodzeniu drugiego leczenia zakażenia *H. pylori*.
- Powyższe badania dotyczące Małopolski, umożliwiają na tym terenie podejmowanie celowanej terapii zakażenia *H. pylori*.

- Wprowadzenie terapii celowanej jako leczenia pierwszego rzutu umożliwia uzyskiwanie szybszych efektów terapeutycznych oraz ogranicza zjawisko narastania oporności szczepów *H. pylori* na leki stosowane w terapii zakażenia.
- Badania genetyczne wykrywające mechanizm oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę mogą przyczynić się do przyspieszenia diagnostyki i identyfikacji szczepów opornych na klarytromycynę, co umożliwia podjęcie terapii celowanej w krótszym czasie, niż wykonanie antybiogramu.

2.3. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji

- Monitorowanie zakażenia *H. pylori* w latach 1997-2014 na terenie Małopolski potwierdziło spadek odsetka zakażeń w populacji dorosłych w kolejnych latach wykonywanych badań (83,9%; 61%; 51%; 25,9%; 23,1%).
- Monitorowanie lekowrażliwości szczepów *H. pylori* na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia wykazało narastanie oporności, a także pojawienie się szczepów wielolekoopornych.
- Badania potwierdzają szybką zmienność wrażliwości/oporności szczepów *H. pylori* na lewofloksacynę i klarytromycynę.
- Wśród szczepów *H. pylori* opornych na lewofloksacynę potwierdzono szczepy wielolekooporne co uzasadnia konieczność ciągłego monitorowania narastania oporności szczepów na lewofloksacynę mimo niskiego, potwierdzonego w badaniach odsetka szczepów opornych na ten lek.
- Wysoki odsetek szczepów *H. pylori* opornych na metronidazol i klarytromycynę, podstawowe leki stosowane w terapii zakażeń *H. pylori* oraz pojawienie się izolatów wielolekoopornych z podwójną i potrójną opornością, wskazuje na konieczność zastąpienia leczenia empirycznego pierwszego rzutu leczeniem celowanym, zgodnie z wykonanym antybiogramem, lub wynikami badań genetycznych. Mogłoby to wpłynąć na poprawę efektywności leczenia i ograniczyć narastanie oporności szczepów na te leki w Małopolsce
- Każde kolejne nieskuteczne leczenie zwiększa ryzyko selekcji szczepów opornych, co w konsekwencji prowadzić może w niedalekiej przyszłości do braku możliwości eradykacji zakażenia.
- Aktualnie na terenie Małopolski nie zaleca się stosowania klarytromycyny w leczeniu zakażeń *H. pylori* bez uprzednio wykonanego testu wrażliwości na ten lek. Częstość występowania szczepów opornych na klarytromycynę w tym regionie przekracza 20%.
- Badania genetyczne wykrywające oporność na klarytromycynę w szczepach *H. pylori* mogą przyczynić się do przyspieszenia diagnostyki i identyfikacji szczepów opornych na klarytromycynę, co umożliwiłoby podjęcie terapii celowanej w krótszym czasie.
- Wyniki przeprowadzonych badań uzasadniają potrzebę dalszego monitorowania lekooporności szczepów *H. pylori* na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia.
- Badania potwierdzają związek pomiędzy wirulencją szczepów *H. pylori* a nasileniem zmian patologicznych w górnym odcinku przewodu pokarmowego.
- Zakażenie żołądka szczepami *H. pylori* produkującymi immunogenną białko CagA (*H. pylori* CagA+) może zwiększać ryzyko rozwoju raka żołądka.

- Traktując immunogenną proteinę CagA jako biomarker związany z ryzykiem zachorowania na raka żołądka, zasadnym wydaje się stosowanie, nieinwazyjnego i taniego, immunoenzymatycznego testu ELISA wykrywającego przeciwciała anti-CagA w surowicy lub testu western blot w celu wczesnego wykrywania zakażenia szczepem chorobotwórczym *H. pylori* CagA+.
- Zastosowanie dwóch testów nieinwazyjnych, immunoenzymatycznego testu ELISA wykrywającego przeciwciała anti-CagA oraz ureazowego testu oddechowego C¹³UBT mogłoby być cennym narzędziem diagnostycznym wykrywającym jednocześnie aktywne zakażenie *H. pylori* oraz typ szczepu określający jego patogenność. Wynik badania potwierdzający zakażenie szczepem o zwiększonej wirulencji, produkującym onkoproteinę CagA, mógłby być dodatkowym wskazaniem do leczenia eradykacyjnego.
- Badania potwierdzają że poziom gastryny u chorych z GC (*gastric cancer*) oraz zakażenie szczepami *H. pylori* CagA+ to dwa markery mogące mieć znaczenie w rokowaniu choroby nowotworowej żołądka.
- Wykazano wysoki odsetek zakażeń szczepami *H. pylori* o większej patogenności (genotyp *cagA+*, *s1m1/s1m2*). Może to stanowić zagrożenie zwiększoną zachorowalnością na takie choroby, jak wrzód żołądka, wrzód dwunastnicy czy rak żołądka.
- Wyniki badań mikrobiologicznych, serologicznych i genetycznych potwierdziły obecność *H. pylori* w jamie ustnej, co nie dowodzi, że jama ustna jest źródłem reinfekcji żołądka po jego skutecznym leczeniu eradykacyjnym.

3. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

3.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Po ukończeniu studiów na kierunku biologia, na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, w 1976 roku w Krakowie, rozpocząłam pracę zawodową w Krakowskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek w Dziale Surowic Diagnostycznych (aktualnie Instytut Biotechnologii Surowic i Szczepionek BIOMED). Surowice te stosowane są w dochodzeniach epidemiologicznych do typowania serologicznego m.in. patogennych szczepów *Escherichia coli* czy *Salmonella spp.* Moim zadaniem było opracowanie technologii i pełnej dokumentacji do wdrożenia i uruchomienia produkcji kilku nowych surowic. W tym celu odbywałam szkolenia w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdańsku, w Zakładzie Bakteriologii i Typowania Fagowego. Zajmowałam się produkcją swoistych surowic diagnostycznych, ale przedmiotem mojego zainteresowania były także bakteriofagi, ich namnażanie i typowanie bakteriofagowe szczepów bakteryjnych, jako metoda dokładniejsza i cenniejsza w dochodzeniach epidemiologicznych, niż typowanie szczepów surowicami diagnostycznymi. W tym okresie zaczęłam bardziej koncentrować się na mikrobiologii i poszukiwaniu w Krakowie jednostki naukowej o profilu zbliżonym do moich zainteresowań.

W 1978 roku uzyskałam zgodę na pracę w ramach rocznego wolontariatu w Instytucie Mikrobiologii Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika w Krakowie, w Zakładzie Bakteriologii kierowanym przez prof. dr hab. Piotra B. Heczko. Brałam udział w badaniach prowadzonych w ramach międzynarodowego grantu, którego koordynatorem był prof. dr hab. Janusz Jeljaszewicz z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Zajmowałam się namnażaniem bakteriofagów gronkowcowych i typowaniem fagowym gronkowców.

W 1979 roku zostałam zatrudniona w Zakładzie Bakteriologii Instytutu Mikrobiologii AM w Krakowie na etacie młodszego asystenta. Badania naukowe, w których wówczas brałam

udział były wielokierunkowe, ale tematem wiodącym były gronkowce i ich udział w patomechanizmie zakażeń. Kontynuowałam badania dotyczące typowania serologicznego i fagowego gronkowców. Poznane i stosowane już wcześniej przeze mnie metody wykorzystywałam m.in. w badaniach, których celem było wykazanie różnic pomiędzy szczepami wyjściowymi a sztucznie wywołanymi mutantami i transduktantami *Staphylococcus aureus*. Wyniki tych badań potwierdziły, iż zmiany genotypowe indukowane przez środki mutagenne lub infekcję DNA pochodzenia fagowego wywołują nie tylko zmiany w składzie ściany komórkowej, ale doprowadzają także do powstania form otoczkowych szczepów, co zwiększa ich wirulencję. Badania te były kontynuowane na modelu zwierzęcym i pozwoliły na wykazanie zwiększonej wirulencji mutantów (Zał.4, cz.II, pkt B 1, Zał.4, cz II, pkt A, ppkt b 1)

Karczewska E, Więcek L, Heczko P. Effect of mutagenic factors and transducing phages on the changes in serological properties and sensitivity to bacteriophages in *Staphylococcus aureus*. Med Dośw Mikrobiol 1983; 35(2): 107-13

Karczewska E, Petrynka M, Heczko P. Pathogenicity of encapsulated mutants of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in mice. *Staphylococci*, Zbl Bakt (Suppl 14): Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1985

W tym samym czasie brałam także udział w badaniach dotyczących wpływu kwasów tłuszczowych wchodzących w skład łoju skórnoego na drobnoustroje stanowiące florę fizjologiczną skóry. Ponieważ wcześniejsze badania wykazały hamujący wpływ kwasów tłuszczowych na większość drobnoustrojów skórnych, a wpływ pobudzający stwierdzono dla *Propionibacterium granulosum*, drobnoustroju izolowanego często ze zmian trądzikowych, to wnioskowano, że metabolizm kwasów tłuszczowych w skórze może być czynnikiem decydującym o składzie i gęstości flory skóry. Postanowiono więc zbadać zależność pomiędzy składem kwasów tłuszczowych łoju skórnoego różnych osób a wpływem łoju na drobnoustroje *in vitro*. Badania potwierdziły zależność pomiędzy składem łoju skórnoego a płcią badanych osób oraz pobudzaniem lub hamowaniem wzrostu różnych gatunków bakterii. Pobudzanie wzrostu dotyczyło tylko *Propionibacterium granulosum*, a łoje wzmagające wzrost zawierały więcej kwasów C12, izoC12, C13, C17, C18, i C19 w stosunku do pozostałych (Zał. 4, cz II, pkt B 2)

Basta M, Karłowski K, **Karczewska E**, Heczko P. Relations between the inhibition and stimulation of microorganism growth and the composition of sebum. Przegl Epidemiol 1984; 38(4): 369-76

Od 1984 roku w ramach współpracy z I Katedrą i Kliniką Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Akademii Medycznej w Krakowie (później Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum) prowadziłam badania mikrobiologiczne żółci pobranej śródoperacyjnie od pacjentów z potwierdzoną kamicią żółciową. Jest to temat bardzo istotny pod względem klinicznym, gdyż zakażenie żółci prowadzić może do powikłań pooperacyjnych, takich jak sepsa lub zakażenie rany pooperacyjnej, a także zapalenia dróg żółciowych skutkującego ropniem lub marskością wątroby. Celem tych badań była analiza mikrobiologiczna i porównanie udziału tlenowej i beztlenowej flory bakteryjnej stanowiącej zakażenie żółci w trzech różnych grupach pacjentów (kamica żółciowa, kamica przewodowa bez stanu zapalnego i kamica przewodowa ze stanem zapalnym). Analiza zależności pomiędzy florą bakteryjną izolowaną z żółci a badaną grupą wykazała, iż jedynie w żółci pacjentów z zapaleniem dróg żółciowych częściej występowały co najmniej dwa gatunki bakterii tlenowych (z dominacją *Escherichia coli*) lub flora mieszana tlenowo-beztlenowa (z dominacją *Bacteroides fragilis*), Zał. 4, cz. II, pkt A, ppkt a 1.

Kosowski K, **Karczewska E**, Kasprowicz A, Andziak J, Heczko P. Bacteria in bile of patients with bile duct inflammation. Eur J Clin Microbiol 1987; 6(5): 575-8

Inne badania, w których brałam udział (1987-1990) dotyczyły zakażeń ran pooperacyjnych po zabiegach na układzie pokarmowym oraz wpływem stosowania profilaktyki antybiotykowej na częstotść tych zakażeń.

Celem badań było ustalenie jakościowego składu flory bakteryjnej ran pooperacyjnych ze szczególnym uwzględnieniem bakterii beztlenowych niesporujących oraz określenie zależności składu flory od operowanego narządu.

Materiałem diagnostycznym do badań mikrobiologicznych były punktaty z ran pooperacyjnych pacjentów leczonych na oddziałach zabiegowych szpitala Wojskowego w Krakowie (Oddział Chirurgii Ogólnej, Oddział Urologiczny, Oddział Urazowo-Ortopedyczny i Ginekologiczny). Badania mikrobiologiczne wydzieliny ropnej wykonywano w sposób standardowy w odniesieniu do bakterii tlenowych, najczęściej występujących w zakażeniach przyrannych, natomiast bakterie beztlenowe identyfikowano zgodnie z zaleceniami *Virginia Polytechnic Institute*. Identyfikację gatunków w obrębie rodzaju *Bacteroides* oparto na metodzie immunofluorescencji bezpośredniej. Na podstawie przeprowadzonych badań zakażenie ran pooperacyjnych stwierdzono u 11,1% spośród operowanych pacjentów. Zaobserwowano także, że w badanym materiale flora bakteryjna beztlenowa stanowiła 24% flory bakteryjnej zakażonych ran pooperacyjnych. W grupie wyizolowanych bakterii tlenowych dominowały gatunki *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, a wśród beztlenowców *Bacteroides fragilis*. Badania wykazały też, że bakterie tlenowe najczęściej izolowano z materiału pochodzącego z ran pooperacyjnych po zabiegach na żołądku i dwunastnicy. Mieszana flora bakteryjna dominowała w ranach po wycięciu wyrostka robaczkowego, po zabiegach na drogach żółciowych i układzie moczowo-płciowym. Natomiast bakterie beztlenowe bez innej flory towarzyszącej potwierdzono w ranach po wycięciu wyrostka robaczkowego i po zabiegach na drogach żółciowych.

Badania dotyczące wpływu stosowania profilaktyki antybiotykowej na częstość zakażenia ran pooperacyjnych po zabiegach na układzie pokarmowym potwierdziły, że profilaktyka przeciwbakteryjna w okresie okołoperacyjnym w znacznym stopniu zmniejsza częstość występowania zakażeń rany pooperacyjnej (Zał. 4, cz. II, pkt B 3,4)

Mądry R, **Karczewska E**, Heczko P. Wpływ stosowania profilaktyki przeciwbakteryjnej na częstość występowania zakażenia rany pooperacyjnej po operacjach na przewodzie pokarmowym. Pol Przegl Chir 1990; 62(6): 419-22

Mądry R, **Karczewska E**, Heczko P. Udział tlenowej i beztlenowej flory bakteryjnej w zakażonych ranach pooperacyjnych. Pol Przegl Chir 1990; 4: 245-52

W 1988 roku nadal współpracowałam z I Katedrą i Kliniką Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej w Krakowie. Badania zaowocowały rozprawą doktorską pt.: *Patogenetyczne właściwości szczepów Escherichia coli wyizolowanych z żółci*, którą obroniłam w 1991 roku. Promotorem pracy był prof. dr hab. Piotr B. Heczko.

Wyniki wcześniejszych badań dotyczące analizy mikrobiologicznej żółci pobieranej od chorych z kamicą żółciową dowiodły, że najczęściej izolowaną z zakażonej żółci bakterią tlenową jest *Escherichia coli*. Skierowało to moje zainteresowania ku zakażeniom bakteryjnym układu żółciowego i rolę tego zakażenia w powstawaniu kamicy żółciowej. Nasuwało się pytanie, dlaczego z żółci od chorych z kamicą najczęściej izolowana jest *Escherichia coli* i które z czynników patogenności tej bakterii odgrywają rolę w infekcji układu żółciowego.

Przeprowadzone badania miały na celu określenie znaczenia pałeczki *Escherichia coli* w schorzeniach dróg żółciowych.

W patogenezie zakażeń bakteryjnych przypisuje się duże znaczenie właściwościom adhezyjnym bakterii. Zdolność przylegania bakterii do powierzchni komórek jest istotnym czynnikiem w procesie kolonizacji, który poprzedza rozwój zakażenia. Brak zdolności przylegania powoduje eliminację bakterii z organizmu żywiciela. Interesujące było więc zbadanie zależności między adhezją *Escherichia coli* do nabłonka pęcherzyka żółciowego a zmianami zapalnymi błony

śluzowej pęcherzyka i dróg żółciowych u chorych z kamicą. Stan błony śluzowej dróg żółciowych oceniano śródoperacyjnie techniką wziernikowania przy użyciu cholangioskopu.

Największą zdolność adherencji pałeczek *Escherichia coli* do nabłonka pęcherzyka żółciowego stwierdzono w środowisku toczących się zmian zapalnych, co przemawia za adherencją nieswoistą, w której biorą udział *receptory nabyte*, a nie *receptory swoiste* znajdujące się w głębszych warstwach nabłonka. W pracy zastosowano test adherencji wg Väisäne.

Wyniki badań identyfikacyjnych fimbrii adherencyjnych wykonane metodą hemaglutynacji czynnej wg Evansa oraz antygenów O i OK wykrywanych za pomocą swoistych surowic diagnostycznych wykazały odmiennosć badanych szczepów w zakresie posiadanych czynników patogenności od już opisanych i obecnych u enterotoksycznych i enteropatogennych *Escherichia coli*. Być może środowisko żółci wpływa na zmiany własności szczepów patogennych.

Wiadomo, iż w wyniku zakażenia bakteryjnego żółci zmienia się motoryka pęcherzyka, co prowadzi do zastojów żółci, a następnie do rozwoju kamicy. Przeprowadzone badania potwierdziły więc znaczenie zakażenia bakteryjnego w patogeniezie kamicy i częściowo przyczyniły się do wyjaśnienia niektórych zagadnień zakażenia dróg żółciowych o etiologii *Escherichia coli*. Udokumentowały adherencję *Escherichia coli* do nabłonka pęcherzyka u chorych z toczącym się procesem zapalnym. Miały także znaczenie w potwierdzeniu infekcyjnej teorii dotyczącej etiologii kamicy żółciowej.

Przez wszystkie lata pracy w Zakładzie Bakteriologii Instytutu Mikrobiologii zdobywałam także wiedzę praktyczną i teoretyczną z zakresu rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej zakażeń i opracowywania materiałów diagnostycznych.

3.1.1. Wykaz prac opublikowanych w czasopismach naukowych przed uzyskaniem stopnia doktora

1. **Karczewska E**, Więcek L, Heczko P. Effect of mutagenic factors and transducing phages on the changes in serological properties and sensitivity to bacteriophages in *Staphylococcus aureus*. *Med Dosw Mikrobiol* 1983; 35(2): 107-13
2. Basta M, Karłowski K, **Karczewska E**, Heczko P. Relations between the inhibition and stimulation of microorganism growth and the composition of sebum. *Przegl Epidemiol* 1984; 38(4): 369-76
3. **Karczewska E**, Petrynka M, Heczko P. Pathogenicity of encapsulated mutants of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in mice. *Staphylococci, Zbl Bakt (Suppl 14)*: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1985
4. Kosowski K, **Karczewska E**, Kasprówicz A, Andziak J, Heczko P. Bacteria in bile of patients with bile duct inflammation. *Eur J Clin Microbiol* 1987; 6(5): 575-8
5. Mądry R, **Karczewska E**, Heczko P. Wpływ stosowania profilaktyki przeciwbakteryjnej na częstość występowania zakażenia rany pooperacyjnej po operacjach na przewodzie pokarmowym. *Pol Przegl Chirurg* 1990; 62(6): 419-22
6. Mądry R, **Karczewska E**, Heczko P. Udział tlenowej i beztlenowej flory bakteryjnej w zakażonych ranach pooperacyjnych. *Pol Przegl Chirurg* 1990; 4: 245-52
7. Basta M, Herman T, Tomanek E, **Karczewska E**, Heczko P. The in vitro susceptibility of Polish isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to various antimicrobials. *The Staphylococci, Zbl Bakt (Suppl 21)*: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991

3.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Pracę doktorską obroniłam w 1991 roku na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika w Krakowie (obecnie: Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum). Promotorem rozprawy był prof.dr hab. Piotr B. Heczko, a recenzentami prof. dr hab. Zofia Porwit-Bóbr i prof. dr hab. Gabriel Turowski.

Po uzyskaniu stopnia doktora moje zainteresowania i wynikający z nich dorobek naukowy, dotyczyły głównie zakażenia *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

Główne kierunki badań:

I Diagnostyka zakażenia *H. pylori*

- opracowanie procedury badania mikrobiologicznego biopsjatu pobranego z błony śluzowej żołądka w kierunku izolacji i identyfikacji *H. pylori*,
- identyfikacja szczepów patogennych *H. pylori* produkujących silnie immunogenną białek CagA (*ang. cytotoxin associated protein A*) i wakuolizującą toksynę VacA (*ang. vacuolating cytotoxin A*) , przy użyciu metod serologicznych i genetycznych; udział szczepów typu CagA+, VacA+ w patomechanizmie zakażenia.

II Badania epidemiologiczne

- monitorowanie zakażeń o etiologii *H. pylori* w Małopolsce
- badanie obecności *H. pylori* w jamie ustnej i próba odpowiedzi na pytanie czy jama ustna może być źródłem reinfekcji żołądka

III Leczenie zakażenia *H. pylori*

- antybiogram
- monitorowanie narastania oporności na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia wg obowiązujących rekomendacji EHS (European *Helicobacter Study Group*) i PTG-E (Polskie Towarzystwo Gastroenterologiczne) prowadzone w celu obserwacji zmian profilu lekowrażliwości w danym regionie.

IV Badanie aktywności przeciwbakteryjnej pochodnych amin

W związku narastaniem oporności szczepów *H. pylori* na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia, badałam aktywność przeciwbakteryjną pochodnych amin jako ewentualnych związków alternatywnych dla aktualnie stosowanych antybiotyków i chemioterapeutyków. Badania prowadzone były także wobec szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA) oraz opornych szczepów bakterii należących do *Enterobacteriaceae* i są kontynuowane, w ramach współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM.

W roku 1991, po obronie pracy doktorskiej, wyjechałam do Stanów Zjednoczonych na roczne stypendium naukowe w University of California, Irvine (Department of Medicine). Brałam udział w badaniach prowadzonych w ramach projektu dotyczącego mechanizmów patogenności *H. pylori*.

Pierwszy etap badań obejmował opracowanie procedury badania mikrobiologicznego biopsjatów błony śluzowej żołądka, pod kątem izolacji i identyfikacji *H. pylori* oraz utworzenie kolekcji wyizolowanych szczepów i surowic pochodzących od badanych osób z dolegliwościami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Patogenność szczepów, wyizolowanych z materiałów klinicznych, badano wykrywając obecność antygenów, istotnych w patomechanizmie zakażenia (immunogenna proteina CagA, toksyna wakuolizująca VacA).

Uzyskane w badaniach wyniki potwierdziły różnice antygenowe pomiędzy szczepami izolowanymi z różnych przypadków klinicznych.

Wczesna identyfikacja szczepów wyizolowanych z biopłatów błony śluzowej żołądka, pod kątem obecności antygenów istotnych w patomechanizmie zakażenia, może służyć jako wskaźnik ryzyka rozwoju choroby.

Wskaźnikiem ryzyka rozwoju choroby może być także informacja o obecności w surowicy pacjenta przeciwciał skierowanych przeciwko immunogennej proteinie CagA.

Działanie cytotoksyczne toksyny VacA oceniane było na liniach komórkowych KATO III, zakażanych nadsącem (zagęszczonym metodą dializacyjną) z płynnej hodowli szczepu *H. pylori*, który uwalniał białko o ciężarze około 87-94 kDa. Po inkubacji obserwowano efekt cytotoksyczny w postaci zwakuolizowanych komórek oraz spowolnienie ich wzrostu i proliferacji. Badania potwierdziły zaburzenie mechanizmu protekcji i regeneracji nabłonka żołądka podczas zakażenia szczepami produkującymi cytotosynę VacA.

Komórki zakażane były zagęszczonym nadsącem w różnych rozcieńczeniach. Odczytu dokonywano w czasie zerowym i w ciągu kolejnych siedmiu dni inkubacji. Proliferację komórek oceniano przy użyciu metody immunohistochemicznej.

Badania potwierdziły udział toksyny VacA (*ang. vacuolating cytotoxin A*) w patomechanizmie zakażenia *H. pylori*.

Gen kodujący białko VacA obecny jest w genomach wszystkich szczepów *H. pylori*, jednak ekspresję tego białka potwierdzono u około 50% z nich.

W roku 1992 scharakteryzowano oczyszczoną toksynę cytotoksyczną VacA (Cover i wsp.).

Pewien krótki wycinek badań wraz z wynikami przedstawiłam w publikacji zamieszczonej w Zał. 4, część II, pkt B, 6.

Karczewska E, Wyle F, Tarnawski A. Immunoblot analysis of immune response to cell surface antigens of different *Helicobacter pylori* strains. *J Physiol Pharmacol* 1996; 47(1): 115-120

Opisane powyżej badania, prowadzone w czasach kiedy nie było jeszcze w Polsce zdefiniowanej diagnostyki zakażenia *H. pylori*, dały podstawę do wprowadzenia w mojej przyszłej działalności naukowej procedury badania mikrobiologicznego biopłatów błony śluzowej żołądka w kierunku izolacji i identyfikacji szczepów *H. pylori*.

W roku 1995, chcąc kontynuować opisane wyżej badania, przyjąłm propozycję współpracy od prof. dr hab. Stanisława J. Konturka, który prowadząc od wielu lat badania nad fizjologią i wydzielaniem żołądkowym oraz patogenezą choroby wrzodowej, planował ich poszerzenie o badania nad udziałem zakażenia *H. pylori* w chorobach górnego odcinka przewodu pokarmowego. Ponieważ badania te wymagały współpracy klinicystów i mikrobiologa, podjęłam pracę w Katedrze Fizjologii UJ CM.

Byliśmy wówczas jedynym w Polsce, kilkusobowym zespołem pracującym kompleksowo nad patomechanizmem zakażenia *H. pylori*, rozpatrując jednocześnie wpływ obecności bakterii na wydzielanie żołądkowe i śluzówkę żołądka poprzez działanie wydzielanych przez nią toksyn i enzymów. Bardzo istotne były także badania dotyczące diagnostyki i zwalczania zakażenia oraz zagadnień epidemiologicznych.

Prowadzone przeze mnie badania mikrobiologiczne dotyczyły wykrywania obecności i identyfikacji *H. pylori* w takich materiałach klinicznych, jak biopłaty śluzówki żołądka, ślina

oraz materiał z kieszonek dziąsłowych pobierany od pacjentów z chorobami przyzębia, a także od pacjentów z potwierdzoną chorobą wrzodową, rakiem żołądka czy dyspepsją bezwrzodową. Badania te były szczególnie istotne dla poznania epidemiologii zakażenia *H. pylori* oraz w poszukiwaniach rezerwuaru i źródeł zakażenia.

Część z nich prowadzona była w ramach Grantu KBN, którego byłam kierownikiem: *Jama ustna jako potencjalne źródło infekcji i reinfekcji Helicobacter pylori. (1997-1998)*, Zał.4, cz. II, pkt G, ppkt a.

Badania zostały opisane i opublikowane w pracy, która wchodzi w skład monotematycznego cyklu publikacji stanowiących podstawę habilitacji, Zał. 4, cz. I, 7.

Karczewska E, Konturek J.E, Konturek P.C, Cześnikiewicz M, Sito E, Bielański W, Kwiecień N, Obtulowicz W, Ziemniak W, Majka J, Hahn E.G, Konturek S.J. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci 2002; 47 (5): 978-986

Wyniki badań były także prezentowane na sympozjum międzynarodowym Zał. 4, cz. III, pkt A, ppkt a, 36.

Karczewska E, Sito E, Cześnikiewicz M, Bielański W, Kwiecień N, Obtulowicz W, Ziemniak W, Szczyrk U, Majka J, Konturek S.J. Oral cavity as a potential source of *Helicobacter pylori* gastric reinfection. XIVth International Workshop on Gastrointestinal Pathology and Helicobacter pylori, Strasbourg, France, 5-8 September 2001, Int Gut 2001; Vol. 49 suppl. 11 s. A37, abstr. 6/28

Kontynuacja badań dotyczących patogenności *H. pylori* dotyczyła także wykrywania silnie immunogennej proteiny CagA, produkowanej tylko przez szczepy, u których w obszarze wyspy patogenności cagPAI (ang. *cytotoxin associated gene A pathogenicity island*) znajduje się gen cagA kodujący immunogenną proteinę CagA. Występuje on u około 50-60% szczepów. Opracowałam i opisałam w jednej z publikacji metodę oznaczania i wykrywania przeciwciał IgG i IgA anty-CagA w surowicy i ślinie, w teście immunoenzymatycznym ELISA. Antygenem w odczynie było rekombinowane białko CagA, które otrzymałam od dr. Harry'ego Kleanthousa z OraVax Inc. (Cambridge, MA, USA). Badania zostały opisane w pracach, które wchodzi w skład monotematycznego cyklu publikacji stanowiącego podstawę habilitacji, Zał.4, cz. I, 6, 7.

Konturek S.J, Starzyńska T, Konturek P.C, **Karczewska E**, Marlicz K, Ławniczak M, Jaroszewicz-Heigelman H, Bielański W, Hartwich A, Ziemniak W, Hahn E.G. *Helicobacter pylori* and CagA status, serum gastrin, interleukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer. Scand J Gastroenterol 2002, 37 (8) : 891-8

Karczewska E, Konturek J.E, Konturek P.C, Cześnikiewicz M, Sito E, Bielański W, Kwiecień N, Obtulowicz W, Ziemniak W, Majka J, Hahn E.G, Konturek S.J. Oral cavity as a potential source of gastric reinfection by *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci 2002; 47 (5): 978-86

Silnie immunogenna proteina CagA, może oddziaływać na procesy fizjologiczne komórek gospodarza, co skutkuje powstawaniem zmian atroficzných, a w konsekwencji doprowadza do rozwoju choroby nowotworowej. Cechy onkogenne proteiny CagA zostały potwierdzone w badaniach prowadzonych na modelu zwierzęcym (Ohnishi i wsp.)

Innym kierunkiem moich badań był udział szczepów *H. pylori* typu CagA+, VacA+ w patogenezie raka żołądka

Już wówczas opublikowane wyniki badań, które prowadzone były w wielu ośrodkach naukowych na świecie potwierdzały rolę immunogennej proteiny CagA w nowotworzeniu. Były dowodem na to, że poprzez indukcję odpowiedzi immunologicznej zakażenie *H. pylori* może prowadzić do transformacji nowotworowej. W skrócie można powiedzieć, że szczepy CagA+ indukują zwiększone uwalnianie prozapalnych cytokin IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α , przyczyniając się do powstawania głębokich zmian morfologicznych w komórkach nabłonka żołądka.

W badaniach, w których brałam udział zostało to potwierdzone na modelu zwierzęcym (gerbille mongolskie) i opisane w pracy zamieszczonej w Zał. 4, cz. II, pkt A, ppkt a, 16.

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecień S, Pajdo R, Drozdowicz D, Stachura J, **Karczewska E**, Hahn EG. Functional and morfological aspects of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in Mongolian gerbils. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15(7): 745-54

Wyniki badań dotyczące patomechanizmu raka żołądka u ludzi, prowadzone pod kątem wydzielania żołądkowego podczas zakażenia szczepami *Helicobacter pylori* CagA+, przedstawiono w publikacji zamieszczonej w Zał. 4, cz. II, pkt A, ppkt a, 17.

SJ, Konturek PC, Bielański W, **Karczewska E**, Zuchowicz M, Hartwich A, Rehfeld JF, Goetze JP, Hahn EG. Serum progastrin and its products, gastric acid secretion and serum pepsinogen in gastric cancer. Digestion 2003; 169-77

W latach 1999-2001 byłam kierownikiem projektu finansowanego ze środków Uczelni (Statut): *Rola cytotoksyn Helicobacter pylori w patogenezie raka żołądka*. Zał. 4, cz. II, pkt G, ppkt c. Badania realizowane były w kooperacji z Kliniką Gastrologiczną Akademii Medycznej w Szczecinie.

Wyniki badań zostały włączone do publikacji wchodzącej w skład monotematycznego cyklu publikacji stanowiącego podstawę habilitacji: Zał. 4, cz. I, 6.

Były także prezentowane na sympozjach międzynarodowych Zał. 4, cz. III, pkt A, ppkt a, 10, 12, 17, 34.

Marlicz K, Starzyńska T, Jaroszewicz H, **Karczewska E**, Konturek PC, Bielański W, Konturek SJ. CagA, TNF α and IL8 seropositivity in gastric carcinoma and accompanying gastric acid secretion and plasma gastrin levels. XIth International Workshop on Gastroduodenal Pathology and Helicobacter pylori, Budapest, Hungary, 2-5 Sptember 1998; Abstracts, s. A67, abstr. 08/228

Karczewska E, Bobrzyński A, Sito E, Ławniczak M, Starzyńska T, Marlicz K, Konturek SJ. Relation between *Helicobacter pylori* (Hp) CagA antibody and histological changes in various gastroduodenal diseases. World Congresses of Gastroenterology, Vienna, Austria, September 6-11, 1998, Digestion 1998, Vol. 59 suppl. 3 s. 381, abstr. ExhA3024

Starzyńska T, **Karczewska E**, Marlicz K, Jaroszewicz-Heigelmann H, Ławniczak M, Konturek PC, Bielański W, Jędrychowski W, Hahn EG, Konturek SJ. Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma importance of CagA seropositivity and gastric secretory status. 7th UEGW, Roma 1999, Endoscop 1999; Vol. 31 suppl. 1

Konturek SJ, Konturek PC, **Karczewska E**, Marlicz K, Rembiesz K, Bielański W, Hahn EG. *Helicobacter pylori* (Hp) status, plasma gastrin and p53 expression of gastric cancer (GC). 9th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, Netherlands, 6-10 October 2001, Gut 2001; Vol. 49, suppl. III November 2001, abstr. 2584

Wyniki badań przedstawione w powyższych pracach dowodzą, że osoby zakażone szczepami patogennymi typu CagA+, VacA+, znajdują się w grupie ryzyka rozwoju zmian nowotworowych żołądka w przyszłości. Ważne jest więc wczesne wykrywanie zakażenia oraz możliwość potwierdzenia patogenności czynnika etiologicznego, czyli wykrywania immunogennej proteiny CagA+ oraz cytotoksyny VacA w szczepach *H. pylori* lub przeciwciał anty-CagA i anty-VacA w surowicach, za pomocą odpowiednich metod diagnostycznych.

Opracowany przeze mnie nieinwazyjny immunoenzymatyczny test ELISA-CagA, jest jedną z proponowanych metod diagnostycznych, pośredniej identyfikacji szczepów *H. pylori* CagA+, na podstawie wykrywanych w teście przeciwciał anty-CagA w badanej surowicy pacjenta zakażonego szczepem *H. pylori* CagA+. Dodatni wynik testu wykrywający obecność przeciwciał

IgG anty-CagA w surowicy pacjenta, potwierdzający aktualne lub przebyte zakażenie patogennym szczepem *H. pylori* CagA+, jest bardzo ważną informacją kliniczną, pomocną dla lekarza w dalszej diagnostyce oraz przystąpieniu do eradykacji zakażenia. Najprawdopodobniej, atrofia i metaplasja jelitowa może ulec regresji po zastosowaniu odpowiedniego modelu leczenia zakażenia.

Wyniki przeprowadzonych badań dotyczących roli patogennych szczepów *H. pylori* (CagA+, VacA+) w patomechanizmie zakażenia, uzasadniają celowość dążenia do zwalczania zakażeń o tej etiologii. Tak w Polsce, jak i w Europie powoływane są zespoły specjalistów opracowujących zalecenia dotyczące diagnostyki i leczenia zakażeń *H. pylori*. W Polsce jest to Grupa Robocza Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii (PTG-E), w Europie *European Helicobacter Study Group* (EHSg).

W związku z częstymi niepowodzeniami i brakiem efektu leczenia z użyciem trójkowej lub czterolekowej terapii empirycznej zakażeń *H. pylori*, wprowadziłam do badań własnych oznaczanie lekowrażliwości szczepów *H. pylori* pochodzących od pacjentów z chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego, wyizolowanych z biopłatów i zidentyfikowanych w badaniu mikrobiologicznym.

W tym czasie aktualne były rekomendacje dotyczące diagnostyki i leczenia zakażeń *H. pylori* z 1996 roku (PTG-E) oraz rekomendacje europejskie EHSg z 1997 roku.

Wykonanie antybiogramu umożliwiało zastosowanie terapii celowanej zgodnej z wynikami przeprowadzonego testu lekowrażliwości, co w przypadku zakażenia szczepami opornymi na rekomendowane leki, w większości przypadków gwarantowało dobry efekt terapeutyczny. Należy zaznaczyć, że takie badania nie były wówczas wykonywane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej zakażeń *H. pylori*.

Zastosowanie antybiogramu wykonywanego metodą ilościową z użyciem E-testu umożliwiło także monitorowanie narastania lekooporności szczepów *H. pylori* na antybiotyki i chemioterapeutyki stosowane w leczeniu zakażenia.

Badania te prowadzone były w ramach grantu, którego byłam kierownikiem, finansowanego przez Centralną Rezerwę Środków Badań Własnych: *Pierwotna i nabyta lekooporność szczepów Helicobacter pylori na metronidazol i klarytromycynę izolowanych od pacjentów z wrzodem żołądka i dwunastnicy przed i po leczeniu*. (1999), Zał. 4, cz. II, pkt G, ppkt b.

Badania kompleksowe, czyli badanie mikrobiologiczne wykrywające obecność *H. pylori* w różnych materiałach klinicznych, antybiogram, opisane powyżej badania serologiczne oraz wprowadzony przez prof. dr hab. S. Konturka ureazowy test oddechowy (UBT, wówczas jedyny w Polsce), umożliwiły monitorowanie leczenia zakażeń *H. pylori* przez kilka lat, głównie na terenie Małopolski.

Wyniki mojej pracy naukowej prowadzonej w tym czasie (1995-2001) zamieszczone są także w innych, niż wymienione powyżej publikacjach zespołowych, których jestem współautorem, Zał. 4, cz. II, pkt A, ppkt a, b, c, pkt B. Poza tym, prezentowane były na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych; Zał. 4, cz. III, pkt A, ppkt a, b.

Ponieważ interesowała mnie także diagnostyka zakażeń o innej etiologii niż *H. pylori*, równolegle w latach 1993-2001 pracowałam w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek w Krakowie, gdzie zajmowałam się opracowywaniem różnych materiałów diagnostycznych pod kątem wykrywania i identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia, oznaczania lekowrażliwości oraz mechanizmów oporności, a także interpretacji klinicznej wyników badań.

W 2001 roku rozpoczęłam pracę na etacie adiunkta w nowoutworzonym Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM, którego kierownikiem

była prof. dr hab. Alicja Budak. Poza pracą dydaktyczną prowadziłam badania, które były kontynuacją wcześniej już opisywanych, związanych z zakażeniem *H. pylori*. Głównie dotyczyły patogenności szczepów izolowanych od pacjentów z chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego oraz wykrywania genów warunkujących obecność cytotoksyny wakuolizującej VacA i immunogennej proteiny CagA, a także ich ekspresji w badanych szczepach. Ma to związek ze stopniem ich chorobotwórczości i wirulencji, o czym pisałam już wcześniej.

Gen *vacA* kodujący cytotoksynę wakuolizującą (VacA) obecny jest u wszystkich szczepów *H. pylori*, jednak tylko około 40-50% z nich wykazuje aktywność cytotoksyczną, wytwarzając toksynę powodującą śmierć komórek nabłonkowych. Gen *vacA* ma bowiem strukturę mozaikową, a ekspresja toksyny zależy od układu alleli sekwencji sygnałowej i regionu środkowego. Największą ilość toksyny wytwarzają szczepy o genotypie s1m1, w przeciwieństwie do szczepów typu s2m2 o najmniejszej wirulencji. Toksyczność związana jest więc z obecnością określonych typów alleli występujących w różnych kombinacjach warunkujących zwiększoną aktywność cytotoksyny lub jej brak. Cytotoksyna stymuluje także powstawanie swoistych przeciwciał anti-VacA wykrywanych m.in. w teście western blot czy ELISA, podobnie jak immunogenna proteina CagA.

Wykrywanie przeciwciał anti-CagA i anti-VacA w surowicy pacjenta jest więc dla lekarza istotną informacją na temat patogenności szczepu będącego czynnikiem etiologicznym zakażenia. Jednocześnie są to także badania epidemiologiczne umożliwiające rejestrację szczepów patogennych *H. pylori* biorących udział w zakażeniach.

Typowanie genetyczne szczepów oraz wykrywanie obecności genów warunkujących ich wirulencję może być wykorzystywane w diagnostyce zakażenia, co ma znaczenie w podejmowaniu przez lekarza decyzji dotyczącej eradykacji zakażenia.

W latach 2007-2009 kierowałam badaniami finansowanymi ze środków Uczelni w ramach badań własnych; *Identyfikacja metodą PCR chorobotwórczych szczepów Helicobacter pylori biorących udział w zakażeniach górnego odcinka przewodu pokarmowego*. Zał. 4, cz. II, pkt G, ppkt c.

Celem badań było wykazanie obecności genów *cagA* oraz alleli genu *vacA* (s1 lub s2, m1 lub m2) w szczepach *H. pylori* metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Analiza statystyczna wyników potwierdziła silną zależność pomiędzy genotypem s2m2 a brakiem genu CagA, natomiast obecność genotypu s1 związana była z obecnością genu CagA.

Wyniki badań potwierdziły, że leczenie zakażenia powinno być wdrażane u pacjentów, u których w badaniu mikrobiologicznym, przy użyciu metod genetycznych potwierdza się szczepy toksyczne typu Cag+, Vac+ (s1m1) lub Cag+, Vac-.

Wyniki przedstawione zostały na sympozjum międzynarodowym; Zał. 4, cz. III, pkt A, ppkt a, 51.

Karczewska E, Wojtas I, Budak A, Sito E, Zwolinska-Wcislo M. Genotypic characterisation of *Helicobacter pylori* isolates from southern Poland. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Helsinki, Finland, 16-19 May 2009, Clin Microbiol Infect 2009; Vol. 15, suppl. 4, abstr. P799.

W 2009 roku opublikowana została praca przeglądowa, dotycząca występowania oporności *H. pylori* na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie. Zostały w niej omówione ważne mechanizmy oporności tych bakterii na leki stosowane w terapii empirycznej zakażenia. Zał. 4, cz. II, pkt A, ppkt a, 19.

Karczewska E, Wojtas I, Budak A. Występowanie pierwotnej oporności *Helicobacter pylori* na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie. Post Mikrobiol 2009;48(1):31-41

W związku z narastaniem oporności na leki stosowane w terapii empirycznej, poza badaniami dotyczącymi chorobotwórczości szczepów *H. pylori*, kontynuowałam badania ich lekowrażliwości w celu poprawienia i uaktualnienia stanu wiedzy na ten temat, dla regionu Małopolski. Badania prowadzone były na klinicznych szczepach *H. pylori* i obejmowały leki najczęściej stosowane w empirycznej terapii eradykacyjnej tego zakażenia, rekomendowane przez EGSG i PTG-E (klarytromycyna, amoksycylina, metronidazol, lewofloksacyna, tetracyklina).

Celem badań było także uzasadnienie znaczenia celowanej terapii zakażeń *H. pylori* wobec narastającej oporności tych bakterii na klarytromycynę, metronidazol i lewofloksacynę, co dawałoby podstawę do wprowadzenia, przynajmniej na terenie Małopolski, rutynowego wykonywania antybiogramu dla szczepów *H. pylori* izolowanych z zakażeń, jeszcze przed zastosowaniem pierwszego leczenia a nie dopiero po nieskutecznej terapii pierwszego lub drugiego rzutu. Według rekomendacji PTG-E i EHSZ wykonanie antybiogramu możliwe jest po drugim nieskutecznym leczeniu zakażenia.

Zastosowanie terapii celowanej zgodnie z wykonanym wcześniej antybiogramem, jako leczenia pierwszego rzutu, umożliwia uzyskiwanie szybszych efektów terapeutycznych bez dodatkowych obciążeń pacjenta, wynikających z wielokrotnego leczenia empirycznego oraz ogranicza zjawisko narastania oporności szczepów *H. pylori* na stosowane leki. Każde kolejne leczenie zwiększa ryzyko selekcji szczepu opornego, co w konsekwencji może prowadzić w niedalekiej przyszłości do utraty możliwości zwalczania tych zakażeń.

Do badań wprowadzono także metody genetyczne dla potwierdzenia i identyfikacji gatunku *H. pylori*, a także wykrywania mechanizmu oporności szczepów na klarytromycynę (PCR – wykrywanie genów 16S rRNA, *ureB*, *ureC* oraz *vacA*, PCR-RFLP – wykrywanie mutacji punktowych A 2143G, A2142G w genie 23S rRNA warunkujących oporność na klarytromycynę).

Wprowadzenie badań genetycznych wykrywających obecność mechanizmu oporności na klarytromycynę w szczepach *H. pylori* umożliwia podjęcie terapii celowanej w krótszym czasie, niż w przypadku wykonywania tradycyjnego antybiogramu.

Badania te realizowane były zespołowo w ramach grantu NCN, którego byłam kierownikiem: *Rola celowanej antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń Helicobacter pylori wobec narastającej lekooporności tych drobnoustrojów, monitorowanej na terenie Małopolski. (2011-2013)*. Zał. 4, cz. II, pkt G, ppkt a.

Wyniki zostały opublikowane w pracach wchodzących w skład monotematycznego cyklu publikacji, Zał.4, cz. I, 1, 2, 3, 4. i zostaną omówione w opisie osiągnięcia naukowego.

Zostały także przedstawione na sympozjach zagranicznych Zał. 4, cz. III, pkt A, ppkt a, 52, 55, 56.

Karczewska E, Wojtas I, Sito E, Budak A. Primary *Helicobacter pylori* resistance to antimicrobial agents in southern Poland. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Vienna, Austria, 10-13 April 2010, Clin Microbiol Infect 2010; Vol. 16, suppl. 2 s. 483, abstr. P1651

Karczewska E, Klesiewicz K, Skiba I, Wojtas-Bonior I, Sito E, Zwolinska-Wcislo M, Budak A. A comparison of primary and secondary clarithromycin and levofloxacin resistance of *Helicobacter pylori* In southern Poland between 2006-2008 and 2009-2011. 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), London, United Kingdom, 31 March- 3 April, 2012, Clinical Microbiol Infect 2012; Vol. 18, suppl. S3 s. 265, abstr. P1106

Klesiewicz K, **Karczewska E**, Nowak P, Sito E, Wojtas-Bonior I, Budak A. Prevalence of the point mutations in 23s rRNA gene conferring to the clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* strains – correlation between Mutations and different levels of resistance. Helicobacter, European Helicobacter Study Group XXVIIIth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer Rzym, 10-13 września 2014, Special Issue: The Year in Helicobacter 2014, 19: 150-151.

Od roku 2008, w ramach współpracy z Zakładem Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej UJ CM, prowadzę badania dotyczące aktywności pochodnych amin, w tym pochodnych piperazyny, chiralnych i achiralnych aminoalkanoli, a także pochodnych arylowych i aroksylowych z układem ksantonu lub kwasu cynamonowego wobec wybranych klinicznych szczepów bakterii, opornych na stosowane leki przeciwbakteryjne. Badania dotyczą głównie szczepów *H. pylori*, ale kontrolnie prowadzone są także wobec wybranych szczepów należących do rodziny *Enterobacteriaceae* oraz opornych na antybiotyki szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. Celem tych wieloletnich już badań jest wskazanie ugrupowań chemicznych determinujących działanie przeciwbakteryjne oraz ewentualne zastosowanie otrzymanych wyników do syntezy nowych związków – analogów amin, zawierających zmienioną w stosunku do prekursorów lokalizację czynnych ugrupowań. Przeprowadzone dotychczas badania wykazały, że właściwości przeciwbakteryjne posiadają ugrupowania takie, jak pirydylopiperazyna, pirymidylopiperazyna i atom chloru. Największą aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *H. pylori* wykazały pochodne ksantonu oraz kwasu cynamonowego. Wartość MIC dla tych szczepów w porównaniu z wartościami MIC uzyskanymi dla *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* były 1000 razy niższe (odpowiednio: 10 µg/ml i 10 000 µg/ml). W badaniach potwierdzono zależność pomiędzy strukturą związku a jego aktywnością.

Badania są kontynuowane. Mają istotne znaczenie dla poszukiwania nowych związków będących alternatywą dla antybiotyków i chemioterapeutyków aktualnie stosowanych w terapii zakażeń.

Wyniki dotyczące tylko wrażliwości *H. pylori* na badane związki zostały opublikowane w 2016 r; Zał. 4, cz. II, pkt A, ppkt a, 23.

Klesiewicz K, **Karczewska E**, Budak A, Marona H, Szkaradek N. Anti-*Helicobacter pylori* activity of some newly synthesized derivatives of xantone. J.Antibiot 2016 (30 march 2016) doi: 10.1038/ja.2016.36.(Epub ahead of print)

Prezentowane także były na sympozjach zagranicznych i krajowych Zał. 4, cz. III, pkt A, ppkt a, 57, ppkt b, 19, 20, 26.

Marona H, Szkaradek N, Budak A, **Karczewska E**, Trojanowska D. Antibacterial activity of the xanthone derivatives against multidrug-resistant strains. I Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin, 19-20 września, 2008; abstr. P-44

Marona H, Szkaradek N, Budak A, **Karczewska E**, Trojanowska D. Antifungal and antibacterial activity of the newly synthesized 2-xanthone derivatives. 17th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology „Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism”. Pedagogical University of Cracow-Kraków, June 5-6, 2008, Materials of 17th International Symposium of Polish Network of Molecular and Cellular Biology / ed. by Henryk Lach; Wydawnictwo naukowe Akademii Pedagogicznej im. Komisji Edukacji Narodowej, 2008; s. 313-316, bibliogr. 10 poz

Klesiewicz K, **Karczewska E**, Szkaradek N, Gunia A, Habuz M, Marona H, Budak A. Wstępna ocena aktywności wybranych pochodnych aminoalkanoli na szczepy z gatunku *Helicobacter pylori*. XVI Sympozjum Naukowe „Postępy w Medycynie Zakażeń” Warszawa, 30.11.2012 01.12.2012

Klesiewicz K, Karczewska E, Gunia A, Szkaradek N, Waszkielewicz A, Marona H, Budak A. Anti-*Helicobacter pylori* activity of newly synthesised derivatives of xanthone, piperazine and cinnamic acid. XXIX International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer, Magdeburg, Germany 15-17 september 2016, Helicobacter 1016, 21:148-149 Issue Supplement

3.2.1. Wykaz prac opublikowanych w czasopismach naukowych po uzyskaniu stopnia doktora

Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)

a. Prace pełnotekstowe w czasopismach:

1. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Karczewska E, Pajdo R, Stachura J, Ghiara P, Hahn EG. Gastric secretion and ulcer healing in mouse stomach infected with cytotoxin expressing strain of *Helicobacter pylori*. J Physiol Pharmacol 1998; 49(3): 387-403
IF: 1,114; pkt. MNiSW: 0
2. Brzozowski T, Konturek PC., Konturek SJ., Kwiecień S, Pajdo R, **Karczewska E**, Stachura J, Hahn EG. Water extracts of *Helicobacter pylori* delay healing of chronic gastric ulcers in rats; role of cytokines and gastrin-somatostatin link. Digestion 1999; 60(1): 22-33
IF: 1,442; pkt. MNiSW: 9
3. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Stachura J, **Karczewska E**, Pajdo R, Ghiara P, Hahn EG. Mouse model of *Helicobacter pylori* infection: studies of gastric function and ulcer healing. Aliment Pharmacol Ther 1999; 13(3): 333-46
IF: 3,057; pkt. MNiSW: 13
4. Pieniążek P, **Karczewska E**, Duda A, Tracz W, Pasowicz M, Konturek SJ. Association of *Helicobacter pylori* infection with coronary heart disease. J Physiol Pharmacol 1999; 50(5): 743-51
IF: 1,270; pkt. MNiSW: 9
5. Szlachcic A, Śliwowski Z, **Karczewska E**, Bielański W, Pytko-Polończyk J, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* and its eradication in rosacea. J Physiol Pharmacol 1999; 50(5): 777-86.
IF: 1,270; pkt. MNiSW: 9
6. Konturek PC, Konturek SJ, Bielański W, **Karczewska E**, Pierzchalski P, Duda A, Starzyńska T, Marlicz K, Popiela T, Hartwich A, Hahn EG. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. J Physiol Pharmacol 1999; 50(5): 857-73
IF: 1,270; pkt. MNiSW: 9
7. Jaworek J, Jachimczak B, Bonior J, Kot M, Tomaszewska R, **Karczewska E**, Stachura J, Pawlik W, Konturek SJ. Protective role of endogenous nitric oxide (NO) in lipopolysaccharide-induced pancreatic damage (a new experimental model of acute pancreatitis). J Physiol Pharmacol 2000; 51(1): 85-102
IF: 1,025; pkt. MNiSW: 9
8. Konturek PC, Konturek SJ, Starzyńska T, Marlicz K, Bielański W, Pierzchalski P, **Karczewska E**, Hartwich A, Rembiasz K, Ławniczak M, Ziemniak W, Hahn EC *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma. Aliment Pharmacol Ther 2000; 14(10): 1311-8
IF: 3,489; pkt. MNiSW: 13
9. Konturek PC, Brzozowski T, **Karczewska E**, Duda A, Bielański W, Hahn EG, Konturek SJ. Water extracts of *Helicobacter pylori* suppress the expression of histidine decarboxylase and reduce histamine content in the rat gastric mucosa. Digestion 2000; 62(2-3): 100-9
IF: 1,780; pkt. MNiSW: 10
10. Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecień S, **Karczewska E**, Drozdowicz D, Stachura J, Hahn EG. *Helicobacter pylori* infection delays healing of ischaemia-reperfusion induced gastric ulcerations: new animal model for studying pathogenesis and therapy of H. pylori infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000; 12(12): 1299-313
IF: 1,142; pkt. MNiSW: 9
11. Konturek PC, Hartwich A, Zuchowicz M, Łabza H, Pierzchalski P, **Karczewska E**, Bielański W, Hahn EG, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenases in gastric cancer. J Physiol Pharmacol 2000; 51(4): 737-49
IF: 1,025; pkt. MNiSW: 9

12. Kowalski M, Konturek PC, Pieniążek P, **Karczewska E**, Kluczka A, Grove R, Kranig W, Nasser R, Thale J, Hahn EG, Konturek SJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in coronary artery disease and effect of its eradication on coronary lumen reduction after percutaneous coronary angioplasty. Dig Liver Dis 2001; 33(3): 222-9
IF: 0696; pkt. MNiSW: 8
13. Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, Meixner H, Bielański W, Starzyńska T, **Karczewska E**, Marlicz K, Stachura J, Hahn EG. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related proteins Bax and Bcl-2, and gastrin human gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15(7): 989-99
IF: 3,900; pkt. MNiSW: 14
14. Hartwich A, Konturek SJ, Pierzchalski P, Zuchowicz M, Łabza H, Konturek PC, **Karczewska E**, Bielański W, Marlicz K, Starzyńska T, Ławniczak M, Hahn EG. *Helicobacter pylori* infection, gastrin, cyclooxygenase-2, and apoptosis in colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 2001; 16(4): 202-10
IF: 1,709; pkt. MNiSW: 10
15. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Kwiecień S, Pajdo R, Drozdowicz D, Stachura J, **Karczewska E**, Hahn EG. Functional and morphological aspects of *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in Mongolian gerbils. Eur J Gastroenterol Hepatol 2003; 15(7): 745-54
IF: 1,578; pkt. MNiSW: 10
16. Konturek SJ, Konturek PC, Bielański W, **Karczewska E**, Zuchowicz M, Hartwich A, Rehfeld JF, Goetze JP, Hahn EG. Serum progastrin and its products, gastric acid secretion and serum pepsinogen in gastric cancer. Digestion 2003; 169-77
IF: 1,399; pkt. MNiSW: 9
17. Marona H, Szkaradek N, **Karczewska E**, Trojanowska D, Budak A, Bober P, Przepiórka W, Cegła H, Szneler E. Antifungal and antibacterial activity of the newly synthesized 2-xantone derivatives. Arch Pharm (Weinheim) 2009; 342(1): 9-18
IF: 1,785; pkt. MNiSW: 20
18. **Karczewska E**, Wojtas I, Budak A. Występowanie pierwotnej oporności *Helicobacter pylori* na leki przeciwbakteryjne w Polsce i na świecie. Post Mikrobiol 2009; 48(1): 31-41
IF: 0,108; pkt. MNiSW: 4
19. Sułkowska-Ziaja K, **Karczewska E**, Wojtas I, Budak A, Muszyńska B, Ekiert H. Isolation and biological activities of polysaccharide fractions from mycelium of *Sarcodon imbricatus* L. P. Karst. (Basidiomycota) cultured in vitro. Acta Pol Pharm 2011; 68(1): 143-5
IF: 0,663; pkt. MNiSW: 15
20. Zwolińska-Wcisło M, Krzysiek-Maczka G, Ptak-Belowska A, **Karczewska E**, Pajdo R, Sliwowski Z, Urbanczyk K, Drozdowicz D, Konturek SJ, Pawlik WW, Brzozowski T. Antibiotic treatment with ampicillin accelerates the healing of colonic damage impaired by aspirin and coxib in the experimental colitis. Importance of intestinal bacteria, colonic microcirculation and proinflammatory cytokines. J Physiol Pharmacol 2011; 62(3), 357-6
IF: 2,267; pkt. MNiSW: 25
21. Klesiewicz K, Nowak P, **Karczewska E**, Skiba I, Wojtas-Bonior I, Budak A. PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains. Acta Biochim. Pol. 2014; 61(2): 311-315.
IF: 1,153; pkt. MNiSW: 15
22. Klesiewicz K, Karczewska E, Budak A, Marona H, Szkaradek N. Anti-*Helicobacter pylori* activity of some newly synthesized derivatives of xantone. J. Antibiot 2016 (30 march 2016) doi: 10.1038/ja.2016.36.(Epub ahead of print)
IF: 1,730; pkt. MNiSW: 20

b. Prace pełnotekstowe w suplementach czasopism:

1. **Karczewska E**, Petrynka M, Heczko P. Pathogenicity of encapsulated mutants of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in mice. *Staphylococci*, Zbl Bakt (Suppl 14): Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1985
Praca oryginalna
IF: 0,698
2. Basta M, Herman T, Tomanek E, **Karczewska E**, Heczko P. The in vitro susceptibility of Polish isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to various antimicrobials. *The Staphylococci*, Zbl Bakt (Suppl 21): Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991
Praca oryginalna
IF: 0,520
3. Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, **Karczewska E**, Pajdo R, Ghiara P, Hahn EG. Mouse model of gastric infection with cytotoxin-expressing strain of *Helicobacter pylori* in studying of pathogenesis of chronic gastric ulcer. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13 (Suppl): 178-84
Praca oryginalna
IF: 0,944
4. Cześnikiewicz-Guzik M, **Karczewska E**, Bielański W, Guzik TJ, Kapera P, Targosz A, Konturek SJ, Loster B. Association of the presence the *Helicobacter pylori* In the oral cavity and In the stomach. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55 (Suppl.2): 105-115
Praca oryginalna
IF: 2,328; pkt. MNiSW: 11
5. Loster BW, Czesnikiewicz-Guzik M, Bielański W, **Karczewska E**, Loster JE, Kalukin J, Guzik TJ, Majewski S, Konturek SJ Prevalence and characterization of *Helicobacter pylori* (H. pylori) infection and colonization In dentists. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 (Suppl 8): 13-8
Praca oryginalna
IF: 1,489; pkt. MniSW: 24

c. Listy do redakcji czasopism:

1. Konturek PC, **Karczewska E**, Dietrich W, Hahn EG, Schuppan D. Increased prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2000;
IF: 2,834; pkt. MNiSW: 12

Publikacje naukowe w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych, niż znajdujące się w bazie Journal Citation reports (JCR)

1. Sito E, **Karczewska E**, Szczerba E, Kamiński K, Oleksy J, Nowak-Sadzikowska J, Maj A. Porównawcza ocena posiewów i testu ELISA w wykrywaniu zakażenia *Helicobacter pylori*. *Med Dosw Mikrobiol* 1994; 46(4):301-4
2. **Karczewska E**, Wyle F, Tarnawski A. Immunoblot analysis of immune response to cell surface antigens of different *Helicobacter pylori* strains. *J Physiol Pharmacol* 1996; 47(1):115-20
3. Pytko-Polończyk J, Konturek SJ, **Karczewska E**, Bielański W, Kaczmarczyk- Stachowska A. Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. *J Physiol Pharmacol* 1996; 47(1):121-9
4. Kosowski K, Heczko P, **Karczewska E**. Wyniki profilaktycznego i leczniczego stosowania antybiotykoterapii w chirurgii dróg żółciowych. *Przegl Lek* 1997; 57(7-8): 551-3
5. **Karczewska E**, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* - chorobotwórczość, diagnostyka i leczenie. *Nowa Med* 1997; R.4(4):17-20

6. Kosowski K, **Karczewska E**, Nowak K, Łukasiewicz J, Heczko PB, Popiela T, Panek M. Adherence of bile-isolated bacteria to the bile ducts mucosa as a pathogenic factor in the development of inflammatory lesions. *Med Sci Monit* 2000; 6(2):291-9
7. Pieniżek P, **Karczewska E**, Stępień E, Tracz W, Konturek SJ. Incidence of *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with coronary artery disease subjected to angioplasty or bypass surgery. *Med Sci Monit* 2001; 7(5):995-1001

Podsumowując całość dorobku naukowego jestem autorem/współautorem 47 prac naukowych w tym 43 prac pełnotekstowych, 2 prac poglądowych, 1 rozdziału monografii zagranicznej i 1 listu do redakcji czasopisma.

Jestem także współautorem w 57 komunikatach prezentowanych na konferencjach międzynarodowych oraz w 31 komunikatach prezentowanych na konferencjach krajowych. (Szczegółowy wykaz w Zał. 4, cz. III, pkt. A)

Sumaryczny Impact Factor wszystkich prac według listy Journal Citation Reports (JRC), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 54.709 (Zał. 7)

Sumaryczny Impact Factor wszystkich prac według listy Journal Citation Reports (JCR) z wyłączeniem z listy publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 45.138 (Zał.8)

Liczba cytowań tych publikacji według bazy Web of Science Core Collection 1945-2016 z dn 15.10.2016r. wynosi 735

Indeks Hirscha według bazy Web of Science Core Collection wynosi 16

Liczba publikacji w czasopismach z IF, które nie podlegają punktacji ze względu na brak danych o wskaźnikach (*KBN przed 1999*): 2.

Punktacja wg KBN z 1999 roku dla tych publikacji wynosi: **18 pkt.**

Liczba publikacji w czasopismach bez IF, które nie podlegają punktacji ze względu na brak danych o wskaźnikach (*KBN przed 1999*): 8.

Punktacja wg KBN z 1999 roku dla tych publikacji wynosi: **42 pkt.**

Rozdziały w monografiach naukowych w języku angielskim **5 pkt.** (1 rozdział)

3.3. Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

Po uzyskaniu stopnia doktora większość badań naukowych prowadziłam w ramach krajowych projektów badawczych. We wszystkich poza projektem K/PDW/000067 byłam kierownikiem. Wyniki tych badań opublikowane zostały głównie w pracach składających się na przedstawione osiągnięcie naukowe zgłoszone do oceny w postępowaniu habilitacyjnym.

W sumie zrealizowałam dwa granty badawcze, Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Narodowego Centrum Nauki, trzy granty dofinansowywane ze środków krajowych, ale inne niż KBN i pięć projektów finansowanych ze środków Uczelni.

Wykaz realizowanych projektów badawczych:**3.3.1. Granty KBN/MNiSW/NCN**

- Projekt Badawczy Grant 4P05B050B (1997-1998): Jama ustna jako potencjalne źródło infekcji i reinfekcji *Helicobacter pylori* (kierownik).
- Projekt Badawczy Grant K/PDW/000067 (2007- 2009): Badania nad wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, stresu, mikroflory jelita na nasilenie, przebieg i gojenie się zmian zapalnych we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego. Badania kliniczne oraz na modelu zwierzęcym (wykonawca).
- Projekt Badawczy Grant K/PBW/000768 (NN404547640 2011) (2011-2013): Rola celowanej antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń *Helicobacter pylori* wobec narastającej lekooporności tych drobnoustrojów, monitorowanej na terenie Małopolski (kierownik).

3.3.2. Inne (poza KBN) granty dofinansowywane ze środków krajowych, z subwencji fundacji

- Badania finansowane przez Centralną Rezerwę Środków Badań Własnych (1999): Pierwotna i nabyta lekooporność szczepów *Helicobacter pylori* na metronidazol i klarytromycynę izolowanych od pacjentów z wrzodem żołądka i dwunastnicy przed i po leczeniu, (Centralna rezerwa środków, projekt UJ) (kierownik).
- Badania finansowane przez Centralną Rezerwę Środków Badań Własnych (2004–2005): Badanie interakcji pomiędzy *Helicobacter pylori* a *Candida* spp.- izolacja i charakterystyka czynnika hamującego (kierownik).
- Badania finansowane przez Centralną Rezerwę Środków Badań Własnych (2005-2006): Izolacja homogennego peptydu odpowiedzialnego za aktywność *Candida* spp. wobec szczepów *Helicobacter pylori* biorących udział w zakażeniu górnego odcinka przewodu pokarmowego (kierownik).

3.3.3. Projekty finansowane ze środków Uczelni

- Program statutowy (1999-2001): Rola cytotoksyn *Helicobacter pylori* w patogenezie raka żołądka (kierownik).
- Badania własne (2002-2003): Chorobotwórczość szczepów *Helicobacter pylori* o genotypie s1/m1, izolowanych od dzieci z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej żołądka, refluksem oraz chorobą wrzodową (kierownik).
- Badania własne (2004-2006): Współwystępowanie grzybów drożdżopodobnych i bakterii patogennych w chorobach górnego odcinka przewodu pokarmowego (kierownik).
- Badania własne (2007-2009): Identyfikacja metodą PCR chorobotwórczych szczepów *Helicobacter pylori* biorących udział w zakażeniach górnego odcinka przewodu pokarmowego (kierownik).
- Badania własne (2010-2011): Monitorowanie lekooporności szczepów *Helicobacter pylori* na amoksycylinę, klarytromycynę, tetracyklinę i metronidazol (kierownik).

3.4. Współpraca naukowa

W ramach realizacji badań, których wyniki opublikowane zostały w pracach składających się na część mojego dorobku naukowego tak przed, jak i po doktoracie, współpracowałam z następującymi jednostkami badawczymi:

- **I Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej CM UJ w Krakowie**
Badanie mikrobiologiczne żółci pobranej od pacjentów z różnymi postaciami kamicy żółciowej w kierunku obecności bakterii tlenowych i beztlenowych. Ocena znaczenia profilaktyki antybiotykowej w chirurgii dróg żółciowych.
(1984-1986)
Badanie mikrobiologiczne żółci pobranej śródoperacyjnie od chorych z kamcią żółciową. Adherencja bakterii wyizolowanych z żółci do nabłonka pęcherzyka żółciowego. Badanie biopłatów błony śluzowej pęcherzyka żółciowego.
(1988-1990)
- **Kliniczny Oddział Chirurgii Ogólnej Wojskowego Szpitala Klinicznego w Krakowie**
Badanie mikrobiologiczne wydzieliny ropnej pochodzącej z ran pooperacyjnych. Ocena wpływu stosowanej profilaktyki przeciwbakteryjnej w okresie okołoperacyjnym na częstość występowania ran pooperacyjnych.
(1987-1990)
- **Zakład Ortodoncji Instytutu Stomatologii UJ CM**
Wykrywanie zakażenia *Helicobacter pylori* w jamie ustnej u pacjentów leczonych stomatologicznie z dolegliwościami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego.
(1997-2003)
- **Klinika Chorób Serca i Naczyń Instytutu Kardiologii UJ CM**
Wykrywanie zakażeń *Helicobacter pylori* u pacjentów z chorobą wieńcową.
(1997-2001)
- **Department of Medicine I, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Niemcy**
Badania biopłatów pobranych podczas gastroskopii oraz materiałów pochodzących z kieszonek dziąsłowych, od pacjentów z chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego. Badania prowadzone w kierunku obecności *Helicobacter pylori* 16S rRNA, metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR).
(1997-2002)
- **Katedra i Klinika Gastroenterologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie**
Wykrywanie zakażenia *Helicobacter pylori* u pacjentów z rakiem żołądka.
(1997-2002)
- **Zakład Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ**
Izolacja homogennego peptydu odpowiedzialnego za aktywność *Candida spp.* wobec szczepów *Helicobacter pylori* biorących udział w zakażeniu górnego odcinka przewodu pokarmowego.
(2003-2004, 2005-2006)
- **Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych oraz Katedra Fizjologii UJ CM**
Badania prowadzone w ramach projektu badawczego K/PDW/000067, dotyczące m.in. udziału bakterii w patomechanizmie nieswoistego zapalenia jelit.
(2007-2011)

- **Zakład Chemii Bioorganicznej Katedry Chemii Organicznej Wydz. Farmaceutycznego UJ CM**
Badania aktywności przeciwbakteryjnej pochodnych amin.
(od 2007-do chwili obecnej)
- **Zakład Bromatologii Wydz. Farmaceutycznego UJ.CM**
Hodowla i identyfikacja bakterii biorących udział w fermentacji mlekowej. Badania dotyczące prebiotyków
(2015-do chwili obecnej)

3.5. Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych

1991-1992 Department of Medicine, University of California, Irvine, USA, stypendium naukowe, udział w pracach badawczych nad patogennością *Helicobacter pylori*

3.6. Szkolenia

Podczas wieloletniej pracy zawodowej poszerzałam swoją wiedzę i umiejętności z zakresu mikrobiologii uczestnicząc w kursach i szkoleniach krajowych.

- 1996/1997 Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańsk-Wrzeszcz, Zakład Bakteriologii, kier. prof. dr hab. med. Janina Lalko – typowanie bakteriofagów pałeczek Enterobacteriaceae, namnażanie bakteriofagów, produkcja surowic diagnostycznych do typowania serologicznego *Escherichia coli* i *Salmonella spp.*
- 2002 Szkolenie „Laboratorium Mikrobiologiczne a Unia Europejska”.
I etap- Zasady organizacji i zarządzania laboratorium
II etap- Wymagania techniczne-podstawy teoretyczne i praktyczne
Warszawa, 04.10. 2002, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
- 2006 Jesienna Szkoła Mikrobiologii Klinicznej. Puławy, uczestnictwo w warsztatach mikrobiologicznych organizowanych przez krajowego konsultanta do spraw mikrobiologii prof. dr hab. med. Walerię Hryniewicz.
- 2011 Wiosenna Szkoła Mikrobiologii Klinicznej. Zakopane, uczestnictwo w warsztatach mikrobiologicznych organizowanych przez prezesa Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów prof.dr hab. med. Walerię Hryniewicz.
- 2011 Szkolenie „Technika Real-Time PCR”- podstawy techniki, projektowanie warunków reakcji, sposoby detekcji otrzymanego produktu, analiza otrzymanych wyników. Polygen, Wrocław.

W latach: 2001, 2003, 2004, 2006, 2007, 2012, 2016 -uczestnictwo w zajęciach naukowo-szkoleniowych prowadzonych w ramach doskonalenia zawodowego „Postępy w medycynie zakażeń”.

Organizatorzy szkoleń:

Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek,
Centrum Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych NIZP,
Fundacja „Centrum Mikrobiologii Klinicznej”,

Komitet Mikrobiologii PAN,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego,
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów

4. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I ORGANIZACYJNA

4.1. Osiągnięcia dydaktyczne

W latach 1978–1992 moja działalność dydaktyczna związana była z prowadzeniem zajęć w formie ćwiczeń z zakresu mikrobiologii dla studentów Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii (na kierunku lekarskim i kierunku: stomatologia), Wydziału Farmaceutycznego i Oddziału Analityki Medycznej (na kierunku: farmacja i kierunku: analityka medyczna) Akademii Medycznej w Krakowie (aktualnie UJ CM).

Od roku 2000 do chwili obecnej prowadzę zajęcia w formie ćwiczeń i seminariów z zakresu mikrobiologii dla studentów Wydziału Farmaceutycznego i Oddziału Analityki Medycznej UJ CM (na kierunku farmacja i kierunku analityka medyczna) oraz Wydziału Nauk o Zdrowiu (kierunki: położnictwo, pielęgniarstwo).

Prowadzę także ćwiczenia dla studentów zawodowych studiów podyplomowych z zakresu analityki medycznej.

W latach 2008, 2009, 2010 prowadziłam kurs specjalizacyjny dla diagnostów laboratoryjnych „Oporność drobnoustrojów na antybiotyki; podstawy teoretyczne i laboratoryjne, metody oznaczania wrażliwości szczepów na antybiotyki i chemioterapeutyki”.

W ramach działalności dydaktycznej przygotowuję na poszczególne zajęcia konspekty, instrukcje, pytania testowe i prezentacje.

W sumie zrealizowałam około 6500 godzin dydaktycznych w ramach pensum dydaktycznego, w tym 480 godzin na studiach podyplomowych.

Szczegółowy przebieg pracy dydaktycznej w Zał. 4, cz III, pkt. D.

4.1.1. Opieka naukowa nad studentami

- Opiekun naukowy Studenckiego Koła Naukowego prowadzonego przy Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM w latach 2006-2014.
CERTYFIKAT otrzymany od Studenckiego Towarzystwa Naukowego UJ CM poświadczający sprawowanie opieki przez habilitanta nad Kołem Naukowym przy Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM w latach 2006–2014 (Zał. 10).

- Promotor, opiekun naukowy 36 prac magisterskich studentów Wydz. Farmaceutycznego UJ CM, (kierunki: analityka medyczna i farmacja), realizowanych w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej w latach 2003-2016.

Jedna z prac magisterskich realizowana w latach 2014/2015 została nagrodzona przez Krajową Radę Diagnostów Laboratoryjnych w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich UJ CM (II miejsce) oraz w Wydziałowym Konkursie Prac Magisterskich UJ CM organizowanym przez Młodą Farmację (I miejsce).

- Opiekun studentów III i IV roku jednolitych studiów magisterskich na kierunku analityka medyczna, Wydział Farmaceutyczny, w latach 2006-2016.

4.1.2. Opieka naukowa nad doktorantami

Promotor pomocniczy w przewodzie doktorskim mgr Karoliny Klesiewicz. Obowiązek powierzony przez Radę Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w dn. 20.12.2012 (**Zał. 11**).

Tytuł pracy doktorskiej: Analiza wrażliwości oraz oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe szczepów *Helicobacter pylori* izolowanych od chorych z zakażeniem *Helicobacter pylori*, przy użyciu metod mikrobiologicznych i genetycznych. Data publicznej obrony: 14.11.2014r.

4.2. Osiągnięcia organizacyjne

4.2.1. Udział w pracach organizacyjnych na rzecz Uczelni

- Współdział w organizacji powołanego na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM w 2000 roku Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej. Jestem pracownikiem tego Zakładu od 2001 roku do chwili obecnej.
- Członek Rady Programowej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM kierunku analityka medyczna (od 2013 do chwili obecnej).
- Hospitacja zajęć dydaktycznych.
- Udział w pracach Wydziałowych Komisji Rekrutacyjnych w latach 2003-2005.
- Udział w organizacji wyborów władz Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2005 roku (członek Komisji Rekrutacyjnej).

5. OTRZYMANE NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

MEDAL ZŁOTY ZA DŁUGOLETNIĄ SŁUŻBĘ, postanowienie z 2009 roku. Odznaczenie państwowe przyznane przez Prezydenta RP Lecha Kaczyńskiego wyróżnionym pracownikom Uniwersytetu Jagiellońskiego, wręczone dn. 23 kwietnia 2010 roku.

Przyznawane za wzorowe i sumienne wykonywanie obowiązków wynikających z pracy zawodowej w służbie Państwa.

6. CZŁONKOSTWO W ORGANIZACJACH ORAZ TOWARZYSTWACH NAUKOWYCH

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW (PTM).
Okres członkostwa: od 1979 roku do chwili obecnej.

Wykaz opublikowanych prac i komunikatów prezentowanych na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych oraz szczegółowa informacja o prowadzonych zajęciach dydaktycznych znajduje się w Załączniku 4 do Wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004, 9:1-6.
2. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weavert LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992, 340:1194-1195.
3. Brown LM. *Helicobacter pylori* and routes of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000, 22: 283-297.
4. Camarotta G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Veneto G, Bernardi S, Boari A, Colizzi V, Fedeli G, Gasbarinni G. Role dental plaque in transmission of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1996, 22:174-177.
5. Al Asghar M, Al Hamoudi N, Anil S. Is the presence of *Helicobacter pylori* in the dental plaque of patients with chronic periodontitis a risk factor for gastric infection? *Can J Gastroenterol.* 2009, 23:177-179
6. Song Q, Lange T, Spahr A et al. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol.* 2000, 53:349-353.
7. Song Q, Haller B, Ulrich D et al. Quantitation of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 2000, 53(3):218-222.
8. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and route of transmission. *Epidemiol Rev.* 2000, 22:283-297.
9. Percival SL, Thomas JG. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health* 2009, 7(3): 469-477.
10. Matysiak-Budnik T., Megraud F.: *Helicobacter pylori* w praktyce lekarskiej. Wydawnictwo Byk Roland Polska, Warszawa 1998.
11. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter* 2004, 9:115-123.
12. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Traini T et al. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol.* 2008, 43:178-185.
13. Adams BL, Bates TC, Oliver JD. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Appl Environ Microbiol.* 2003, 69:7462-7466.
14. Cellini L, Di Campli E, Grande R, Di Bartolomeo S, et al. Detection of *Helicobacter pylori* associated with zoo-plankton. *Aquatic Microb Ecol.* 2005, 40:115-120.
15. Azevedo NF, Guimaraes N, Figueiredo C, Keevil CW, Vieira MJ. A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *World J Gastroenterol.* 2007, 33:157-169.
16. Cellini L, Grande R, Artese L, Marzio L. Detection of *Helicobacter pylori* in saliva and esophagus. *New Microbiologica* 2010, 33:351-357.
17. Miyabayashi I, Furihata K, Shimizu T, et al. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2000, 5(1):30-37.
18. Thomas E, Jiang C, Chi DS, Li C, Ferguson DA. The role of the oral cavity in *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* 1997, 92:2148-2154.
19. Labenz J, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* in gastroesophageal reflux disease: causal agent, independent or protective factor? *Gut* 1997, 41:277-280.
20. Kosunen TU, Seppala K, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992, 339:893-895.
21. Jaskowski TD, Martins TB, Hill HR, Litwin CM. Immunoglobulin A antibodies to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 1997, 35: 2999-3000.
22. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Estimating the world cancer burden: Globo-can 2000. *Int J Cancer.* 2001, 94: 153-156.

23. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest. 2004, 113:321-333.
24. Naumann M, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* induced epithelial cell signaling in gastric carcinogenesis. Trends Microbiol. 2004, 12:29-36.
25. Kuklińska U, Łasica AM, Jagusztyn-Krynica EK. Białko CagA *Helicobacter pylori* – pierwsza zidentyfikowana bakteryjna onkoproteina. Post Mikrobiol. 2011, 50(2): 97-106.
26. Crove SE. *Helicobacter* infection, chronic inflammation and the development of malignancy. Curr Opin Gastroenterol. 2005, 21:32-38.
27. Hocker M, Hohenberger P. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. Lancet 2003, 362(9391):1231-1233.
28. Yoshimura T, Shimoyama T, Tanaka M et al. Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with *Helicobacter pylori* infection. J Clin Pathol. 2000, 53(7):532-536.
29. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc Natl Acad Sci. USA 2008; 105:1003-1008.
30. Dzierżanowska-Fangrat K, Dzierżanowska D. Zakażenie *Helicobacter pylori* – implikacje kliniczne i terapeutyczne. Świat człowieka światem drobnoustrojów. Monografia pod red. W. Hryniewicz 2007, 35-41.
31. Zambon CF, Basso D, Navaglia F et al. Pro and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. Cytokine 2005, 29:141-152.
32. Konturek S. Fiziologia człowieka tom V: Układ trawienny i wydzielanie wewnętrzne. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydanie VI 2000, ISBN 83-233-1219-2.
33. Chmiela M, Wiśniewska M, Bąk L, Bielański W et al. Serological differentiation of *Helicobacter pylori* CagA(+) and CagA(-) infections. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2003, 51:131-136.
34. Konturek PC. Rola *Helicobacter pylori* w raku żołądka. Medycyna po Dyplomie 2006, 13 supl: 18-21.
35. Baran E. Zarys mikologii lekarskiej. Wrocław, 1998.
36. Zwolińska-Wcisło M, Brzozowski T, Kwiecień S, et al. Kolonizacja grzybicza przewodu pokarmowego w badaniach klinicznych i doświadczalnych. Przegl Lek. 2003, 6:81-89.
37. Zwolińska-Wcisło M. Zakażenie grzybicze żołądka i jego znaczenie kliniczne. Przegl Lek. 1993, 50:109-112.
38. Zwolińska-Wcisło M, Budak A, Bogdał J, Trojanowska D, Stachura J. Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. Med. Sci Monit. 2001, 7(5):982-988.
39. Dzierżanowska D. Zakażenia szpitalne. Bielsko-Biała, αmedica press 2008.
40. Brzozowski T, Zwolińska-Wcisło M, Konturek PC, Kwiecień S, Drozdowicz D, Konturek SJ, Stachura J, Budak A, Bogdał J, Pawlik WW, Hahn EG. Influence of gastric colonization with *Candida albicans* on ulcer healing in rats: effect of ranitidine aspirin and probiotic therapy. Scand J Gastroenterol. 2005, 40(3): 286-296.
41. Budak A, Trojanowska D, Zwolińska-Wcisło M, Bucka A, Borecka B. Charakterystyka grzybów izolowanych z żołądka u chorych z wrzodami oraz z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej. Mikol Lek. 2002, 9(1): 7-12.
42. Scott BB, Jenkins D. Gastro-oesophageal candidiasis. Gut 1982, 23:137-139.
43. Katzenstein A.L, Maksem J. Candidal infection of gastric ulcers. Histology, incidence and clinical significance. Am J Clin Pathol. 1979, 71:137-141.
44. Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut 1997, 40:701-703.
45. Ando T, Goto Y, Maeda O, Watanabe O, Ishiguro K, Goto H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. World J Gastroenterol. 2006, 12:181-186.
46. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. Am J Pathol. 2001, 158:647-654.

47. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995, 270:17771-17777.
48. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol. 1995, 33:2753-2756.
49. Dzierżanowska-Fangrat K, Rozynek E, Celińska-Cedro D, Jarosz M, Pawłowska J, Szadkowski A, Budzyńska A. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. Int J Antimicrob Agents 2005, 26:230-234.
50. Broutet N, Tchamgoue S, Pereira E, Lamouliatte H, Salamon R, Megraud F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy-results of an individual data analysis of 2751 patients. Aliment Pharmacol Ther. 2003, 17:99-109.
51. Dzierżanowska D. Antybiotyki w praktyce ambulatoryjnej. Alfa-medica Press, Bielsko-Biała, 2005
52. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goosens H, Glupczynski Y. Study Group participants. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotics consumption. Gut 2013, 62(1):34-42.
53. Gerritis MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis. 2006, 6(11):699-709.
54. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. European *Helicobacter pylori* Study Group. Management of *Helicobacter pylori* infection –the Maastricht IV Florence Consensus Report. Gut 2012, 61(5):646-664.
55. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007, 56(6):772-781.
56. Dzieniszewski J, Jarosz M, oraz Grupa Robocza PTG-E do spraw zakażenia *Helicobacter pylori*. Ustalenia Grupy Roboczej PTG-E dotyczące postępowania w zakażeniu *Helicobacter pylori*- consensus 2008. Gastroenterol Pol. 2008, 15(5): 323-331.
57. EUCAST clinical breakpoints for *Helicobacter pylori*, April 2011, Available from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_clinical_breakpointsfor_Helicobter_pylori.

47. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995, 270:17771-17777.
48. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol. 1995, 33:2753-2756.
49. Dzierżanowska-Fangrat K, Rozynek E, Celińska-Cedro D, Jarosz M, Pawłowska J, Szadkowski A, Budzyńska A. Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. Int J Antimicrob Agents 2005, 26:230-234.
50. Broutet N, Tchamgoue S, Pereira E, Lamouliatte H, Salamon R, Megraud F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy-results of an individual data analysis of 2751 patients. Aliment Pharmacol Ther. 2003, 17:99-109.
51. Dzierżanowska D. Antybiotyki w praktyce ambulatoryjnej. Alfa-medica Press, Bielsko-Biała, 2005
52. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y. Study Group participants. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotics consumption. Gut 2013, 62(1):34-42.
53. Gerritis MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis. 2006, 6(11):699-709.
54. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. European *Helicobacter pylori* Study Group. Management of *Helicobacter pylori* infection –the Maastricht IV Florence Consensus Report. Gut 2012, 61(5):646-664.
55. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007, 56(6):772-781.
56. Dzieniszewski J, Jarosz M, oraz Grupa Robocza PTG-E do spraw zakażenia *Helicobacter pylori*. Ustalenia Grupy Roboczej PTG-E dotyczące postępowania w zakażeniu *Helicobacter pylori*- consensus 2008. Gastroenterol Pol. 2008, 15(5): 323-331.
57. EUCAST clinical breakpoints for *Helicobacter pylori*, April 2011, Available from http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_clinical_breakpointsfor_Helicobter_pylori.

