
REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Infecția cu *Helicobacter pylori* la om: implicații în patologia umană, tipizarea tulpinilor bacteriene, testarea rezistenței la antibiotice

Doctorand **Camelia Raluca Prunduș**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Andreica Vasile**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

| | |
|---|----|
| 1. Microbiologie | 19 |
| 1.1. Istoric | 19 |
| 1.2. Gen și filogenie | 19 |
| 1.2.1. Specii gastrice de Helicobacter | 19 |
| 1.2.2. Specii enterohepatice de Helicobacter | 20 |
| 1.3. Microbiologia Helicobacter pylori | 20 |
| 1.3.1. Genom | 20 |
| 1.3.2. Morfologie | 21 |
| 1.3.3. Profil enzimatic | 21 |
| 1.3.4. Condiții de creștere | 22 |
| 1.3.5. Matricea celulară | 22 |
| 2. Epidemiologia infecției cu Helicobacter pylori | 23 |
| 2.1. Prevalența și distribuția geografică | 23 |
| 2.2. Sursa de infecție | 23 |
| 2.3. Căi de transmitere a infecției | 23 |
| 2.4. Recurența infecției | 24 |
| 3. Patogeneza infecției cu Helicobacter pylori | 25 |
| 3.1. Factori bacterieni | 25 |
| 3.1.1. Insula de patogenicitate cag PAI | 25 |
| 3.1.2. Citotoxina vacuolizantă asociată genei A (vac A) | 26 |
| 3.1.3. Rezistența în mediul acid | 26 |
| 3.1.4. Adezine și alte proteine membranare | 27 |
| 3.1.5. Lipopolizaharidele | 27 |
| 3.2. Răspunsul imun al gazdei | 28 |
| 3.2.1. Rolul anticorpilor în protecția imună | 28 |
| 3.2.2. Modularea răspunsului imun | 28 |
| 3.2.3. Activarea răspunsului imun dobândit | 28 |
| 3.2.4. Rezistența la fagocitoză și modularea activității celulelor dendritice | 29 |
| 3.2.5. Influențarea activității celulelor T | 29 |
| 3.3. Influența caracteristicilor genetice ale gazdei | 29 |
| 3.3.1. Interleukina 1 (IL1) | 29 |
| 3.3.2. Alte citochine | 31 |
| 4. Boli asociate cu infecția cu Helicobacter pylori | 31 |
| 4.1. Boli eso-gastro-duodenale | 31 |
| 4.2. Alte boli | 33 |
| 5. Diagnosticul infecției cu Helicobacter pylori | 37 |
| 5.1. Mijloace invazive de diagnostic | 37 |
| 5.1.1. Histologia | 37 |

| | |
|--|----|
| 5.1.2. Testul ureazei | 38 |
| 5.1.3. Cultura și testarea rezistenței la antibiotice | 38 |
| 5.1.4. Amplificarea genetică a ADN-ului bacterian în fragmentele de mucoasă gastrică (PCR și RT-PCR) | 39 |
| 5.2. Mijloace non-invazive de diagnostic | 39 |
| 5.2.1. Testul respirator al ureazei | 39 |
| 5.2.2. Antigenul fecal pentru <i>Helicobacter pylori</i> | 39 |
| 5.2.3. Teste serologice | 40 |
| 6. Tratatamentul infecției cu <i>Helicobacter pylori</i> | 41 |
| 6.1. Regimuri terapeutice utilizate | 41 |
| 6.1.1. Prima linie de tratament | 41 |
| 6.1.2. A doua linie de tratament | 42 |
| 6.1.3. A treia linie de tratament | 43 |
| 6.1.4. Terapia secvențială | 43 |
| 6.1.5. Terapia concomitentă | 43 |
| 6.2. Progrese privind dezvoltarea unui vaccin împotriva <i>Helicobacter pylori</i> | 43 |
| 6.3. Verificarea eradicării infecției | 44 |
| 6.4. Profilaxia infecției | 44 |
| CONTRIBUȚIA PERSONALĂ | |
| 1. Ipoteza de lucru/obiective | 47 |
| 2. Studiul 1 - Prevalența și implicațiile patologice actuale ale infecției cu <i>Helicobacter pylori</i> la pacienții cu sindrom dispeptic | 49 |
| 2.1. Introducere | 49 |
| 2.2. Ipoteza de lucru/obiective | 50 |
| 2.3. Material și metodă | 50 |
| 2.4. Rezultate | 51 |
| 2.5. Discuții | 61 |
| 2.6. Concluzii | 63 |
| 3. Studiul 2 - Implicarea infecției cu <i>Helicobacter pylori</i> în apariția bolilor inflamatorii intestinale. | 65 |
| 3.1. Introducere | 65 |
| 3.2. Ipoteza de lucru/obiective | 66 |
| 3.3. Material și metodă | 67 |
| 3.4. Rezultate | 68 |
| 3.5. Discuții | 73 |
| 3.6. Concluzii | 75 |
| 4. Studiul 3 - Compararea eficienței a trei regimuri terapeutice utilizate pentru eradicarea infecției cu <i>Helicobacter pylori</i>. Relația dintre răspunsul la tratament și prezența cag A | 77 |
| 4.1. Introducere | 77 |
| 4.2. Ipoteza de lucru/obiective | 79 |
| 4.3. Material și metodă | 79 |
| 4.4. Rezultate | 80 |

| | |
|--|-----|
| 4.5. Discuții | 86 |
| 4.6. Concluzii | 88 |
| 5. Studiul 4 - Cultivarea și testarea sensibilității la antibiotice a Helicobacter pylori | 89 |
| 5.1. Introducere | 89 |
| 5.2. Ipoteza de lucru/obiective | 89 |
| 5.3. Material și metodă | 90 |
| 5.4. Rezultate | 92 |
| 5.5. Discuții | 95 |
| 5.6. Concluzii | 95 |
| 6. Concluzii generale | 97 |
| 7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei | 99 |
| REFERINȚE | 101 |

Cuvinte cheie: Helicobacter pylori, România, rezistența la antibiotice, dispepsie

Introducere:

Infecția cu Helicobacter pylori (H. pylori) este întâlnită la aproximativ jumătate din populația lumii. Numeroase studii efectuate în ultimii 30 de ani, au dovedit implicarea bacteriei în patogeneza multor afecțiuni. Este clar stabilit rolul bacteriei în ceea ce privește patogeneza ulcerului gastric și duodenal, a gastritei, cancerului gastric și a limfomului asociat țesutului limfoid al mucoasei gastrice (MALT). În ceea ce privește rolul H. pylori în patogeneza unor boli extradiigestive (cardiologice, pulmonare, hematologice, dermatologice, alergologice, neurologice) s-au efectuat multiple cercetări, care au dus la un număr record de articole și cărți publicate, la ora actuală existând o revistă dedicată acestei bacterii.

În ciuda atenției deosebite care a fost acordată acestei bacterii, există încă lucruri puțin înțelese despre ea, cum ar fi calea de transmitere a infecției. Prevalența infecției este în scădere în țările dezvoltate, dar se menține la cote mari în țările în curs de dezvoltare. Scăderea prevalenței a fost posibilă datorită unor mijloace performante de diagnostic și faptului că infecția este frecvent tratată cu antibiotice. Utilizarea la scară largă a antibioticelor a dus însă la o creștere a rezistenței bacteriei la antibiotice, afectând astfel eficiența tratamentului.

În țările dezvoltate, testarea sensibilității la antibiotice după eșecul primei linii de tratament împotriva H. pylori, a devenit o practică curentă. Dar pentru aceasta, este necesară cunoașterea ratei de rezistență la antibiotice. În România există date insuficiente referitoare la acest domeniu.

În România cercetările privind infecția cu H. pylori au fost inițiate de profesor doctor Vasile Andreica imediat după descoperirea bacteriei. Din anul 2005 doctoranda face parte din echipa de cercetare condusă de domnul profesor Vasile Andreica în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Prof. Dr. Octavian Fodor Cluj Napoca, cu participarea la grantul de cercetare HELICOPAT-EPID. Această lucrare a fost elaborată cu scopul de a oferi noi date cu privire la infecția cu H. pylori în România: prevalența infecției, impactul ei asupra patologiei la ora actuală, implicarea factorilor de virulență bacteriană în patogeneza afecțiunilor esogastro-duodenale și rezistența la antibiotice.

Prin studiile efectuate au fost obținute date actuale privind tendințele epidemiologice ale infecției cu H. pylori la pacienții cu manifestări dispeptice din regiunea Cluj-Napoca. S-a pus în evidență modificarea spectrului etiologic al gastritelor și reducerea prevalenței ulcerelor gastrice și duodenale la pacienții cu manifestări dispeptice. Studiul eficienței terapeutice a unor regimuri de eradicare a infecției cu H. pylori aduce contribuții originale în practica clinică din țara noastră.

Contribuția personală:

Ipoteza generală

H. pylori constituie principalul factor de risc pentru dezvoltarea cancerului gastric. La ora actuală prevalența infecției cu H. pylori a scăzut în țările dezvoltate, dar se menține ridicată în țările în curs de dezvoltare. Acest fapt a fost posibil prin identificarea și tratarea corespunzătoare a infecției cu H. pylori. Creșterea rezistenței la antibiotice a bacteriilor la nivel global, constituie o problemă majoră de sănătate. Chiar dacă prevalența

infecției cu *H. pylori* s-a redus, rezistența bacteriei la antibiotice, mai ales la Claritromicină, este în continuă creștere. Acest lucru ar putea duce la reducerea ratelor de eradicare a infecției și implicit la creșterea frecvenței cancerului gastric.

Cu toate că s-a dovedit implicarea infecției cu *H. pylori* în patogeniza unor boli, acest domeniu nu pare a fi epuizat. Modificările induse de tratamentul utilizat pentru eradicarea infecției cu *H. pylori* la nivelul microbiotei intestinale, par a fi implicate într-o serie de afecțiuni considerate până recent de etiologie neprecizată (bolile inflamatorii intestinale).

Utilizarea unui regim terapeutic pentru eradicarea infecției cu *H. pylori* cât mai bine adaptat rezistenței la antibiotice din diferite zone geografice, pare să fie soluția optimă pentru menținerea ratei de răspuns la tratament.

Obiectivele generale ale cercetării:

- a. Evaluarea evoluției în timp a infecției cu *H. pylori* la pacienții cu simptome de tip dispeptic și implicații actuale în patologia eso-gastro-duodenală;
- b. Aprecierea relației de cauzalitate între apariția bolilor inflamatorii intestinale și prezența infecției cu *H. pylori*;
- c. Compararea eficienței unor regimuri terapeutice utilizate în eradicarea infecției cu *H. pylori* și identificarea implicării unor factori de virulență bacteriană în răspunsul la tratament;
- d. Cultivarea tulpinilor bacteriene cu evaluarea sensibilității la antibiotice.

Primul studiu - a avut ca scop evaluarea prevalenței și a implicațiilor patologice actuale ale infecției cu *H. pylori* la pacienții cu sindrom dispeptic în cadrul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Prof Dr. "Octavian Fodor" Cluj-Napoca, România.

Material și metodă: A fost efectuat un studiu de cohortă la pacienții cu simptome de tip dispeptic care s-au prezentat în Departamentul de Endoscopie al Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Prof Dr. "Octavian Fodor" Cluj-Napoca, România, între iunie 2016 și mai 2017, acuzând manifestări de tip dispeptic. Dispepsia a fost definită conform criteriilor Roma III ca prezența unor simptome digestive supărătoare (plenitudine postprandială, senzație de sațietate precoce, durere sau arsură epigastrică) fără niciun semn de boală organică care să explice simptomele, acestea fiind prezente în ultimele 3 luni, cu debutul simptomatologiei în ultimele 6 luni. Pacienții care au utilizat antibiotice sau medicație antisecretorie gastrică (antiacide, blocante ale receptorilor H₂, inhibitori ai pompei de protoni (IPP)) cu mai puțin de 4 săptămâni înaintea momentului includerii în studiu, au fost excluși din studiu. De asemenea, au fost excluși pacienții care anterior prezentării au suferit o operație la nivelul stomacului (gastrectomie totală sau parțială) s-au care au fost evaluați în Departamentul de Endoscopie pentru alte manifestări decât dispepsia (investigarea unui sindrom anemic, hemoragie digestivă superioară activă). Fiecare pacient a semnat un consimțământ informat și a răspuns la un chestionar referitor la date demografice, antecedente patologice personale și heredocolaterale, tratament anterior al infecției cu *H. pylori* (metodă de diagnostic, tratament). La toți pacienții s-a efectuat o esogastroduodenoscopie (la indicația medicului curant) cu prelevare de biopsie antrală și efectuarea testului rapid al ureazei.

Rezultate: Au fost incluși în studiu 955 subiecți cu vârsta cuprinsă între 18 și 91 ani. Jumătate din subiecții investigați au avut vârsta mai mică de 59 de ani. Majoritatea subiecților investigați au fost în clasa de vârstă 61-70 ani, urmată de clasa 51-60 ani. Majoritatea subiecților investigați au fost din mediul urban, diferența urban - rural fiind semnificativă statistic. Procentul subiecților de gen feminin a fost semnificativ mai mare comparativ cu procentul subiecților de gen masculin.

Simptomul cel mai frecvent raportat de subiecții incluși în studiu a fost durere epigastrică, urmat de pirozis și tulburări de tranzit la femei, respectiv grețuri la bărbați.

Două sute optzeci și patru subiecți au avut infecție cu *H. pylori*. Nu a existat o asociere semnificativă statistic între gen și infecția cu *H. pylori*. Infecția cu *H. pylori* a fost semnificativ mai frecventă la pacienții din mediul rural comparativ cu mediul urban.

Infecția cu *H. pylori* a fost cea mai frecventă la subiecții > 80ani, urmată de grupa de vârstă 21-30 ani și respectiv clasa de vârstă 41-50 ani.

Patruzeci și cinci din totalul de 955 subiecți au primit anterior tratament de eradicare a *H. pylori*. Cinsprezece din cei 284 subiecți care au prezentat *H. pylori* pozitiv au avut anterior tratament de eradicare, respectiv treizeci din cei 671 pacienți cu *H. pylori* negativ, fără a exista o asociere semnificativă statistic între tratamentul de eradicare pentru *H. pylori* aplicat anterior și actuala infecție cu *H. pylori*.

Cea mai frecventă patologie identificată la endoscopia digestivă superioară a fost gastrita. Nu s-a evidențiat o asociere semnificativă statistic între prezența esofagitei de reflux și infecția cu *H. pylori*. Unsprezece dintre subiecții eșantionului au prezentat esofag Barret fără a exista diferență semnificativă statistic între prezența infecției cu *H. pylori* la cei cu și fără esofag Barret.

Frecvența infecției cu *H. pylori* a fost semnificativ mai mare în rândul subiecților fără gastrită comparativ cu cei cu gastrită. Un procent semnificativ statistic mai mare din pacienții cu ulcer gastric au prezentat și infecție cu *H. pylori*. Similar cu asocierea dintre ulcerul gastric și infecția cu *H. pylori*, neoplasmul gastric s-a dovedit a fi asociat semnificativ cu infecția cu *H. pylori*. Trei dintre subiecții evaluați au avut limfom gastric, doi dintre aceștia având și infecție cu *H. pylori*. Nu s-a identificat o diferență semnificativă statistic între frecvența *H. pylori* la pacienții cu limfom gastric comparativ cu cei fără limfom gastric. Ulcerul duodenal a fost semnificativ statistic asociat cu infecția cu *H. pylori* (Fig. 14). Mai mult, prezența infecției cu *H. pylori* este factor de risc pentru ulcerul duodenal.

Nu s-a identificat o asociere semnificativă statistic între prezența anemiei feriprive și infecția cu *H. pylori*.

Concluzii: Declinul în timp al frecvenței infecției cu *H. pylori* relevă îmbunătățirea condițiilor socio-economice în zona Cluj Napoca. Totodată, s-a redus numărul de ulcere gastrice și duodenale în rândul pacienților cu simptome dispeptice.

Creșterea frecvenței infecției cu *H. pylori* în rândul pacienților cu manifestări dispeptice dar fără modificări endoscopice de gastrită dovedește că strategia testează și tratează poate fi utilizată în această regiune a țării. Diferența semnificativă între frecvența infecției la pacienții dispeptici în diferite zone ale României atrage atenția asupra necesității efectuării unor studii epidemiologice la nivel național.

Al doilea studiu - a investigat asocierea dintre bolile inflamatorii intestinale (BII) și infecția cu *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), pe o populație românească. O analiză secundară a studiat asocierea terapiei anterioare de eradicare a *H. pylori* și debutul BII.

Material și metodă: Un studiu caz - control (1: 2) cu design experimental a fost utilizat pentru a evalua asocierea dintre infecția cu *H. pylori* și BII pe o populație românească. Populația țintă a fost reprezentă de subiecți cu BII (cazuri) monitorizate în Ambulatoriul de specialitate al Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie „Prof. Dr. Octavian Fodor” Cluj-Napoca, România, din ianuarie 2016 până în iulie 2016.

Pacienții cu BII confirmată, care au primit sau nu terapie biologică (Infliximab, Adalimumab) au fost eligibili pentru studiu. Pacienții martori au fost recrutați dintre pacienții care s-au adresat aceluiași departament pentru investigații, însă fără nici un simptom dispeptic. Martorii au fost potriviți ca și gen și vârstă (± 5 ani) cu cazurile cu BII.

Participanții au primit același chestionar, conținând aspecte privind datele demografice, istoricul medical și tratamentul anterior pentru infecția cu *H. pylori*. Martorii cu terapie anterioară de eradicare a *H. pylori* au fost întrebați despre simptomele pe care le aveau, tipul de test utilizat pentru diagnosticul infecției și tratamentul de eradicare.

În plus, pacienții cu BII au fost întrebați despre debutul bolii. Activitatea BII a fost evaluată prin scorul Mayo respectiv Indexul Severității Harvey-Bradshaw pentru pacienții cu UC și BC. S-au obținut probe de sânge pentru testele de laborator de rutină și serologia *H. pylori* pentru toți pacienții incluși în studiu.

Criteriul de excludere pentru martori a constat în administrarea unei terapii de eradicare a *H. pylori* cu mai puțin de 12 luni înainte de înrolare în studiu, deoarece cazurile publicate în literatura de specialitate descriu un debut al BII, diagnosticat la 6-12 luni după terapia de eradicare.

Participanții care au fost seropozitivi pentru *H. pylori* și/sau au relatat infecție cu *H. pylori* dovedită anterior, au fost considerați *H. pylori* pozitivi.

Rezultate: Patru sute patruzeci și unu de subiecți au fost incluși în studiu, 147 cu BII. Vârsta pacienților a variat de la 18 ani la 85 de ani. Vârsta medie a cazurilor nu a diferit semnificativ statistic comparativ cu vârsta medie a martorilor. 37,4% din subiecții din lotul caz au fost din mediul rural, în timp ce din grupul de control 34,7% au fost din mediul rural, fără diferențe semnificative între grupuri.

Vârsta de debut a BII a variat de la 13 la 80 de ani, cu o medie de 37,7 ani. Colita ulceroasă (CU) a fost observată la 73,5% dintre cazuri, în timp ce boala Crohn (BC) a fost observată la 26,5% din cazurile investigate, cu o frecvență semnificativ mai mare a CU comparativ cu BC.

Treizeci și opt dintre pacienții cu BII (30 cu UC și 8 cu BC) și o sută douăzeci și nouă de subiecți din grupul martor au avut anticorpii IgG *H. pylori* pozitivi, cu o frecvență semnificativ mai mică printre cei cu BII. Prezența *H. pylori* s-a dovedit un factor de protecție pentru BII comparativ cu pacienții martor. Rata terapiei

anterioare de eradicare a H. pylori la pacienții cu BII a fost mai mică și statistic diferită de cea observată în grupul martor.

Opt pacienți din grupul cu BII (6 cu CU și 2 cu BC) au primit terapia de eradicare a H. pylori înainte de debutul bolii. Indicațiile pentru testarea H. pylori și terapia de eradicare înainte de debutul BII au fost simptomele dispeptice la toți cei 8 pacienți (epigastralgie la 6 dintre ei, grețuri la 4 dintre pacienți și balonarea respectiv la 3). La toți acești pacienți infecția cu H. pylori a fost diagnosticată prin testul ureazei după eso-gastro-duodenoscopie cu biopsie, în alt serviciu medical. Perioada liberă dintre terapia de eradicare a H. pylori și debutul BII la acești pacienți a fost cuprinsă între 6 luni și 7 ani. Cinci din opt (3 cu CU și 2 cu BC) pacienți au dezvoltat boala între 6 și 12 luni după terapia pentru eradicarea H. pylori în timp ce ceilalți trei au dezvoltat boala la trei, cinci și respective șapte ani după terapia de eradicare. Pacienții cu BII cu infecție anterioară cu H. pylori au fost tratați de către medicul specialist gastroenterolog din centrul medical unde s-a pus diagnosticul infecției. Toți au fost tratați înainte de 2016 și au primit tripla terapie bazată pe Claritromicină, timp de 7 zile. În grupul martor, majoritatea subiecților cu infecție anterioară cu H. pylori au fost tratați cu aceeași triplă terapie timp de 7 zile, cu excepția a doi dintre ei, care au prezentat alergie la Penicilină și au primit o triplă terapie cu Claritromicină și Metronidazol.

Concluzii: În populația noastră de studiu am găsit o asocieră negativă între infecția cu H. pylori și BII. Considerăm că sunt necesare studii suplimentare care să investigheze posibila asocieră a infecției cu H. pylori cu alte patologii extra-gastrice. Rămâne de demonstrat dacă efectul aparent protector al H. pylori pentru BII se datorează altor variabile sau este reprezentat de prezența bacteriei vii. Mai multe studii sunt necesare pentru a investiga rolul tratamentului de eradicare a infecției cu H. pylori ca factor de risc pentru dezvoltarea BII.

Studiul al treilea - a avut ca scop evaluarea eficienței a 3 regimuri terapeutice utilizate pentru eradicarea infecției cu Helicobacter pylori: 1) tripla terapie standard: Esomeprazol 2×40 mg/zi + Claritromicină 2×500 mg/day + Amoxicilină 2×1g/zi timp de 10 zile; 2) cvadrupla terapie pe bază de Bismut: Esomeprazol 2×40mg/zi + preparat pe bază de Bismut 4×120mg/zi + Metronidazol 4×250mg/zi + Tetraciclină 4×500mg/zi timp de 10 zile; 3) terapia secvențială: Esomeprazol 2×40mg/zi + Amoxicilină 2×1g/zi timp de 5 zile, apoi Nexium 2×40mg/zi + Claritromicină 2×500mg/zi + Metronidazol 2×500mg/zi timp de încă 5 zile.

Scopul secundar a fost stabilirea unei relații între prezența anticorpilor cagA și răspunsul la tratamentul de eradicare a infecției, la pacienții simptomatici.

Material și metodă: S-a realizat un studiu prospectiv cu urmărire la 1 lună de la sfârșitul tratamentului, asupra pacienților consecutivi cu manifestări de tip dispeptic și infecție cu H. pylori, care s-au prezentat în ambulatorul Institutului Regional de Gastroenterologie și Hepatologie Prof. Dr. Octavian Fodor Cluj. Populația accesibilă a fost reprezentată de totalitatea pacienților care s-au prezentat la un singur medic, în intervalul iunie 2015- mai 2017. Nu au fost incluși în studiu pacienții care au făcut tratament cu inhibitori ai pompei de protoni, antiacide sau antibiotice, cu o lună anterior prezentării în ambulatorul de specialitate. Conform criteriilor Maastrich IV, la pacienții tineri, fără semne de alarmă și fără antecedente heredocolaterale de neoplasme digestive, pentru identificarea infecției s-a efectuat un test neinvaziv (antigenul fecal pentru H. pylori). La restul pacienților infecția a fost diagnosticată prin testul ureazei efectuat la endoscopia digestivă superioară cu prelevare de biopsie de la nivelul antrului gastric. Tuturor pacienților cu H. pylori pozitiv li s-a recoltat o probă de sânge la includerea în studiu pentru evaluarea anticorpilor cagA.

Pacienților li s-a prescris unul dintre tratamentele de eradicare a infecției cu H. Pylori: pacienții care nu au mai făcut anterior tratament pentru eradicarea infecției cu H. pylori și nu au relatat utilizarea anterioară de Amoxicilină sau Claritromicină, au primit fie tripla terapie standard (grup 1), fie terapia secvențială (grup 3); pacienții care au relatat tratament anterior de eradicare a infecției cu H. pylori sau utilizare de Amoxicilină sau Claritromicină au primit cvadrupla terapie pe bază de Bismut. Pacienții au fost chemați la reevaluare la 4 săptămâni după terminarea tratamentului. S-a evaluat răspunsul la tratamentul de eradicare a infecției cu H. pylori prin determinarea antigenului fecal pentru H. pylori.

Rezultate: Au fost incluși în studiu 101 pacienți cu vârsta cuprinsă între 18 și 78 ani, jumătate din cei incluși în studiu având vârsta mai mică de 52 ani. Un procent semnificativ statistic mai mare a fost reprezentat de femei. Nu au existat diferențe semnificative statistic între vârstele pacienților de gen feminin comparativ cu cei de gen masculin. Un procent semnificativ statistic mai mare din pacienții investigați au provenit din mediul urban. S-a identificat o asocieră semnificativă statistic între gen și mediul de proveniență.

Patruzeci și unu de pacienți au fost încadrați în grupul 1, treizeci și trei în grupul 2, și douăzeci și șapte de pacienți în grupul 3. Șaizeci și șapte din pacienții investigați au fost diagnosticați folosind testul ureazei efectuat după prelevare de biospie de la nivelul antrului gastric. Patruzeci și opt dintre acești pacienți au fost cu gastrită, un număr mai mic cu ulcer duodenal și respectiv ulcer gastric.

Opt pacienți din cei 101 incluși în studiu nu s-au prezentat la reevaluare la 4 săptămâni de la terminarea tratamentului. La reevaluare, douăzeci și patru de pacienți au avut rezultat pozitiv (23.8%) și șaizeci și nouă rezultat negativ. Procentul cei mai mare de pozitivitate a fost identificat în grupul 1 iar cel mai mic în grupul 2, asocierea dintre vindecare și schema terapeutică fiind semnificativă statistic.

Cincezeci și patru din pacienții incluși în studiu au avut valori pozitive pentru Ac cagA, fără a exista diferențe semnificative statistic între cei cu rezultat Ac cagA pozitiv respectiv negativ. Un procent mai mare din pacienții cu Ac cagA pozitiv au avut la reevaluare un rezultat pozitiv pentru H. pylori, dar asocierea dintre prezența/absența Ac cagA și lipsa răspunsului la tratament nu a fost semnificativă statistic. Nici genul și nici mediul de proveniență nu s-au asociat semnificativ statistic cu Ac cagA. Nu s-a evidențiat o asociere semnificativă statistic între prezența patologiei gastro-duodenale identificată endoscopic și prezența Ac cagA. Nu s-a evidențiat o asociere semnificativă statistic între gen și răspunsul terapeutic, respectiv între mediu și răspunsul terapeutic.

Concluzii: Rata mai mare de eradicare a infecției cu H. pylori utilizând cvadrupla terapie pe bază de bismut comparativ cu tripla terapie standard și secvențială ne îndreptățește să susținem faptul că profilul rezistenței la antibiotice a bacteriei s-a schimbat în România. În acest context, propunem ca Transilvania să fie considerată zonă cu rezistență crescută a H. pylori la Claritromicină. În consecință, considerăm că cvadrupla terapie pe bază de Bismut ar trebui să reprezinte prima linie de tratament pentru eradicarea H. pylori în Transilvania.

Pe baza rezultatelor obținute recomandăm efectuarea unor studii suplimentare pe loturi mai mari de pacienți, în ceea ce privește rezistența la antibiotice a H. pylori în România și rolul cagA în răspunsul la tratamentele de eradicare.

Al patrulea studiu - a avut ca scop obținerea culturilor de Helicobacter pylori pentru testarea sensibilității și rezistenței la antibiotice.

Material și metodă: S-a realizat un studiu de cohortă asupra pacienților consecutivi care au efectuat endoscopie digestivă superioară, populația accesibilă fiind reprezentată de totalitatea pacienților care s-au prezentat la un singur medic, în intervalul februarie-martie 2008. Pentru fiecare pacient s-a prelevat un set de trei biopsii gastrice, două de la nivelul mucoasei antrale (una pentru testul rapid al ureazei și una pentru cultura bacteriană) și una de la nivelul mucoasei corpului gastric (pentru cultura bacteriană).

În funcție de rezultatul la testul rapid al ureazei, pacienții au fost împărțiți în 3 loturi: lotul A a cuprins perechile de probe bioptice de la pacienții la care testul ureazei a fost intens pozitiv (la 15 minute), lotul B a cuprins perechile de probe bioptice de la pacienții la care pozitivarea testului ureazei s-a făcut tardiv, lotul C a cuprins perechile de probe bioptice de la pacienții la care testul ureazei a fost negativ.

Prelevarea fragmentelor bioptice pentru cultură s-a făcut pe medii de transport speciale: Portagerm pylori. Pentru cultivare am încercat două variante: prima a utilizat plăci cu un mediu special pentru H.pylori: Helicobacter pylori BioMerieux, plăci turnate, iar pentru a doua variantă s-a preparat un mediu selectiv pentru H.pylori. Pentru a crea atmosfera de microaerofilie cultivarea s-a realizat într-un dispozitiv special denumit Anaerojar Oxoid. S-a realizat însămânțarea probelor de biopsie pe toată suprafața plăcilor. S-a făcut incubarea acestor probe pentru 7-10 zile în atmosfera de microaerofilie. După 5 zile plăcile au fost examinate pentru a se observa creșterea bacteriană, iar apoi au fost examinate zilnic. Plăcile pe care nu s-a dezvoltat nimic s-au incubat pentru încă două zile în atmosfera menționată. Coloniile suspecte de a fi Helicobacter pylori s-au identificat prin prezența ureazei, catalazei pozitive, precum și a oxidazei pozitive, hipurat negative. După efectuarea prealabilă a colorației Gram cultura a fost examinată la microscop. Pentru testarea sensibilității la antibiotice a bacteriei H. pylori am utilizat metoda E-test, care este și metoda agreată de Grupul European de Studii pentru H. pylori.

Rezultate: În lotul A au fost incluși 24 de pacienți la care testul rapid al ureazei s-a pozitivat la 15 minute de la recoltare. Lotul B a inclus 4 pacienți cu pozitivare tardivă a testului ureazei. Lotul C a fost alcătuit din 5 pacienți la care testul ureazei a fost negativ. După 9-10 zile de la însămânțare s-a observat prezența unor colonii discrete translucente și non coalescente. Din cele 24 de perechi de probe aparținând pacienților din lotul A, s-au obținut culturi bacteriene la 21 de perechi de probe. La 19 perechi s-a obținut cultură atât din corp cât și din antru, iar la două perechi s-a obținut cultură numai din antru. La 3 pacienți nu s-au obținut

culturi. La cele patru perechi de probe aparținând lotului B nu s-a decelat creștere bacteriană. La una dintre probele care au fost pozitive la 24 de ore, la aproximativ două zile de la incubare, pe mediul de cultură s-a observat creșterea unei enterobacterii producătoare de urează: *Oligella ureolytica*. În lotul C nu s-au obținut culturi bacteriene.

Testarea sensibilității la antibiotice s-a realizat la 10 tulpini de *H. pylori*. Acestea au fost testate la Amoxicilină, Claritromicină, Metronidazol și Tetraciclină. Testarea sensibilității la antibiotice a tulpinilor de *H. pylori* izolate a arătat rezistență la Claritromicină de 30% și de 40% la Metronidazol. Nu s-a observat rezistență la Amoxicilină și la Tetraciclină.

Concluzii: Coroborând rezultatele studiului referitor la eficiența terapiilor de eradicare a infecției cu *H. pylori* cu rezultatele acestui substudiu ajungem la concluzia că pentru identificarea unei scheme terapeutice cu maxima eficiență, sunt necesare studii suplimentare pe loturi mai mari de pacienți. Absența rezistenței la Amoxicilină și Tetraciclină ne permit să susținem utilizarea acestor antibiotice în schemele de eradicare a *H. pylori*. Rezistența crescută la Claritromicină presupune evitarea utilizării ei de rutină pentru eradicarea *H. pylori*. Valoarea rezistenței la Claritromicină de 30% plasează zona Transilvaniei în arie de rezistență crescută la acest antibiotic, astfel încât cvadrupla terapie cu Bismut ar trebui considerate drept prima linie de tratament în eradicarea infecției.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Un punct de originalitate al tezei constă în studierea tendințelor epidemiologice ale infecției cu *Helicobacter pylori* la pacienții cu manifestări dispeptice din regiunea Cluj-Napoca. S-a dovedit reducerea prevalenței infecției cu *H. pylori* la populația cu manifestări dispeptice. Această observație este în strânsă corelație cu îmbunătățirea condițiilor socio-economice în România. S-a observat o scădere a prevalenței la 38% și la pacienții din mediul rural.

Un alt aspect original îl constituie dovedirea schimbării spectrului etiologic al gastritelor. Infecția cu *Helicobacter pylori* nu mai reprezintă principalul factor etiologic al gastritelor.

Prevalența ulcerului gastric și duodenal este foarte redusă la pacienții cu manifestări dispeptice. Aceste observații schimbă practica clinică, prin necesitatea căutării altor factori etiologici la pacienții cu manifestări dispeptice.

De o importanță deosebită este și studierea eficienței terapeutice a regimurilor de eradicare ale infecției cu *H. pylori*. Raportarea unei rate de eradicare de 87% pentru cvadrupla terapie comparativ cu 65% rata de eradicare la terapia standard, aduce contribuții originale la practica clinică din țara noastră.

Un aspect original este reprezentat de studierea asocierii infecției cu *Helicobacter pylori* la pacienții cu BII din această regiune geografică. S-a dovedit o prevalență foarte redusă a infecției la pacienții cu BII. Tratamentul anterior al infecției cu *H. pylori* nu poate fi considerat agent cauzal al BII.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Helicobacter pylori infection in human: implications in human pathology, bacterial strains typing, antibiotic resistance

Doctoral candidate **Camelia Raluca Prunduș**

Doctoral supervisor **Prof.dr. Andreica Vasile**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Contents

INTRODUCTION

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

| | |
|--|----|
| 1. Microbiology | 19 |
| 1.1. History | 19 |
| 1.2. Gender and phylogeny | 19 |
| 1.2.1. Gastric Helicobacter species | 19 |
| 1.2.2. Enterohepatic Helicobacter species | 20 |
| 1.3. Helicobacter pylori microbiology | 20 |
| 1.3.1. Genome | 20 |
| 1.3.2. Morphology | 21 |
| 1.3.3. Enzymatic profile | 21 |
| 1.3.4. Growth conditions | 22 |
| 1.3.5. Cellular matrix | 22 |
| 2. Helicobacter pylori infection epidemiology | 23 |
| 2.1. Prevalence and geographical distribution | 23 |
| 2.2. Source of infection | 23 |
| 2.3. Means of transmission | 23 |
| 2.4. Recurrent infection | 24 |
| 3. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection | 25 |
| 3.1. Bacterial factors | 25 |
| 3.1.1. Cag PAI pathogenicity island | 25 |
| 3.1.2. Gene A associated vacuolated cytotoxin (vac A) | 26 |
| 3.1.3. Resistance in acid medium | 26 |
| 3.1.4. Adhesins and other membrane proteins | 27 |
| 3.1.5. Lipopolysaccharide | 27 |
| 3.2. The immune response of the host | 28 |
| 3.2.1. The roll of antibodies in immune protection | 28 |
| 3.2.2. Modulation of the immune response | 28 |
| 3.2.3. Activation of acquired immune response | 28 |
| 3.2.4. The resistance to phagocytosis and modulation of dendritic cells activity | 29 |
| 3.2.5. Influence on the T cells activity | 29 |
| 3.3. Influence of genetic characteristics of the host | 29 |
| 3.3.1. Interleukin 1 (IL1) | 29 |
| 3.3.2. Other cytokines | 31 |
| 4. Diseases associated with Helicobacter pylori infection | 31 |
| 4.1. Eso-peptic disease | 31 |
| 4.2. Other diseases | 33 |

| | |
|---|----|
| 5. The diagnosis of Helicobacter pylori infection | 37 |
| 5.1. Invasive diagnostic tools | 37 |
| 5.1.1. Histology | 37 |
| 5.1.2. Urease test | 38 |
| 5.1.3. Culture and antibiotic resistance testing | 38 |
| 5.1.4. Genetic amplification of the bacterial DNA in gastric fragments (PCR and RT-PCR) | 39 |
| 5.2. Non- invasive diagnostic tools | 39 |
| 5.2.1. Urease breath test | 39 |
| 5.2.2. Helicobacter pylori fecal antigen | 39 |
| 5.2.3. Serological tests | 40 |
| 6. Helicobacter pylori infection treatment | 41 |
| 6.1. Regimens used | 41 |
| 6.1.1. First line treatment | 41 |
| 6.1.2. Second line treatment | 42 |
| 6.1.3. Third line treatment | 43 |
| 6.1.4. Sequential therapy | 43 |
| 6.1.5. Concomitant therapy | 43 |
| 6.2. Progress on developing a vaccine against Helicobacter pylori | 43 |
| 6.3. Check infection eradication | 44 |
| 6.4. Prophylaxis | 44 |
| PERSONAL CONTRIBUTION | |
| 1. Hypothesis. Objectives | 47 |
| 2. Study 1 - Current prevalence and pathological implications of Helicobacter pylori in patients with dyspepsia | 49 |
| 2.1. Introduction | 49 |
| 2.2. Hypothesis. Objectives | 50 |
| 2.3. Material and method | 50 |
| 2.4. Rezultate | 51 |
| 2.5. Discuții | 61 |
| 2.6. Conclusions | 63 |
| 3. Study 2 - The involvement of H. pylori in the development of inflammatory bowel diseases | 65 |
| 3.1. Introduction | 65 |
| 3.2. Hypothesis. Objectives | 66 |
| 3.3. Material and method | 67 |
| 3.4. Results | 68 |
| 3.5. Discussions | 73 |
| 3.6. Conclusions | 75 |
| 4. Study 3 - Comparing the effectiveness of three regimens used to eradicate Helicobacter pylori infection. The relationship between the response and the presence cag A | 77 |
| 4.1. Introduction | 77 |
| 4.2. Hypothesis. Objectives | 79 |

| | |
|--|-----|
| 4.3. Material and method | 79 |
| 4.4. Results | 80 |
| 4.5. Discussions | 86 |
| 4.6. Conclusions | 88 |
| 5. Study 4 - Growing and antibiotic susceptibility testing of Helicobacter pylori | 89 |
| 5.1. I Introduction | 89 |
| 5.2. Hypothesis. Objectives | 89 |
| 5.3. Material and method | 90 |
| 5.4. Results | 92 |
| 5.5. Discussions | 95 |
| 5.6. Conclusions | 95 |
| 6. General conclusions | 97 |
| 7. Originality and innovative contributions of the thesis | 99 |
| REFERENCES | 101 |

Key words: Helicobacter pylori, Romania, antibiotic resistance, dyspepsia

Introduction:

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection is found in about half of the world's population. Numerous studies over the past 30 years have proved the involvement of bacteria in the pathogenesis of many diseases. The role of bacteria is clearly defined in the pathogenesis of gastric and duodenal ulcers, gastritis, gastric cancer and lymphoma of gastric mucosa associated with lymphoid tissue (MALT). Regarding the role of *H. pylori* in the pathogenesis of extradigestive diseases (cardiac, pulmonary, hematologic, skin, allergy, neurological) many studies have been conducted that led to a record number of articles and books published. Today there is a magazine dedicated to the bacteria.

Despite the special attention that was given to this bacteria is still poorly understood things about it, such as the route of transmission. Prevalence is decreasing in developed countries, but still remains at large in developing countries. The decrease was possible due to the diagnostic performance means and to the fact that the infection is commonly treated with antibiotics. Widespread use of antibiotics has led to an increase bacterial resistance to antibiotics, thus affecting the efficiency of the treatment.

In developed countries, antibiotics susceptibility testing after failure of first line against *H. pylori* treatment has become a common practice. But it is necessary to know the rate of antibiotic resistance. In Romania there are insufficient data on this subject.

In Romania research on *H. pylori* infection were initiated by Prof. Dr. Vasile Andreica immediately after discovery of the bacterium. Since 2005 PhD student is part of the research team led by Professor Vasile Andreica in the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology Prof. Dr. Octavian Fodor Cluj Napoca, participation in research grant HELICOPAT-EPID. This paper was prepared in order to provide new data on *H. pylori* infection in Romania: prevalence, its impact on currently pathology, its involvement in the pathogenesis of eso-peptic diseases and resistance to antibiotics.

The studies obtained current data on epidemiological trends of *H. pylori* infection in patients with dyspeptic symptoms in the region of Cluj-Napoca. It highlighted change etiologic spectrum of gastritis and reducing the prevalence of gastric and duodenal ulcers in patients with dyspeptic symptoms. Study of therapeutic efficacy arrangements for eradication of *H. pylori* infection brings original contributions to clinical practice in our country.

Personal contribution:

Hypothesis

H. pylori is the main risk factor for developing gastric cancer. At present the prevalence of H. pylori infection has decreased in developed countries, but remains high in developing countries. This was possible through the identification and treatment of H. pylori infection. Increased antibiotic resistance of bacteria worldwide, is a major health problem. Even though the prevalence of H. pylori infection has decreased, the resistance of bacteria to antibiotics, especially clarithromycin, is steadily increasing. This could result in reduced rates of eradication of infection and thus increase incidence of gastric cancer.

Although the involvement of H. pylori infection in the pathogenesis of different diseases was proved, this area seems to be exhausted. The changes induced by the treatment used to eradicate H. pylori infection in the intestinal microbiota, appear to be involved in a number of diseases of unknown etiology until recently considered (Inflammatory bowel diseases).

Use of a therapeutic regimen for the eradication of H. pylori infection well adapted for antibiotic resistance in different geographical areas, seems to be the optimal solution to maintain response rates to treatment.

The general objectives of research:

- a. Evaluation of time evolution of H. pylori infection in patients with dyspeptic symptoms and current implications in eso-gastro-duodenal pathology;
- b. Assessment of causality between the occurrence of inflammatory bowel disease and the presence of H. pylori infection;
- c. Comparing the effectiveness of therapeutic regimens used in the eradication of H. pylori infection and identify the involvement of bacterial virulence factors in response to treatment;
- d. The cultivation of bacterial strains with antibiotic susceptibility evaluation.

Study 1 - it aimed to evaluate the prevalence and current pathological implications of H. pylori infection in patients with dyspepsia in the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology, Prof Dr "Octavian Fodor" Cluj-Napoca, Romania.

Material and method: A cohort study was conducted in patients with dyspeptic symptoms that were presented in the Endoscopy Department of Gastroenterology and Hepatology Regional Institute Prof Dr "Octavian Fodor" Cluj-Napoca, Romania, between June 2016 and May 2017, accusing dyspeptic symptoms. Dyspepsia was defined according to Rome III as the presence of digestive symptoms troublesome (postprandial fullness, feeling of early satiety, pain or heartburn) without any signs of organic disease to explain the symptoms, which are present in the last 3 months with symptom onset in the last six months. Patients who had gastric antisecretory medication or antibiotics (antacids, H₂ blockers, proton pump inhibitors (PPIs)) by more than 4 weeks prior to baseline were excluded from the study. Also excluded were patients who previously have had a total or partial gastrectomy or were evaluated for other events than dyspepsia in the Department of endoscopy (investigation of anemic syndrome, upper gastrointestinal bleeding active). Each patient signed an informed consent and answered a questionnaire on demographics, medical history and personal family history, previous treatment of H. pylori infection (method of diagnosis, treatment). All patients performed an esogastroduodenoscopy (at the physician recommendation) with antral biopsy sampling and rapid urease test was performed.

Results: 955 subjects aged between 18 and 91 years were included in the study. Half of the subjects investigated were aged less than 59 years. Most investigated subjects were age class 61-70 years, followed by 51-60 years class. Most investigated subjects were from urban areas, the urban - rural difference is statistically significant. The percentage of female subjects was significantly higher than the percentage of male subjects.

The most common symptom reported by subjects included in the study was epigastric pain, followed by heartburn and transit disorders in women and nausea in men.

Two hundred eighty-four subjects had H. pylori infection. There was no statistically significant association between gender and H. pylori infection. H. pylori infection was significantly more frequent in patients in rural areas compared with urban areas.

H. pylori infection was most common in subjects > 80 years, followed by the age group 21-30 years and 41-50 years age class respectively.

Forty-five out of 955 subjects had received prior treatment to eradicate H. pylori. Fifteen of the 284 subjects who had positive H. pylori had previously a eradication treatment, respectively thirty of the 671 patients with

negative *H. pylori*, with no statistically significant association between previous *H. pylori* eradication treatment and current *H. pylori* infection.

The most frequent pathology identified in upper gastrointestinal endoscopy was gastritis. There wasn't a statistically significant association between the presence of reflux esophagitis and *H. pylori* infection. Eleven subjects had Barrett's esophagus but there was no statistically significant differences between the presence of *H. pylori* infection in patients with and without Barrett's esophagus.

H. pylori infection rate was significantly higher in subjects without gastritis compared to those with gastritis. A statistically significant higher proportion of patients with gastric ulcer had infection with *H. pylori*. Similar with the association between gastric ulcers and *H. pylori* infection, gastric cancer was found to be significantly associated with *H. pylori* infection. Three of evaluated subjects had gastric lymphoma, and two of them had *H. pylori* infection. No statistically significant difference was found between the frequency of *H. pylori* in patients with gastric lymphoma compared with those without gastric lymphoma. Duodenal ulcer was significantly associated with *H. pylori* infection (Fig. 14). Moreover, the presence of *H. pylori* infection is a risk factor for duodenal ulcer.

No statistically significant association was identified between the presence of iron deficiency anemia, and infection with *H. pylori*.

Conclusions: The decline of *H. pylori* infection rate reveals improvement of socio-economic conditions in the Cluj Napoca area. However, the number of gastric and duodenal ulcers in patients with dyspeptic symptoms reduced.

Increased frequency of *H. pylori* infection in patients with dyspeptic symptoms without endoscopic gastritis changes proves that test and treat strategy may be used in this region of the country. The significant difference between the frequency of infection in dyspeptic patients in different parts of Romania emphasizes the need to conduct nationwide epidemiological studies.

Study 2 - investigated the association between inflammatory bowel disease (IBD) and infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), in a Romanian population. A secondary analysis of the study was regarding the association between prior eradication therapy for *H. pylori* and the onset of IBD.

Material and method: A case - control study (1: 2) experimental design was used to evaluate the association between *H. pylori* infection and IBD on a Romanian population. The target population was represented by subjects with IBD (cases) monitored in Ambulatory of the Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology "Prof. Dr. Octavian Fodor "Cluj-Napoca, Romania, from January 2016 to July 2016.

Patients with confirmed IBD receiving or not biological therapy (Infliximab, Adalimumab) were eligible for the study. Witnesses patients were recruited among patients who have addressed the same department for investigation, but had no dyspeptic symptoms. Controls were suitable as gender and age (± 5 years) with cases with IBD.

Participants were given the same questionnaire containing issues about demographics, medical history and previous treatment for *H. pylori* infection. Witnesses with previous eradication therapy for *H. pylori* were asked about symptoms they had, the type of test used to diagnose infection and eradication treatment.

In addition, patients with IBD were asked about onset of the disease. IBD activity was evaluated by the Mayo score Severity respectively Harvey-Bradshaw index for patients with UC and CD. There were obtained blood samples for routine laboratory testing and for *H. pylori* serology for all patients included in the study.

Exclusion criteria for witnesses consisted of administering therapy to eradicate *H. pylori* less than 12 months prior to enrollment in the study because cases published in the literature describing the onset of IBD diagnosed 6-12 months after eradication therapy.

Participants who were seropositive for *H. pylori* and / or reported previously established *H. pylori* infection were considered *H. pylori* positive.

Results: Four hundred forty-one subjects were enrolled in the study, 147 with IBD. Patient age ranged from 18 years to 85 years. The average age of cases did not differ statistically significant compared with average age witnesses. 37.4% of subjects in the case group were from rural areas, whereas in the control group 34.7% were in rural areas, without significant differences between groups.

The age of onset of IBD ranged from 13 to 80 years, averaging 37.7 years. Ulcerative colitis (UC) was observed in 73.5% of cases, while Crohn's disease (CD) was observed in 26.5% of investigated cases, with a significantly higher frequency of UC as compared to the CD.

Thirty-eight of the patients with IBD (30 with UC and 8 with CD) and one hundred twenty-nine subjects in the control group had IgG antibodies to *H. pylori*, with a significantly lower frequency among those with IBD. The

presence of *H. pylori* has been shown a protection factor for IBD patients as compared to controls. Rate for prior eradication therapy for *H. pylori* in patients with IBD was lower and statistically different from that observed in the control group.

Eight patients in the IBD group (6 with UC and 2 with CD) received *H. pylori* eradication therapy before disease onset. Indications for testing and *H. pylori* eradication therapy before the onset of IBD were dyspeptic symptoms in all 8 patients (6 of them heartburn, nausea in 4 and bloating in 3 of patients). In all these patients *H. pylori* infection was diagnosed by urease test after eso-gastro-duodenoscopy biopsy in other medical service. Free period of *H. pylori* eradication therapy and the onset of IBD in these patients was between 6 months and 7 years. Five of eight (3 with UC and 2 with CD) patients developed the disease between 6 and 12 months after eradication therapy for *H. pylori* while the other three have developed the disease three, five and seven years after eradication therapy. IBD patients with previous *H. pylori* infection were treated by gastroenterologist from the medical center where infection was diagnosed. All were treated before 2016 and received triple therapy based on Clarithromycin for seven days. In the control group, most subjects with previous *H. pylori* infection were treated with the same triple therapy for 7 days, with the exception of two of them, who had penicillin allergy and received a triple combination with Clarithromycin and Metronidazole.

Conclusions: In our study population we found a negative association between *H. pylori* infection and IBD. We believe that further studies are needed to investigate the possible association of *H. pylori* infection with other extra-gastric pathologies. It remains to be shown if the apparent protective effect of *H. pylori* for IBD is due to other variables or to the presence of live bacteria. More studies are needed to investigate the role of eradication treatment for *H. pylori* infection as a risk factor for the development of IBD.

Study 3 - it was aimed to evaluate the effectiveness of the three treatment regimens used for the eradication of *Helicobacter pylori*: 1) standard triple therapy: Esomeprazole 2 × 40 mg / day + Clarithromycin 2 × 500 mg / day + Amoxicillin 2 × 1 g / day for 10 days ; 2) bismuth quadruple therapy: Esomeprazole 2 × 40 mg / day + bismuth preparation 4 × 120 mg / day + 4 × Metronidazole 250 mg / day + Tetracycline 4 × 500 mg / day for 10 days; 3) The sequential therapy: Esomeprazole 2 × 40 mg / day + Amoxicillin 2 × 1 g / day for 5 days, then Nexium 2 × 40 mg / day + Clarithromycin 2 × 500 mg / day + metronidazole 2 × 500 mg / day for 5 days. Secondary goal was to establish a relationship between the presence of cagA antibodies and the response to treatment in eradicate the infection in symptomatic patients.

Material and method: A prospective study was performed tracking 1 month after the end of treatment on consecutive patients with dyspeptic symptoms type and *H. pylori* infection, which were presented in ambulatory Regional Institute of Gastroenterology and Hepatology Prof. Dr. Octavian Fodor Cluj . The population was represented by all accessible patients presenting to a single physician, in the range of 2015-May June 2017. Were not included in the study patients who have received treatment with proton pump inhibitors, antacids and antibiotics, with a month before submitting the ambulatory specialist. IV Maastricht criteria in young patients without alarm and without a family history of digestive neoplasms, infection was identified with a noninvasive test (fecal antigen *H. pylori*). In the remaining patients the infection was diagnosed by the urease test performed from biopsy sampling of the gastric antrum after upper digestive endoscopy. All patients with *H. pylori* were harvested from a blood sample for the evaluation of baseline cagA antibodies.

Patients were prescribed one treatment to eradicate *H. pylori* infection: patients who have not previously been treated for eradication of *H. pylori* infection and not reported previous use of amoxicillin or clarithromycin, received either standard triple therapy (group 1) or sequential therapy (group 3); patients who have previously reported the eradication treatment of *H. pylori* infection or amoxicillin or clarithromycin use received bismuth quadruple therapy. Patients were called to re-evaluation at 4 weeks after treatment. We evaluate the response to eradication treatment by determining *H. pylori* fecal antigen.

Results: They were included in this study 101 patients aged 18 to 78 years, half of those included in the study aged less than 52 years. A significantly higher percentage was represented by women. There were no statistically significant differences between age female patients compared to males. A percentage significantly higher in patients investigated were from urban areas. It was found a statistically significant association between gender and background.

Forty-one patients were enrolled in group 1, thirty-three in group 2 and twenty-seven patients in group 3. Sixty-seven of the evaluated patients were diagnosed using urease test performed after sampling biopsy from

the gastric antrum. Forty-eight of these patients had gastritis, fewer duodenal ulcer and gastric ulcer respectively.

Eight of the 101 patients included in the study did not presented to 4 weeks after treatment evaluation. On review, twenty-four patients were positive (23.8%) and sixty-nine negative. The higher percentage of positivity was identified in group 1 and the smallest one in group 2, the combination of healing and the treatment regimen being statistically significant.

Fifty-four of the studied patients were positive for cagA with no statistically significant differences between those with positive and negative results for cagA Ab. A larger percentage of patients with positive cagA Ab had a positive result for the reevaluation of *H. pylori*, but the combination of the presence / absence of Ab cagA and lack of response to treatment was not statistically significant. Gender or area of origin were not statistically significantly associated with cagA Ab. There was not a statistically significant association between the presence of gastroduodenal pathology identified by endoscopy and the presence of Ab cagA. There was not a statistically significant association between gender and therapeutic response or between the environment and response to therapy.

Conclusions: The higher rate of eradication of *H. pylori* infection using bismuth quadruple therapy versus standard triple therapy and sequential enables us to support that antibiotic resistance profile of bacteria has changed in Romania. In this context, we propose that Transylvania to be considered area of increased *H. pylori* resistance to Clarithromycin. Consequently, we believe that bismuth quadruple therapy should be the first line treatment for *H. pylori* eradication in Transylvania.

Based on the results obtained we recommend additional studies on larger groups of patients, in terms of antibiotic resistance for *H. pylori* Romania and role of cagA in the response to eradication treatment.

Al patrulea studiu - aimed at obtaining cultures of *Helicobacter pylori* for antibiotic susceptibility and resistance testing.

Material and method: A cohort study of consecutive patients who performed upper gastrointestinal endoscopy was conducted, accessible population represented by all patients who presented to one doctor, between February-March 2008. For each patient has been taken a set of three gastric biopsies: two from antral mucosa (one for rapid urease test and one for bacterial culture) and one from mucosal gastric body (for bacterial culture).

Depending on the result of urease test, the patients were divided into 3 groups: Group A comprised pairs of biopsy from patients with urease test strongly positive (at 15 min), the batch B comprised pairs of samples biopsy from patients who had a late positive urease test, the group C consisted of pairs of biopsy from patients with negative urease test.

For biopsy sampling fragments for culture we used a special transport media: Portagerm *pylori*. For culture we tried two variants: for the first one we used turntable plate with a special medium used for *H. pylori*: *H. pylori* BioMerieux, and for the second embodiment a selective medium for *H. pylori* was prepared. To create the microaerophilic atmosphere needed for cultivation we used a special device called Anaerojar Oxoid. Seeding was done with biopsy samples all over the boards. Incubating these samples was done for 7-10 days in microaerophilic atmosphere. After 5 days the plates were examined for bacterial growth and after were examined daily. Plates that had not developed anything were incubated for another two days in the atmosphere mentioned. The colonies suspected of *Helicobacter pylori* were identified by the presence of urease, catalase positive, oxidase positive and hippurate negative. After prior Gram staining the culture was examined microscopically. To test the antibiotic susceptibility of the *H. pylori* bacteria we used the E-test method, which is the method accepted by the European Study Group for *H. pylori*.

Results: In group A 24 patients were included with rapid urease test positive in 15 minutes to harvest. Group B included 4 patients with late urease test positivity. Batch C was made up of five patients with negative urease test. After 9-10 days after plating, we observed the presence of discrete translucent and non-coalescing colonies. Of the 24 pairs of samples from patients belonging to group A, the bacterial cultures were obtained from 21 pairs of samples. For 19 pairs were obtained both culture from the antrum and gastric body, and for two pairs was obtained only culture from antrum. In 3 patients there were not obtained culture. In the four pairs of samples belonging to group B bacterial growth was not detected. On one of the samples that were positive after 24 hours, at about two days of incubation, in the culture medium was observed growth of urease-producing Enterobacteriaceae: *Oligella ureolytica*. In the group C have not been obtained bacterial culture.

Antibiotic susceptibility testing was performed on 10 strains of *H. pylori*. They were tested at Amoxicillin, Metronidazole and Tetracycline. Antibiotic susceptibility testing of *H. pylori* strains to clarithromycin isolates showed 30% and 40% metronidazole resistance. There was no resistance to amoxicillin and tetracycline.

Conclusions: Corroborating the results of the study on the effectiveness of therapies for eradicating *H. pylori* infection results of this substudy conclude that identifying a regimen of maximal effectiveness, further studies are needed on larger groups of patients. The absence of resistance to Amoxicillin and Tetracycline allow us to support the use of these antibiotics in *H. pylori* eradication schemes. Increased resistance to Clarithromycin is intended to avoid use them routinely for *H. pylori* eradication. Clarithromycin strength value of 30% place Transilvania in the area of high resistance to this antibiotic, such as bismuth quadruple therapy should be considered as first-line treatment in eradicating the infection.

Originality and innovative contributions of the thesis

A point of originality for the thesis is the study of the epidemiological trends of *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms in the region of Cluj-Napoca. It turned out reducing the prevalence of *H. pylori* infection in the population with dyspeptic symptoms. This is in close correlation with improving socio-economic conditions in Romania. There was a decrease in prevalence at 38% in patients in rural areas.

Another original aspect is the prove of the change of etiologic spectrum of gastritis. *Helicobacter pylori* infection is no longer the main etiologic factor of gastritis.

Prevalence of gastric and duodenal ulcer is very low in patients with dyspeptic symptoms. These observations change clinical practice by the need to seek other etiologic factors in patients with dyspeptic symptoms. Of particular importance is the study of efficacy for therapeutic regimes used for the eradication of *H. pylori* infection. Reporting an eradication rate of 87% for the quadruple therapy compared with 65% eradication rate to standard therapy brings original contributions to clinical practice in our country.

An original aspect is the study about the association of *Helicobacter pylori* infection in patients with IBD in this particular region. It proved a very low prevalence of infection in patients with IBD. Pre-treatment of *H. pylori* infection can not be considered to be the causative agent of IBD.