ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΕΛΛΗΝΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΩΝ

● *HELICOBACTER PYLORI* DIVERSITY AND GENETIC FLEXIBILITY: A ROLE FOR COMH?

K. Kostidis[1], *K. D. Bardhan*[2], *J. R. Sayers*[1]
[1]Henry Wellcome Laboratories for Medical Research, University of Sheffield Medical School, Sheffield, [2]Gastroenterology, Rotherham General Hospital, Rotherham, United Kingdom

Aims: Many organisms, including *H. pylori* share the property of the uptake of foreign DNA (competence), mainly used for genetic transformation. *H. pylori* alone possesses the unique *comH* gene which has been linked to competence (Smeets *et al.*, 2000). We were able to express and purify the ComH protein in our earlier work (Kostidis *et al.*, 2005). Our aims are to determine the level and degree of ComH interaction with DNA and to identify the location of this unique protein within the cell.

Methods: *H. pylori* strain 26695 was cultured and *comH* was amplified by PCR from the genomic DNA, cloned and expressed in various expression vectors. Antibodies against ComH were raised in rabbits and the antisera was used to detect the location of the protein *in vivo*. A range of nuclease and DNA-binding assays were also used.

Results: The protein expressed in the pGEX-KG system was solubilised, partially purified and used to grow antibodies. For use in functional assays, *comH* was cloned and expressed in pET21b. The resulting protein was purified through a combination of affinity and ion exchange chromatography. ComH was tested for nuclease activity by means of liquid nuclease assays and DNA-substrate SDS-PAGE under various conditions. No nuclease activity was detected. Nevertheless, ComH was able to bind ssDNA in electrophoretic mobility assays, with a binding constant (K_d) of 36 nM at pH 7. ComH antisera showed that the protein is located in the outter membrane and that it is surface exposed.

Conclusion: This is the first time ComH, a unique protein throughout nature, has been expressed, purified and partially characterised. Against expectation, it is not a nuclease but it is able to bind ssDNA with high efficiency. Its exact function remains unknown but we presume it is in some way essential in internalising DNA. The fact that it preferentially binds to ssDNA suggests the existence of and interaction with a helicase. Due to the position of ComH and the degree of its association with the membrane, we were unable to identify any interacting proteins.

● ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΑΣΘΕΝΗ ΙΣΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *H. PYLORI (HP)* ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΑΡΙΘΜΟ ΘΕΣΕΩΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗΣ *EPIYA-C* ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ CagA

ΕΓ. Παναγιωτοπούλου[1], Δ. Σγούρας[1], Κ. Παπαδάκος[1], Β. Martinez[1], Σ. Μιχόπουλος[2], Γ. Μάντζαρης[3], Ε. Ρώμα[4], Α. Μεντής[1] και Α. Αρχιμανδρίτης[5]
[1]Εργ. Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ε.Ι. Pasteur, Γαστρεντερολογικές Κλινικές, Νοσ. [2]"Αλεξάνδρα" και [3]"Ευαγγελισμός",[4]1η Παιδιατρική Κλινική Νοσ. Παίδων "Αγ. Σοφία", και [5]2η Παθολογική Κλινική, Νοσ. "Ιπποκράτειο", Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Σκοπός μας ήταν ο χαρακτηρισμός των θέσεων *EPIYA* τύπου *A*:*EPIYA*KVNK, *B*: *EPIYA*QVAKK, *C*:*EPIYA*TIDDLG της πρωτεΐνης CagA κλινικών στελεχών *Hp*, διότι μετά από φωσφορυλίωση στις εν λόγω θέσεις στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα, η CagA απορυθμίζει σημαντικούς μοριακούς μηχανισμούς που συνδέονται με καρκινική εξαλλαγή.

Υλικό και μέθοδος: Σε 101 cagA-θετικά κλινικά στελέχη *Hp,* η 3'-περιοχή του γονιδίου cagA πολλαπλασιάστηκε με PCR με χρήση ειδικών εκκινητών (EPIYA PCR), έγινε ανάγνωση αλληλουχίας των προϊόντων και προσδιορίστηκε ο αριθμός και τύπος των θέσεων *EPIYA* μετά από στοίχισή τους. Σε όλες τις περιπτώσεις η έκφραση της πρωτεΐνης CagA ανιχνεύθηκε με ανοσοστύπωση κατά Western σε εκχυλίσματα ολικών πρωτεϊνών από συγκαλλιέργειες γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων και κλινικών στελεχών.

Αποτελέσματα: Σε 91 περιπτώσεις παρατηρήθηκε ένα μοναδικό προϊόν PCR υποδηλώνοντας παρουσία CagA πρωτεΐνης με επαναλαμβανόμενες θέσεις *EPIYA* σε συνδυασμούς ABC (n=70), ABCC (n=17), ABCCC (n=2), ABABC (n=1) και AC (n=1). Αντίθετα, σε 10 περιστατικά παρατηρήθηκαν δύο PCR προϊόντα που υποδήλωναν συνύπαρξη 2 στελεχών στον ίδιο ασθενή με διαφορετικό αριθμό *EPIYA* στην CagA, το οποίο επιβεβαιώθηκε και από την έκφραση των επιμέρους CagA πρωτεϊνών. Σε αυτά τα περιστατικά, ακολούθησε λήψη μεμονωμένων αποικιών που τυποποιήθηκαν με RAPD PCR. Τα προϊόντα EPIYA PCR κάθε στελέχους κλωνοποιήθηκαν και έγινε ανάγνωση αλληλουχίας. Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε ότι επρόκειτο για ισογονιδιακά στελέχη με διαφορετικό αριθμό *EPIYA-C* θέσεων στην CagA. Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν λοιμώξεις με ζεύγη στελεχών του τύπου ABC-ABCC (n=6), AB-ABC (n=2) και από μία των τύπων ABC-ABCCC, ABCC-ABCCCC.

Συμπέρασμα: Τυποποιήσαμε επιτυχώς κλινικά στελέχη *Hp* αναφορικά με τον αριθμό και συνδυασμό των θέσεων φωσφορυλίωσης *EPIYA* της CagA πρωτεΐνης. Επιπλέον, σε ποσοστό 10% του δείγματος διαπιστώσαμε την ύπαρξη ισογονιδιακών στελεχών στον ίδιο ασθενή, τα οποία εξέφραζαν CagA πρωτεΐνη με διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων *EPIYA-C*. Η διαφορά αυτή αντικατοπτρίζει μία τάση δυναμικής εξέλιξης των στελεχών *Hp* μέσα στον ξενιστή, με άγνωστη μέχρι στιγμής επίπτωση στην παθογένεια του βακτηρίου.

● ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΜΕ ΥΨΗΛΗ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΟΛΟΚΛΗΡΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CagA

Κ. Παπαδάκος[1], Ε. Παναγιωτοπούλου[1], Β. Martinez[1], Σ. Μιχόπουλος[2], Ε. Χατζηλουκάς[3], Δ. Σγούρας[1] και Α. Μεντής[1]

[1]Εργ. Ιατρικής Μικροβιολογίας Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα, [2]Γαστρεντερολογική Μονάδα, ΓΠΝΑ Αλεξάνδρα, Αθήνα, [3]Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σκοπός: Για να μελετήσουμε την παθογένεια της πρωτεΐνης CagA χρειάστηκε να προβούμε σε πολλαπλασιασμό και κλωνοποίηση ολόκληρου του γονίδιου που την κωδικοποιεί. Όμως, αυτό αποτελεί μια πρόκληση λόγω του μεγάλου μεγέθους και της πολυμορφικότητας του γονιδίου στην 3' περιοχή του.

Υλικό–Μέθοδος: Χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από δύο ισογονιδιακά στελέχη (alcag4-1 και alcag4-4) που απομονώθηκαν από τον ίδιο ασθενή και εκφράζουν πρωτεΐνη CagA με 3 και 5 θέσεις φωσφορυλίωσης EPIYA αντίστοιχα. Για τον πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκε υψηλής πιστότητας Vent DNA πολυμεράση (N.E. Biolabs). Επιλέχθηκαν εκκινητές βάσει δημοσιευμένων αλληλουχιών γονιδίων cagA και σχεδιάστηκαν επιπλέον εκκινητές που περιελάμβαναν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου Age I για την κλωνοποίηση του προϊόντος σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pCDNA3.1. Έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR με χρήση κυκλοποιητή Mastercycler Gradient (Eppendorf), με σκοπό την ελαχιστοποίηση των παρά-προϊόντων της αντίδρασης. Η πιστότητα του πολλαπλασιασμού ελέγχθηκε με ανάγνωση της αλληλουχίας των προϊόντων σε γενετικό αναλυτή CEQ8000 (Beckmann).

Αποτελέσματα: Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες PCR ως προς τη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (40-70°C) καθώς και τις συγκεντρώσεις $MgSO_4$ (2, 4, 6 και 8 mM) και εκκινητών (0,1-1,0μM). Ελάχιστη εμφάνιση παρά-προϊόντων επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητών 61°C για τους κανονικούς εκκινητές και 62°C για τους εκκινητές με θέσεις αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου Age I. Καλύτερος ειδικός πολλαπλασιασμός επιτεύχθηκε για συγκέντρωση 8mM ιόντων Mg. Τέλος επιλέχθηκε συγκέντρωση εκκινητών 250μM και για τις δύο περιπτώσεις των ζευγών των εκκινητών. Με αυτές τις συνθήκες πολλαπλασιάστηκε επιτυχώς τμήμα DNA με το προβλεπόμενο μήκος και για τα δύο στελέχη (alcag4-1: 3564 βάσεις και alcag4-4: 3764 βάσεις).

Συμπέρασμα: Αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε επιτυχώς μια απαιτητική μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τον πολλαπλασιασμό με πιστότητα ολόκληρου του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη CagA. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε επιτυχώς σε πλασμιδιακούς φορείς πρωτεϊνικής έκφρασης για την περαιτέρω μοριακή διερεύνηση του ρόλου της CagA πρωτεΐνης, μετά από έκφραση σε γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα.

● ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΟΥΡΕΑΣΗΣ (CLO TEST): ΠΟΣΟ ΑΞΙΟΠΙΣΤΗ ΕΙΝΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ;

Α. Ρουμπάνη[1], Ι. Παχούλα[1], Α. Πολύζος[1], Ι. Παναγιώτου[1], Α. Κωνσταντινίδου[2], Δ. Σγούρας[3], Ε. Λαγκώνα[1], Ε. Ρώμα- Γιαννίκου[1]
[1]Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, [2]Παθολογοανατομικό Τμήμα Νοσ. Παίδων «Η Αγία Σοφία», [3]Εργ. Ιατρ. Μικροβιολογίας Ε.Ι Παστέρ

Σκοπός: Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας και της ειδικότητας του CLO test σε σύγκριση με την απομόνωση του *H. pylori* (*Hp*) στη βιοψία, καλλιέργεια ιστού και η συσχέτισή του με το βακτηριδιακό φορτίο, την ενεργότητα της γαστρίτιδας και την παρουσία οζιδίων στο πυλωρικό άντρο.

Υλικό και μέθοδος: Μελετήθηκαν αναδρομικά τα αποτελέσματα 3459 γαστροσκοπήσεων που έγιναν τα τελευταία 18 χρόνια (1989–2006). Σαν Gold standard μέθοδος για την διάγνωση της λοίμωξης από *Hp* χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια ιστού πυλωρικού άντρου ή/και βιοψία. Η ταξινόμηση της γαστρίτιδας έγινε σύμφωνα με το τροποποιημένο σύστημα Sidney. Λοίμωξη *Hp* είχαν 480 παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 15 ετών (mean 10,4±3,3 SD έτη), CLO test έγινε σε 450 παιδιά.

Αποτελέσματα: Σε 393/450 παιδιά το CLO test ήταν θετικό, ενώ σε 57 (12,6%) ψευδώς αρνητικό (ευαισθησία: 87,3%, ειδικότητα: 97,9%). Ευαισθησία ιστολογικής 95%, καλλιέργειας 94%. Η πιθανότητα για ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα μειώνεται με την αύξηση του βακτηριδιακού φορτίου ($p < 0,01$). Οζίδια είχαν 264 παιδιά (55%). Το CLO ήταν θετικό στο 58,3% των παιδιών με οζίδια και 41,7% χωρίς ($p < 0,05$). Στατιστικά σημαντική ήταν η συσχέτιση παρουσίας οζιδίων και ενεργότητας της νόσου ($p < 0,016$). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συσχέτιση με αιμορραγία πεπτικού (CLO+ 86% με αιμορραγία και 87% χωρίς, $p > 0,05$). Το αυξημένο ποσοστό (19,4%) ψευδώς αρνητικών CLO σε παιδιά ≤5 ετών δεν απεδείχθη στατιστικώς σημαντικό ($p > 0,05$). Το CLO test αποδείχθηκε ψευδώς θετικό στο 2,1%.

Συμπέρασμα: Το CLO test έχει υψηλή ειδικότητα, αλλά υπολείπεται σε ευαισθησία συγκριτικά με τη βιοψία και καλλιέργεια ιστού και πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τις δύο αυτές μεθόδους για την αύξηση της ευαισθησίας για τη διαπίστωση της λοίμωξης από *Hp* στα παιδιά.

● ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *HELICOBACTER PYLORI (HP)* ΣΤΗ ΛΕΒΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ

B. Martinez-Gonzalez[1], Ε.Γ. Παναγιωτοπούλου[1], Κ. Παπαδάκος[1], Ι. Παχούλα[2], Ε. Ρώμα[2], Σ. Μιχόπουλος[3], Δ. Σγούρας[1] και Α. Μεντής[1]
[1]Εργ. Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ε.Ι. Παστέρ, Γαστρεντερολογικές Κλινικές [2]Νοσ. Παίδων «Αγία Σοφία» και [3]Νοσ. «Αλεξάνδρα»

Σκοπός: Η λεβοφλοξασίνη (LE), μία φθοριοκινολόνη 3ης γενιάς έχει προταθεί για 2ης και 3ης γραμμής θεραπεία εκρίζωσης του *Hp*. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση των επιπέδων αντοχής στην LE κλινικών στελεχών *Hp* απομονωμένων από παιδιά και ενήλικες.

Υλικό και Μέθοδος: Εξετάστηκαν 104 κλινικά στελέχη *Hp,* 75 από ενήλικες στη πλειοψηφία τους με ιστορικό μίας τουλάχιστον αποτυχημένης εκρίζωσης και 29 από παιδιά με συμπτώματα επιγαστραλγίας. Η μέτρηση της ευαισθησίας στη LE έγινε με την μέθοδο E-test (όριο ευαισθησίας 8μg/ml). Ακολούθησε συσχέτιση με τα επίπεδα αντοχής των στελεχών και στην κλαριθρομυκίνη (CH) και στη μετρονιδαζόλη (MZ).

Αποτελέσματα: Εννέα στελέχη (8,7%) βρέθηκαν ανθεκτικά στη LE, από τα οποία 8 (10,7%) προέρχονταν από ενήλικες και 1 (3,4%) από παιδιά. Επτά από τα 9 στελέχη (77,8%) παρουσίασαν ταυτόχρονα αντοχή και στη MZ και στην CH και προέρχονταν όλα από ενήλικες.

	Στελέχη *Hp* ανθεκτικά		
	CH	**MZ**	**MZ+CH**
LE ανθεκτικά	1	1	7
LE ευαίσθητα	18	16	40

Συμπεράσματα: Η αντοχή στη LE στελεχών *Hp* από παιδιά είναι χαμηλή και κινείται στα επίπεδα του 3%. Αντίθετα σε στελέχη ενηλίκων τα επίπεδα αντοχής κινούνται στο 10% και είναι παρεμφερή με αυτά που έχουν αναφερθεί σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες. Αυτά τα στελέχη από ενηλίκους παρουσίασαν ταυτόχρονη αντοχή και σε MZ και CH, αποτέλεσμα της μίας τουλάχιστον αποτυχημένης θεραπείας εκρίζωσης. Η LE θα μπορούσε να αποτελέσει αντιβιοτικό επιλογής για θεραπεία εκρίζωσης 2ης ή 3ης γραμμής υπό την προϋπόθεση ότι έχει προσδιοριστεί η ευαισθησία των υπό εκρίζωση στελεχών σε αυτήν.

ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΕΛΙΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΛΩΡΟΥ ΣΕ ΠΑΙΔΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ: ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ι. Παχούλα[1], Α. Ρουμπάνη[1], Α. Πολύζος[1], Ι. Παναγιώτου[1], Α. Κωνσταντινίδου[2], Φ. Παλαμίδου[1], Κ. Αθανασάκη[1], Β. Martinez[3], Ε. Ρώμα-Γιαννίκου[1]
[1]Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, [2]Παθολογοανατομικό τμήμα Νοσ. Παίδων «Η Αγία Σοφία», [3]Εργ. Ιατρ. Μικροβιολογίας Ε.Ι Παστέρ

Σκοπός: Η μελέτη των επιδημιολογικών δεδομένων και της κλινικής εκδήλωσης της λοίμωξης από *Helicobacter pylori* (*Hp*) στα παιδιά.

Υλικό-Μέθοδος: Μελετήθηκαν αναδρομικά 3459 παιδιά που γαστροσκοπήθηκαν τη χρονική περίοδο 1989-2006 και ταξινομήθηκαν σε πάσχοντες και μη από *Hp* λοίμωξη με τα καθορισμένα κριτήρια: ιστολογική εξέταση, CLO test, και/ή καλλιέργεια ιστού. Καταγράφηκε η χρονολογία γαστροσκόπησης και η εθνικότητα στο σύνολο, ενώ η ηλικία, το φύλο και η κλινική εικόνα μόνο στους πάσχοντες από *Hp* λοίμωξη.

Αποτελέσματα: *Hp* λοίμωξη διαπιστώθηκε σε 480 παιδιά (14%), μέσης ηλικίας 10,4±3,3 SD έτη (252 αγόρια), 456/480 (95%) ήταν ελληνικής καταγωγής. Εξ αυτών, το 62,5% των παιδιών ανέφερε επιγαστραλγία, 24% δυσπεπτικά ενοχλήματα, 11,7% κοιλιακό άλγος, 10% αιμορραγία πεπτικού, 5,4% οπισθοστερνικό καύσος, και 1,25% δυσοσμία στόματος. Στελέχη *Hp* ανευρέθηκαν «τυχαία» σε γαστρικές βιοψίες 8 παιδιών (1,67%) που ελέγχθηκαν για κιρσούς οισοφάγου ή μετά από κατάποση καυστικής ουσίας, 10 παιδιών με ΙΦΝΕ (2%) και 8 παιδιών με κοιλιοκάκη (1,67%). Επί του συνόλου των Ελλήνων που γαστροσκοπήθηκαν ανά έτος, το ποσοστό των πασχόντων μειώθηκε από 27% το 1989 σε 8% το 2006 και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$), ενώ εκείνο επί του συνόλου των αλλοδαπών παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (25%, p=NS).

Συμπεράσματα: Η επιγαστραλγία ήταν η κύρια κλινική εκδήλωση της *Hp* λοίμωξης. Το ποσοστό των Ελλήνων πασχόντων μειώθηκε σημαντικά με την πάροδο των ετών πιθανά λόγω της βελτίωσης των συνθηκών υγιεινής, ενώ εκείνο των αλλοδαπών παρέμεινε υψηλό. Ο έλεγχος για *Hp* λοίμωξη επιβάλλεται σε κάθε παιδί που υποβάλλεται σε γαστροσκόπηση για να μειωθεί ο κίνδυνος παραμονής του μικροβίου εφ΄ όρου ζωής.