
STATE OF THE ART ΔΙΑΛΕΞΗ

Γαστρικό μικροβίωμα – νοσολογικές συσχετίσεις

Γαστρικό μικροβίωμα - νοσολογικές συσχετίσεις

Δ. Σγούρας

Κύριος Ερευνητής, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Εισαγωγή στην ανάλυση του γαστρεντερικού μικροβιώματος

Μία πλειάδα πρόσφατων μελετών υποστηρίζουν ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιστή και της γαστρεντερικής του χλωρίδας, συσχετίζονται με την εκδήλωση χρόνιων παθήσεων συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη, της παχυσαρκίας, της νόσου του ευερέθιστου εντέρου, των νόσων διαταραχής της συμπεριφοράς, των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Η **γαστρεντερική χλωρίδα** αποτελείται από 10^{13} - 10^{14} μικροοργανισμούς (άρχαια, μύκητες, ιούς και βακτήρια) και τρισεκατομμύρια κυττάρων. Ειδικότερα, αναφορικά με τα βακτήρια, περισσότερα των 5000 διαφορετικών βακτηριακών ειδών φαίνεται να ενδημούν στον ειλέο και το παχύ έντερο. Για τον λόγο αυτό, ο συνδυασμός της «βιολογίας» του ξενιστή και της μικροχλωρίδας του, θεωρείται ότι αποτελεί ένα υπέρ-όργανο, με συλλογικό γονιδίωμα που υπερβαίνει, κατά τουλάχιστον 100-φορές τον αριθμό των γονιδίων του ανθρωπίνου γονιδιώματος. Ο όρος **μικροβίωμα αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών, των γονιδιωμάτων τους και των περιβαλλοντολογικών αλληλεπιδράσεων τους, σε ένα συγκεκριμένο οικοσύστημα, εν προκειμένω, αυτό του γαστρεντερικού σωλήνα**. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για το ανθρώπινο μικροβίωμα έχει πραγματοποιήσει άλματα, σαν απόρροια της τεράστιας τεχνολογικής εξέλιξης που έχει επιτευχθεί με τη χρήση πειραματικών διατάξεων υψηλής απόδοσης (high throughput) για την αποκρυπτογράφηση γονιδιωμάτων. Τέτοιες διατάξεις συντελούν στην παραγωγή εκτεταμένων συνόλων πειραματικών δεδομένων αλληλουχίας γενετικού υλικού, τα οποία με κατάλληλο βιο-πληροφοριακό χειρισμό επιτρέπουν την αποκωδικοποίηση γονιδιωμάτων σε πάσης φύσεως περιβαλλοντολογικά ή βιολογικά/κλινικά δείγματα. Επιπλέον, ξεπερνούν την δυνατότητα απλής αποτύπωσης και διάκρισης μεταξύ του γενετικού υλικού ανθρώπινης και μικροβιακής φύσεως και συμβάλλουν στον περαιτέρω χαρακτηρισμό του μεταβολικού τους προφίλ και των πιθανών μηχανισμών αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικροοργανισμών. Για το λόγο αυτό αποτελεί σημαντική πρόκληση ο χειρισμός, η ανάλυση και κατανόηση του όγκου των πληροφοριών που καλείται να εξετάσει ο σύγχρονος ερευνητής. Ο όρος **μεταγονιδιωματική (metagenomic) ανάλυση αναφέρεται στο χαρακτηρισμό του συνόλου των γονιδίων, ανθρώπινης και βακτηριακής προελεύσεως που ανιχνεύονται στο μικροβίωμα**.

Βασικοί Εντερότυποι της γαστρεντερικής μικροβιακής χλωρίδας

Πρόσφατα, συνδυασμός δεδομένων μεταγονιδιωματικής ανάλυσης κοπράνων από άτομα προερχόμενα από διαφορετικές χώρες και σύγκριση τους με αντίστοιχα δεδομένα άλλων πολυκεντρικών μελετών, οδήγησαν στην αναγνώριση τριών βασικών εντεροτύπων της γαστρεντερικής χλωρίδας, ανεξαρτήτως εθνικότητας ή γεωγραφικής κατανομής.¹ Ο **εντερότυπος I** συσχετίζεται με την επικράτηση του γένους των βακτηριοειδών (*Bacteroidetes*) και παραβακτηριοειδών (*Parabacteroides*), τα οποία εμφανίζουν εκτεταμένη σακχαρολυτική και πρωτεολυτική δραστηριότητα και χαρακτηρίζονται από πλούσια παραγωγή βιοτίνης, ριβοφλαβίνης, παντοθενικού και ασκορβικού οξέος. Ο **εντερότυπος II** συσχετίζεται με την επικράτηση του γένους Πρεβοτέλα (*Prevotella*) και θειο-αναγωγικού δονακίου (*Desulfovibrio*) τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη δυνατότητα καταβολισμού γλυκοπρωτεϊνών της βλέννας και πλούσια παραγωγή θυαμίνης και φυλλικού οξέος. Ο **εντερότυπος III** χαρακτηρίζεται από επικράτηση των αναερόβιων βακτηρίων του γένους κεκρυφαλοκόκκων (*Ruminococcus*) και του γένους *Akkermansia* με κατ'εξοχήν έντονη ινολυτική δράση. Τα δεδομένα αυτά ενδεχομένως υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός περιορισμένου αριθμού καταστάσεων αρμονικής συμβίωσης μεταξύ ξενιστή και μικροοργανισμών, οι οποίες διαφοροποιούνται αναλόγως της δίαιτας και της φαρμακευτικής αγωγής. Επίσης, ενώ η κατάταξη μεταξύ των εντεροτύπων βασίζεται κυρίως στη πληθυσμιακή σύνθεση, για την πλήρη κατανόηση του ρόλου των μικροβιακών κοινοτήτων, βασική προϋπόθεση αποτελεί η λειτουργική ανάλυση τους. Έτσι, ενώ χαρακτηριστικά του ξενιστή όπως το βάρος, η ηλικία ή το φύλο δεν φαίνεται να συσχετίζονται με τους συγκεκριμένους εντεροτύπους, δεδομένα που προέρχονται από την λειτουργική ανάλυση, π.χ. του μεταβολικού προφίλ του κάθε εντεροτύπου, φαίνεται να συσχετίζονται απόλυτα με την ηλικία ή το βάρος, παρέχοντας έτσι ενδεχόμενη διαγνωστική αξία στην ανάλυση του μικροβιώματος.

Μικροβίωμα μη-εντερικού τύπου και νοσολογικές συσχετίσεις

Μέχρι πρότινος, θεωρείτο ότι σε σύγκριση με την εντερική μικροχλωρίδα, η ποικιλομορφία του μικροβιώματος του οισοφάγου και του στομάχου αφενός ήταν μάλλον πτωχή και αφετέρου ότι προσομοιάζει της στοματοφαρυγγικής. Μελέτες με χρήση παραδοσιακών τεχνικών απομόνωσης αερόβιων και αναερόβιων βακτηριακών ειδών σε εκπλύσεις του αυλού είχαν προσδιορίσει την ύπαρξη στρεπτοκόκκων, σταφυλοκόκκων, κλεμψιέλλα, βακτηριοειδών, γαλακτοβακίλλων και πεπτοκόκκων.^{2,3} Αντίθετα μελέτες που έχουν βασισθεί στην χρήση σύγχρονων μεθόδων μοριακής ανάλυσης της αλληλουχίας των γονιδίων που κωδικοποιούν την 16S μικρή υπομονάδα RNA του ριβοσώματος (16S rRNA), έχουν αναδείξει την παρουσία πλήθους μικροβίων και συνεπώς αντιτίθενται στην προηγούμενη θεώρηση περί «στείρων» συνθηκών στον ανώτερο πεπτικό σωλήνα. Έτσι, οι πλέον πρόσφατες μοριακές μελέτες ανάλυσης μικροβιώματος του οισοφάγου και του στομάχου έχουν ήδη καταδείξει την παρουσία πέραν των 150 ειδών.⁴⁻⁸ Η συντριπτική πλειονότητα των συνομοταξιών βακτηρίων (περί το 97%) που αναγνωρίζονται μέσω γονιδιωματικής ανάλυσης αλληλουχιών 16S rRNA ανήκουν στους φερμουσίτες, τα βακτηριοειδή, τα πρωτεοβακτήρια και τα ακτινοβακτήρια.^{4,5} Οι φερμουσίτες στους οποίους συγκαταλέγονται τα γένη των στρεπτοκόκκων, σταφυλοκόκκων, κλοστριδίων και βακίλλων, αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του μικροβιώματος του πρόσθιου εντέρου και φυλογενετικά προέρχονται περίπου κατά 70% από τον οισοφάγο και μεταξύ 22-31% από το στομάχι. Όσον αφορά τον οισοφάγο, τα βακτηριοειδή αποτελούν την δεύτερη πλέον πολυπληθή συνομοταξία (περίπου 20% των κλώνων) και ακολουθούν κατά φθίνουσα αναλογία τα ακτινοβακτήρια (4.3%), πρωτεοβακτήρια (2.2%), φουσοβακτήρια (2.2%) και τα μη-καλλιεργήσιμα TM7 (1.4%). Αντίθετα στο στομάχι η σχετική αναλογία ανατρέπεται υπέρ των πρωτεοβακτηρίων (28-37%), βακτηριοειδών 11-28% και ακτινοβακτηρίων (8-9%).^{4,7} Επιπλέον, ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν αναφορικά με την σύνθεση του μικροβιώματος και διαφορών στην κατανομή των συνομοταξιών βακτηρίων μεταξύ άντρου και γαστρικού σώματος.⁷ Οι αντίστοιχες ομοιότητες μεταξύ των μικροβιωμάτων του οισοφάγου και του στομάχου αναφορικά με την σύσταση αλλά και την κατανομή επεκτείνονται και στο επίπεδο του γένους και του είδους. Η επικρατούσα συνομοταξία των φερμουσιτών αντιπροσωπεύεται σε επίπεδο είδους από τους στρεπτόκοκκους (*S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. parasanguis*, and *S. salivarius*). Είναι αναμενόμενο ότι, ο αυστηρά αερόβιος χαρακτήρας των στρεπτοκόκκων συμβάλλει στη διαβαθμισμένη μείωση της παρουσίας τους από τον οισοφάγο στο στομάχι. Επιπλέον, στους παρόντες κατά gram(-) μικροοργανισμούς σε επίπεδο γένους συγκαταλέγονται τα βακτήρια Πρεβοτέλλα, οι κόκκοι Βεϊλλονέλλα, οι Ναϊσέριες, οι Πορφυρομονάδες, οι Αιμόφιλοι και τα κατά gram(+) *Rothia*. Η ανάπτυξη χρόνιας γαστρίτιδας από λοίμωξη με Ελικοβακτήριο του πυλωρού επιφέρει σημαντικές κλινικές επιπτώσεις, όπως αναμένεται για κάθε λοίμωξη που οφείλεται σε ένα κυρίαρχο βακτηριακό είδος. Έτσι ανάλυση του γαστρικού μικροβιώματος με την συνδρομή μεθόδων γονιδιωματικής ανάλυσης, επί θετικής Ελικοβακτηριακής λοίμωξης έχει καταδείξει ότι το συγκεκριμένο πρωτεοβακτήριο αποτελεί την κύρια συνομοταξία, σε ποσοστό 72% των κλώνων, που ανιχνεύονται.⁴ Ως γνωστόν, η χρόνια φλεγμονή που επιφέρει η λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την δημιουργία δυσπεψίας και πεπτικού έλκους και αποτελεί παράγοντα αυξημένου κινδύνου για την εκδήλωση γαστρικού αδενοκαρκινώματος και γαστρικού λεμφώματος. Η ανάπτυξη γαστρίτιδας ανεξαρτήτως της παρουσίας ή απουσίας Ελικοβακτηριακής λοίμωξης ή προερχόμενης από χρήση μη-στεροειδών αντι-φλεγμονωδών (ΜΣΑΦ) παραγόντων, έχει παρατηρηθεί ότι συνοδεύεται από μεταβολές στο γαστρικό μικροβίωμα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το γαστρικό μικροβίωμα στο άντρο αποτελείται από πρωτεοβακτήρια (37%) και φερμουσίτες (22%).⁷ Αντίθετα παρουσία γαστρίτιδας που δεν συνδέεται με τη παρουσία Ελικοβακτηρίου ή την χρήση ΜΣΑΦ η αναλογία στο μικροβίωμα του άντρου αναστρέφεται με τους φερμουσίτες – κυρίως παρουσία στρεπτοκόκκων- να επικρατούν κατά 41% έναντι των πρωτεοβακτηρίων (20%). Αυτό το αποτέλεσμα δημιουργεί την εντύπωση ότι υπάρχει σχέση αίτιου και αιτιατού μεταξύ της φλεγμονής και της σύστασης του μικροβιώματος.

Η λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου σύμφωνα με την Διεθνή Εταιρεία για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.^{9,10} Παρ' όλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός καρκινογένεσης είναι ακόμα υπό διερεύνηση και συναρτάται με την συντονισμένη δράση λοιμοτοξικών παραγόντων του βακτηρίου, του ανοσολογικού υπόβαθρου του ξενιστή, καθώς και περιβαλλοντολογικών συνθηκών διατροφής και καπνίσματος. Επιπλέον είναι σαφές ότι η παρουσία της Ελικοβακτηριακής λοίμωξης έχει αποτέλεσμα την δυναμική ουδετεροποίηση του γαστρικού pH, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη

άλλων ειδών, με ενδεχομένως ενδογενή καρκινογενή δράση τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ήταν απόντα, π.χ. βακτήρια ικανά για νιτρωδο-αναγωγική δράση. Καλλιέργειες ληφθείσες από βιοψίες γαστρικού καρκίνου σε σύγκριση με αντίστοιχες από φυσιολογικό στομάχι έχουν καταδείξει την ύπαρξη περισσότερων και πολυποικίλων ειδών βακτηρίων – κυρίως αναερόβιου χαρακτήρα που ανήκουν στη συνομοταξία των βακτηριοειδών και των κλοστριδίων.¹¹ Αντίθετα, μοριακή γονιδιωματική ανάλυση μικροβιωμάτων ασθενών με γαστρικό καρκίνο, εκ των οποίων 8 στους 10 ήταν θετικοί σε Ελικοβακτηριακή λοίμωξη, σε σύγκριση με αντίστοιχους δυσπεπτικούς ασθενείς-απουσία Ελικοβακτηριακής λοίμωξης, δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές αναφορικά με τη σύσταση ή την κατανομή στο επίπεδο των ειδών, συμπεριλαμβανομένου του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού.¹² Αναγνωρίστηκαν όμως περισσότερες από 100 συνομοταξίες βακτηρίων με επικρατέστερες αυτές των φερμουσιτών, βακτηριοειδών, πρωτεοβακτηρίων, ακτινοβακτηρίων και φουσοβακτηρίων με χαρακτηριστικά αντιπροσωπευτικά γένη αυτά των στρεπτοκόκκων, γαλακτοβακίλλων, βείλλονέλλα και πρεβοτέλλα. Ο ενδεχόμενος ρόλος αυτών των συγκεκριμένων ειδών στην ανάπτυξη γαστρικής νεοπλασίας δεν έχει εκτιμηθεί.

Ελικοβακτήριο του πυλωρού – Μικροβίωμα υπό εξαφάνιση

Μία σειρά μελετών καταδεικνύουν πλέον ότι το Ελικοβακτήριο του πυλωρού αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του ανθρώπινου γαστρικού μικροβιώματος συνοδεύοντας το ανθρώπινο είδος στην έξοδο του από την Αφρική περίπου πριν από 50.000 χρόνια.¹³ Σαν αποτέλεσμα αυτού παρατηρούνται μεγάλες γεωγραφικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των στελεχών. Τα συγκεκριμένα βακτήρια αναπτύσσουν, μέσω προσκολλητινών (BabA, SabA), ιδιαίτερα στενή σχέση με το γαστρικό επιθήλιο και έχουν την ικανότητα μέσω του λειτουργικού συστήματος μεταφοράς τύπου IV να ενίουν εντός των επιθηλιακών κυττάρων διάφορους παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης CagA, μπορούν να παρεμβάλλονται στην φυσιολογική μεταγωγή της ενδοκυττάριας πληροφορίας και να επάγουν μηχανισμούς φλεγμονής στο χόριο, επηρεάζοντας αφενός τις νευροενδοκρινικές (γαστρίνη, σωματοστατίνη) και αφετέρου τις ανοσολογικές λειτουργίες (χημειοκίνες, T- και B- λεμφοκύτταρα).¹⁴ Παρ' όλη όμως την μακροχρόνια συμβίωση και τον κυρίαρχο ρόλο του στο ανθρώπινο γαστρικό μικροβίωμα⁴ είναι σαφές ότι τα 100 τελευταία χρόνια ο επιπολασμός του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού μειώνεται δραματικά. Αν και οι λόγοι για αυτή τη μείωση δεν είναι απόλυτα ξεκάθαροι, είναι λογικό να θεωρούνται σημαντικοί παράγοντες οι αλλαγές στο τρόπο και τις συνθήκες διαβίωσης π.χ. καθαρό νερό, χρήση αντιβιοτικών κ.λπ.¹⁵ Μελέτες της τελευταίας εικοσαετίας έχουν αναδείξει την συμβολή του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης πεπτικού έλκους και γαστρικού καρκίνου. Πρόσφατα όμως υπάρχουν αρκετές ενδείξεις περί αρνητικής συσχέτισης μεταξύ Ελικοβακτηρίου του πυλωρού και γάστρο-οισοφαγικής παλινδρομικής νόσου καθώς και των νεοπλαστικών της επακόλουθων όπως οισοφάγου Barrett και αδενοκαρκινώματος του οισοφάγου και της γάστρο-οισοφαγικής συμβολής.¹⁶ Πρόσφατα, ένας σημαντικός αριθμός επιδημιολογικών μελετών έχουν συσχετίσει την λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού με μειωμένο κίνδυνο εκδήλωσης παιδιατρικού άσθματος, αλλεργικής ρινίτιδας και αλλεργιών του δέρματος.¹⁷⁻¹⁹ Τα τελευταία χρόνια μελέτες σε πειραματικές λοιμώξεις Ελικοβακτηρίου του πυλωρού σε πειραματόζωα έχουν καταδείξει ότι, αντίθετα με τα ενήλικα ζώα, τα νεογνά με λοίμωξη ενώ παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα αποικισμού του βακτηρίου, έχουν χαμηλότερα επίπεδα χημικής και κυτταρικής ανοσολογικής απόκρισης, αναπτύσσοντας ανοσολογική ανοχή.²⁰ Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοσολογικής ανοχής παίζουν τα foxP3-θετικά T-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα και ο παράγοντας TGF-β. Είναι ενδιαφέρον ότι, αντίστοιχα υψηλότερα επίπεδα T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων στη κυκλοφορία, έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με λοίμωξη Ελικοβακτηρίου του πυλωρού έναντι αυτών χωρίς λοίμωξη και ότι η ανάπτυξη πεπτικού έλκους στους ασθενείς συνδυάζεται με διαταραχή της λειτουργίας των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων.²¹ Ακόμα πιο σημαντικά, απεδείχθη σε επίπεδο πειραματόζωων ότι είναι δυνατή η προστασία με απλή μεταμόσχευση CD4+CD25+ T-λεμφοκυττάρων από νεογνά πειραματόζωα που είχαν λοίμωξη Ελικοβακτηρίου του πυλωρού.²² Το σύνολο των παραπάνω πειραματικών μελετών καταδεικνύει ότι πράγματι ενδεχομένως η λοίμωξη Ελικοβακτηρίου του πυλωρού προστατεύει έναντι ανάπτυξης παιδιατρικού άσθματος. Αντίστοιχα παρόμοιες μελέτες αρχίζουν να καταδεικνύουν ότι η λοίμωξη Ελικοβακτηρίου του πυλωρού προστατεύει έναντι άλλων κοινών λοιμώξεων όπως τη φυματίωση.²³ Μάλιστα η συγκεκριμένη μελέτη καταδεικνύει ότι η παρουσία του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού όχι μόνο αυξάνει την ειδική ανοσολογική απόκριση έναντι του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης αλλά και μειώνει αισθητά την αναζωπύρωση της λοίμωξης σε ένα πειραματικό μοντέλο φυματίωσης σε πιθήκους. Συμπερασματικά, όπως η ανθρωπότητα μετακινείται

από θετικές σε αρνητικές συνθήκες λοίμωξης Ελικοβακτηρίου του πυλωρού είναι σαφές ότι η φυσιολογία του πεπτικού δεν είναι η μόνη που θα υποστεί μεταβολές.

Επίλογος

Τα τελευταία χρόνια, παρ' όλη την επιτάχυνση στην έρευνα για τον χαρακτηρισμό της ποικιλομορφίας των μικροβιωμάτων που απαντώνται είτε στους διαφορετικούς ανθρώπινους πληθυσμούς, είτε σε συσχέτιση με συγκεκριμένες νόσους αλλά και διαιτολογικές συνθήκες, η εκμετάλλευση των αποτελεσμάτων για την αναγνώριση θεραπευτικών πρακτικών είναι ακόμα στα σπάργανα. Η υπολογιστική βιολογία φαίνεται να πλησιάζει όλο και περισσότερο στον προσδιορισμό ενός «θεραπευτικού μικροβιώματος» μέσα από την ολοκληρωμένη ανάλυση των πολλαπλών τύπων δεδομένων. Τα βασικά ζητήματα που πρέπει να απαντηθούν είναι ποιες πρωτεΐνες και μεταβολικές οδοί του μικροβιώματος συνδέονται με φαινοτύπους της νόσου και πώς θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένας αριθμός αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για την κάθε περίπτωση. Αντίστοιχα, ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο τρόπος με τον οποίο θα ήταν δυνατόν να τροποποιηθεί το μικροβίωμα σε τέτοιο βαθμό ώστε και να μειωθούν οι ενδεχόμενες παρενέργειες από τα προϊόντα μεταβολισμού των φαρμάκων και ταυτόχρονα να αυξηθεί η συνολική θεραπευτική απόδοση των χορηγούμενων σχημάτων. Τέλος αποτελεί ενδιαφέρον ερώτημα κατά πόσον η γνώση από την διαλεύκανση του μικροβιώματος μπορεί να αποβεί χρήσιμη για την ανάπτυξη αποδεδειγμένα χρήσιμων πρακτικών που θα συνδυάζουν τη χορήγηση προβιοτικών και πρεβιοτικών για την λειτουργική παρέμβαση στο ανθρώπινο μικροβίωμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-180.
2. Gagliardi D, Makihara S, Corsi PR, et al. Microbial flora of the normal esophagus. *Dis Esophagus* 1998;11:248-250.
3. Pajeccki D, Zilberstein B, dos Santos MA, et al. Megaesophagus microbiota: a qualitative and quantitative analysis. *J Gastrointest Surg* 2002;6:723-729.
4. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:732-737.
5. Pei Z, Bini EJ, Yang L, et al. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4250-4255.
6. Pei Z, Yang L, Peek RM, et al. Bacterial biota in reflux esophagitis and Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol* 2005;11:7277-7283.
7. Li XX, Wong GL, To KF, et al. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One* 2009;4:e7985.
8. Yang L, Lu X, Nossa CW, et al. Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. *Gastroenterology* 2009;137:588-597.
9. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2012;100:1-441.
10. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13:607-615.
11. Sjostedt S, Kager L, Heimdahl A, et al. Microbial colonization of tumors in relation to the upper gastrointestinal tract in patients with gastric carcinoma. *Ann Surg* 1988;207:341-346.
12. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, et al. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J Med Microbiol* 2009;58:509-516.
13. Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 2007;445:915-918.
14. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J Clin Invest* 2009;119:2475-2487.
15. Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat Rev Micro* 2009;7:887-894.

16. Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Seminars in radiation oncology* 2007;17:2-9.
17. Reibman J, Marmor M, Filner J, et al. Asthma is inversely associated with *Helicobacter pylori*. Status in an Urban Population. *PLoS One* 2008;3:e4060.
18. Chen Y BMJ. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Archives of Internal Medicine* 2007;167:821-827.
19. Chen Y, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *Journal of Infectious Diseases* 2008;198:553-560.
20. Arnold IC, Lee JY, Amieva MR, et al. Tolerance rather than immunity protects from *Helicobacter pylori* – induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology* 2011;140:199-209. e8.
21. Robinson K, Kenefeck R, Pidgeon EL, et al. *Helicobacter pylori* – induced peptic ulcer disease is associated with inadequate regulatory T cell responses. *Gut* 2008;57:1375-1385.
22. Arnold IC, Dehzad N, Reuter S, et al. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2011;121:3088-3093.
23. Perry S, de Jong BC, Solnick JV, et al. Infection with *Helicobacter pylori* is associated with protection against tuberculosis. *PLoS One* 2010;5:e8804.