

Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

Κωνσταντίνα Καλλέργη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*H. pylori*) προκαλεί την πιο συχνή βακτηριακή λοίμωξη παγκοσμίως, κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της γαστρίτιδας και έλκους του δωδεκαδακτύλου, ενώ παράλληλα εμπλέκεται στην παθογένεια του γαστρικού καρκίνου. Λόγω της κλινικής σημασίας της λοίμωξης από *H. pylori* έχουν αναπτυχθεί αρκετές ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσής του τόσο στα βιολογικά δείγματα όσο και σε δείγματα περιβάλλοντος.

Η χρήση διαφορετικών μοριακών τεχνικών και κυρίως της PCR στη διάγνωση του *H. pylori* παρουσιάζει ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον και έχει βοηθήσει:

- α) στην ανίχνευση του DNA του μικροβίου σε κλινικό υλικό,
- β) στην ανίχνευση γενετικών παραγόντων λοιμογόνου δύναμης του *H. pylori* και
- γ) στον προσδιορισμό μεταλλαγών στο γονίδιο του *H. pylori* που κωδικοποιούν αντοχή στα αντιβιοτικά.¹

Η PCR είναι πιο ευαίσθητη από την καλλιέργεια και πλεονεκτεί στο ότι η ποιότητα του δείγματος είναι λιγότερο σημαντική για την επιτυχία της. Δεν απαιτεί ζωντανά μικρόβια στο δείγμα και ανιχνεύει 10^1 - 10^2 βακτήρια, έναντι

10^3 - 10^4 που ανιχνεύονται με τις άλλες μοριακές τεχνικές.²

Πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν υβριδισμό κατά Southern ή και nested PCR είναι πιο ευαίσθητα από ότι η ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη μετά από χρώση βρωμιούχου αιθιδίου.

ΠΡΟΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΓΙΑ ΑΞΙΟΠΙΣΤΗ PCR

Επεξεργασία του δείγματος πριν από την PCR

Η μεταφορά και η επεξεργασία του δείγματος διαφέρει κατά περίπτωση και εξαρτάται από τον τύπο του και την αναμενόμενη συγκέντρωση του *H. pylori* σ' αυτό.

Στόχος είναι η εξαγωγή και η απομόνωση του DNA του *H. pylori* σε καθαρή μορφή για να χρησιμοποιηθεί ακολούθως στην PCR. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν προταθεί διάφορα πρωτόκολλα ανίχνευσης του *H. pylori* σε βιολογικά ή άλλα υλικά και κατά καιρούς έχουν ελεγχθεί:

- α) τεμάχια βιοψίας από γαστρικό βλεννογόνο ή υλικό από CLO test
- β) γαστρικό υγρό
- γ) κόπρανα
- δ) σίελος ή οδοντική πλάκα
- ε) πόσιμο νερό

Οι συμβατικές μέθοδοι της Μοριακής Βιολογίας για παραλαβή του καθαρού DNA από ένα δείγμα είναι δοκιμασμένες και αξιόπιστες, αλλά δεν παύουν να είναι πολύπλοκες και χρονοβόρες.³

Αρχικά γίνεται λύση των κυτταρικών μεμβρανών και αδρανοποίηση των ενδοκυτταρικών νουκλεασών. Τα νουκλεϊνικά οξέα διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά και λαμβάνονται σε καθαρή μορφή με διάφορες μεθόδους όπως η χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου.

Γενικά προτιμώνται οι πιο απλές μέθοδοι. Καλή εναλλακτική λύση προσφέρουν τα εμπορικά kits που κυκλοφορούν. Αυτά χρησιμοποιούν θειοκυανιούχο γουανιδίνη και ισοπροπανόλη (ISO Quick) ή στήλες φυγοκέντρου που δεσμεύουν τα νουκλεϊνικά οξέα τα οποία αργότερα εκλύονται με H_2O ή ειδικό διάλυμα (Qiagen, EZNA).

Εξασφάλιση και βελτίωση της ευαισθησίας και της ειδικότητας

Η ευαισθησία της PCR στο κλινικό δείγμα είναι μικρότερη απ' ότι θεωρητικά αναμένεται, λόγω ύπαρξης μικρού αριθμού βακτηρίων και λόγω παρουσίας αναστολέων της πολυμεράσης. Η ευαισθησία της PCR αυξάνεται όταν χρησιμοποιηθεί ο υβριδισμός ή η nested τεχνική.

Η ειδικότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η φύση των εκκινητών, η θερμοκρασία υβριδισμού, η συγκέντρωση της πολυμεράσης και των ιόντων Mg^{++} στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Η επιβεβαίωση της ειδικότητας γίνεται με υβριδισμό ή με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων.⁴

Ένας τρόπος αύξησης της ευαισθησίας και της ειδικότητας συγχρόνως είναι ο διαχωρισμός του *H. pylori* από το υπόλοιπο δείγμα πριν από την PCR με τη βοήθεια ανοσομαγνητικών σφαιριδίων που είναι ευαισθητοποιημένα με ειδικά αντι-*H. pylori* αντισώματα. Η τεχνική είναι γνωστή σαν ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (immunomagnetic separation-IMS) και έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του *H. pylori* από τα κόπρανα.⁵

Χρήση κατάλληλων μαρτύρων

Ο ρόλος τους είναι σημαντικός τόσο κατά τη φάση του πειραματικού σχεδιασμού της PCR, όσο και κατά την εφαρμογή της στη διαγνωστική πράξη.

Οι μάρτυρες επεξεργάζονται όπως ακριβώς και τα προς εξέταση δείγματα, είναι απαραίτητοι σε κάθε δοκιμασία και βοηθούν στη σωστή εκτίμηση του αποτελέσματος της PCR.

Θετικός μάρτυρας είναι ένα στέλεχος *H. pylori* ή κατάλληλο τμήμα του γονιδίου του και ελέγχει την καλή εκτέλεση της δοκιμασίας (ευαισθησία).

Αρνητικός μάρτυρας είναι είτε dH_2O είτε μικροοργανισμός άσχετος ή συγγενής με το *H. pylori* και ελέγχει την ειδικότητα της αντίδρασης.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ DNA ΤΟΥ *H. PYLORI* ΣΤΟ ΚΛΙΝΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ

Το γονιδίωμα του *H. pylori* έχει χαρτογραφηθεί πλήρως από το 1997, οπότε και δημοσιεύτηκε η ακριβής νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Αποτελείται από 1.667.867 ζεύγη βάσεων (bp) που κωδικοποιούν τουλάχιστον 1.590 γονίδια από τα οποία τα 500 περίπου είναι μοναδικά.⁶

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευσή του βασίζονται στα γνωστά γονίδια της ουρεάσης, το 16S rRNA, το γονίδιο που κωδικοποιεί την ειδική του είδους πρωτεΐνη 26 KDa ή σε τυχαία επιλεγμένα τμήματα του γονιδίου.²

PCR-γονίδιο ουρεάσης

PCR με εκκινητές βασισμένους στα γονίδια της ουρεάσης (*ureA*, *ureB*, *ureC*) ανιχνεύουν το *H. pylori* σε υλικό βιοψίας και γαστρικό υγρό με ευαισθησία 100% και ειδικότητα που ξεπερνά το 97%.⁷ Οι εκκινητές αυτοί είναι

συμπληρωματικοί τμήματος του γονιδίου της ουρεάσης (του *H. pylori* που δεν έχει νουκλεοτιδική ομολογία με γονίδια ουρεάσης) άλλων βακτηρίων (πρωτεΐων, κλεμψιελλών).

Η ευαισθησία της είναι 10-100 βακτήρια στο δείγμα και με υβριδισμό ή nested τεχνική η ευαισθησία αυτή τουλάχιστον δεκαπλασιάζεται.⁸

Η επιβεβαίωση της ειδικότητας γίνεται με υβριδισμό ή με περιοριστικά ένζυμα. Η χρωματομετρική μέθοδος για την ανίχνευση του προϊόντος του υβριδισμού είναι ευαίσθητη και ταχεία τεχνική. Η ομοιότητά της με την ELISA την κάνει προσιτή στα περισσότερα κλινικά εργαστήρια. Ανιχνεύει την ύπαρξη έστω και ενός βακτηρίου στο δείγμα και έχει ευρεία εφαρμογή στην παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

PCR-16S rRNA γονίδιο

Η in vitro ενίσχυση τμήματος του 16S rRNA γονιδίου έχει το θεωρητικό πλεονέκτημα της πολύ μεγάλης ευαισθησίας επειδή υπάρχει μεγάλος αριθμός αντιγράφων rRNA στο κύτταρο.⁹

Εκκινητές που βασίζονται σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τμημάτων του 16S rRNA του *H. pylori* δίνουν διαφόρου μεγέθους τελικά προϊόντα ενίσχυσης (800 bp, 500 bp, 139 bp, 109 bp).

Η ευαισθησία της 16S rRNA PCR είναι 0,05-0,5 βακτήρια στο δείγμα και αυξάνει ακόμη περισσότερο όταν συνδυαστεί με υβριδισμό.⁹ Η ειδικότητα όμως της 16SrRNA PCR με εκκινητές Hp1/Hp2 και τελικό προϊόν 109 bp έχει αμφισβητηθεί από μερικούς ερευνητές. Οι εκκινητές αυτοί πολλαπλασιάζουν μη ειδικά το ανθρώπινο γονιδιακό DNA και επομένως δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά για την ανίχνευση του *H. pylori* σε βιολογικά υλικά.¹⁰

26KDa-PCR

Εκκινητές έναντι νουκλεοτιδικών αλληλουχιών τμήματος της ειδικής του είδους πρωτεΐνης 26 KDa του *H. pylori* έχει ανιχνευτεί σε όλα σχεδόν τα βιολογικά υλικά (βιοψία, γαστρικό υγρό, σίελος, κόπρανα) με PCR που δίνει τελικό προϊόν 298 bp.¹¹

Adhesion-PCR

Οι εκκινητές βασίζονται σε νουκλεοτιδική αλληλουχία τμήματος του γονιδίου της υπομονάδας της προσκολλητίνης του *H. pylori* και έχουν ανιχνευτεί στο μικρόβιο σε κόπρανα και πόσιμο νερό.¹²

Οι λίγες μελέτες που υπάρχουν πιθανολογούν κοπρανο-στοματική, στοματο-στοματική ή κοινή περιβαλλοντική πηγή μετάδοσης.¹³

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΥ ΔΥΝΑΜΗΣ

Η PCR έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γενετικών παραγόντων που έχουν σχέση με την αυξημένη παθογένεια ορισμένων στελεχών του *H. pylori*.

Ca_g νησίδιο παθογένειας (cag pathogenicity island)

Είναι περιοχή μεγέθους 40 Kb και ενσωματώθηκε στο γονίδιο του *H. pylori* από άγνωστη πηγή σχετικά πρόσφατα.¹⁴

Χωρίζεται σε 2 περιοχές (cag I και cag II). Η περιοχή cag I (MB 23.508 bp) περιέχει μια σειρά σημαντικών γονιδίων (cag A, ρic A, ρic B) και προάγει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και κυρίως IL-8. Το γονίδιο cag A το οποίο βρίσκεται στο 60% περίπου των στελεχών που απομονώνονται από ενήλικες ασθενείς είναι δείκτης ύπαρξης του cag νησιδίου παθογένειας. Ο cag A(+) γονότυπος σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης πεπτικού έλκους, εντερικής μεταπλασίας, ατροφικής γαστρίτιδας και τέλος αδενοκαρκινώματος του στομάχου στις Δυτικές χώρες.¹⁵ Οι λοιμώξεις με cag A(+) στελέχη σε παιδιά σχετίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης γαστρίτιδας.¹⁶

Εκκινητές με αλληλουχίες συμπληρωτικές τμημάτων της cagA περιοχής του γονιδιώματος του *H. pylori* μπορούν να ανιχνεύσουν την ύπαρξη του caGA γονιδίου είτε σε στελέχη που απομονώθηκαν από καλλιέργεια, είτε σε υλικό βιοψίας. Λόγω του γενετικού πολυμορφισμού του γονιδίου cagA το τελικό προϊόν της PCR έχει άλλοτε άλλο μέγεθος.

vacA γονίδιο (vacuolating cytotoxin gene A)

Το vacA γονίδιο (MB 3-864 bp) υπάρχει σε όλα τα στελέχη *H. pylori* και αποτελείται από 2 περιοχές: τη μέση (mid region) με 2 αλληλία m1 και m2 και την περιοχή αλληλουχίας σήματος (signal sequence region) με 3 αλληλία S1a, S1b, S2.¹⁵

Το vacA γονίδιο έχει δομή μωσαϊκού στο βακτηριακό κύτταρο. Ο γονότυπος S1 είναι ο πιο κυτταροτοξικός και υπάρχει ισχυρή συσχέτιση της παρουσίας του με την εμφάνιση πεπτικού έλκους, ενώ ο τύπος S2 δεν είναι κυτταροτοξικός.

Γενικά ο τύπος vacA m1 είναι πιο τοξικός από τον vacA m2 και ο vacAS1a/m1 από τον vacAS1b/m1.

Η ανάπτυξη μιας vacA-PCR βασισμένης στα διάφορα αλληλία του vacA

γονιδίου είναι ακόμη αντικείμενο έρευνας γιατί οι ως τώρα μελέτες δεν συμφωνούν απόλυτα, όσον αφορά τη σχέση τους με την εμφάνιση του έλκους.¹⁷

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η αντοχή του *H. pylori* στις μακρολίδες οφείλεται σε σημειακή μεταλλαγή στο 23S rRNA γονίδιο στη θέση 2143 ή 2144.¹⁸

Η μεταλλαγή είναι κυρίως μετάπτωση A→G (transition) και σπανιότερα αμφιμετατροπή A→C (transversion). Η ανίχνευση αυτών των μεταλλαγών γίνεται με PCR με εκκινητές που πολλαπλασιάζουν τμήμα του 23S rRNA γονιδίου του υπό εξέταση στελέχους *H. pylori*.

Η ύπαρξη της μεταλλαγής πιστοποιείται με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR (μέθοδος αναφοράς-αλλά κουραστική και δύσκολη). Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται τα περιοριστικά ένζυμα BsaI (A2143G) και BbsI (A2144G). Η A2143C μεταλλαγή δεν ανιχνεύεται με ένζυμο.

Μέθοδος εκλογής για την ανίχνευση των μεταλλαγών είναι ο υβριδισμός (PCR-OLA), ο οποίος ανιχνεύει όλους τους τύπους σχετικά εύκολα ακόμη και σε τεμάχιο βιοψίας.¹⁹

ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ PCR ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΟΥ *H. PYLORI*

Ποσοτική PCR

Έχει χρησιμοποιηθεί διαγνωστικά σε δείγματα γαστρικού βλεννογόνου και γαστρικού υγρού. Είναι ανταγωνιστική μέθοδος και βασίζεται σε σύγχρονο πολλαπλασιασμό ενός εσωτερικού standard και της αλληλουχίας του DNA-στόχου με το ίδιο ζεύγος εκκινητών. Μετράται ακριβώς η ποσότητα του DNA του *H. pylori* που υπάρχει στο δείγμα και υπάρχει θετική συσχέτιση με τις άλλες διαγνωστικές μεθόδους. Εκτός της αντικειμενικής εκτίμησης της ποσότητας του DNA στο δείγμα υπάρχει η δυνατότητα διάκρισης των ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω επιμόλυνσης ή ύπαρξης αναστολέων αντίστοιχα.²⁰

Multiplex PCR

Ανιχνεύονται ταυτόχρονα πολλά γονίδια του *H. pylori* στην ίδια δοκιμασία, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ζεύγη εκκινητών ειδικά επιλεγμένα ώστε να έχουν την ίδια περίπου θερμοκρασία υβριδισμού, με οικονομία χρόνου και χρήματος.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ *H. PYLORI* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

PCR σε τεμάχια γαστρικού βλεννογόνου

Πολυάριθμες μελέτες μετά το 1990 έχουν αποδείξει ότι η PCR σε τεμάχιο βιοψίας είναι ασφαλής και σίγουρη τεχνική ανίχνευση του *H. pylori*. Υπάρχει πάντα ο κίνδυνος των ψευδώς θετικών αντιδράσεων λόγω επιμόλυνσης είτε του δείγματος είτε του γαστροσκοπίου.

Οι ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις οφείλονται κυρίως στον κατά τόπους αποικισμό του βλεννογόνου ή στην ύπαρξη των αναστολέων στο δείγμα. Η τεχνική της PCR συνεχώς βελτιώνεται και έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι με εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα που αγγίζει το 100%.

PCR στο γαστρικό υγρό

Η λήψη του γαστρικού υγρού γίνεται με ρινογαστρικό καθετήρα μιας χρήσης συνεπώς αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μόλυνσης του γαστροσκοπίου.

Το κυριότερο πλεονέκτημα της εξέτασης του γαστρικού υγρού έναντι της βιοψίας είναι ότι αποφεύγεται η γαστροσκόπηση όπου δεν είναι αναγκαία (νέα άτομα-παρακολούθηση θεραπείας).²¹

Στις περιπτώσεις παιδιών αποφεύγεται η γενική αναισθησία και η διάγνωση γίνεται με μικρότερο κόστος και λιγότερη ταλαιπωρία. Η ευαισθησία της PCR στο γαστρικό υγρό είναι ανάλογη ή και μεγαλύτερη της βιοψίας γιατί το δείγμα αντικατοπτρίζει ολόκληρο το βλεννογόνο του στομάχου.

Τα αποτελέσματα διαφόρων μελετών που αφορούν την ευαισθησία της μεθόδου διαφέρουν και αυτό οφείλεται στη διαφορετική προετοιμασία του δείγματος πριν από την PCR. Η άμεση εξουδετέρωση της οξύτητας μετά τη λήψη του γαστρικού υγρού είναι απαραίτητη για να μην ελαττωθεί η ευαισθησία.²²

PCR σε κόπρανα

Υπάρχουν αρκετές δυσκολίες στην εφαρμογή της PCR στα κόπρανα, που αφορούν την ευαισθησία και την ειδικότητα της λόγω ύπαρξης αναστολέων και άφθονης μικροβιακής χλωρίδας αντίστοιχα.

Οι αναστολές της PCR στα κόπρανα είναι η χολερυθρίνη και τα χολικά άλατα, αλλά και οι πολυσακχαρίτες των τροφών, οι οποίοι πρέπει να απομακρυνθούν ή να αδρανοποιηθούν.²³

Η απομάκρυνσή τους γίνεται με αραίωση των κοπράνων, με χρωματο-

γραφία στήλης ή με χρήση φίλτρου πολυπροπυλενίου. Η μέθοδος εκλογής για απομάκρυνση των αναστολέων είναι η χρήση των ανοσομαγνητικών σφαιριδίων ευαισθητοποιημένων με αντι-*H. pylori* αντισώματα πριν από την PCR (IMS). Είναι ένας εύκολος τρόπος ανίχνευσης του *H. pylori* γιατί δεν χρειάζονται επί πλέον στάδια εξαγωγής του DNA και υπάρχει μηχανική απομάκρυνση των αναστολέων με πλύσιμο. Επιπλέον στα ανοσομαγνητικά σφαιρίδια προσκολλώνται όλες οι μορφές του *H. pylori* και η όλη διαδικασία της ανίχνευσης γίνεται αυθημερόν (εντός 6 h). Κύριο πλεονέκτημα του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού είναι ότι συγχρόνως συγκεντρώνει τα βακτήρια και απομακρύνει τους αναστολείς.

Ο συνδυασμός των ορολογικών μεθόδων και της IMS-PCR στα κόπρανα μπορεί να αντικαταστήσει στο μέλλον τη γαστροσκόπηση και τη δοκιμασία αναπνοής ουρίας και εφαρμόζεται άφοβα σε βρέφη.²⁴

PCR σε οδοντική πλάκα και σίελο

Η PCR σε σίελο και οδοντική πλάκα έχει δώσει αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την ευαισθησία της και προς το παρόν δεν χρησιμοποιείται διαγνωστικά.^{9,25} Δεν παύει όμως να έχει επιδημιολογικό ενδιαφέρον. Υπάρχουν αρκετές ψευδώς (+) αντιδράσεις λόγω ουρεάση (+) μικροβίων στη στοματική κοιλότητα καθώς και συγγενών με το *H. pylori* ειδών στη μικροβιακή χλωρίδα της περιοχής. Η αύξηση της ευαισθησίας της PCR σε δείγματα σιέλου γίνεται με τη χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ PCR ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ *H. PYLORI*

Η χρήση της PCR στη διάγνωση ρουτίνας είναι υπερβολή όταν οι ανάγκες καλύπτονται από τις συμβατικές μεθόδους. Η χρησιμοποίησή της έχει θέση σε περιπτώσεις χαμηλού βακτηριακού φορτίου, όπως αυτό συμβαίνει συχνά κατά τον έλεγχο της εκρίζωσης του *H. pylori* μετά θεραπεία.

Η PCR δίνει λύση για την ύπαρξη του *H. pylori* στο γαστρικό βλεννογόνο όταν υπάρχει ασυμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ καλλιέργειας και ορολογικών δοκιμών.

Κοκκώδεις και μη καλλιεργήσιμες μορφές του *H. pylori* ανιχνεύονται με PCR στα κόπρανα, στο σίελο και στη βιοψία μετά θεραπεία. Η συμβολή της PCR στη διαγνωστική προσέγγιση της λοίμωξης από *H. pylori* είναι σημαντική σ' αυτές τις περιπτώσεις.

Η PCR στη γαστρική βιοψία είναι αποδεδειγμένα ασφαλής. Η εφαρμογή της στο γαστρικό υγρό είναι μια ελκυστική εναλλακτική λύση. Η PCR στα

κόπρανα πιθανόν να αποτελέσει τη μελλοντική μέθοδο εκλογής στη διάγνωση της λοίμωξης. Ο έλεγχος της αντοχής των στελεχών *H. pylori* στις μακρολίδες γίνεται με ταχύτητα και ασφάλεια με PCR-OLA και σήμερα είναι δυνατή η ανίχνευση αντοχής σε 24h από τη γαστροσκόπηση. Όσο αυξάνουν οι γνώσεις μας σχετικά με τους μοριακούς δείκτες που συνδυάζονται με αυξημένη παθογένεια του *H. pylori*, τόσο η PCR θα είναι περισσότερο χρήσιμη.²⁶

Προς το παρόν όμως παραμένει μια ακριβή και απαιτητική τεχνική και δεν είναι προσιτή στα διαγνωστικά εργαστήρια ρουτίνας. Πρόσφατα έχει κάπως απλοποιηθεί με τη χρήση χρωματομετρικών μεθόδων ανίχνευσης του τελικού προϊόντος. Θα γίνει αποδεκτή σε ευρεία κλίμακα όταν απλοποιηθεί ακόμα περισσότερο και κυκλοφορήσουν φθηνά εμπορικά kits.

Οι πιθανότερες χρήσεις της στο άμεσο μέλλον αφορούν:

- α) την ανίχνευση της αντοχής στις μακρολίδες πριν από την έναρξη της θεραπείας και
- β) την ανίχνευση του *H. pylori* στα κόπρανα για τον έλεγχο της εκρίζωσής τους μετά τη θεραπεία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. van Zret AA, Megrand F. The year in *Helicobacter pylori*. Diagnosis. Curr Opin Gastroen 1998;14(Suppl 1):S27-S33.
2. Fouad AK, El Zaatari, Oweis SM, Graham DY. Uses and cautions for use of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci 1997;42(10):2116-9.
3. Greenfield L, White T. Sample preparation methods. In Persing D, Smith T, Tenover F, White T, eds. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications. American Society for Microbiology, 122-37.
4. Weiss J, Mecca J, Silva E, Cassmer D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *H. pylori* infections in dyspeptic patients. J Clin Microbiol 1994;32(7):1663-8.
5. Enroth HE, Enggard L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *H. pylori* in water and stool specimens. J Clin Microbiol 1995;33:2162-5.
6. Zhongning G, Taylor D. *Helicobacter pylori*-molecular genetics and diagnostic typing. Br Med Bull 1998;54(1):31-8.
7. Kawamata O, Yoshida H, Hirota K, et al. Nested polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* infection with novel primers designed by sequence analysis of urease A gene in clinically isolated bacterial strains. Bioch Biophys Res Commun 1996;219:266-72.
8. Clayton CL, Kleanthous H, Goutes DJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *H. pylori* using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30(1):192-200.

9. Wahlfors J, Meurman HJ, Toskala J, et al. Development of a rapid PCR method for identification of *H. pylori* in dental plaque and gastric biopsy specimens. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis* 1995;14:780-6.
10. Chong s, Qihyuan L, Fitzgerald F, Chao-Hung L. Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *H. pylori*. *J Clin Microbiol* 1996;34:2728-30.
11. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, O'Toole P. Rapid detection of *H. pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:54-8.
12. Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation for detection of *H. pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33:2162-5.
13. Hulten K, Han S, Enroth H, Klein P, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996;110:1031-5.
14. Blaser MJ. Role of *vacA* and *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10(Suppl. 1):73-7.
15. Atherton J. *H. pylori* virulence factors. *Br Med Bull* 1998;94(1):105-20.
16. Husson MO, Gottrand F, Vachee A, et al. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. *J Clin Microbiol* 1995;33:3300-3.
17. van Doorn L, Figueiredo C, Rossan R, Jannes G, et al. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998;36:1271-6.
18. Occhialini A, Urdaci M, Doncet Populaire F, et al. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: Rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemoth* 1997;41:2724-8.
19. Stone G, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, et al. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agent Chemother* 1997;41:712-4.
20. Furuta T, Kaneco E, Suzaki M, Arai H, Futami H. Quantitative study of *Helicobacter pylori* in gastric mucus by competitive PCR using synthetic DNA fragments. *J Clin Microbiol* 1996;34(10):2421-5.
21. Westblom T, Phadnis S, Yang P, Czinn St. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by means of a polymerase chain reaction. Assay for gastric juice aspirates. *CID* 1993;16:367-71.
22. Basso D, Navaglia F, Cassaro M, Scrinnyer M, et al. Gastric juice polymerase chain reaction: An alternative to histology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 1996;1(3):159-64.
23. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petri K, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997;35:995-8.
24. Watanabe T, Tomita M, Kudo M, Kurokawa M, Urino A, Todo A, Chiba T. Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation based polymerase chain reaction in feces. *Gastroenterology* 1998;33:1140-3.
25. Namavar F, Roosendaal R, Knipers E, Groot P, et al. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. *EJCMID* 1995;14:234-7.

26. Bjorkholm B, Befrits R, Jaup B, Engstrand L. Rapid PCR detection of *Helicobacter pylori* associated virulence and resistance genes directly from gastric biopsy material. J Clin Microbiol 1998;36:3689-90.