

Μοριακές μέθοδοι τυποποίησης του *Helicobacter pylori*

Ανδρέας Μεντής

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μέθοδοι τυποποίησης χρησιμοποιούνται τις περισσότερες φορές για να διαπιστωθεί εάν δύο ή περισσότερα στελέχη ενός είδους βακτηρίου που σχετίζονται επιδημιολογικά έχουν ή όχι κλωνική σχέση μεταξύ τους, δηλαδή εάν αποτελούν απογόνους ενός αρχικού στελέχους. Έχουν αναπτυχθεί πολλές τυποποιητικές μέθοδοι στο παρελθόν, ανάλογα με τις διαθέσιμες μεθόδους σε κάθε εποχή. Σαν παραδείγματα αναφέρουμε την ορολογική τυποποίηση και τη λυσιτυπία. Σήμερα, χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο μέθοδοι που βασίζονται στα φυσικά χαρακτηριστικά των μορίων ενός μικροβίου. Τα στελέχη που αποτελούν κλώνο είναι γενετικά όμοια ή σχεδόν όμοια και επομένως τα χαρακτηριστικά των μορίων τους είναι και αυτά όμοια. Η σύγκριση των μορίων χρησιμοποιείται για την αναγνώριση της κλωνικής σχέσεως των συγκρινόμενων στελεχών ενός βακτηρίου. Η τυποποίηση εφαρμόζεται σε βακτήρια του ίδιου γένους και είδους.

Για το *H. pylori* έχουν χρησιμοποιηθεί παλαιότερα κλασσικές μέθοδοι τυποποίησης όπως η βιοτυπία. Οι μέθοδοι όμως αυτές είχαν πτωχά αποτελέσματα ως προς τη διαχωριστική τους ικανότητα μεταξύ των στελεχών, ή δεν ήσαν πρακτικές στην εφαρμογή τους. Τις μεθόδους αυτές διαδέχθηκαν την αρχή της δεκαετίας του '90 με επιτυχία οι νεώτερες μοριακές μέθοδοι τυπο-

ποιήσεως. Στην περίπτωση του *H. pylori* έχουν δοκιμασθεί μοριακές τυποποιήσεως βασιζόμενες στα φυσικά χαρακτηριστικά των μορίων του μικροβίου όπως τα λιπαρά οξέα, οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα νουκλεϊκά οξέα. Στην παρούσα ανασκόπηση θα αναφερθούν κυρίως μέθοδοι τυποποιήσεως του *H. pylori* που βασίζονται στα νουκλεϊκά οξέα – DNA μοριακές μέθοδοι τυποποιήσεως.

Οι DNA μοριακές μέθοδοι τυποποιήσεως του *H. pylori* βασίζονται στη μεγάλη ποικιλομορφία του βακτηριακού γονιδιώματος του συγκεκριμένου βακτηρίου. Υπάρχει μακρο-ποικιλία, δηλαδή διαφορετική θέση των γονιδίων στο μικροβιακό χρωμόσωμα αλλά και μικρο-ποικιλία, δηλαδή διαφορά της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων σε κάθε γονίδιο από στέλεχος σε στέλεχος. Οι μοριακές μέθοδοι έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για την επιδημιολογία και παθογένεια της λοιμώξεως από το μικρόβιο αυτό.

ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ DNA ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΕΩΣ ΤΟΥ *H. PYLORI*

Θραύσματα περιορισμού χρωμοσωμικού και εξωχρωμοσωμικού DNA

Σε γενικές γραμμές στις μεθόδους αυτές γίνεται σύγκριση του αριθμού και μεγέθους των θραυσμάτων του DNA που προκύπτουν από την επίδραση περιοριστικών ενζύμων (ενδονουκλεασών). Τα ένζυμα αυτά κόβουν το DNA σε σταθερές θέσεις με ειδικό σημείο αναγνώρισεως που συνήθως αποτελείται από 4 – 6 βάσεις. Ο διαχωρισμός, αναγνώριση και σύγκριση των θραυσμάτων του DNA γίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και παρατήρηση σε υπεριώδες φως μετά από χρώση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο.

Πολυμορφισμός θραυσμάτων περιορισμού χρωμοσωμικού DNA (Restriction Fragments Length Polymorphism - RFLP)

Μετά από επίδραση περιοριστικών ενζύμων στο χρωμοσωματικό DNA του μικροβίου, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των θραυσμάτων του DNA και σύγκριση των ζωνών της ηλεκτροφορήσεως. Η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται πλέον, διότι ο μεγάλος αριθμός θραυσμάτων καθιστά δυσχερή τη σύγκριση.

Ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο (Pulse Field Gel Electrophoresis)

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται ενδονουκλεάσες που πέττουν το μικροβιακό χρωμόσωμα σε λίγα μόνο σημεία. Τα προκύπτοντα θραύσματα του DNA στην περίπτωση αυτή είναι μεγάλου μοριακού βάρους (>40 kb) και δεν μπορούν να διαχωρισθούν με την κλασσική DNA ηλεκτροφόρηση. Με την

ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο πεδίο είναι δυνατός ο διαχωρισμός των μεγάλων αυτών τμημάτων του DNA. Είναι μέθοδος πολύ αποτελεσματική, αλλά δεν χρησιμοποιείται ευρέως στην περίπτωση του *H. pylori*.

RFLP και υβριδισμός – ριβοτυπία

Χρωμοσωμικό DNA πέπτεται με περιοριστικά ένζυμα (π.χ. *HindIII*, *HaeIII*) και ακολουθεί υβριδισμός με ανιχνευτές cDNA για τα γονίδια του ριβωσωματικού RNA. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για το *H. pylori* αλλά επειδή είναι χρονοβόρα και κοπιαστική δεν είναι ευρέως διαδομένη.

Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων πλασμιδιακού DNA

Δεν χρησιμοποιείται για το *H. pylori*

Μέθοδοι που βασίζονται στην PCR

Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας PCR προϊόντος (PCR-DNA sequencing)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στον πολλαπλασιασμό με PCR ενός γονιδίου του μικροβίου που διαθέτει πολυμορφία, όπως το ριβωσωματικό RNA. Ακολουθεί προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του προϊόντος της PCR και σύγκριση της αλληλουχίας των εξεταζομένων βακτηριακών στελεχών.

Ηλεκτροφόρηση θραυσμάτων περιοριστικών ενζύμων προϊόντος PCR (PCR-RFLP)

Στη μέθοδο αυτή, τμήματα γονιδίων με γνωστή αλληλουχία πολλαπλασιάζονται με PCR. Τα προϊόντα της PCR ακολούθως πέπτονται με περιοριστικά ένζυμα και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και σύγκριση των θραυσμάτων. Τα γονίδια της ουρεάσης *ureA*, *ureB*, *ureC*, και *UreD* του *H. pylori* συνήθως χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση του μικροβίου αυτού.

Τυποποίηση με PCR με αυθαίρετες αλληλουχίες (AP-PCR και RAPD-PCR)

Στις μεθόδους αυτές, τυχαία τμήματα του μικροβιακού γονιδιώματος πολλαπλασιάζονται με τη βοήθεια μονών εκκινητών (primer) με αυθαίρετες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Οι εκκινητές αυτοί δεν έχουν γνωστή ομολογία

βάσεων με το στόχο. Η σύνδεση του εκκινητού με το DNA του μικροβίου γίνεται σε χαμηλές σχετικά θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της PCR ώστε ο εκκινητής να υβριδισθεί σε διάφορες θέσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA. Η ηλεκτροφόρηση των παραγομένων προϊόντων της PCR μπορεί να κάνει δυνατή τη διαφοροποίηση των στελεχών. Χρειάζεται προσοχή στην εφαρμογή της μεθόδου ώστε τα αποτελέσματα να είναι αναπαραγώγιμα. Το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν απαιτείται γνώση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μικροβίου.

Άμεση τυποποίηση με PCR

Για την τυποποίηση στελεχών *H. pylori* σε επίπεδο είδους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές PCR για την ανίχνευση των διαφόρων υποτύπων του γονιδίου *vacA* όπως *s1a*, *s1b*, *s2m1* και *m2*. Αντίστοιχα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν *cagA* εκκινητές για διαφοροποίηση των στελεχών σε *cagA+* και *cagA-*.

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέρους ή όλου του βακτηριακού χρωμοσώματος

Αποτελεί την απόλυτη μέθοδο τυποποίησης. Κατ' αυτήν γίνεται σύγκριση των στελεχών μετά προσδιορισμό μέρους ή του συνόλου του γονιδιώματος του μικροβίου. Η μέθοδος αυτή δεν είναι προς το παρόν ευρέως διαδομένη, αν και υπάρχουν αυτόματα μηχανήματα για τον προσδιορισμό νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΕΩΣ ΤΟΥ *H. PYLORI*

Επιδημιολογικές μελέτες

Οι μοριακές μέθοδοι τυποποίησης έχουν βοηθήσει σημαντικά στη διερεύνηση του τρόπου μεταδόσεως της λοίμωξης. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συμβολή των μεθόδων αυτών στην μελέτη της ενδοοικογενειακής μεταδόσεως της λοίμωξης (από γονείς σε παιδιά, ή μεταξύ συζύγων).

Κλινικές μελέτες

Η εκρίζωση του μικροβίου από το γαστρικό βλεννογόνο οδηγεί σε ποσοστό > 90% σε θεραπεία του δωδεκαδακτυλικού έλκους. Η παρουσία όμως

του μικροβίου μετά τη θεραπεία και η υποτροπή του έλκους μπορεί να οφείλεται είτε σε μη εκρίζωση του αρχικού στελέχους, είτε σε νέα μόλυνση. Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο περιπτώσεων μπορεί να γίνει με την χρησιμοποίηση των μοριακών μεθόδων τυποποιήσεως. Ομοίως, οι μοριακές μέθοδοι βοηθούν στη διερεύνηση της κλωνικής ή όχι σχέσεως μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών που απομονώνονται από τον ίδιο ασθενή πριν και μετά θεραπεία.

Μελέτη εξέλιξης και παθογένειας

Η μοριακή τυποποίηση έχει χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη της εξέλιξης της λοίμωξης από *H. pylori*. Έχουν συγκριθεί στελέχη που έχουν απομονωθεί από τον ίδιο ασθενή κατά τακτά χρονικά διαστήματα, αλλά και στελέχη που έχουν απομονωθεί από διάφορες αποικίες σε καλλιέργεια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Desforges J. The use of molecular methods in infectious diseases. *NEJM* 1992;1290-7.
2. Logan R, berg D. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1996;1462-3.
3. Blanc D, Hauser P, Francioli P, Bille J. Molecular typing methods and their discriminatory power. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:61-3.
4. Kansau I, Raymond J, Bingen E. Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* 1996;147:661-9.
5. Μυριαγκού Π, Μεντής Α, Γεωργόπουλος Σ, Ζαφείρης Ι, Αρτίκης Λ, Τζουβελέκης Λ, Τζελέπη Ε, Ντάνος Ν. Ανάπτυξη διπλής (nested) αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση για την ανίχνευση και τυποποίηση στελεχών *Helicobacter pylori*. Αρχικά αποτελέσματα. Επιστημονική ημερίδα "Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού": Διεθνή δεδομένα και Ελληνική εμπειρία. Αθήνα, Απρίλιος 1995.
6. Wang J, Sheu J, Lin J, Wang T, Wu M. Direct DNA amplification and restriction pattern analysis of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer and their families. *J Infect Dis* 1993;168:1544-8.
7. Han S, Schreiber H, Bhakdi S, Loos M, Maeurer M. vacA genotypes and genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Laborat Immunol* 1998;139-45.
8. Georgopoulos S, Mentis A, Spiliadis C, Tzouveleki L, Tzelepi E, Moshopoulos A, Skandalis N. *Helicobacter pylori* infection in spouses of duodenal ulcer patients and comparison of ribosomal RNA gene patterns. *Gut* 1996; 39:634-8.