

Marcin Jaworski

Laboratorium Mikrobiologii UCML Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy

Promotor pracy: dr hab. n. med. Edyta Podsiadły

1. Wstęp

Helicobacter pylori jest Gram-ujemną, mikroaerofilną bakterią o spiralnej budowie, najczęściej występującą w błonie śluzowej ludzkiego żołądka. Został zidentyfikowany jako częsta przyczyna przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka, która może prowadzić do nowotworów przewodu pokarmowego. Narastająca oporność *H. pylori* na antybiotyki spowodowana jest wprowadzeniem terapii empirycznej bez wcześniejszej identyfikacji drobnoustroju oraz nastawieniu antybiogramu w celu wprowadzenia terapii celowanej.

2. Cel

W przeprowadzonych badaniach poddano analizie lekowrażliwość szczepów *H. pylori* wyizolowanych z błony śluzowej żołądka dzieci. Niezwykle ważnym elementem oznaczania lekowrażliwości jest wyhodowanie lub wykrycie DNA *H. pylori*. W ramach przeprowadzonych badań poddano optymalizacji nowe metody hodowli oraz zastosowanie metod diagnostyki molekularnej do bezpośredniej detekcji patogenu.



3. Metodologia

- Przygotowanie szczepów *H. pylori* do analizy
- Diagnostyka homogenatów z błony śluzowej żołądka w celu wykrycia *H. pylori*
- Oznaczenie lekowrażliwości szczepów *H. pylori*
- Porównanie odzysku *H. pylori* na różnych podłożach bakteriologicznych
- Izolacja DNA ze szczepów *H. pylori* i próbek homogenatów
- RT-PCR w kierunku *H. pylori*

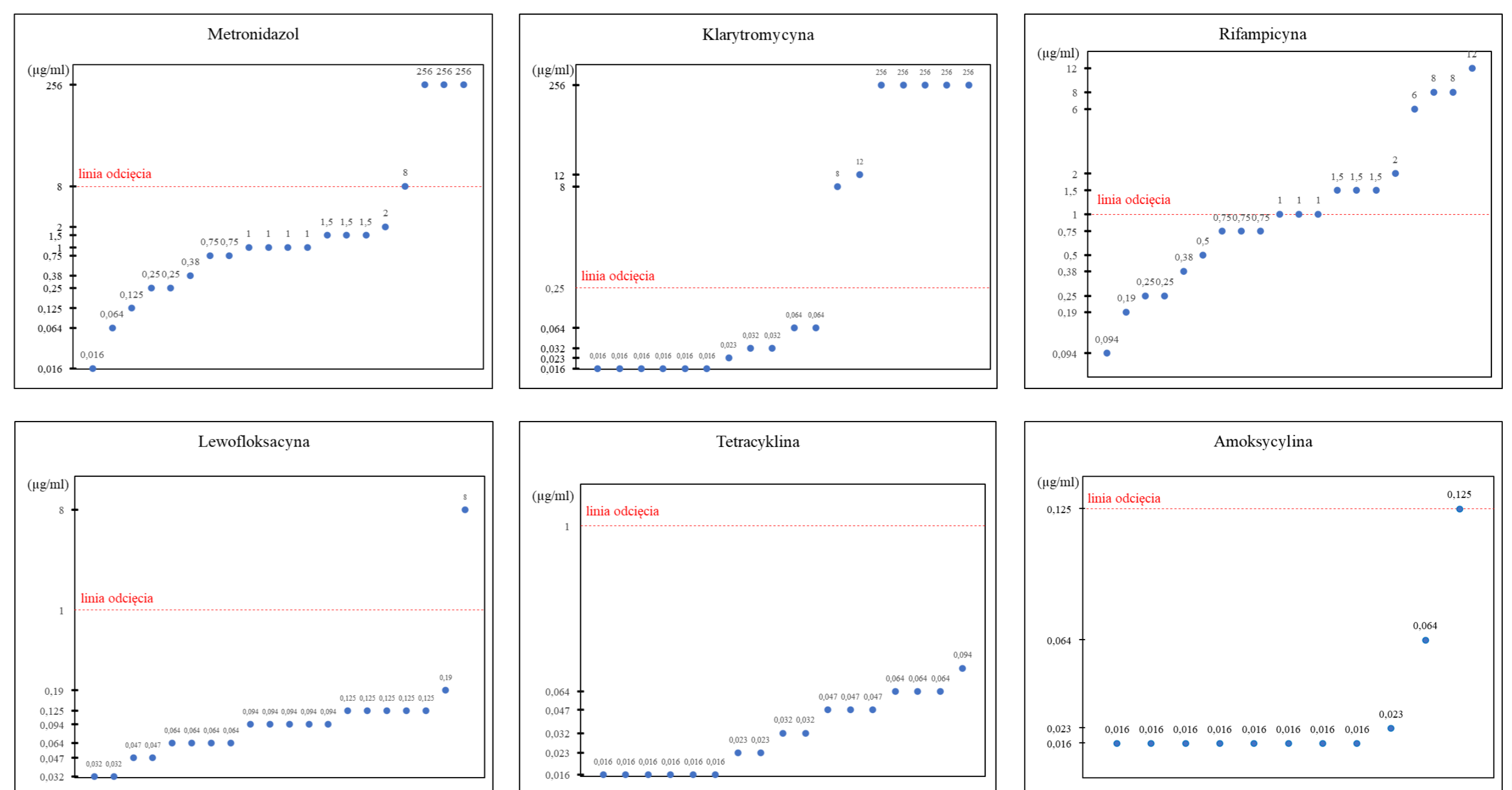


4. Wyniki

Wyniki oznaczenia minimalnego stężenia hamującego antybiotyków dla szczepów *H. pylori* wyizolowanych z wycinków błony śluzowej żołądka

	Amoksyacylina (µg/mL)	Klarytromycyna (µg/mL)	Lewofloksacyna (µg/mL)	Metronidazol (µg/mL)	Rifampicyna (µg/mL)	Tetracyklina (µg/mL)
1	---	---	0,125	256	0,75	---
2	---	256	0,032	1	0,19	0,016
3	0,016	---	0,047	0,25	8	---
4	---	0,064	0,125	1	0,5	0,016
5	0,125	256	0,125	0,75	0,25	---
6	---	0,064	0,094	8	0,094	0,064
7	0,064	0,032	8	1	0,75	0,016
8	0,016	0,016	0,094	0,016	12	0,016
9	---	256	0,125	0,25	1,5	0,047
10	---	256	0,125	2	0,75	0,023
11	---	0,016	0,19	1,5	1	0,047
12	---	8	0,064	1	1,5	0,016
13	0,016	0,016	0,047	0,064	1	0,016
14	0,016	0,016	0,032	0,75	1,5	0,094
15	0,016	0,016	0,064	1,5	8	0,023
16	0,016	0,032	0,094	1,5	6	0,064
17	0,016	0,016	0,064	256	2	0,047
18	---	12	0,094	0,38	0,25	0,064
19	0,016	0,023	0,064	0,125	1	0,032
20	0,023	256	0,094	256	0,38	0,032
ATCC 43629	---	0,25	---	0,5	1	0,032
EUCAST v.13 2023	≤ 0,125	≤ 0,25	≤ 1,0	≤ 8,0	≤ 1,0	≤ 1,0

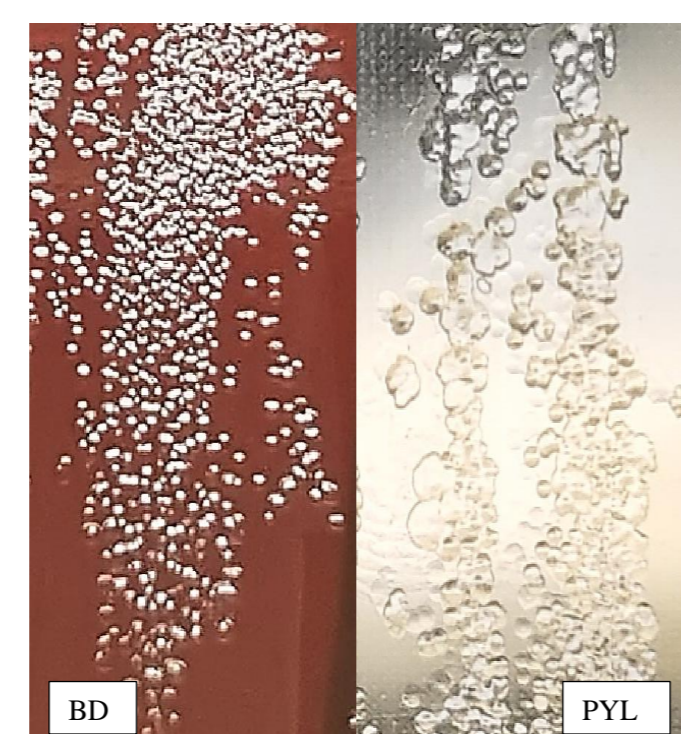
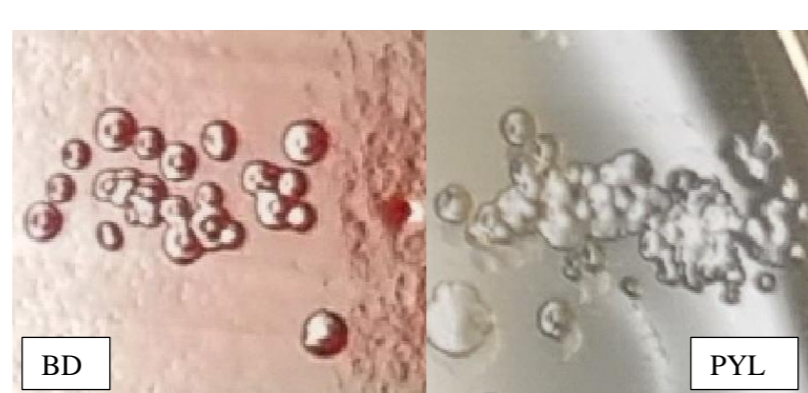
Wartości MIC dla poszczególnych antybiotyków dla badanych szczepów *H. pylori*.



Szacunkowa liczba kolonii bakteryjnych wyhodowanych na podłożach BD i PYL

Porównanie morfologii i wzrostu kolonii bakteryjnych szczepu *H. pylori* na podłożach BD i PYL

Pochodzenie bakterii i gęstość w skali McFarlanda	Liczba kolonii bakteryjnych wyhodowanych na podłożach	
	PYLORI Agar	BD Helicobacter Agar
ATCC 43629	0,12	3400
	0,25	1800
Szczep 1	0,12	4200
	0,25	1200
Szczep 2	0,12	380
	0,25	550
Szczep 3	0,12	80
	0,25	100
Średnia z wszystkich szczepów	0,12	2015
	0,25	913



Porównanie izolacji DNA szczepu wzorcowego *H. pylori* ATCC 43629 zestawami Syngen DNA Mini Kit i Genomic Micro AX Bacteria Gravity

Szczep wzorcowy ATCC 43629	Syngen DNA Mini Kit		Genomic Micro AX Bacteria Gravity		Wartości Docelowe
	MH-F	Schaedler	MH-F	Schaedler	
DNA (ng/µl)	0,8	33,4	5,9	20,0	> 20
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2,42	1,85	2,01	1,46	1,8 – 2,0
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	1,12	2,17	0,13	0,18	2,0 – 2,2

Ocena izolacji DNA zestawem Syngen DNA Mini Kit

Parametr	Homogenat			Wartości docelowe
	Homogenat 1	Homogenat 2	Homogenat 3	
DNA (ng/µl)	10,4	4,3	5,3	> 20
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,45	1,41	1,48	1,8 – 2,0
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	0,69	0,79	0,91	2,0 – 2,2

Parametr	Homogenat	Szczep wzorcowy		Wartości docelowe
	Homogenat 4	Mueller Hinton 2	Podłoże płynne Schaedlera*	
DNA (ng/µl)	2,5	0,8	33,4	> 20
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	2,27	2,42	1,85	1,8 – 2,0
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	0,86	1,12	2,17	2,0 – 2,2

Porównanie metod diagnostyki bakteriologicznej do wykrywania *H. pylori*

Homogenat	Hodowla	Preparat mikroskopowy	Test ureazowy	Objawy kliniczne	RT-PCR	Ct
homogenat 1	+	+	+	+	+	30,38
homogenat 2	+	+	+	+	+	30,80
homogenat 3	-	+	+	+	+	30,66
homogenat 4	-	-	+	+	-	N/A
szczep wzorcowy Schaedler	+	+	+	N/A	+	20,57
szczep wzorcowy MH-F	+	+	+	N/A	+	24,64

5. Wnioski

- Największą wrażliwość wyhodowane szczepy *H. pylori* wykazały na tetracyklinę i amoksyacylinę
- Najwięcej szczepów opornych *H. pylori* stwierdzono na rifampicynę i klarytromycynę, a podwyższony odsetek na metronidazol
- W populacji pediatrycznej występują wielolekooporne szczepy *H. pylori*
- Podłoża BD i PYL wykazują jednakową żyzność do zastosowania w diagnostyce *H. pylori*
- Wzrost na podłożu BD jest bardziej charakterystyczny niż na podłożu PYL
- Hodowla na podłożu płynnym Schaedlera w warunkach mikroaerofilnych wykazuje lepsze parametry do izolacji DNA niż na podłożu MH-F i podłożu płynnym Schaedlera w warunkach tlenowych
- Zestaw Syngen DNA Mini Kit ma większą wydajność i jakość wyizolowanego DNA niż zestaw Genomic Micro AX Bacteria Gravity
- Metoda PCR umożliwia wykrycie DNA *H. pylori* z homogenatów i tym samym potwierdzić jego obecność w niejednoznacznych wynikach uzyskanych przy pomocy metod bakteriologicznych

Powiązana literatura

Alfarouk K.O., *The Possible Role of Helicobacter pylori in Gastric Cancer and Its Management*. frontiers in Oncology 2019. 9(75): doi. 10.3389.

Megraud F., Coenen S., Wittkop L., *Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe in 2018 and its relationship to antibiotic consumption in the community*. Gut, 2021. 70(10): p. 1815-1822.

Ansari S., Yamaoko Y., *Helicobacter pylori Infection, Its Laboratory Diagnosis and Antimicrobial Resistance: a Perspective of Clinical Relevance*. American Society For Microbiology, 2022. 35(3): p. 1-55.