



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά με συγκριτική
ανάλυση ολικού βακτηριακού γονιδιώματος σε πολυανθεκτικά
στελέχη Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού»**

ΓΕΩΣΗΜΑΝΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Διευθύντρια Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη,
Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Επιβλέπουσα: Παναγούλα Κόλλια, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής
Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Επιστημονικός υπεύθυνος: Διονύσιος Σγούρας, Διευθυντής Ερευνών, Εργαστήριο
Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση μηχανισμών ανοχής στα αντιβιοτικά με συγκριτική ανάλυση ολικού βακτηριακού γονιδιώματος σε πολυανθεκτικά στελέχη Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού»

ΓΕΩΣΗΜΑΝΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ – ΒΙΟΛΟΓΟΣ

A.M. 41708

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Κόλλια Παναγούλα,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ

Σγούρας Διονύσιος,

Διευθυντής Ερευνών, Εργ. Ιατρική Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη, Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Κόλλια Παναγούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου, ΕΚΠΑ

Σγούρας Διονύσιος, Διευθυντής Ερευνών, Εργ. Ιατρική Μικροβιολογίας, Ε. Ι. Παστέρ

ΑΘΗΝΑ 2019

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «**ΛΟΙΜΩΔΗ, ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ, ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ**» (MIS **5002486**) που εντάσσεται στη «Δράση Στρατηγικής Ανάπτυξης Ερευνητικών και Τεχνολογικών Φορέων» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2018-2019, στο Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ε. Ι. Παστέρ σε συνεργασία με τον τομέα Γενετικής και Βιοτεχνολογίας του Ε.Κ.Π.Α., στο πλαίσιο του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Ισιδώρα Παπασιδέρη, Διευθύντρια του Μ.Δ.Ε. και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παναγούλα Κόλλια, για την πολύτιμη ευκαιρία που μου έδωσαν να φοιτήσω στο παρόν πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών και βέβαια για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας. Η εμπειρία και οι γνώσεις που έλαβα στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος είναι πολύτιμες και στην απόκτησή τους συνέβαλαν τα μέλη Δ.Ε.Π. και οι συνεργαζόμενοι ερευνητές, τους οποίους και ευχαριστώ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, οφείλω στον επιστημονικό υπεύθυνο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, το Διευθυντή Ερευνών του Εργαστηρίου Ιατρικής Μικροβιολογίας, Δρ Διονύσιο Σγούρα, ο οποίος με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα και συνέβαλε καθοριστικά στην εκπόνηση του εγχειρήματος. Εκτιμώ τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγησή του και τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αυτό το διάστημα. Επίσης, ευχαριστώ για τη φιλοξενία, το Διευθυντή των Εργαστηρίων Δημόσιας Υγείας του Ε.Ι.Π., Δρ Ανδρέα Μεντή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Εντεταλμένο Ερευνητή της Μονάδας Βιοπληροφορικής και Εφαρμοσμένης Γενωμικής, του Ε.Ι.Π., Δρ. Τιμοκράτη Καραμήτρο, για την επιστημονική καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια του σε όλα τα επίπεδα και κυρίως για την εμπιστοσύνη του και την ευκαιρία να εργαστώ μαζί του. Θα ήθελα ακόμα, να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και ειδικότερα τη Δρ Beatriz Martinez-Gonzalez για τις συμβουλές, την υποστήριξη καθώς και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Ευχαριστώ πολύ, επίσης, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χρύσα Καρτσιούκα και κυρίως τους υποψήφιους διδάκτορες Γιάννη Καραγιάννη και Λευτέρη Κοντιζά για την υποστήριξη σε επιστημονικό και ηθικό επίπεδο κατά την εκπόνηση και συγγραφή της διπλωματικής εργασίας μου και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένεια και τους φίλους μου, οι οποίοι με στηρίζουν με αγάπη και υπομονή όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*H. pylori*) αποτελεί κύριο αιτιολογικό παράγοντα για την εκδήλωση μια σειράς παθήσεων, όπως η χρόνια ενεργός γαστρίτιδα και το πεπτικό έλκος και αυξάνει κατακόρυφα τον κίνδυνο για την ανάπτυξη γαστρικού καρκίνου, η εκκρίωσή του δε, αποτελεί προτεραιότητα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, λόγω της αυξητικής τάσης της αντοχής του στα αντιβιοτικά. Στην Ελλάδα, πολυκεντρική μελέτη της περιόδου 2012-2015 που πραγματοποιήθηκε από το Ε. Ι. Παστέρ, ανέδειξε την έκταση του φαινομένου, αποκαλύπτοντας τα υψηλά επίπεδα αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη (27,2%), στη μετρονιδαζόλη (32,1%) και στη λεβοφλοξασίνη (7,7-8,2%).

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων Ανάγνωσης Αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος (WGS) με στόχο τη μελέτη της γενετικής βάσης του μηχανισμού αντοχής. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 38 κλινικά στελέχη *H. pylori* τα οποία είχαν ήδη χαρακτηριστεί αναφορικά με την ευαισθησία τους στα προαναφερθέντα αντιβιοτικά με φαινοτυπική διαδικασία προσδιορισμού (E-test). Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών 6 γονιδίων σχετιζόμενων με την αντοχή στην κλαριθρομυκίνη (23S rRNA), τη μετρονιδαζόλη (*rdxA*, *frxA*, *rpsU*) και τη λεβοφλοξασίνη (*gyrA*, *gyrB*), με τα αντίστοιχα γονίδια του στελέχους αναφοράς *H. pylori* 26695. Καταγράφηκε η παρουσία πλαισιοτροποποιητικών αλλαγών (ελλείψεων και προσθηκών) και σημειακών μεταλλάξεων, που είτε έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφορετικού αμινοξικού καταλοίπου στην πολυπεπτιδική αλυσίδα που συντίθεται, είτε είναι σιωπηλές και η ανάλυση ολοκληρώθηκε με εφαρμογή στατιστικής δοκιμασίας για την αξιολόγηση της παρουσίας των μεταλλάξεων σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στο εκάστοτε αντιβιοτικό, στελέχη.

Αναφέρονται μεταλλάξεις που έχουν ήδη σχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό, οι οποίες θεωρούνται χαρακτηριστικές και συχνά εμφανιζόμενες και το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματά μας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ωστόσο η περίπτωση μεταλλάξεων που βιβλιογραφικά αναφέρονται ως υπεύθυνες για την αντοχή και οι οποίες στην παρούσα μελέτη, εντοπίστηκαν και σε ευαίσθητα στελέχη, ενώ περαιτέρω ανάλυσης σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών χρήζουν και οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν αποκλειστικά ή κατά κύριο λόγο σε ανθεκτικά στελέχη, η παρουσία των οποίων όμως δεν έχει σχετιστεί άμεσα με το φαινόμενο αντοχής του *H. pylori*

στα αντιβιοτικά. Σημειώνεται, ακόμη, ότι στους πίνακες καταγραφής των μεταλλάξεων υπάρχει ένα σύνολο θέσεων στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων με παρουσία συγκεκριμένων αζωτούχων βάσεων, οι οποίες είναι ίδιες στην πλειοψηφία ή ακόμη και στο σύνολο των στελεχών και διαφορετικές από αυτές που καταγράφονται στο στέλεχος αναφοράς. Η ύπαρξη αυτών των πολυμορφικών θέσεων είναι αναμενόμενη, καθώς το *H. pylori* διαθέτει εξαιρετική πολυμορφικότητα, απόρροια του αντίξοου περιβάλλοντος στο οποίο επιβιώνει και στην πλειοψηφία τους δεν αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως σχετιζόμενες με την αντοχή στα αντιβιοτικά.

Η τεχνολογία Ανάγνωσης Αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος (WGS) έχει συνεισφέρει σημαντικά στη μελέτη οργανισμών, όπως το *H. pylori*, η εκκρίωση του οποίου αποτελεί ζήτημα δημόσιας υγείας, λόγω της διαρκώς αυξανόμενης αντοχής έναντι των αντιβιοτικών. Η αξιοποίηση των δυνατοτήτων και των πλεονεκτημάτων της μεθόδου, καθιστά δυνατή τη μελέτη οργανισμών σε επίπεδο γονιδιώματος, ενώ παράλληλα εξασφαλίζει την αποδέσμευση από παραδοσιακές τεχνικές καλλιέργειας. Μάλιστα, παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλού χειρισμού των δεδομένων, ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε μελέτης και εξαγωγής συμπερασμάτων χρήσιμων στην κλινική πράξη, τα οποία αφορούν παραδείγματος χάρη, ζητήματα παθογένειας ή αντοχής στα αντιβιοτικά. Παρά τα πολλαπλά οφέλη από την εκμετάλλευση της τεχνολογίας WGS, υπάρχουν φραγμοί στην εδραίωση της στη διαγνωστική ρουτίνα των μικροβιολογικών εργαστηρίων. Ο χρόνος διεκπεραίωσης των αναλύσεων και αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, καθώς και η ανάγκη για προσαρμογή της ροής εργασίας, αποτελούν χαρακτηριστικά εμπόδια. Κι αυτό, διότι διαχρονικά αποτελεί αναγκαιότητα η μείωση του απαιτούμενου χρονικού διαστήματος για την ολοκλήρωση των διαδικασιών, ώστε να μην ξεπερνά το χρόνο των παραδοσιακών αναλύσεων. Επιπλέον, τίθενται ζητήματα εκπαίδευσης και κατάρτισης του επιστημονικού δυναμικού για την εξοικείωση όχι μόνο με το πειραματικό μέρος, αλλά και τη βιοπληροφορική ανάλυση, που έπεται αυτού. Τέλος, προβληματισμοί εγείρονται γύρω από την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων φαινοτυπικής και γονοτυπικής ανίχνευσης της αντοχής στα αντιβιοτικά, με τη δεύτερη μέθοδο να προσδιορίζεται ως καταλληλότερη για την περίπτωση αντιβιοτικών, η αντοχή έναντι των οποίων έχει συνδεθεί με καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις.

Summary

Helicobacter pylori infection is the etiologic factor for the development of digestive diseases, such as chronic active gastritis and peptic ulcer and remains a primary risk factor for the development of gastric adenocarcinoma. For this reason, its successful eradication remains a priority for the WHO, especially due to the rising levels of observed antibiotic resistance, which affects therapeutic efficacy. According to a multicenter study conducted by the Hellenic Pasteur Institute in Greece between 2012-2015, primary resistance levels to clarithromycin, metronidazole and levofloxacin were determined to be 27,2%, 32,1% and 8,2% respectively.

In the present study, a Whole-genome sequencing (WGS) approach was applied and bioinformatic analysis was performed to investigate the genetic basis of antimicrobial resistance mechanisms. We analyzed 38 *H. pylori* clinical strains isolated from adult symptomatic patients, in which phenotypic antibiotic susceptibility had been previously characterized using the E-test®. Premature stop codon and frame-shift mutations, as, point mutations (silent mutations included) were observed in genes related to clarithromycin (23S *rRNA*), metronidazole (*rdxA*, *frxA*, *rpsU*) and levofloxacin (*gyrA*, *gyrB*) resistance with reference to 26695 strain. We observed mutations frequently associated with antibiotic resistance uniquely in resistant strains, but we also identified some previously reported as resistance-associated mutations, in both resistant and susceptible strains. Moreover, a number of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) was identified, however, further analysis is required in order to examine their impact on *H. pylori* eradication. *H. pylori* strains are characterized by genetic diversity which is greater than within most other bacteria and this is something that should be taken into account when studying the role of the SNPs. The association between the genetic variants of the aforementioned genes and the phenotype of antibiotic resistance were analyzed using Fisher's exact test.

Whole-genome sequencing technology is a practical state-of-the-art tool for analyzing genomic variations associated with antibiotic resistance in *H. pylori*, that way contributing significantly to the study of resistance mechanisms. Despite the benefits of the technology, which allows detailed characterization of pathogens, providing a large amount of information including strain type, virulence, antibiotic resistance there are barriers to implementing WGS in the determination of antibiotic susceptibility of *H. pylori* in clinical

microbiology practice. The most common arguments mainly concern the long turnaround time, which needs to be lowered in order to have a significant clinical impact on decision making. It should be noted that there is need not just for shortening of turnaround time but making it no longer than the traditional methods' duration. In order WGS to be integrated into clinical workflows, another barrier should be overcome and that is the correlation of phenotypic susceptibility and resistance to the WGS genotype. We cannot assume that a specific strain is phenotypically resistant or susceptible to an antimicrobial drug just by revealing the presence of gene mutations related to antibiotic resistance, but we should clearly link new findings to a diagnosis and treatment choice. Finally, regarding the pipelines (data analysis workflow) used to extract sequence data, it is important that the established software is user-friendly and the information extracted to be accurate and clinically applicable.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	1
Περίληψη.....	2
Summary.....	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ / ΣΥΜΒΟΛΩΝ	9
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. Γενικά Στοιχεία για το Ελικοβακτήριο του πυλωρού	12
1.1 Γενικές πληροφορίες.....	12
1.1.1 Μορφολογία του <i>H. pylori</i>	12
1.1.2 Γονιδίωμα του <i>H. pylori</i>	13
1.1.3 Συσχέτιση του <i>H. pylori</i> με ασθένειες	13
1.2 Ταξινόμηση.....	115
1.3 Επιδημιολογία	115
1.4 Μετάδοση	13
2. Παθοφυσιολογία της Λοίμωξης <i>H. pylori</i>	14
2.1 Βιολογία της λοίμωξης	14
2.2 Παράγοντες που σχετίζονται με την <i>H. pylori</i> λοίμωξη	15
3. Διάγνωση.....	23
4. Θεραπεία εκρίζωσης	20
4.1 Βασικά θεραπευτικά σχήματα	20
4.2 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών στα βακτήρια	25
5. Ανάπτυξη αντοχής του <i>H. pylori</i> στα αντιβιοτικά	32
5.1 Επιπολασμός της αντοχής.....	33
5.2 Γενετική και μηχανιστική βάση της αντιμικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά	32
5.3 Ανάπτυξη αντοχής του <i>H. pylori</i> στην κλαριθρομυκίνη	33
5.4 Ανάπτυξη αντοχής του <i>H. pylori</i> στη μετρονιδαζόλη	39
5.5 Ανάπτυξη αντοχής του <i>H. pylori</i> στις φθοριοκινολόνες.....	40
5.6 Ανάπτυξη αντοχής του <i>H. pylori</i> αμοξυκιλλίνη	41
5.7 Ανάπτυξη αντοχής του <i>H. pylori</i> στην τετρακυκλίνη.....	42
6. Ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά.....	43
6.1 Φαινοτυπική ανίχνευση	43
6.1.1 Μέθοδος ενσωμάτωσης σε άγαρ.....	43
6.1.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών στο άγαρ	40

6.1.3	E-test (Epsilon meter test).....	404
6.2	Γονοτυπική ανίχνευση.....	404
6.2.1	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	415
6.2.2	PCR – RFLP (Ανάλυση πολυμορφισμών μήκους περιοριστικού θραύσματος).	415
6.2.3	Ανάγνωση αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i>	415
7.	Σκοπός	437
B. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ		448
1.	Διαχείριση στελεχών <i>H. pylori</i>	459
1.1.	Απομόνωση και καλλιέργεια στελεχών <i>H. pylori</i> από κλινικά δείγματα.....	459
1.2.	Κρυοσυντήρηση στελεχών <i>H. pylori</i>	459
1.3.	Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργεια <i>H. pylori</i>	50
2.	Φαινοτυπική ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά με τη μέθοδο E-test	50
3.	Ανάγνωση αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος κλινικών στελεχών <i>H. pylori</i>	51
3.1	Προετοιμασία βιβλιοθήκης.....	51
3.1.1	Κατακερματισμός DNA.....	52
3.1.2.	Καθαρισμός του κατακερματισμένου DNA	53
3.1.3.	Πρόσδεση προσαρμογέων και επιδιόρθωση εγκοπών (nick repair)	53
3.1.4.	Καθαρισμός του DNA που φέρει προσδεδεμένους προσαρμογείς	515
3.1.5.	Επιλογή μεγέθους βιβλιοθήκης	515
3.1.6.	Ενίσχυση και καθαρισμός της βιβλιοθήκης.....	526
3.1.7.	Ποιοτική αξιολόγηση βιβλιοθηκών.....	53
3.2.	Προετοιμασία προτύπου - DNA template	54
3.3.	Ανάγνωση αλληλουχίας	60
4.	De Novo Assembly.....	61
5.	Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων.....	62
5.1	Κατασκευή βάσεων δεδομένων.....	604
5.2	Αναζήτηση αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων	604
5.3	Εξαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας από τη βάση δεδομένων.....	604
6.	Ανίχνευση μεταλλαγών	615
7.	Στατιστική Ανάλυση	615
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		626
1.	Αντοχή του <i>H. pylori</i> στην κλαριθρομυκίνη	637
1.1.	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>23S rRNA</i>	648
2.	Αντοχή του <i>H. pylori</i> στη μετρονιδαζόλη	671

2.1.	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>rdxA</i>	72
2.2.	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>frxA</i>	715
2.3.	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>rpsU</i>	748
3.	Αντοχή του <i>H. pylori</i> στη λεβοφλοξασίνη	78
3.1.	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>gyrA</i>	80
3.2.	Μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>gyrB</i>	83
	Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	815
	Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	89
	ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	101

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ / ΣΥΜΒΟΛΩΝ

BabA	Blood group antigen-binding adhesin
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
BQT	Bismuth-containing quadruple therapy
CagA	Cytotoxin-associated gene A
CLA	Clarithromycin
CT	Concomitant therapy
DupA	Duodenal ulcer promoting gene
FdxA	Ferredoxin (φερρεδοξίνη)
FdxB	Ferredoxin-Like Protein (ένζυμα που μοιάζουν με τη φερρεδοξίνη)
FldA	Flavodoxin (φλαβοδοξίνη)
FrxA	NAD(P)H-φλαβινοξειδοαναγωγή
<i>gyrA</i>	Γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα A της βακτηριακής DNA γυράσης (τοποϊσομεράση II)
<i>gyrB</i>	Γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα B της βακτηριακής DNA γυράσης (τοποϊσομεράσης II)
FrxB	Ferredoxin-Like Protein (ένζυμα που μοιάζουν με τη φερρεδοξίνη)
HY	Hybrid therapy
I	Susceptible, Increased Exposure
LEV	Levofloxacin
LEV ^S	Στελέχη ευαίσθητα στη λεβοφλοξασίνη
MdaB	NADPH quinone reductase (NADPH κινονοαγωγή)
MET	Metronidazole
MET ^R	Στελέχη ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη
MET ^S	Στελέχη ευαίσθητα στη μετρονιδαζόλη
MIC	minimal inhibition concentration
OipA	Outer inflammatory protein
PARP1	Adenosine diphosphate ribosyl transferase
PPI	Proton pump inhibitor (αναστολείς αντλίας πρωτονίων)
R	Resistant

RUT	Rapid Urea Test
RdxA	NADPH-αδρανής στο οξυγόνο-νιτροαναγωγήση
S	Susceptible, standard dosing regimen (ευαίσθητο στέλεχος)
ST	Sequential therapy
UBT	Urea breath test
VacA	Vacuolating cytotoxin A
WGS	Whole Genome Sequencing

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά Στοιχεία για το Ελικοβακτήριο του πυλωρού

1.1 Γενικές πληροφορίες

1.1.1 Μορφολογία του *H. pylori*

Το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori*) είναι gram-αρνητικό μικροαερόφιλο βακτήριο που αποικίζει τα επιθηλιακά στρώματα του ανθρώπινου στομάχου, αποτελώντας μάλιστα κυρίαρχο οργανισμό στο γαστρικό θώκο (Hooi,2017). Προκαλεί μια από τις πιο διαδεδομένες λοιμώξεις με παγκόσμια διασπορά, με την έναρξη αυτής να καταγράφεται



Εικόνα Α - 1: Μορφολογία του *H. pylori*. Προσαρμογή από (Reshetnyak and Reshetnyak,2017).

κατά τα πέντε πρώτα χρόνια της ζωής του ανθρώπου (Mărginean,2017). Το είδος περιγράφηκε από τους ερευνητές Marshall και Warren το 1983 (Marshall and Warren,1984) ως ένα σπειροειδές βακτήριο που προσομοιάζει μορφολογικά στα βακτήρια του γένους *Campylobacter* και επιπλέον όπως και αυτά χαρακτηρίζεται από ύπαρξη θυμινών και γουανινών σε ποσοστό 34% στο γονιδίωμα του, αναπτύσσεται σε μικροαερόφιλες συνθήκες και αδυνατεί να ζυμώσει γλυκόζη (Solnick and Vandamme,2001). Το σπειροειδές αυτό βακτήριο είναι δυνατόν να αποκτήσει τη μορφή κόκκου και η ύπαρξη διαφωνίας

μεταξύ των ερευνητών τα τελευταία 10 χρόνια έγκειται στο αν το σχήμα

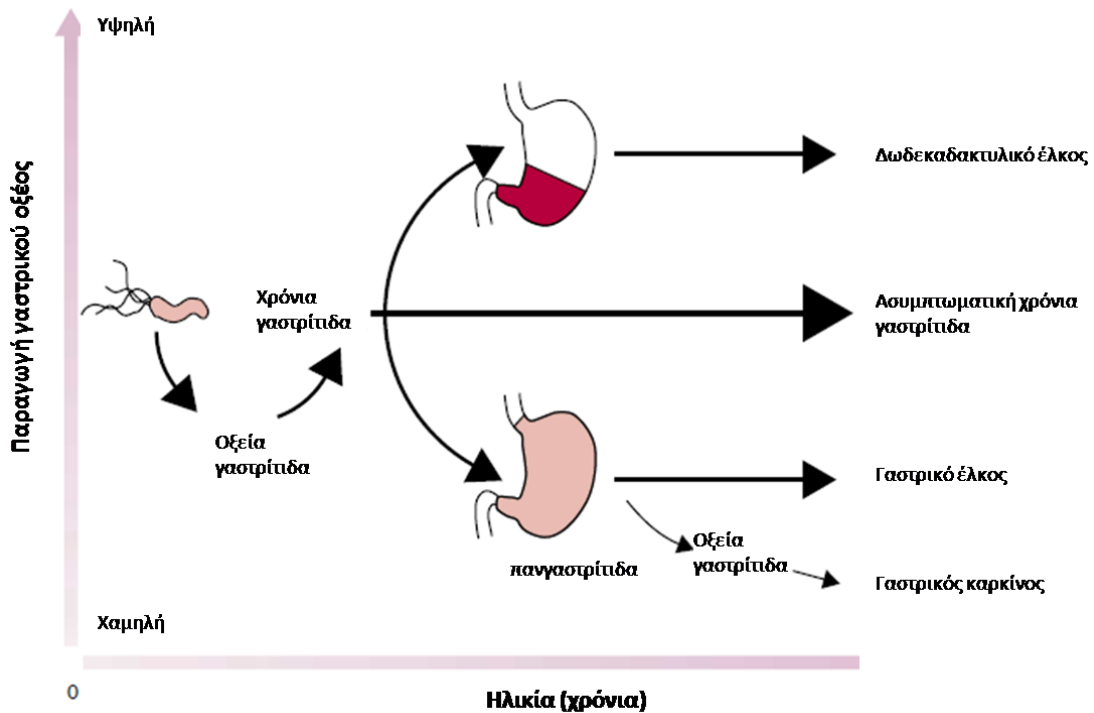
αποκτάται ως απόκριση σε συνθήκες stress στο περιβάλλον του μικροοργανισμού, είτε υποδηλώνει μη βιώσιμη κυτταρική μορφή (Azevedo,2007). Η διάμετρος των βακτηρίων *H.pylori* κυμαίνεται από 0,2μm έως 1,2μm και το μήκος τους από 1,5μm έως 10.0μm, ενώ η κατευθυνόμενη κίνηση τους στο γαστρικό βλεννογόνο διαμεσολαμβάνεται από την ύπαρξη 1-6 μαστιγίων στον ένα πόλο του βακτηριακού κυττάρου, παράλληλα με τη δράση χημειοτακτικών παραγόντων, ενώ αναφέρεται ότι δε σχηματίζουν σπόρια (Waskito,2018).

1.1.2 Γονιδίωμα του *H. pylori*

Το 1997 ολοκληρώθηκε η πρώτη πλήρης ανάγνωση αλληλουχίας του γονιδιώματος του στελέχους *H. pylori* 26695, που θεωρείται στέλεχος αναφοράς, διαθέτει κυκλικό γονιδίωμα, 1.667.867 ζεύγη βάσεων και 1590 κωδικοποιητικές αλληλουχίες (Tomb,1997). Το γονιδίωμα του Ελικοβακτηρίου παρουσιάζει εξαιρετική πολυμορφικότητα και τα διάφορα στελέχη ποικίλουν ως προς τον αριθμό αναδιατάξεων των γονιδίων, ενώ φέρουν αναστροφές, ελλείψεις και προσθήκες στη νουκλεοτιδική ακολουθία των γονιδίων, οι οποίες μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται και εντός του ίδιου στελέχους κατά τη διάρκεια της λοίμωξης (Draper,2017). Η πολυμορφικότητα εκφράζεται και με την παρουσία επαναλήψεων, μεταθετών στοιχείων ακόμα και την έλλειψη βασικών συστατικών των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA (Draper,2017).

1.1.3 Συσχέτιση του *H. pylori* με ασθένειες

Τα βακτήρια του είδους *H. pylori* έχουν προσαρμοστεί στη διαβίωση στο δυσμενές, ισχυρά όξινο περιβάλλον του στομάχου, το οποίο έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν, μειώνοντας τις τιμές οξύτητας προκειμένου να επιβιώσουν (Diaconu,2017). Στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων λοίμωξης από το μικροοργανισμό οι φορείς εμφανίζουν ασυμπτωματική χρόνια γαστρική φλεγμονή (**Εικόνα Α-2**), και μόνο σε ένα ποσοστό (10%) εμφανίζουν ανάπτυξη γαστρικού ή δωδεκαδακτυλικό έλκους (Diaconu,2017, He,2016). Τέλος, επιβεβαιωμένη είναι και η αιτιολογική σχέση της λοίμωξης από Ελικοβακτήριο με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης γαστρικής κακοήθειας όπως, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα (1% των ατόμων που φέρουν τη λοίμωξη) και τα λεμφώματα Hodgkin 's και non-Hodgkin' s MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) Β-κυτταρικά λεμφώματα (Diaconu,2017).



Εικόνα Α - 2: Σχηματική αναπαράσταση του φυσικού ιστορικού της λοίμωξης από *H. pylori*. Η λοίμωξη αποκτάται συνήθως κατά την παιδική ηλικία και εμμένει ισοβίως, εφόσον δεν αντιμετωπιστεί με κατάλληλη θεραπευτική αγωγή. Μετά την οξεία φάση, οι περισσότεροι ασθενείς αναπτύσσουν ασυμπτωματική χρόνια γαστρίτιδα, ενώ σε ορισμένους πρόκειται σε βάθος χρόνου να αναπτυχθούν σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις. Έκκριση γαστρικού οξέως σε φυσιολογικά ή υψηλή επίπεδα προδιαθέτει για εμφάνιση δωδεκαδακτυλικού έλκους, ενώ σε χαμηλά επίπεδα προδιαθέτει ανάπτυξη γαστρικού έλκους και καρκίνου. Προσαρμογή από (Gerrits,2006).

Βέβαια, εκτός των προαναφερθεισών ασθενειών, ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι μελέτες που αφορούν εξωγαστρικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από Ελικοβακτήριο, παθολογικές δηλαδή καταστάσεις εκτός στομάχου, που αφορούν την εμφάνιση καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, αιματολογικών διαταραχών και μεταβολικών συνδρόμων που σχετίζονται με τη διαταραχή του ισοζυγίου γλυκόζης (Franceschi,2015).

1.2 Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού με βάση την πλατφόρμα ταξινόμησης του NCBI (National Center for Biotechnology Information) των ΗΠΑ, εικονίζεται στον **Πίνακα Α - 1**.

1. Συγκεκριμένα, το γένος *Helicobacter* στο οποίο ανήκει ο μικροοργανισμός περιλαμβάνει

Πίνακας Α - 1: Ταξινόμηση του *H. pylori*.

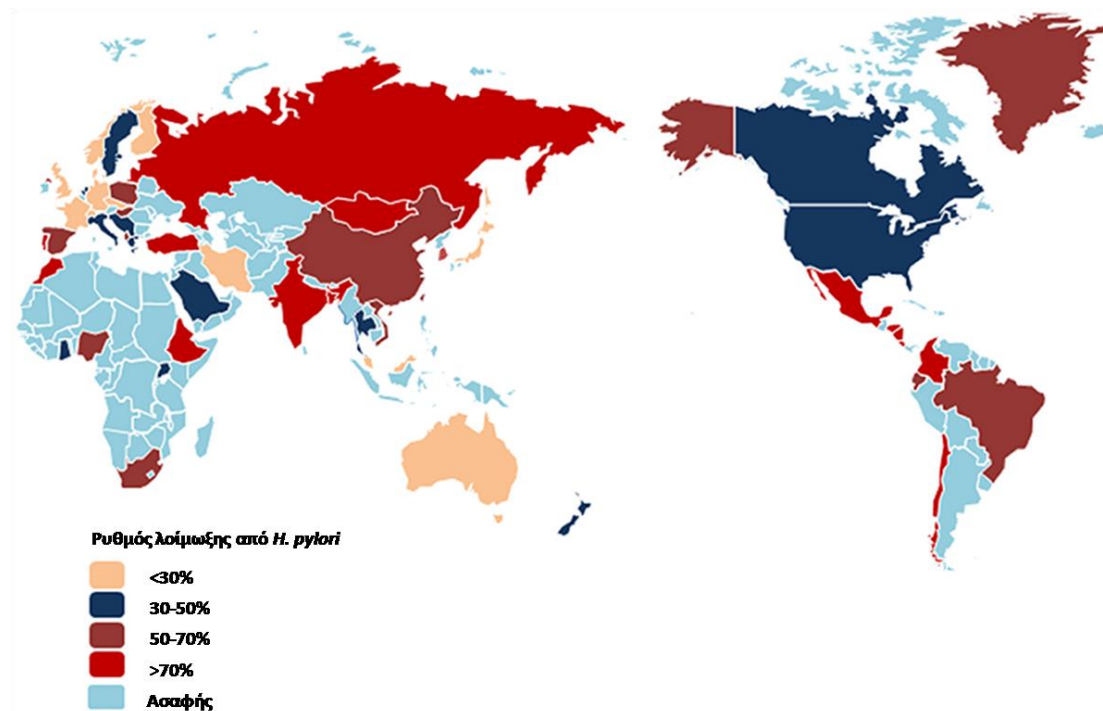
Υπερβασίλειο	Bacteria
Φύλο	Proteobacteria
Υπόφυλο	Epsilonproteobacteria
Κλάση	delta/epsilonsybdvisions
Τάξη	Campylobacterales
Οικογένεια	Helicobacteraceae
Γένος	Helicobacter

περισσότερα από 50 είδη και υπάγεται στην οικογένεια *Helicobacteraceae*, μαζί με τα γένη *Flexispira*, *Sulfuricurvum*, *Sulfirimonas*, *Thiovulum*, *Wolinella* και ορισμένα αταξινομήτα (unclassified) γένη. Όσον αφορά στην προέλευση των *H. pylori* στελεχών που μολύνουν τον άνθρωπο, γενωμικές και πρωτεωμικές μελέτες σε

εκατοντάδες στελέχη τα τελευταία χρόνια, φανερώνουν ήδη υπάρχουσα συνεξέλιξη του *H. pylori* με το είδος *Homo sapiens* από την εποχή της «εξόδου» του ανθρώπου από την Αφρική πριν από 50.000 με 70.000 χρόνια (Leja,2016, Kodaman,2014). Το γεγονός για συνύπαρξη στελεχών του *H. pylori* και συνέλιξης τους με το ανθρώπινο είδος πριν από την περίοδο των μεταναστεύσεων, αντανακλάται στην ικανότητα αποτύπωσης των φυλετικών μετακινήσεων του *Homo sapiens* ανά τους αιώνες, μελετώντας την πολυμορφία των στελεχών *H. pylori* ανά γεωγραφική περιοχή (Dominguez-Bello and Blaser,2011, Linz,2007).

1.3 Επιδημιολογία

Το *H. pylori* αποικίζει ειδικά το στομάχο στον άνθρωπο και προκαλεί την πιο διαδεδομένη λοίμωξη σε παγκόσμιο επίπεδο, καθόσον αυτή εντοπίζεται μεσοσταθμικά στο 50% του παγκόσμιου πληθυσμού, με το ποσοστό αυτό να εκτοξεύεται στο 80% στους πληθυσμούς αναπτυσσόμενων, μη βιομηχανοποιημένων χωρών (Kotilea,2019). Καθώς αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης χρόνιας γαστρίτιδας και βασικό αιτιολογικό παράγοντα εκδήλωσης πεπτικού έλκους και του γαστρικού καρκίνου και δεδομένης της κατάταξης του στην κατηγορία των καρκινογόνων τάξης Ι, από το Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας το 1994 (Ahn and Lee,2015), γίνεται αντιληπτό γιατί η λοίμωξη από *H. pylori* αποτελεί σημαντικό ζήτημα δημόσιας υγείας.



Εικόνα Α - 3: Οι τεράστιες διαφορές που υπάρχουν στον επιπολασμό της *H. pylori* λοίμωξης παγκοσμίως οφείλονται στις διακυμάνσεις των συνθηκών υγιεινής και του κοινωνικοοικονομικού υποβάθρου των διαφόρων χωρών και περιοχών. Φαίνεται ότι βελτίωση των συνθηκών αυτών, επέφερε μείωση στο ποσοστό λοίμωξης σε χώρες όπως η Ιαπωνία κι η Κορέα, ωστόσο υψηλός παραμένει ο επιπολασμός στη Ρωσία, τη νότια Αφρική και τη νοτιοανατολική Ασία. Προσαρμογή από (Hu,2017).

Σύμφωνα με τη μελέτη των Hooi, Lai *et al.*2017, η οποία περιλάμβανε 62 χώρες, υπολογίζεται ότι το έτος 2015, 4,4 δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως (60,3% του παγκόσμιου πληθυσμού) είχαν *H. pylori* λοίμωξη με την κατανομή αυτών να χαρακτηρίζεται από ανομοιομορφία και ποικιλότητα στις διαφορετικές περιοχές/χώρες (**Εικόνα Α – 3**). Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός της λοίμωξης και κατά συνέπεια των άμεσα σχετιζόμενων με αυτήν ασθενειών (πεπτικό έλκος και γαστρικός καρκίνος) βαίνει μειούμενος στις χώρες του λεγόμενου Δυτικού κόσμου, συμπεριλαμβανομένων της Βόρειας Αμερικής (37,1%) και της Αυστραλίας (24,4%), ενώ αντίθετα φαίνεται να έχει σταθεροποιηθεί σε σημαντικά υψηλά επίπεδα στις αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής (79,1%), της Λατινικής Αμερικής και Καραϊβικής (63,4%) και της Ασίας (54,7%) (Kotilea,2019). Οι διαφορές μεταξύ των χωρών αντικατοπτρίζουν σε μεγάλο βαθμό τις διαφορετικές συνθήκες διαβίωσης των ατόμων στις περιοχές αυτές, τη δυνατότητα πρόσβασης σε καθαρό πόσιμο νερό, τις συνθήκες υγιεινής και την κοινωνικο-οικονομική τους κατάσταση (Hooi,2017, Kotilea,2019).

Στην Ευρώπη ειδικά, σημαντικές διαφορές καταγράφονται και μεταξύ χωρών, των οποίων οι κάτοικοι διαβιούν σε παρόμοιες συνθήκες. Αναφέρεται χαρακτηριστικά, το παράδειγμα της Ισπανίας και της Πορτογαλίας, στις οποίες καταγράφεται υψηλός επιπολασμός της λοίμωξης, παρά τη βελτίωση του βιοτικού επιπέδου και της οικονομικής κατάστασης των πολιτών συνολικά τις τελευταίες δεκαετίες (Kotilea,2019). Επιπλέον, σε περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου το ποσοστό εμφάνισης της νόσου εμφανίζεται ιδιαίτερα αυξημένο (της τάξης του 80%), σε αντίθεση με το ποσοστό που καταγράφεται στο γενικό Ευρωπαϊκό πληθυσμό και το οποίο κυμαίνεται από 20% μέχρι 40% (O'Connor and O'Morain,2013, Zamani,2018).

1.4 Μετάδοση

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η λοίμωξη από *H. pylori* είναι από τις πιο διαδεδομένες παγκοσμίως και αποκτάται κατά την παιδική ηλικία και συγκεκριμένα συνήθως πριν τη συμπλήρωση του 5^{ου} έτους, ωστόσο δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστοί και χαρτογραφημένοι οι τρόποι μετάδοσης του παθογόνου στον πληθυσμό. Πιθανότερη θεωρείται η μετάδοση μέσω της κοπρανο-στοματικής, γαστρο-στοματικής και στοματο-στοματικής οδού, ειδικά μεταξύ ατόμων του στενού οικογενειακού περιβάλλοντος (intrafamilial transmission) (Burucosa and Axon,2017), γεγονός που αποδεικνύεται από μελέτη που αφορά παιδιά μικρότερα των 15 ετών και στην οποία διαπιστώνεται ότι ο γονότυπος των *H. pylori* στελεχών των παιδιών ήταν κατά κανόνα, ίδιος με αυτόν της μητέρας τους και σε λιγότερες περιπτώσεις του πατέρα τους (Mamishi,2016). Το *H. pylori* έχει ανιχνευτεί στην οδοντική πλάκα, το σάλιο, τη γλώσσα, τη βλέννα της στοματικής κοιλότητας και τα ρινικά κανάλια με εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ωστόσο σε κάθε περίπτωση, για την πέραν πάσης αμφιβολίας ταυτοποίησή του, είναι απαραίτητη η απομόνωση με καλλιέργεια. Η αναγκαιότητα αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι, το DNA του μικροοργανισμού μπορεί να ανιχνευτεί στη στοματική κοιλότητα σε περιπτώσεις όπως αυτή της παλινδρόμησης της τροφής και επομένως λανθασμένα να θεωρηθεί ότι η κοιλότητα αποικίζεται από βακτήρια *H.pylori*. Επιπλέον, μέσω της απομόνωσης με καλλιέργεια αντιμετωπίζεται και η ενδεχόμενη εσφαλμένη ταξινόμηση άλλων μικροοργανισμών που παράγουν το ένζυμο ουρεάση, στο είδος *H.pylori* (Burucosa and Axon,2017).

Ένα ζήτημα που βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη είναι η μετάδοση του παθογόνου μέσω της επαφής με μολυσμένο νερό, δεδομένου ότι ιδίως σε αναπτυσσόμενες χώρες, σε κοινωνίες

στις οποίες οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι καλές και μέρος του πληθυσμού δεν έχει εύκολη πρόσβαση σε καθαρό, πόσιμο νερό, παρατηρείται αύξηση κρουσμάτων γαστρεντερικών διαταραχών, ορισμένες εκ των οποίων συνδέονται άμεσα με την ύπαρξη *H. pylori* λοίμωξης. Η υπόθεση της μετάδοσης μέσω μολυσμένου ύδατος υποστηρίζεται και από τη δυνατότητα του Ελικοβακτηρίου να προσκολλάται σε υλικά διαφορετικής φύσης και να σχηματίζει ένα είδος συσσωματώματος (co-aggregate) με άλλα βακτήρια, διαμορφώνοντας πολύπλοκες δομές σε επαφή με επιφάνειες, όπως αντλίες νερού και σωληνώσεις (Aziz,2015). Εξετάζεται, επίσης, και ο ρόλος του μολυσμένου φαγητού στη μετάδοση του *H.pylori*, με μελέτες να κάνουν αναφορά στην απομόνωση του μικροοργανισμού από δείγματα γάλακτος μετά την παραλαβή του από το ζώο, αλλά και από γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως τυρί, βούτυρο και παγωτό για την παρασκευή των οποίων χρησιμοποιήθηκε απαστερίωτο γάλα (Zamani,2017). Έχουν αναφερθεί, επίσης, περιπτώσεις ανίχνευσης του μικροοργανισμού με μοριακές μεθόδους (PCR) και με καλλιέργεια, σε λαχανικά, όμως θεωρείται ότι σε αυτήν την περίπτωση, η μόλυνση από βακτήρια του είδους προήλθε από χρήση μολυσμένου νερού κατά την καλλιέργεια ή το πλύσιμο των λαχανικών (Zamani,2017).

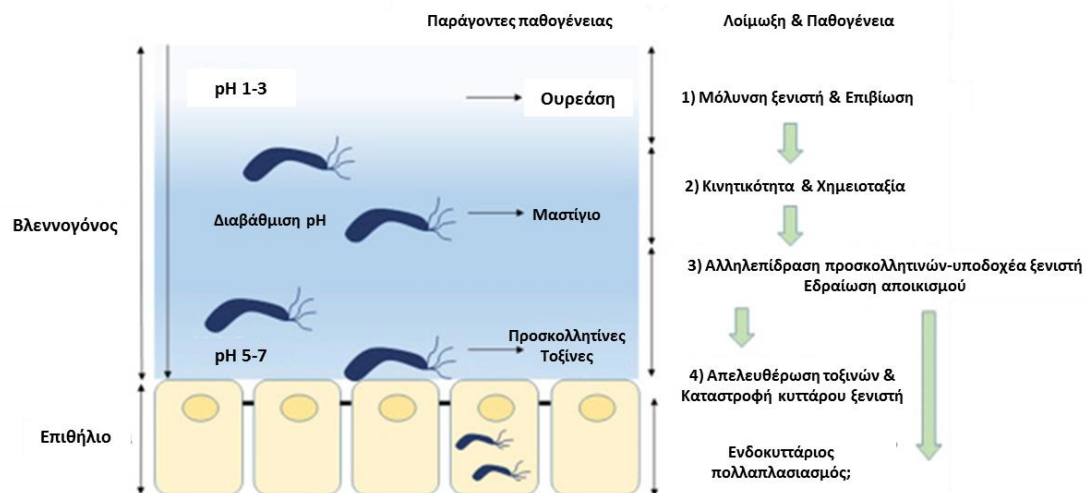
Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι μετάδοση *H. pylori* μπορεί να συμβεί ιατρογενώς, μέσω της γαστρο-στοματικής οδού, από τη χρήση των μολυσμένων οργάνων γαστροσκόπησης και μάλιστα για τους επαγγελματίες υγείας και το προσωπικό που εργάζεται σε ενδοσκοπικές μονάδες. Έτσι, η μη αποτελεσματική αποστείρωση των γαστροσκόπιων φαίνεται να αποτελεί πραγματικό παράγοντα κινδύνου για τη μετάδοση του *H. pylori* (Burucosa and Axon,2017, Kheyre,2018).

2. Παθοφυσιολογία της Λοίμωξης *H. pylori*

2.1 Βιολογία της λοίμωξης

Κατά την εγκατάσταση του Ελικοβακτηρίου στο στόμαχο του ξενιστή, ο μικροοργανισμός χρησιμοποιεί το ένζυμο ουρεάση, για να μειώσει την οξύτητα στο «εχθρικό» περιβάλλον του σε τιμές pH πλησίον του ουδέτερου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τα μαστίγια που βρίσκονται στον ένα βακτηριακό πόλο, μετακινείται διατρυπώντας τα στρώματα βλέννης με κατεύθυνση προς τα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή και επιτυγχάνει έτσι να αποικίσει την περιοχή και να εδραιώσει τη λοίμωξη, μέσω αλληλεπιδράσεων των βακτηριακών προσκολλητινών (SabA, BabA κ.λπ.) με τους υποδοχείς του κυττάρου – ξενιστή (Εικόνα Α –

4). Τα βακτηριακά κύτταρα απελευθερώνουν δραστικά μόρια, πρωτεΐνες – τοξίνες, όπως κατά κύριο λόγο τις CagA (cytotoxin-associated gene A) και VacA (vacuolating cytotoxin A), με στόχο την πρόκληση ιστικής βλάβης και ενεργοποίησης ανοσολογικής ανοχής. Παράλληλα από τα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου, ξεκινούν οι διαδικασίες ενεργοποίησης φλεγμονής με την έκκριση χημειοκινών για την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης και της χημειοταξίας των ουδετερόφιλων, με αποτέλεσμα κλινικές εκδηλώσεις, όπως η ανάπτυξη χρόνιας ενεργού γαστρίτιδας και πιθανώς γαστρο-δωδεκαδακτυλικού έλκους (Καο,2016).



Εικόνα Α - 4: Με τη δραστικότητα της ουρεάσης και τη διαμεσολαβούμενη από μαστίγια κατευθυνόμενη κίνηση, το *H. pylori* μεταβαίνει προς τα κατώτερα στρώματα της βλέννας, πάνω από τα επιθηλιακά κύτταρα και αποικίζει την περιοχή με τη βοήθεια παραγόντων όπως οι προσκολλητίνες (συμπεριλαμβανομένης της συνδεόμενης με αντιγόνα αίματος πρωτεΐνης A), η πρωτεΐνη που δεσμεύει σιαλικό οξύ και άλλες εξωμεμβρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς των επιθηλιακών κυττάρων του ξενιστή. Μετά τον επιτυχή αποικισμό, η απελευθέρωση παραγόντων παθογένειας, όπως οι τοξίνες CagA και VacA εμπλέκονται στην καταστροφή των ιστών του ξενιστή και στον ενδοκυττάρια πολλαπλασιασμό. Προσαρμογή από (Καο,2016)

2.2 Παράγοντες που σχετίζονται με την *H. pylori* λοίμωξη

Παράγοντες παθογένειας

Πρόκειται για μόρια που συμβάλλουν στο μηχανισμό παθογένειας και συγκεκριμένα στη φάση προσκόλλησης του βακτηρίου στο κύτταρο-ξενιστή και στην πρόκληση ιστικών βλαβών και η δράση των οποίων φαίνεται να σχετίζεται με διαφορετική απόκριση των ατόμων στη λοίμωξη. Αναφέρεται μάλιστα, ότι ενώ στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, ορισμένοι εμφανίζουν βαρύτερες κλινικές εκδηλώσεις, όπως το γαστρικό έλκος, γαστρικό καρκίνο και το MALT λέμφωμα (Καο,2016, Chang,2018). Τα τελευταία χρόνια, γίνεται μια προσπάθεια μελέτης των παραγόντων αυτών, με μεθόδους γονιδιωματικής, πρωτεωμικής και με μελέτη του μεταγραφώματος στελεχών που

προέρχονται από ασθενείς με διαφορετικές γαστρικές διαταραχές, προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος των μορίων του ενδιαφέροντός μας στη διαμόρφωση του φαινομένου της παθογένειας (Kao,2016).

Οι μελέτες αυτές εστιάζουν ιδίως στην παρουσία, το βαθμό έκφρασης και τον τύπο της πρωτεΐνης CagA (Cytotoxin-associated gene A), τοξίνης υπεύθυνης για την πρόκληση ιστικής βλάβης. Στελέχη *H. pylori* CagA-θετικά έχουν σχετιστεί ευθέως με τη ανάπτυξη γαστρίτιδας, γαστρικού έλκους και καρκίνου και εντοπίζονται στο 60% και 90% των λοιμώξεων από το βακτήριο στις Δυτικές και Ασιατικές χώρες αντίστοιχα. Οι δύο διαφορετικοί CagA τύποι, Δυτικός και Ασιατικός διακρίνονται από την επανάληψη της αμινοξικής αλληλουχίας Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA μοτίβο) στο N-άκρο της. Το μόριο επιδρά με πολλούς τρόπους στο κύτταρο-ξενιστή, τροποποιώντας τη βασική πλευρά των επιθηλιακών κυττάρων, τον κυτταροσκελετό, ενώ επηρεάζει επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ενεργοποιεί την έκκριση ιντερλευκίνης-8 από τα κύτταρα του γαστρικού επιθηλίου (Sgouras,2019).

Στους κυρίαρχους παράγοντες παθογένειας συγκαταλέγεται και η πρωτεΐνη VacA, ένα ολιγομερές που απαρτίζεται από δύο δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains) p33 και p55 (Kao,2016). Το σύμπλεγμα ενσωματώνεται στη μεμβράνη του ξενιστή και λειτουργεί με χαρακτηριστικά διαύλου ιόντων, υποβοηθώντας τον αποικισμό του *H. pylori*, καθώς επιτρέπει την εκροή μεταβολικών υποστρωμάτων που μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Kao,2016). Επιπλέον, το ολιγομερές είναι δυνατόν να ενδοκυττωθεί και να επιτρέψει τη διείσδυση ανιόντων τα όψιμα ενδοσώματα και το σχηματισμό μεγάλων κυστιδίων με την εισροή νερού (Kao,2016). Η πρωτεΐνη VacA στοχεύει στα μιτοχόνδρια, προκαλώντας απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και απόπτωση, ενώ διαταράσσει και το ισοζύγιο πολλαπλασιασμού και θανάτου, επιδρώντας σε γονίδια του κυτταρικού κύκλου (Kao,2016). Τέλος, όπως και η CagA, επάγει έκκριση της IL-8 από το κύτταρο ξενιστή, με αποτέλεσμα την έναρξη φλεγμονώδους αντίδρασης (Kao,2016).

Εκτός των μορίων CagA και VacA, ένα σύνολο άλλων πρωτεϊνών, όπως η OipA, η BabA και η DupA, βρίσκεται στο επίκεντρο των μελετών που αφορούν στην παθογένεια. Η πρωτεΐνη OipA είναι προσκολλητίνη της εξωτερικής μεμβράνης, η δραστηριότητα της οποίας ρυθμίζεται από την επανάληψη του δινουκλεοτιδίου CT στο 5' άκρο του γονιδίου. Το μόριο

αυτό εμπλέκεται στην επαγωγή φλεγμονώδους απόκρισης, μέσω της ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου της ιντερλευκίνης IL-8 από τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου, με την πρόσδεση σε αυτόν μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι NFκBAP-1 κ.λπ., ενώ *in vitro* μελέτες αποκάλυψαν και το ρόλο της OipA στην αναδιαμόρφωση του σκελετού ακτίνης μέσω φωσφορυλίωσης μορίων σηματοδοτικών μονοπατιών (Yamaoka and Graham,2014). Η ένταση των φαινομένων παθογένειας μελετάται συναρτήσει του βαθμού έκφρασης των πρωτεϊνικών μορίων BabA και BabB, που ανήκουν στην ομάδα αντιγόνων του αίματος σύνδεσης της συγκολλητίνης και δεσμεύονται με τα ABO/Lewis^b αντιγόνα αίματος (Backert,2016). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η μεσολαβούμενη από BabA δέσμευση είναι δυνατόν να αντιστραφεί με αύξηση της τιμής pH(Camilo,2017). Τέλος, ερευνάται η δράση της πρωτεΐνης DupA, κωδικοποιούμενης από το γονίδιο που προάγει το δωδεκαδακτυλικό έλκος (duodenal ulcer promoting gene A), η οποία έχει σχετιστεί με αυξημένα επίπεδα IL-8 στο άντρο και την επαγωγή παραγωγής IL12 από τα μονοκύτταρα (Yamaoka and Graham,2014). Σε ασθενείς με στελέχη *H. pylori* DupA θετικά, είναι αυξημένος ο κίνδυνος ανάπτυξης δωδεκαδακτυλικού έλκους, μειωμένη όμως η πιθανότητα εμφάνισης γαστρικού καρκίνου (Yamaoka and Graham,2014).

Γενετική προδιάθεση

Πέραν του ρόλου των παραγόντων παθογένειας του *H. pylori* και των εξωγενών παραγόντων όπως οι συνθήκες διαβίωσης, ένα σύνολο ενδογενών χαρακτηριστικών των ατόμων, φαίνεται να επιδρά στις διαδικασίες απόκτησης και εδραίωσης της λοίμωξης κατά την παιδική ηλικία. Συγκεκριμένα, ως απόκριση στη χρόνια λοίμωξη από *H. pylori*, μετά την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας, παράγονται κυτταροκίνες στο βλεννογόνο του στομάχου και έχει διαπιστωθεί ότι γενετικοί πολυμορφισμοί στα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια αυτά, ενδέχεται να επηρεάσουν την έκφραση τους και το βαθμό ευαισθησίας των ατόμων στη λοίμωξη (Sugimoto,2010). Μάλιστα, φορείς πολυμορφισμών που σχετίζονται με αυξημένη έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου και έλκους, ενώ αντίθετα μειωμένα εμφανίζονται τα επίπεδα φλεγμονής στο βλεννογόνο του στομάχου, σε φορείς πολυμορφισμών σε γονίδια αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (Sugimoto,2010). Μάλιστα, και σε επίπεδο πληθυσμών, διαφορετικοί γενετικοί πολυμορφισμοί φαίνεται να συνδέονται με τις *H. pylori* σχετιζόμενες ασθένειες, με τους πληθυσμούς των λεγόμενων Δυτικών χωρών να φέρουν κυρίως πολυμορφισμούς στα γονίδια των ιντερλευκινών IL-4 (θέση 590), IL-6 (θέσεις 174G/C, 572G/C), IL-8 (θέση 251A/T), ενώ στους

Ασιατικούς πληθυσμούς, επικρατέστεροι φέρεται να είναι οι πολυμορφισμοί στα γονίδια *IL-1B*, *IL-10*, *TNF-A* (Mărginean,2017, Sugimoto,2010).Αναλυτικότερα, στους πολυμορφισμούς IL-1B-511 T και IL-1B-31C στο γονίδιο που κωδικοποιεί την IL-1 και στο γονίδιο IL-1RN που κωδικοποιεί τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1, οφείλονται τα αυξημένα επίπεδα ιντερλευκίνης IL-1β στο βλεννογόνο, με άμεση συνέπεια την παρεμπόδιση της έκκρισης γαστρικού οξέος και την επακόλουθη διευκόλυνση του αποικισμού του στόμαχου από το *H. pylori*, την εκδήλωση γαστρίτιδας και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης γαστρικού καρκίνου (Sugimoto,2010, El-Omar,2000). Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) TNF-α-238G/A, TNF-α-308G/A και IL-10-1082A/G έχουν, επίσης, σχετιστεί υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκίνου (Jia,2016).

Γνωρίζοντας ότι, συνέπεια της λοίμωξης από Ελικοβακτήριο του πυλωρού είναι η μειωμένη ικανότητα αποτελεσματικής επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA μέσω των μηχανισμών εκτομής βάσης (Base Excision Repair, BER) και επιδιόρθωσης λανθασμένα ζευγαρωμένων βάσεων (Mismatch Repair, MMR), είναι σημαντικό να διαπιστωθεί η ύπαρξη πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια που συμμετέχουν στους μηχανισμούς αυτούς και η πιθανή συσχέτιση αυτών με το γαστρικό καρκίνο (Jia,2016). Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί ο πολυμορφισμός που οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή V762A στο γονίδιο που κωδικοποιεί το μόριο PARP1 (adenosine diphosphate ribosyl transferase), κρίσιμο συστατικό του μηχανισμού BER (Jia,2016).

Τέλος, υπό έρευνα βρίσκεται και η συσχέτιση των μηχανισμών καρκινογένεσης, με την ύπαρξη πολυμορφισμών στα γονίδια που κωδικοποιούν τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), ένζυμα που καταλύουν τη μεθυλίωση του DNA σε κατάλοιπα κυτοσίνης, τα οποία εντοπίζονται συγκεντρωμένα στις CpG νησίδες πλησίον του 5' άκρου στη θέση έναρξης μεταγραφής των γονιδίων. Είναι γνωστό ότι, κατά την *H. pylori* λοίμωξη, ενισχύεται η μεθυλίωση του DNA, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων, φαινόμενο που, δυνητικά, συμβάλλει στην ύπαρξη αυξημένου κινδύνου εμφάνισης γαστρικού καρκίνου (Jia,2016).

Εξωγενείς παράγοντες

Όπως διαπιστώνεται κι από επιδημιολογικές μελέτες σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο, δημογραφικοί και κοινωνικο-οικονομικοί παράγοντες, όπως αυξημένο εισόδημα και

υψηλού επιπέδου εκπαίδευση, έχουν σχετιστεί με μείωση του επιπολασμού της γαστρίτιδας, της ανάπτυξης γαστρικής ατροφίας και της εμφάνισης εντερικής μεταπλασίας, διαταραχές που φέρουν ως κύριο αιτιολογικό παράγοντα την ύπαρξη του *H. pylori* (Sjomina,2018).Αυτό αποδεικνύεται κι από μελέτη που αφορά στην πόλη Shijiazhuang και στην αγροτική περιοχή Shexian County της Κίνας, οι οποίες χαρακτηρίζονται από άνηση οικονομική ανάπτυξη και οι μεταξύ τους διαφορές στον επιπολασμό γαστρικού καρκίνου σχετιζόμενου με *H.pylori* λοίμωξη είναι αντίστοιχες των διαφορών μεταξύ ανεπτυγμένων και αναπτυσσόμενων κρατών (Wen,2017). Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και ο διατροφικός παράγοντας, εφόσον μειωμένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, αυξημένη κατανάλωση λιπαρών τροφών, σε συνδυασμό με επιβλαβείς καθημερινές συνήθειες, όπως το κάπνισμα και η υπερκατανάλωση αλκοόλ ή ακόμη και η ελλιπής τήρηση υγιεινής χειρών και μειωμένη κατανάλωση νερού, συνδέονται με αυξημένη παρουσία της λοίμωξης στους ενήλικες (Sjomina,2018).

3. Διάγνωση

Μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στον τομέα της διάγνωσης της λοίμωξης από *H. pylori*, με τη βελτίωση των τεχνικών που αξιοποιούν το υλικό που προέρχεται από τις γαστρικές βιοψίες, αλλά και από περιφερειακά δείγματα, όπως ο εκπνεόμενος αέρας, το αίμα, τα κόπρανα κ.λπ.

Οι δοκιμασίες διάγνωσης διακρίνονται σε επεμβατικές και μη επεμβατικές. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται η καλλιέργεια του μικροοργανισμού και η ιστολογική εξέταση βιοψιών στομάχου μετά από χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση του παθογόνου και την αξιολόγηση της βαρύτητας της λοίμωξης, ενώ εξίσου χρησιμοποιούνται και οι χρώσεις Warthin-Starry, κατά Giemsa, πορτοκαλί της ακριδίνης και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις (Lopes,2014, Patel,2014). Άλλες δοκιμασίες που λαμβάνουν χώρα μετά την λήψη βιοπτικού υλικού από το στόμαχο κατά τη γαστροσκόπηση, είναι η ταχεία δοκιμασία ουρίας (Rapid Urea Test, RUT) και μοριακές μέθοδοι όπως η PCR (Tongtawee,2016). Σημειώνεται ότι, είναι σημαντικό να επιτευχθεί έγκαιρη ανίχνευση της λοίμωξης, σε πραγματικό χρόνο ακόμα και κατά την ενδοσκόπηση, προκειμένου να πραγματοποιηθεί άμεσα παρατήρηση τυχόν μορφολογικών ανωμαλιών και αλλοιώσεων στο βλεννογόνο συμβατών με την ύπαρξη ή όχι ενεργού λοίμωξης από *H. pylori*.

Οι μη επεμβατικές τεχνικές περιλαμβάνουν τη δοκιμασία αναπνοής ουρεάσης, την ανίχνευση αντισωμάτων, καθώς και των βακτηριακών αντιγόνων στα κόπρανα. Στη δοκιμασία αναπνοής ουρεάσης (Urea breath test - UBT), που εφαρμόζεται εκτεταμένα καθώς είναι χαμηλού κόστους και παρουσιάζει ικανοποιητικότερα αποτελέσματα σε σχέση με άλλες διαθέσιμες δοκιμασίες, χορηγείται στον ασθενή ουρία σεσημασμένη με ^{13}C ή ^{14}C (Tongtawee,2016, Bessède,2017). Η παρουσία *H. pylori* μέσω της δράσης του ενζύμου ουρεάση, διασπά την ουρία σε αμμωνία και σεσημασμένο διοξείδιο του άνθρακα ($^{13}\text{CO}_2$ ή $^{14}\text{CO}_2$), το οποίο συλλέγεται κατά την εκπνοή και μετριέται (Bessède,2017). Η ανίχνευση βακτηριακών αντιγόνων (Stool antigen test - SAT) αποτελεί διαγνωστική δοκιμασία που χρησιμοποιείται λόγω του χαμηλού κόστους της και των πλεονεκτημάτων που προσφέρει, καθώς δεν απαιτεί για την πραγματοποίησή της δαπανηρό εξοπλισμό και εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό, αλλά η συλλογή δείγματος είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί από τον ασθενή στο σπίτι (Lopes,2014). Η δοκιμασία για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι βακτηριακών αντιγόνων όπως η πρωτεΐνη CagA, οι heat-shock πρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), η καταλάση κ.λπ. χρησιμοποιείται κατά τη διάγνωση, απαιτεί όμως την πραγματοποίηση συμπληρωματικών τεχνικών, όπως οι ιστολογικές εξετάσεις και η καλλιέργεια για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος (Lopes,2014). Αυτό διότι, κατά τη χρόνια *H. pylori* λοίμωξη, κυρίαρχη είναι η παρουσία IgG ανοσοσφαιρινών και σπάνια ανιχνεύονται οι IgM ανοσοσφαιρίνες, που υποδηλώνουν ύπαρξη οξείας φάσης της λοίμωξης (Patel,2014).

4. Θεραπεία εκρίζωσης

4.1 Βασικά θεραπευτικά σχήματα

Η λοίμωξη από *H. pylori* έχει συσχετιστεί ευθέως με την ανάπτυξη παθήσεων του γαστρεντερικού συστήματος, όπως η λειτουργική δυσπεψία, η ατροφική γαστρίτιδα, το γαστρικό αδενοκαρκίνωμα κ.ά., επομένως κρίνεται ζωτικής σημασίας η χορήγηση θεραπευτικών σχημάτων στους ασθενείς με σκοπό την εκρίζωση του παθογόνου και την επακόλουθη αναστροφή ή τον περιορισμό της βλάβης όπου είναι εφικτό. Οι αποφάσεις – προτάσεις που αφορούν στη βελτιστοποίηση των δοκιμασιών διάγνωσης, της θεραπευτικής προσέγγισης, της πρόληψης με γνώμονα την προστασία της δημόσιας υγείας, λαμβάνονται από το Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Συμφωνίας, η τελευταία συνεδρίαση του οποίου έγινε στη Φλωρεντία το 2015. (Malfertheiner,2017). Ένα από τα κυριότερα σημεία

που επισημαίνονται στο Maastricht V/Florence Consensus Conference, είναι η απόφαση για χορήγηση θεραπείας εκρίζωσης ακόμα και σε ασυμπτωματικούς ασθενείς (Malfertheiner,2017).

Ως θεραπευτικό σχήμα πρώτης γραμμής έχει οριστεί ήδη από το 1990 η τριπλή θεραπεία (Standard triple therapy (STT)), που περιλαμβάνει χρήση αναστολέα της αντλίας πρωτονίων (proton pump inhibitor (PPI)) και δύο αντιβιοτικών, αμοξυκιλλίνης και κλαριθρομυκίνης ή μετρονιδαζόλης/τινιδαζόλης, ωστόσο ενδείξεις των τελευταίων χρόνων καταδεικνύουν τη διαρκώς μειούμενη αποτελεσματικότητα του σχήματος, κυρίως λόγω της μη συμμόρφωσης των ασθενών στη θεραπεία και της αύξησης αντοχής της κλαριθρομυκίνης σε τοπικό επίπεδο (Yeo,2018, Zagari,2018, Kalach,2017). Σύμφωνα πάντως με τις διεθνείς οδηγίες, αξίζει να εφαρμόζονται σχήματα που έχουν ως κύριο αντιβιοτικό την κλαριθρομυκίνη, με επέκταση όμως της χορήγησης για διάστημα 14 και όχι 7 ημερών (Zagari,2018).

Εναλλακτικές θεραπείες που έχουν προταθεί είναι:

- η τετραπλή θεραπεία με χορήγηση αλάτων βισμούθιου (bismuth-containing quadruple therapy - BQT), PPI, τετρακυκλίνης και μετρονιδαζόλης για 10 ημέρες σύμφωνα με τις οδηγίες σε Ευρώπη και Βόρεια Αμερική ή 14 ημέρες σύμφωνα με τις Καναδικές οδηγίες, σε περιοχές με επιπολασμό αντοχής στην κλαριθρομυκίνη >15% (Zagari,2018). Η θεραπεία αυτή, που είναι εξαιρετικά αποτελεσματική σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει πρωτύτερα αγωγή, αρχικά προτεινόταν ως δεύτερης γραμμής (Fallone,2016, Malfertheiner,2012), ήρθε όμως στο προσκήνιο, μετά την παρατήρηση για αύξηση των κλινικών στελεχών με αντοχή στην κλαριθρομυκίνη και τη λεβοφλοξασίνη, δεδομένου ότι δεν περιλαμβάνει τη χορήγηση κανενός από τα δύο αντιβιοτικά. Σύμφωνα μάλιστα με πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη, το σχήμα αυτό παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά εκρίζωσης (90,4%) σε σχέση με τη χορήγηση τριπλής θεραπείας για 14 ημέρες (83,7%) και την τετραπλή θεραπεία χωρίς χρήση βισμούθιου (85,9%) (Zagari,2018, Liou,2016).
- η τετραπλή θεραπεία, χωρίς χρήση βισμούθιου, περιλαμβάνει χορήγηση PPI και τριών αντιβιοτικών, αμοξυκιλλίνης, κλαριθρομυκίνης και μετρονιδαζόλης ή τινιδαζόλης. Διακρίνουμε δύο τύπους του θεραπευτικού αυτού σχήματος, τη

- **διαδοχική θεραπεία** (sequential therapy, ST), κατά την οποία η αμοξυκιλλίνη που χορηγείται τις 5 πρώτες ημέρες, αντικαθίσταται στη συνέχεια με κλαριθρομυκίνη και μετρονιδαζόλη ή τινιδαζόλη για τις 5 επόμενες ημέρες και τη **σύγχρονη θεραπεία** (concomitant therapy, CT), κατά την οποία τα τρία αντιβιοτικά χορηγούνται ταυτόχρονα, γεγονός που εξασφαλίζει και μεγαλύτερη πιθανότητα συμμόρφωσης του ασθενούς στη θεραπεία (Zagari,2018). Δυστυχώς, στη διαδοχική, όπως και στην τριπλή θεραπεία, το αποτέλεσμα επηρεάζεται αρνητικά από την ύπαρξη στελεχών με αντοχή στην κλαριθρομυκίνη (>15%) ή στη μετρονιδαζόλη (>30%), κάτι που δε φαίνεται να συμβαίνει στην περίπτωση της σύγχρονης θεραπείας. Μάλιστα, μόνο στην τελευταία, σημειώθηκε ποσοστό εκρίζωσης αρκετά υψηλό (>90%), ώστε να θεωρηθεί κατάλληλη ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε περιοχές με υψηλό επίπεδο αντοχής (Zagari,2018, Georgopoulos,2016). Δεν ισχύει το ίδιο, βέβαια, για τους ασθενείς που φέρουν στελέχη ανθεκτικά στα δύο αντιβιοτικά, κλαριθρομυκίνη και μετρονιδαζόλη, με τις περιπτώσεις αυτές να εμφανίζουν ένα ποσοστό εκρίζωσης της τάξης του 75% (Zagari,2018).
- **υβριδική θεραπεία** (hybrid therapy, HY): κατά την οποία χορηγείται αρχικά στον ασθενή PPI και αμοξυκιλλίνη για 7 ημέρες και εν συνεχεία στην αγωγή προστίθενται κλαριθρομυκίνη και μετρονιδαζόλη, χωρίς να διακοπεί η χορήγηση των προηγούμενων φαρμακευτικών παραγόντων (De Francesco,2014). Η αποτελεσματικότητα της υβριδικής θεραπείας παρουσιάζεται μειωμένη, σε ασθενείς με στελέχη *H. pylori*, διπλά ανθεκτικά (σε ποσοστά >5%, >9%, >15%) σε κλαριθρομυκίνη και μετρονιδαζόλη, ωστόσο στην Ελλάδα, όπου ο επιπολασμός της είναι >5%, αλλά <9%, η υβριδική θεωρείται αποτελεσματική ως πρώτη γραμμή. Βέβαια, για την Ελλάδα, καταλληλότερη κρίνεται η χορήγηση σύγχρονης θεραπείας καθώς έχει μικρότερη διάρκεια (σύγχρονη: 10 ημέρες έναντι υβριδικής: 14 ημέρες) και μειωμένη πολυπλοκότητα, οπότε και εξασφαλίζεται η συμμόρφωση των ασθενών σε αυτήν (Georgopoulos,2018).

Σύμφωνα με μεταανάλυση των Yeo, Shiu et al. 2018, η εφαρμογή θεραπευτικών σχημάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα υπήρξε αποτελεσματικότερη των σύντομων θεραπειών, σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει ποτέ θεραπεία εκρίζωσης του *H. pylori*, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη χορήγηση τριπλής θεραπείας με κλαριθρομυκίνη για 10 ή 14 και όχι

7ημέρες. Επιπλέον, μεγαλύτερο ήταν το ποσοστό επιτυχίας των εναλλακτικών θεραπειών που αναφέρθηκαν έναντι των περισσότερων τριπλών θεραπειών. Συγκεκριμένα, στην αποτελεσματικότητα της ταυτόχρονης (concomitant) θεραπείας συμβάλλει η ταυτόχρονη χορήγηση και των 4 φαρμακευτικών παραγόντων, προς διευκόλυνση της συμμόρφωσης του ασθενούς, εν αντιθέσει με τη διαδοχική και την υβριδική θεραπεία, κατά τις οποίες το σχήμα αλλάζει με την πάροδο των ημερών (Yeο,2018).

Στις θεραπείες δεύτερης γραμμής κατατάσσονται η τετραπλή θεραπεία με χρήση βισμούθιου (αν και όπως αναφέρθηκε ήδη, αυτό τείνει να αλλάξει) και το θεραπευτικό σχήμα που βασίζεται στη χορήγηση κινολονών, όπως προτάθηκε από τις οδηγίες του IV Ευρωπαϊκού Πλαισίου Συμφωνίας (Maastricht Guidelines IV) και της συμφωνίας του Toronto (Toronto Consensus) (Fallone,2016, Malfertheiner,2012). Συγκεκριμένα, εφαρμόζεται η τριπλή θεραπεία βασισμένη στη λεβοφλοξασίνη, με τη συγχορήγηση αμοξυκιλλίνης και PPI, κυρίως μετά την αποτυχία θεραπείας με βισμούθιο. Αποτυχία και αυτού του σχήματος, θα υποχρεώσει το θεράποντα ιατρό σε σχεδιασμό θεραπείας τρίτης γραμμής, μετά από εφαρμογή δοκιμασίας ευαισθησίας σε αντιβιοτικά, σε καλλιέργεια του στελέχους *H. pylori* ή χρήση μοριακών τεχνικών και μεθόδων ανάγνωσης αλληλουχίας με σκοπό τη διερεύνηση των αιτιών ανάπτυξης αντοχής. Πρόκειται για σχήματα τετραπλής θεραπείας βασισμένης σε χορήγηση βισμούθιου και λεβοφλοξασίνης ή τριπλής θεραπείας με PPI, αμοξυκιλλίνης και ριφαμυκίνης (Malfertheiner,2017, Fallone,2016, Malfertheiner,2012).

Παράλληλα με όσα αναφέρθηκαν, οι διεθνείς οδηγίες σε ένα γενικό πλαίσιο τονίζουν τη σημασία χορήγησης PPI, αποτέλεσμα της δράσης των οποίων είναι η ουδετεροποίηση του pH του στομάχου με επακόλουθη μείωση και του βακτηριακού φορτίου, αλλά και της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) των αντιβιοτικών που απαιτούνται, ενισχύοντας έτσι τη δράση τους. Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα χορήγησης αναστολέων αντλίας πρωτονίων σε άτομα που μεταβολίζουν αποτελεσματικά τους PPIs (Zagari,2018).

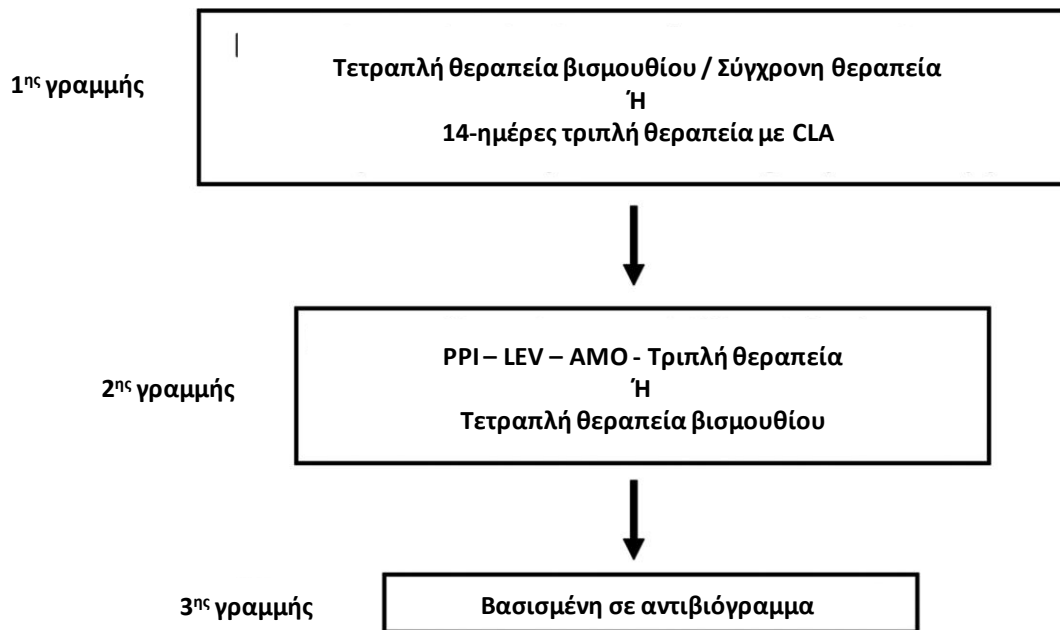
Όσον αφορά στις κατευθυντήριες οδηγίες για την εκρίζωση του *H. pylori* που χορηγούνται στην Ελλάδα, αυτές εκδόθηκαν το 2015, από τον Εθνικό Οργανισμό Παροχής Υπηρεσιών Υγείας (ΕΟΠΥΥ), με τη συμβολή της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης του Ελικοβακτηριδίου του

Πυλωρού (ΕΕΜΕΠ). Λαμβάνοντας υπ' όψιν το υψηλό ποσοστό αντοχής του Ελικοβακτηρίου στην κλαριθρομυκίνη (>25%) προτείνονται ως θεραπευτικά σχήματα πρώτης γραμμής:

- η **διαδοχική** θεραπεία: Αναστολές αντλίας πρωτονίων (ΑΑΠ) x2 + αμοξυκιλλίνη 1 g x2 για 5-7 ημέρες και στη συνέχεια ΑΑΠ x2 + κλαριθρομυκίνη 500 mg x2 + μετρονιδαζόλη 500 mg x2 για άλλες 5-7 ημέρες.
- Η **ταυτόχρονη** θεραπεία: ΑΑΠ x2+ αμοξυκιλλίνη 1g x2 για 7 ημέρες + κλαριθρομυκίνη 500 mg x2 + μετρονιδαζόλη 500 mg x2 για 10-14 ημέρες.
- Η **υβριδική** θεραπεία: ΑΑΠ x2+ αμοξυκιλλίνη 1 g x2 για 7 ημέρες. Στη συνέχεια, ΑΑΠ x2+ αμοξυκιλλίνη 1g x2 + κλαριθρομυκίνη 500 mg x2 + μετρονιδαζόλη 500 mg x2 για άλλες 5-7 ημέρες.

Σε περίπτωση αποτυχίας, χορηγείται αγωγή δεύτερης γραμμής: ΑΑΠ x2+ αμοξυκιλλίνη 1 g x2 + λεβοφλοξασίνη 500 mg x2 για 10 ημέρες. Λήψη καλλιέργειας συνιστάται σε ενδεχόμενη αποτυχία και αυτού του σχήματος.

Δυστυχώς, παρά την πληθώρα επιλογών σε θεραπευτικά σχήματα, οι παρενέργειες από το συνδυασμό μεγάλου αριθμού φαρμάκων, η ολοένα και μεγαλύτερη επικράτηση ανθεκτικών στελεχών στον πληθυσμό και η συνεχιζόμενη κατάχρηση αντιβιοτικών για τη θεραπεία άλλων βακτηριακών λοιμώξεων, εμποδίζουν την εκρίζωση του παθογόνου σε επίπεδο πληθυσμού. Ειδικά όταν η λοίμωξη αφορά άτομα στην παιδική ηλικία, κατά την οποία συμβαίνει η μόλυνση, καλό θα είναι, τόσο η απόφαση για την επιλογή θεραπευτικού σχήματος όσο και για τη διάρκεια χορήγησης, να λαμβάνεται βάσει των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά, ιδίως στην κλαριθρομυκίνη σε τοπικό επίπεδο, το κόστος της αγωγής και τη συμμόρφωση του ασθενούς στη θεραπεία (Kalach,2017).



Εικόνα Α - 5: Αλγόριθμος για την εκρίζωση του *H. pylori*. Οι θεραπείες 1^{ης} γραμμής χορηγούνται όταν η ανοχή στην κλαριθρομυκίνη είναι μικρότερη από 15% είτε δεν έχει προηγηθεί χορήγηση μακρολιδών. Σε αντίθετη περίπτωση, χορηγείται θεραπευτικό σχήμα 2^{ης} γραμμής με βάση τη λεβοφλοξασίνη, ενώ σε περίπτωση αποτυχίας, δημιουργείται νέο σχήμα βασισμένο στο αντιβιογράμμα που προκύπτει από τη δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Αν αυτό δεν είναι διαθέσιμο, τότε η νέα θεραπεία περιλαμβάνει συνδυασμούς αντιβιοτικών που δεν έχουν χορηγηθεί στις θεραπείες 1^{ης} και 2^{ης} γραμμής. Προσαρμογή από (Zagari,2018).

4.2 Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών στα βακτήρια

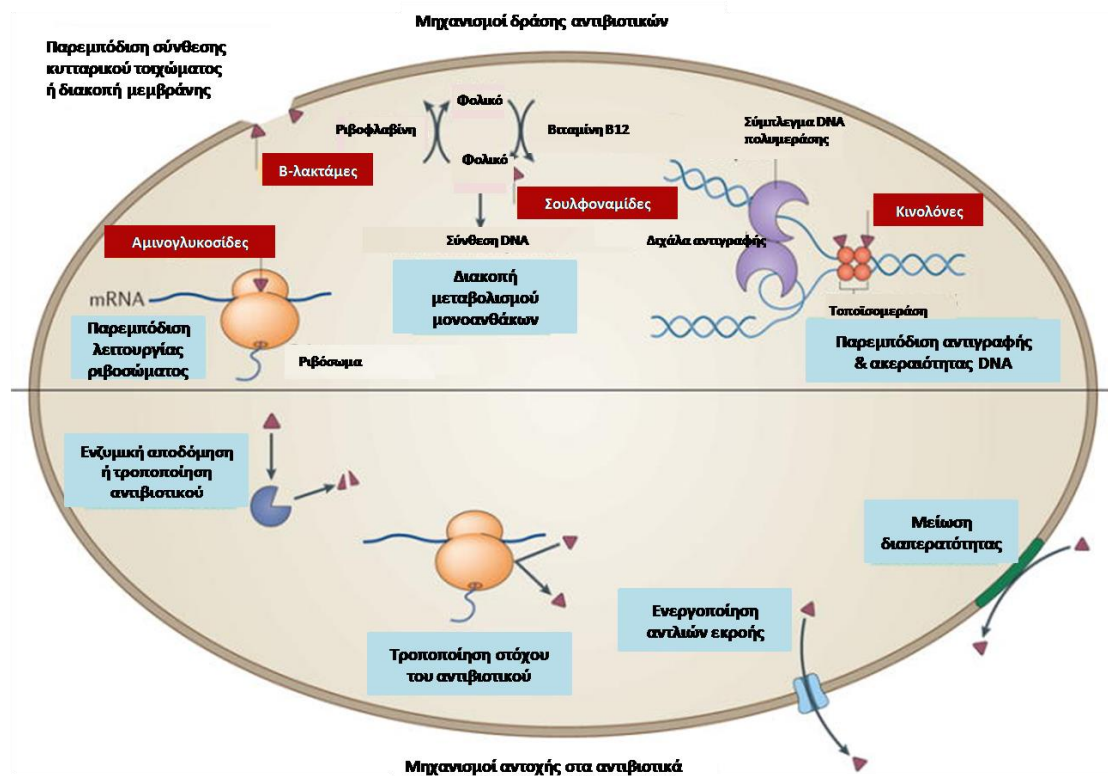
Τα αντιβιοτικά ορίστηκαν από τον S.A.Waksman το 1947 ως χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την ανάπτυξη και να καταστρέφουν βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς (Mohr,2016, Waksman,1947). Σήμερα, αντιβιοτικό βάσει του ορισμού των Bennett και Bentley χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ουσία έχει antimicrobial δράση ανεξάρτητα από το αν έχει παραχθεί με φυσικό, συνθετικό ή ημισυνθετικό τρόπο (Mohr,2016, Bentley and Bennett,2003).

Παρεμπόδιση σύνθεσης βακτηριακού τοιχώματος

Η πενικιλίνη ανήκει στην κατηγορία των β-λακταμών, η οποία περιλαμβάνει επίσης τις κεφαλοσπορίνες, τις καρβαπενέμες και τις μονοβακτάμες, αντιβιοτικά που φέρουν το χαρακτηριστικό δακτύλιο β-λακτάμης και αναστέλλουν τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων (**Εικόνα Α-6**) (Mohr,2016, Karoor,2017). Με την κατασκευή ημισυνθετικών πενικιλινών ευρέως φάσματος, κατέστη δυνατή και η αντιμετώπιση της λοίμωξης από Gram-αρνητικά βακτήρια (Mohr,2016). Ομοίως, το αντιβιοτικό ευρέως φάσματος βακιτρακίνη, που απομονώθηκε από τα είδη *Bacillus subtilis* και *Bacillus licheniformis* παρεμποδίζει τη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης, μέσω πρόσδεσης στο λιπιδικό μεταφορέα

πυροφωσφορικού, που μεταφέρει πρόδρομα μόρια για τη βιοσύνθεση του τοιχώματος (Mohr,2016). Τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης παρεμποδίζει με τη δράση του και ένα σύνολο γλυκοπεπτιδίων που παράγονται από ακτινομύκητες του εδάφους και περιλαμβάνουν την βανκομυκίνη, την τεϊκοπλανίνη κ.ά. (Mohr,2016, Karoor,2017).

Η πραγματική επανάσταση ήρθε με την ανακάλυψη βακτηρίων του περιβάλλοντος (διαβιούντα στο έδαφος για παράδειγμα) ως πηγής νέων αντιμικροβιακών παραγόντων (Mohr,2016). Έτσι προέκυψαν αντιβιοτικά όπως η τυροθρίσίνη με δράση στην αποσύνθεση του καψιδίου των βακτηρίων του γένους *Pneumoniococcus* και η γραμισιδίνη, αντιβιοτικό που δημιουργεί διαύλους στη μεμβράνη Gram-θετικών βακτηρίων (Mohr,2016).



Εικόνα Α - 6: Στο άνω μέρος της εικόνας παρουσιάζονται οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών, στους οποίους περιλαμβάνονται α) αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (αμινογλυκοσίδες), β) αναστολή σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος και παραβίαση ακεραιότητας της μεμβράνης (β-λακτάμες), γ) διακοπή μεταβολισμού μονο-ανθράκων (σουλφοναμίδες) και δ) παρέμβαση στη διαδικασία αντιγραφής και διατήρησης της ακεραιότητας του γονιδιώματος (κινολόνες). Στο κάτω μέρος εικονίζονται οι κύριες στρατηγικές αντίστασης στα αντιβιοτικά, οι οποίες εφαρμόζονται και από το *H. pylori* και οι οποίες είναι α) αδρανοποίηση του αντιβιοτικού μέσω ενζυματικής αποικοδόμησης ή τροποποίησης του αντιβιοτικού, β) τροποποίηση ή υπερέκφραση του μορίου-στόχου, γ) διατήρηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης κάτω από τα ανασταλτικά επίπεδα, με την ενεργοποίηση αντλιών εκροής ή μειώνοντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Προσαρμογή από (Crofts,2017).

Παρεμπόδιση διαδικασιών αντιγραφής και μεταγραφής

Αντιβιοτικά όπως η ακτινομυκίνη, που απομονώθηκε από το ακτινοβακτήριο *Streptomyces antibioticus* subsp. *antibioticus* το 1940, προσδένονται στη διπλή έλικα του DNA και παρεμβαίνουν στη δράση ενζύμων στις διαδικασίες σύνθεσης και μεταγραφής. Βέβαια, η ακτινομυκίνη ως θεραπευτικός παράγοντας, αποδείχθηκε εξαιρετικά τοξική για τον άνθρωπο και σήμερα χρησιμοποιείται ως συστατικό αντικαρκινικής θεραπείας. Η ριφαμυκίνη, που μαζί με το παράγωγο της ριφαμπικίνη ανήκουν στην ομάδα των ανσαμυκινών, έχει βακτηριοκτόνο δράση, καθώς εμποδίζει τη σύνθεση του RNA σε βακτήρια εγκατεστημένα στον ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο χώρο (Mohr,2016).

Οι φθοριοκινολόνες, η δράση των οποίων θα συζητηθεί σε επόμενη ενότητα διεξοδικά, είναι συνθετικά αντιβιοτικά, με βακτηριοκτόνο δράση, μέσω παρεμπόδισης της βακτηριακής DNA γυράσης (τοποϊσομεράση II), ενζύμου που καταλύει τροποποιήσεις στην τοπολογία του DNA, αλληλομετατρέποντας χαλαρές και υπερελικωμένες μορφές (**Εικόνα A-6**) (Mohr,2016).

Παρεμπόδιση πρωτεϊνοσύνθεσης

Πρόσδεση στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα

Οι αμινογλυκοσίδες (στρεπτομυκίνη, νεομυκίνη, καναμυκίνη, γενταμυκίνη) είναι μεγάλα, θετικά φορτισμένα μόρια, που προσδένονται στην εξωκυττάρια μεμβράνη και δημιουργούν μεγάλους πόρους, που διευκολύνουν την είσοδο του αντιβιοτικού στο βακτηριακό κύτταρο (Karoor,2017). Χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος, γεγονός που διευκολύνει την είσοδο των αμινογλυκοσιδίων στο κύτταρο και την πρόσβαση αυτών στον τελικό τους στόχο, την 30S ριβοσωμική των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Mohr,2016, Karoor,2017). Με παρόμοιο τρόπο γίνεται και η πρόσδεση των τετρακυκλινών (όπως η τετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη, δοξοκυκλίνη σε συντηρημένες περιοχές του 16S rRNA με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου του αμινοακυλο-tRNA στη A θέση του βακτηριακού ριβοσώματος (Εικόνα A-6)(Karoor,2017).

Πρόσδεση στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα

Η χλωραμφαινικόλη αναστέλλει τη διαδικασία μετάφρασης, καθώς προσδένεται αντιστρεπτά στις συντηρημένες περιοχές της κοιλότητας της πεπτιδυλ-τρανσφοράσης του 23S rRNA στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα, παρεμποδίζοντας την προσθήκη του t-RNA στη

θέση A και το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού (Karoor,2017). Αποτελεί, μάλιστα, το μόνο αντιβιοτικό που είναι αποτελεσματικό έναντι των ειδών του γένους *Salmonella* (συμπεριλαμβανομένου του είδους *Salmonella typhi*) (Mohr,2016). Ομοίως μέσω πρόσδεσης στο ριβόσωμα, δρουν οι μακρολίδες, οι στρεπτογραμίνες, οι οξαζολιδινόνες κ.ά. (Mohr,2016).

Αναστολείς μεταβολισμού φολικού οξέος

Ως ορόσημο της ιστορίας των αντιβιοτικών χαρακτηρίζεται η ανακάλυψη της προστατευτικής δράσης της σουλφαμιδο-χρυσοϊδίνης σε ποντίκια τα οποία είχαν μολυνθεί με πολύ υψηλή δόση του αιμολυτικού στελέχους *Streptococcus*. Με τη δράση ενζύμων, το πρόδρομο αυτό μόριο μετατρέπεται σε σουλφαναμίδη, ενεργό φάρμακο, στόχος του οποίου είναι το ένζυμο DHPS (dihydropteroate synthase), που συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης φολικού οξέος (**Εικόνα Α-6**) ενδογενώς. Καθώς τα θηλαστικά δεν εξαρτώνται από το ενδογενές μονοπάτι βιοσύνθεσης φολικού οξέος και επομένως σ' αυτά απουσιάζει το ένζυμο στόχος, η σουλφαναμίδη δρα αποκλειστικά ως βακτηριοστατικό Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων (Mohr,2016). Σε διαφορετικό σημείο της οδού βιοσύνθεσης παρεμβαίνει το αντιβιοτικό τριμεθοπρίμη αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου διϋδροφολική αναγωγή (Karoor,2017).

5. Ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στα αντιβιοτικά

Η επιτυχία της θεραπείας εκρίζωσης του *H. pylori* φαίνεται ότι εξαρτάται από την επιλογή θεραπευτικού σχήματος, τη δοσολογία και τη διάρκεια χορήγησης των αντιβιοτικών και βέβαια τη συμμόρφωση του ασθενούς στις οδηγίες του θεράποντος ιατρού. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στις διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι η κλαριθρομυκίνη, μετρονιδαζόλη, τετρακυκλίνη, αμοξικιλίνη, ενώ ως μέρος θεραπειών κυρίως τρίτης γραμμής χορηγούνται στους ασθενείς φθοριοκινολόνες (λεβοφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη κ.λπ.). Δυστυχώς, παρά την πληθώρα θεραπευτικών σχημάτων που έχουν προταθεί, τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ότι τα αποτελέσματα μπορεί να είναι απογοητευτικά, λόγω αφ' ενός, μειωμένης συμμόρφωσης των ασθενών εξ' αιτίας των παρενεργειών της πολύπλοκης αγωγής, αφ' ετέρου δε περιορισμένης αποτελεσματικότητας των φαρμάκων στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, όταν αυτά χορηγούνται ως μονοθεραπεία, αλλά κυρίως λόγω της διαρκώς αυξανόμενης αντοχής που παρουσιάζει το *H. pylori* στα αντιβιοτικά (Gerrits,2006, Francesco,2011). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η αντιμικροβιακή αντοχή αναπτύσσεται όταν οι

μικροοργανισμοί (όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, οι ιοί και τα παράσιτα) «τροποποιούνται» μετά την έκθεσή τους σε φάρμακα με αντιμικροβιακή δράση (όπως αντιβιοτικά, αντιμυκητιακά, αντικά, ανθελονοσιακά και ανθελμινθικά). Ως αποτέλεσμα, τα φάρμακα καθίστανται αναποτελεσματικά και οι λοιμώξεις εμμένουν, αυξάνοντας τον κίνδυνο εξάπλωσης τους (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή επιτροπή EUCAST (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing), ως ανθεκτικός (Resistant, R) ορίζεται ο μικροοργανισμός, για την εκρίζωση του οποίου, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα αποτυχίας, ακόμη και όταν υπάρχει αυξημένη έκθεση στο αντιβιοτικό. Ευαίσθητα (Susceptible, Standard Dosing Regimen, S) χαρακτηρίζονται τα στελέχη, για τα οποία υπάρχει μεγάλη πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας, με την εφαρμογή δοσολογικού σχήματος τυπικού έναντι αυτών. Τέλος, Μετρίως Ευαίσθητα (Susceptible, Increased Exposure, I), χαρακτηρίζονται τα στελέχη για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των οποίων, απαιτείται προσαρμογή του δοσολογικού σχήματος ή συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο σημείο της λοίμωξης (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Η Επιτροπή EUCAST εξέδωσε οδηγίες το 2019, συνιστώντας τη μέθοδο αραίωσης του αντιβιοτικού σε άγαρ, για την κατάταξη των στελεχών *H.pylori* σε ευαίσθητα, μετρίως ευαίσθητα και ανθεκτικά βάσει της τιμής MIC μετά από έκθεση σε δεδομένο αντιβιοτικό. Σημειώνεται σε αυτό το σημείο, ότι ο όρος έκθεση αναφέρεται στο πώς επηρεάζεται ο παθογόνος μικροοργανισμός στη θέση της λοίμωξης, από τον τρόπο και τη διάρκεια χορήγησης, τη δοσολογία και βέβαια τους ενδογενείς μηχανισμούς κατανομής και αποβολής της αντιμικροβιακής ουσίας (EUCAST, 2019). Στην πορεία κατάταξης των στελεχών βάσει του βαθμού αντοχής, η EUCAST έχει ορίσει και περιοχές τεχνικής αβεβαιότητας (Area of Technical Uncertainty, ATU), οι οποίες αντιστοιχούν σε τιμές MIC που δεν επιτρέπουν ακριβή διάκριση μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών και που συνήθως είναι τιμές ενδιάμεσες αυτών που έχουν καταγραφεί για τα ανθεκτικά και τα ευαίσθητα στελέχη.

5.1 Επιπολασμός της αντοχής

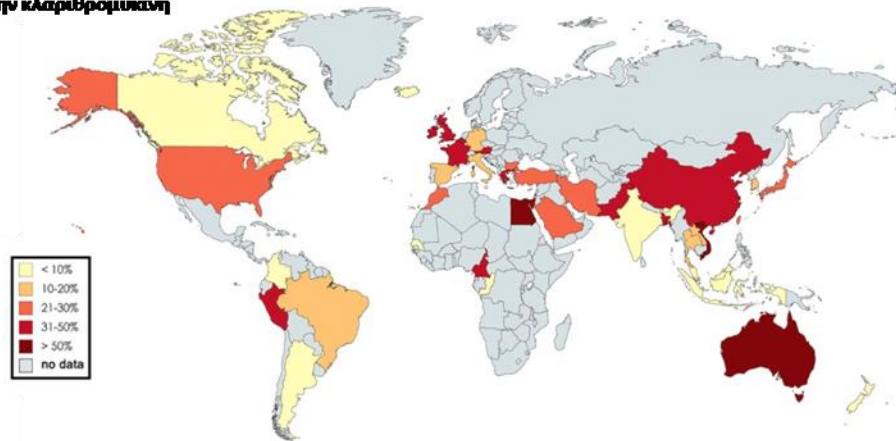
Το πρόβλημα της ολοένα αυξανόμενης αντοχής στα αντιβιοτικά δεν είναι γεωγραφικά περιορισμένο, αντιθέτως το ποσοστό πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς αντοχής στα τρία ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, την κλαριθρομυκίνη, τη μετρονιδαζόλη και τη

λεβοφλοξασίνη, παγκοσμίως είναι μεγαλύτερο του 15%, τιμή που αποτελεί κατώφλι για την επιλογή θεραπείας. Η χορήγηση αγωγής που βασίζεται στην κλαριθρομυκίνη είναι αποτελεσματική και οδηγεί σε εκρίζωση του *H. pylori* σε λιγότερο από 80% των περιπτώσεων, γεγονός ιδιαίτερα ανησυχητικό, αν αναλογιστεί κανείς τις διαφοροποιήσεις ως προς την αποτελεσματικότητα των εναλλακτικών θεραπειών, όπως η τετραπλή διαδοχική θεραπεία, ή οι θεραπείες τρίτης γραμμής (Savoldi,2018). Υψηλά ποσοστά αντοχής καταγράφονται στην Ισπανία, την Ιταλία, το Ιράν και τις Ηνωμένες Πολιτείες, ενώ >20% φαίνεται να είναι και το ποσοστό αντοχής στην κλαριθρομυκίνη στην Πολωνία, το Μαρόκο και τη Γερμανία (Alba,2017). Περισσότερο ελπιδοφόρα ήταν τα ποσοστά 6% και 9% που κατεγράφησαν στη Ισλανδία και την Ινδονησία αντίστοιχα (Alba,2017). Επιπλέον, μελέτες αναδεικνύουν το υψηλό ποσοστό αντοχής (>70%) στη μετρονιδαζόλη σε χώρες όπως η Κίνα και το Ιράκ, ενώ και στην Πολωνία και τη Σιγκαπούρη τα ανθεκτικά στελέχη παρουσιάζουν αύξηση με το ποσοστό τους να έχει ανέλθει στο 83% και 58,2% έναντι του 36% και 24,8% που καταγράφηκε τα προηγούμενα χρόνια (Alba,2017).

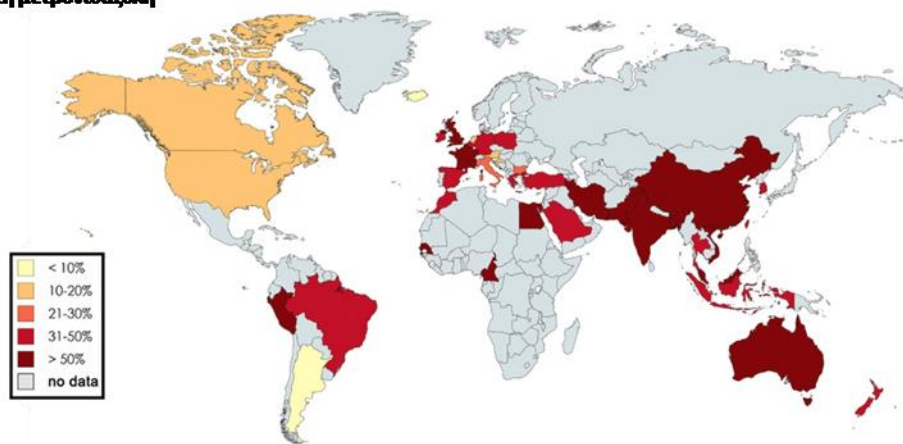
Στη Ελλάδα, την περίοδο 2012-2015, πραγματοποιήθηκε Πολυκεντρική Μελέτη για την αξιολόγηση της πρωτοπαθούς αντοχής του *H. pylori* στα κοινώς χορηγούμενα αντιβιοτικά (Martinez-Gonzalez,2015). Παρατηρήθηκε αντοχή στη κλαριθρομυκίνη σε ποσοστό 27,2% και ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο αντοχής στη μετρονιδαζόλη (32,1%), για το οποίο ωστόσο παρατηρείται μία ελαφρά τάση μείωσης τα τελευταία έτη, γεγονός που πιθανώς αντικατοπτρίζει την σταθερή χρήση του αντιβιοτικού αυτού στην χώρα μας. Το ποσοστό αντοχής στη λεβοφλοξασίνη είναι <10%, με μία σταθερή πορεία από το 2008 (7,7%) μέχρι και σήμερα (8,2%) (Martinez-Gonzalez,2015, Megraud,2013).

Καθώς, υψηλότερο ποσοστό αντοχής καταγράφεται σε ασθενείς που έχουν προηγουμένως λάβει θεραπεία για την *H. pylori* λοίμωξη, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή δοκιμασίας αντιβιογράμματος και καθορισμού της MIC, τουλάχιστον για την κλαριθρομυκίνη και τη μετρονιδαζόλη και βέβαια για κάθε άλλο αντιβιοτικό για το οποίο υπάρχουν ενδείξεις ότι αναπτύσσεται αντοχή σε υψηλό ποσοστό στον πληθυσμό (Alba,2017).

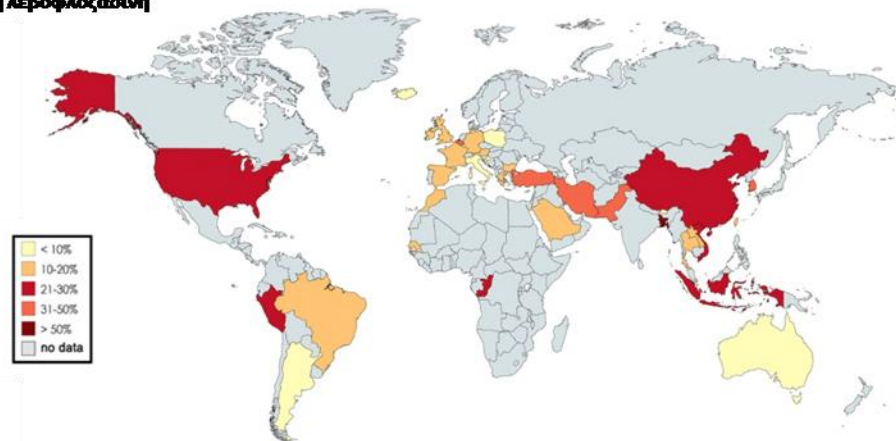
A) Αντοχή στην κλαριθρομυκίνη



B) Αντοχή στη μετρονιδαζόλη



Γ) Αντοχή στη λεβοφλοξασίνη



Εικόνα A - 7: Επιτολασμός της αντοχής (2006-2016) του *H. pylori* έναντι των αντιβιοτικών A) κλαριθρομυκίνης: Η αντοχή έναντι της CLA παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά στο Ισραήλ (45%) και στη Γαλλία (43%), B) μετρονιδαζόλης, με το υψηλότερο ποσοστό 57% να εντοπίζεται στο Ισραήλ και Γ) λεβοφλοξασίνης, με ποσοστό 30% στην Τουρκία, 29% στη Γερμανία, 16% στην Ισπανία και 15% στη Γαλλία. Προσαρμογή από (Savoldi,2018).

Κάθε χρόνο στην Ευρώπη και την Αμερική χάνουν τη ζωή τους 25.000 και 63.000 άνθρωποι αντίστοιχα από βακτηριακές λοιμώξεις που προκαλούνται από πολυανθεκτικά στελέχη (multiple drug resistance, MDR) (Zaman,2017). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός

Υγείας προειδοποιεί για τη «μετά των αντιβιοτικών εποχή», όπου ακόμη και λοιμώξεις εμφανιζόμενες με μεγάλη συχνότητα στον πληθυσμό ή μικροτραυματισμοί, πιθανόν να οδηγούν σε θάνατο, λόγω της αδυναμίας αντιμετώπισής τους με τα υπάρχοντα αντιβιοτικά (Zaman,2017).

5.2 Γενετική και μηχανιστική βάση της αντιμικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά

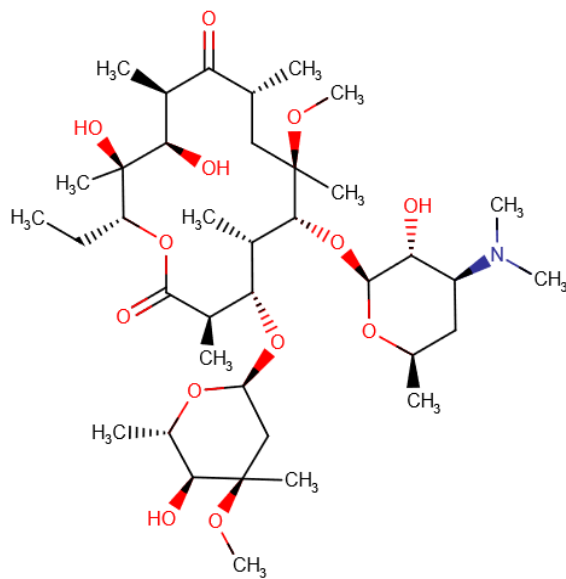
Η αντοχή στα αντιβιοτικά προκύπτει ως αποτέλεσμα διεργασιών της φυσικής επιλογής, με τα βακτήρια που «ευνοούνται», να είναι αυτά που φέρουν αντοχή έστω και σε μικρό βαθμό (Zaman,2017). Αναλυτικότερα, η μη συνετή χορήγηση αντιβιοτικών (μη ειδικού για τον ασθενή θεραπευτικού σχήματος ή δοσολογίας) φαίνεται να ευθύνεται για την ανάπτυξη αντοχής, καθώς με την αλόγιστη χρήση τους, ασκείται ένα είδος εξελικτικής πίεσης στα βακτήρια και όσα εξ' αυτών, φέρουν μεταλλάξεις που τους προσδίδουν πλεονέκτημα έναντι της δράσης του αντιβιοτικού, παραμένουν και πολλαπλασιάζονται, ακόμη και παρουσία αυτού (Zaman,2017). Η «ιδιότητά» λοιπόν της αντοχής προκύπτει σταδιακά, λόγω μεταλλάξεων στο βακτηριακό γονιδίωμα σε συνδυασμό με το φαινόμενο της εξελικτικής πίεσης (Zaman,2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι, αντιβιοτικά ίδια, ή παρόμοια με αυτά που χορηγούνται στην κλινική πράξη, χρησιμοποιούνται στη γεωργία για την προστασία των καλλιεργειών, αλλά και στην κτηνοτροφία, όπου προστίθενται στο νερό και την τροφή βοοειδών, είτε για την προστασία αυτών, είτε με ρόλο αυξητικών παραγόντων και η πρακτική αυτή ενδέχεται να διαδραματίζει ένα ρόλο στην ανάπτυξη και βέβαια στη διασπορά στον άνθρωπο, αντοχής στα δεδομένα αντιβιοτικά (Zaman,2017).

Τα βακτήρια και ειδικότερα το *H. pylori* χαρακτηρίζονται από μεγάλη γονιδιωματική πλαστικότητα που τους επιτρέπει να ανταπεξέρχονται στις δυσμενείς συνθήκες που αντιμετωπίζουν στον περιβάλλοντα χώρο. Ειδικότερα, βακτήρια που μοιράζονται τον οικολογικό τους θώκο με οργανισμούς που παράγουν ουσίες με αντιμικροβιακή δράση, έχουν αναπτύξει κατά τη διάρκεια της εξέλιξης μηχανισμούς αντιστάθμισης της επιβλαβούς επίδρασης των ουσιών αυτών (Zaman,2017). Οι στρατηγικές προσαρμογής των βακτηρίων, όπως περιγράφονται και στην **εικόνα A-6**, αφορούν α) σε μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά μόρια που συνδέονται ή αποτελούν στόχο του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών και β) στην ενσωμάτωση «ξένου» DNA, το οποίο κωδικοποιεί για μόρια που καθορίζουν την ανάπτυξη αντοχής μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Munita and Arias,2016). Πέραν της γενετικής βάσης, υπάρχει και η

λεγόμενη μηχανιστική βάση της αντοχής, που περιλαμβάνει στρατηγικές των βακτηρίων, όπως η χημική τροποποίηση ή καταστροφή του αντιβιοτικού με τη δράση βακτηριακών ενζύμων, η ελάττωση της διαπερατότητας της μεμβράνης στην τοξική για το βακτήριο ουσία, είτε η άμεση απομάκρυνσή της με αντλίες εκροής (Munita and Arias,2016).

5.3 Ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη

Η κλαριθρομυκίνη ανήκει στην κατηγορία των μακρολιδων και το μόριό της αποτελείται από ένα 14-μελή δακτύλιο λακτάμης με δύο ομάδες σακχαρικών καταλοίπων, L-κλαδινόζης και D-δεσοζαμίνης (Εικόνα A-9). Αποτελεί βακτηριοστατικό φάρμακο – κλειδί στα θεραπευτικά σχήματα πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της *H. pylori* λοίμωξης σε Ευρώπη και Αμερική, η ευρύτατη όμως χρήση της για τη θεραπεία ενός συνόλου άλλων παθήσεων, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πρωτογενούς αντοχής έναντι του αντιβιοτικού αυτού και βέβαια την αποτυχία της αγωγής (Iwamoto,2014). Σύμφωνα με τη μέθοδο αραίωσης του αντιβιοτικού στο



άγαρ, όπως έχει καθοριστεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή EUCAST το 2019, το

Εικόνα A - 8: Δομή κλαριθρομυκίνης
(Πηγή: σύνδεσμος <https://www.drugbank.ca/drugs/DB0121>)

MIC, για το χαρακτηρισμό ενός στελέχους ως ευαίσθητο, μετρίως ευαίσθητο ή ανθεκτικό στην κλαριθρομυκίνη λαμβάνει τιμές $\leq 0,25\mu\text{g/ml}$, $= 0,5\mu\text{g/ml}$ και $> 0,5\mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα. Η βακτηριοστατική δράση του αντιβιοτικού εξαρτάται από την ικανότητα πρόσδεσης στην περιοχή της πεπτιδυλτρανσφεράσης του βακτηριακού 23S rRNA, που κωδικοποιείται από το V domain και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Francesco,2011, Iwamoto,2014).

Η κλαριθρομυκίνη προσδένεται αντιστρεπτά στο βρόχο της πεπτιδυλτρανσφεράσης του V domain του 23S rRNA, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της επιμήκυνσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και επομένως της πρωτεϊνοσύνθεσης (Gerrits,2006). Η αντοχή του Ελικοβακτηρίου στην κλαριθρομυκίνη έχει σχετιστεί με σημειακές

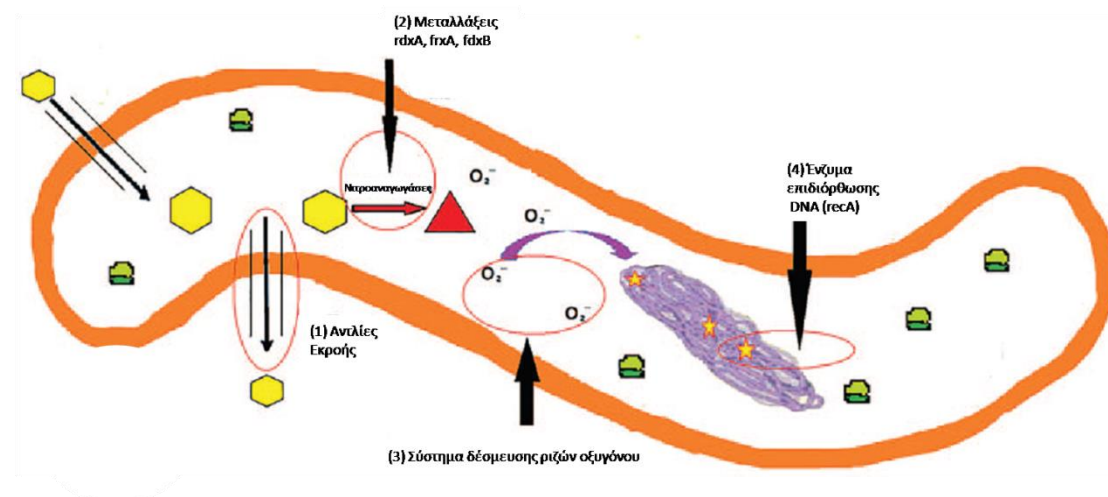
μεταλλάξεις στην περιοχή, του V domain που μειώνουν τη συγγένεια και παρεμποδίζουν την πρόσδεση του αντιβιοτικού στη ριβοσωμική υπομονάδα (Alba,2017). Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που έχουν καταγραφεί σε ποσοστό >90% σε ανθεκτικά στην κλαριθρομυκίνη (Hachem) στελέχη είναι η αντικατάσταση της νουκλεοτιδικής βάσης αδενίνης από γουανίνη στις θέσεις 2142 (A2142G) και 2143 (A2143G) (Alba,2017, Binh,2014). Επιπλέον, σημειώνονται οι μεταλλάξεις T2182C και G2611A, οι οποίες έχουν σχετιστεί με χαμηλά επίπεδα αντοχής, ενώ ο ρόλος των μεταλλαγών A2115G, T2117C, G2141A,A2144T, G2223A, T2288C,T2289C, G2245T,C2694A, T2711C, T2717C δεν έχει αποσαφηνιστεί λόγω της μικρής συχνότητας εμφάνισής τους (Francesco,2011, Alba,2017, Binh,2014, Chen,2018). Βιβλιογραφικά, οι θέσεις 2142,2143 και 2182 σύμφωνα με διαφορετική αρίθμηση των θέσεων νουκλεοτιδικών βάσεων, αναφέρονται ως θέσεις 2146, 2147 και 2186 (Iwamoto,2014). Με την ανάπτυξη αντοχής έχουν συσχετιστεί και άλλοι παράγοντες όπως η παραγωγή των ενζύμων rRNA-μεθυλασών, η δράση ενζύμων που απενεργοποιούν τις μακρολίδες και η ενεργοποίηση αντλιών εκροής του αντιβιοτικού (Francesco,2011). Μάλιστα, με την αντοχή στην κλαριθρομυκίνη στα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν συνδεθεί τουλάχιστον 5 συντηρημένες οικογένειες αντλιών εκροής, με κυριότερη την RND οικογένεια (resistance-nodulation-cell division), η οποία απαρτίζεται από τρεις πρωτεΐνες, μια της εξωτερικής μεμβράνης, μια πρωτεΐνη σύντηξης και μια αντλία εκροής της εσωτερικής μεμβράνης (Chen,2018).

Πέραν των μεταλλαγών που έχουν αναφερθεί στην περιοχή του V domain του 23S rRNA, υπεύθυνες για την ανάπτυξη αντοχής στις μακρολίδες, φαίνεται να είναι πλακαιοτροποποιητικές μεταλλαγές, όπως προσθήκες και ελλείψεις στο γονίδιο *rpl22* που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη L22 της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας, που αλληλεπιδρά με όλα τα domains του 23S rRNA (Binh,2014). Ελλείψεις στα κωδικόνια Met82-Lys83-Arg84 αποτελούν αιτία της αντοχής που αναπτύσσουν τα βακτήρια *E. coli* στην ερυθρομυκίνη και εφόσον το αντιβιοτικό αυτό ανήκει στην κατηγορία των μακρολίδων και έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με την κλαριθρομυκίνη, πιθανόν και ο μηχανισμός ανάπτυξης αντοχής, μέσω των προαναφερθεισών μεταλλάξεων, είναι κοινός στα δύο αντιβιοτικά (Binh,2014). Πράγματι, επιβεβαιώθηκε η περίπτωση ανθεκτικών στην κλαριθρομυκίνη στελεχών *H. pylori* που έφεραν μεταλλαγές στο γονίδιο *rpl22*, όχι όμως στο 23S rRNA (Binh,2014).

5.4 Ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη

Η μετρονιδαζόλη ανήκει στην κατηγορία των νιτρο-ιμιδαζολών και χορηγείται ως προφάρμακο, το οποίο ενεργοποιείται μέσα στο βακτηριακό κύτταρο, μετά την αναγωγή της νιτρο-ομάδας με τη μεταφορά ενός ή δύο ηλεκτρονίων (Gerrits,2006). Υποδοχείς των ηλεκτρονίων στο *H. pylori* είναι η φερρεδοξίνη (FdxA) και η φλαβοδοξίνη (FldA), ένζυμα που μοιάζουν με τη φερρεδοξίνη (FrxB), η NADPH-αδρανής στο οξυγόνο-νιτροαναγωγή (RdxA) και NADPH-φλαβινοξειδοαναγωγή (FrxA), ένζυμα που παράγονται από το Ελικοβακτήριο του πυλωρού (Gerrits,2006). Αποτέλεσμα της αναγωγής είναι η παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων, ριζών νιτρικών ανιόντων και υδροξυλαμίνης που προκαλούν θανατηφόρες βλάβες στο DNA και στις υποκυτταρικές δομές (Hu,2017, Gerrits,2006).

Το φαινόμενο της αντοχής έναντι τη μετρονιδαζόλης εντοπίζεται σε υψηλότερα ποσοστά στις αναπτυσσόμενες χώρες (>60%) και είναι δυνατόν να οφείλεται στην απορρύθμιση ενός συνόλου μηχανισμών (Εικόνα A-10), με κυριότερο τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *rdxA* που κωδικοποιεί την NADPH-αδρανή στο οξυγόνο-νιτροαναγωγή (RdxA) (Hu,2017, Nishizawa and Suzuki,2014). Ένα σύνολο γεγονότων, όπως προσθήκες, ελλείψεις τρανσποζονίων, σημειακές αλλά και πλαισιοτροποποιητικές αλλαγές είναι δυνατόν να συνυπάρχουν σε επίπεδο γονιδίου (Nishizawa and Suzuki,2014).



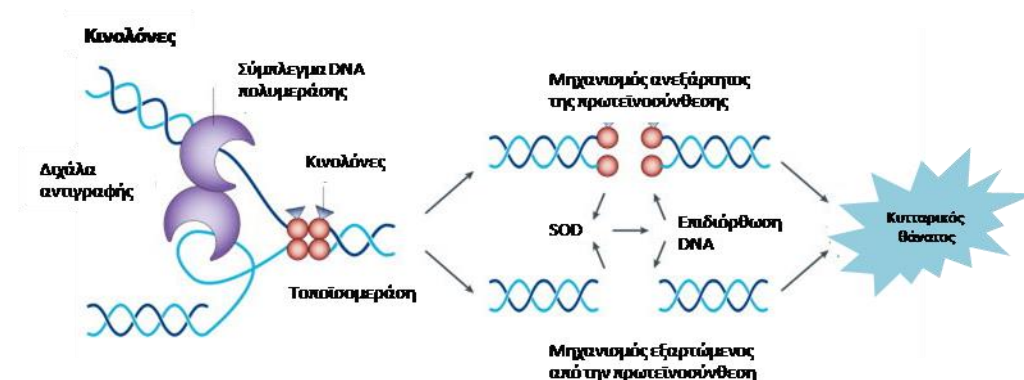
Εικόνα A - 9: Μηχανισμοί αντοχής στη μετρονιδαζόλη στο *H. pylori*. Η ανάπτυξη αντοχής οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια *rdxA*, *frxA*, *frxB* που κωδικοποιούν πρωτεϊνικά μόρια στόχους του μηχανισμού δράσης της μετρονιδαζόλης, στη δράση των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA, αλλά και των αντλιών εκροής που απομακρύνουν το αντιβιοτικό, μειώνοντας την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του. Προσαρμογή από (Alba,2017)

Άλλοι παράγοντες όπως σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια όπως το FrxA, FdxB, RibF, MdaB, με συνέπεια την αδρανοποίηση αυτών, έχουν σχετιστεί αύξηση

της βακτηριακής αντοχής, ιδίως παρουσία και των μεταλλαγών στο γονίδιο *rdxA* (Hu,2017, Gerrits,2006, Nishizawa and Suzuki,2014). Επιπλέον, μεταλλάξεις σε αμινοξικά κατάλοιπα C78Y και P114S του ρυθμιστή πρόσληψης τρισθενούς σιδήρου, (Sugimoto), συνδέονται με την αντοχή στη μετρονιδαζόλη, καθώς είναι υπεύθυνες για την καταστολή της έκφρασης της υπεροξειδικής δισμουτάσης, που προστατεύει τα βακτήρια από τοξικές ρίζες υπεροξειδίου (Lee,2018). Τέλος, με την αντοχή στη μετρονιδαζόλη έχει σχετιστεί η μετάλλαξη G37T στο γονίδιο *rpsU*, καθώς και μεταλλάξεις στα γονίδια *drpA*, *drpB*, *rps4*, *ackA*, *rnc* και *capF* (Miftahussurur,2016). Για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος ανθεκτικό στη μετρονιδαζόλη, θα πρέπει η τιμή MIC, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή EUCAST το 2019, να είναι > 8μg/ml.

5.5 Ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στις φθοριοκινολόνες

Για την εκρίζωση της *H. pylori* λοίμωξης σε ασθενείς που έχουν ήδη λάβει προηγούμενη θεραπεία χωρίς επιτυχία, χορηγούνται φθοριοκινολόνες, αντιβιοτικά ευρέος φάσματος που αξιοποιούνται συνήθως σε θεραπευτικά σχήματα τρίτης γραμμής (rescue therapies) (Alba,2017, Miftahussurur,2016). Η λεβοφλοξασίνη (κινολόνη 3^{ης} γενιάς) συγκεκριμένα παρεμποδίζει τη δράση της βακτηριακής DNA γυράσης (τοποϊσομεράση II), ένζυμο απαραίτητο για τη διατήρηση ελικοειδούς δομής του DNA (Εικόνα A-11), αλλά και για τη διεκπεραίωση των διαδικασιών αντιγραφής και μεταγραφής (Alba,2017, Nishizawa and Suzuki,2014). Η γυράση αποτελεί τετραμερές δύο A και δύο B υπομονάδων που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* και η υπομονάδα A, συγκεκριμένα, είναι υπεύθυνη με τη δράση της για την κοπή και επανασύνδεση των ελίκων του DNA (Nishizawa and Suzuki,2014).



Εικόνα A - 10: Οι κινολόνες είναι αντιβιοτικά που παρεμβαίνουν στις διαδικασίες τροποποίησης της δομής του DNA κατά την υπερελίκωση αυτού, μέσω της πρόσδεσής τους στο ένζυμο τοποϊσομεράση II ή IV. Αυτό οδηγεί στην εμφάνιση θραύσεων της δίκλωνης έλικας του DNA και βέβαια θάνατο του κυττάρου σε τρόπο εξαρτώμενο ή όχι της πρωτεϊνσύνθεσης. Προσαρμογή από (Kohanski,2010).

Τα τελευταία χρόνια το ποσοστό πρωτοπαθούς αντοχής στη λεβοφλοξασίνη κυμαίνεται μεταξύ 2-22% στις διαφορετικές χώρες/περιοχές και ήδη σε ορισμένες χώρες, όπως η Ινδονησία, όπου ο επιπολασμός της αντοχής είναι υψηλός (33,1%), η αποτελεσματικότητα δράσης της λεβοφλοξασίνης δεν είναι αρκετή για να συμπεριληφθεί στα θεραπευτικά σχήματα (Miftahussurur,2016, Suzuki,2010). Μάλιστα, το ποσοστό παρουσιάζεται σε όλο τον κόσμο διαρκώς αυξανόμενο, καθώς η αντοχή είναι ιδιαίτερα εύκολο να αποκτηθεί, ιδιαίτερα σε χώρες με υψηλή κατανάλωση φθοροκινολονών (Nishizawa and Suzuki,2014). Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή EUCAST το 2019, έχει ορίσει ως τιμή-κατώφλι για το χαρακτηρισμό ενός στελέχους ως ανθεκτικό στη λεβοφλοξασίνη το MIC >1μg/ml.

Η γενετική βάση της αντοχής στο αντιβιοτικό αυτό στηρίζεται σε σημειακές μεταλλάξεις στην QRDR (quinolones resistance-determining region) περιοχή των γονιδίων *gyrA* και *gyrB*, αποτέλεσμα των οποίων είναι η παρεμπόδιση της πρόσδεσης του αντιβιοτικού στο ένζυμο (Alba,2017, Miftahussurur,2016). Οι κυρίαρχες μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο *gyrA* σε ανθεκτικά *H. pylori* στελέχη είναι αυτές στα κωδικόνια D91(G/N/A/Y), N87K και A88V, ενώ στο γονίδιο *gyrB* οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια D481E και R484K (Alba,2017). Ως υποψήφιες για μελέτη, αναφέρονται επίσης οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια L45FA55S, A97V, R130K, G60S στο γονίδιο *gyrA* και 463 στο γονίδιο *gyrB*, προκειμένου να αξιολογηθεί η πιθανότητα σύνδεσής τους με το φαινόμενο της αντοχής (Nishizawa and Suzuki,2014, Zamani,2017).

5.6 Ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* αμοξυκιλλίνη

Η αμοξυκιλλίνη, βακτηριοκτόνο της οικογένειας των πενικιλινών, προσδένεται στις πρωτεΐνες-μεταφορείς, που δεσμεύουν πενικιλίνη (penicillin binding proteins, PBP) και παρεμβαίνει στη σύνθεση πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού τοιχώματος, με άμεση συνέπεια τη λύση του κυττάρου (Gerrits,2006, Nishizawa and Suzuki,2014). Το πλεονέκτημα της έναντι άλλων πενικιλινών είναι ότι απελευθερώνεται στο γαστρικό υγρό και παραμένει σταθερή στις όξινες συνθήκες (Gerrits,2006). Σύμφωνα με την EUCAST, στελέχη με τιμές MIC >0,125μg/ml κατηγοριοποιούνται ως ανθεκτικά, ενώ στην αντίθετη περίπτωση ως ευαίσθητα, ενώ γενικά δεν καταγράφονται υψηλά ποσοστά αντοχής στην αμοξυκιλλίνη σε παγκόσμιο επίπεδο και σπάνια εντοπίζονται ανθεκτικά στελέχη με τιμές MIC >0,5μg/ml.

Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, η αντοχή στην αμοξικιλίνη οφείλεται στη δραστικότητα των β-λακταμασών, ενζύμων που διασπούν το δακτύλιο β-λακτάμης του αντιβιοτικού (Gerrits,2006). Αντίθετα, στα Gram-θετικά βακτήρια, πολλαπλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rbp1* είναι κυρίως υπεύθυνες για την ανάπτυξη αντοχής, η οποία όμως παραμένει χαμηλή (<2%) σε παγκόσμιο επίπεδο, εξαιρουμένου του Μπαγκλαντές (6,6%) (Gerrits,2006, Nishizawa and Suzuki,2014). Μάλιστα, η συσσώρευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *rbp1* είναι δυνατόν να ευθύνεται για τη σταδιακή αύξηση του επιπέδου αντοχής, η οποία εκφράζεται βάσει του αριθμού αντικαταστάσεων που φέρουν τα στελέχη, με τα «χαμηλής αντοχής» να έχουν μέχρι 2 αντικαταστάσεις και τιμές MIC: 0,06-0,25 μg/ml, ενώ τα στελέχη «υψηλής αντοχής» να χαρακτηρίζονται από 1-3 αντικαταστάσεις (Nishizawa and Suzuki,2014). Παραδόξως, η αντοχή του *H. pylori* στην αμοξικιλίνη, αν και το βακτήριο κατατάσσεται στα Gram-αρνητικά, δε φαίνεται να μεσολαβείται από τη δράση της β-λακταμάσης, αλλά από μεταλλαγές στο *rbp1* γονίδιο, ενώ αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι, συχνά δεν πρόκειται για αντοχή, αλλά ανοχή στο αντιβιοτικό, η οποία είναι παροδική και όχι σταθερή (Gerrits,2006). Υψηλότερα επίπεδα αντοχής συνήθως σχετίζονται όχι μόνο με τις προαναφερθείσες μεταλλαγές, αλλά και με μειωμένη διαπερατότητα της μεμβράνης στο αντιβιοτικό ή ενεργητική εκροή αυτού από το κύτταρο (Gerrits,2006).

5.7 Ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στην τετρακυκλίνη

Η τετρακυκλίνη, βακτηριοστατικό της κατηγορίας των τετρακυκλινών αντιβιοτικών, δρα στο επίπεδο της βακτηριακής ριβοσωμικής υπομονάδας 30S, παρεμποδίζοντας τη σύνδεση κωδικονίου– αντικωδικονίου, την πρόσδεση δηλαδή του αμινοακυλο-tRNA, με αποτέλεσμα την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Hu,2017). Βάσει της μεθόδου ενσωμάτωσης του αντιβιοτικού στο άγαρ, έχει καθοριστεί τιμή MIC >1μg/ml ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ανάπτυξης του *H. pylori* παρουσία τετρακυκλίνης για τα ανθεκτικά στελέχη (EUCAST 2019). Η αντοχή στην τετρακυκλίνη προκαλείται κυρίως από σημειακές μεταλλάξεις στο *tet-1* του *16S rRNA* και το επίπεδο αντοχής έχει συνδεθεί στενά με τον αριθμό αντικαταστάσεων νουκλεοτιδικών βάσεων. Συγκεκριμένα, η τριπλή σημειακή μετάλλαξη στις θέσεις 926-928 με αλλαγή της τριπλέτας AGA σε TTC ,συνδέεται με υψηλό επίπεδο αντοχής, ενώ οι αντικατάσταση μιας ή δύο βάσεων σχετίζεται με χαμηλό επίπεδο (Hu,2017, Nishizawa and Suzuki,2014). Επιπρόσθετα, η δραστηριότητα των μηχανισμών εκροής εμπλέκεται πιθανόν στην ανάπτυξη αντοχή των κλινικών στελεχών *H. pylori*, επομένως με τη χρήση αναστολέα των αντλιών εκροής, είναι δυνατόν να μειωθεί η

ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της τετρακυκλίνης. Ωστόσο, δεν έχει περιγραφεί ακόμα ο ακριβής μηχανισμός για τη συσχέτιση της λειτουργίας της αντλίας εκροής και την αντίσταση του *H. pylori* στην τετρακυκλίνη (Hu,2017, Gerrits,2006).

6. Ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά

Στη σύγχρονη κλινική πράξη, για την επιλογή του καταλληλότερου θεραπευτικού σχήματος, ιδίως μετά από πρώτη αποτυχημένη προσπάθεια εκρίζωσης του *H. pylori*, αξιοποιούνται κυρίως οι φαινοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης της αντοχής, οι οποίες βασίζονται στην καλλιέργεια του βακτηρίου και τον έλεγχο της ανάπτυξής του παρουσία διαβαθμισμένης συγκέντρωσης ενός ή περισσότερων αντιβιοτικών (Mégraud and Lehours,2007). Γονοτυπικές μέθοδοι ανίχνευσης εφαρμόζονται κυρίως στην περίπτωση στελεχών ανθεκτικών σε κλαριθρομυκίνη, καθώς η αντοχή σε αυτήν οφείλεται στην ύπαρξη καλά χαρακτηρισμένων μεταλλάξεων, ωστόσο προσπάθεια γίνεται να εδραιωθεί η χρήση των μεθόδων, για τη διερεύνηση αντοχής και σε άλλα αντιβιοτικά (Mégraud and Lehours,2007).

6.1 Φαινοτυπική ανίχνευση

6.1.1 Μέθοδος ενσωμάτωσης σε άγαρ

Η τεχνική αυτή θεωρείται μέθοδος αναφοράς, συγκριτικά με άλλες μεθόδους, ιδίως για την ανίχνευση της αντοχής στη μετρονιδαζόλη και μάλιστα συστάσεις, οδηγίες γι' αυτήν έχει εκδώσει τόσο το *Ινστιτούτο Κλινικών και Εργαστηριακών Προτύπων (CLSI)* των ΗΠΑ όσο και η EUCAST (Mégraud and Lehours,2007). Με τη μέθοδο αυτή, η ευαισθησία του *H. pylori* αξιολογείται μετά την καλλιέργεια του βακτηρίου σε τρυβλία που περιέχουν άγαρ, στο οποίο έχουν ενσωματωθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις του υπό έλεγχου αντιβιοτικού (Gerrits,2006). Γίνεται παρατήρηση των τρυβλίων και καταγράφεται η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία επιτυγχάνεται πλήρης αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης, η οποία αναφέρεται ως MIC (Hachem,1996). Με την ίδια διαδικασία, ανιχνεύεται η ευαισθησία σε υγρό θρεπτικό μέσο (broth-microdilution method), ωστόσο σπάνια χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντοχής στο *H. pylori* σε σχέση με τη μέθοδο ενσωμάτωσης σε άγαρ, λόγω της δυσκολίας ανάπτυξης του βακτηρίου στο υγρό θρεπτικό (Mégraud and Lehours,2007).

6.1.2 Μέθοδος διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών στο άγαρ

Πρόκειται για μια οικονομική και απλή μέθοδο, η οποία όμως δε συνιστάται για βακτήρια που αναπτύσσονται αργά όπως το *H. pylori* (Gerrits,2006, Mégraud and Lehours,2007). Δίσκοι εμποτισμένοι με γνωστές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών τοποθετούνται σε τρυβλίο με άγαρ, στο οποίο αναπτύσσεται βακτηριακή καλλιέργεια (Gerrits,2006). Μετά την επώαση για 5 ημέρες σε μικροαερόβια ατμόσφαιρα στους 37°C, προσδιορίζεται η ευαισθησία στα αντιβιοτικά με μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης, που έχει δημιουργηθεί γύρω από το δίσκο, όπου και διαχύθηκε το αντιβιοτικό (Gerrits,2006, Hachem,1996). Σημειώνεται ότι, λόγω της μεγάλης απόστασης μεταξύ των τιμών MIC μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών, η μέθοδος αυτή επιτρέπει σαφή διάκρισή τους (Mégraud and Lehours,2007).

6.1.3 E-test (Epsilometer test)

Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί έναντι των άλλων, καθώς είναι ποσοτική και επιτρέπει άμεσο υπολογισμό της τιμής MIC, ενώ εν αντιθέσει με τη μέθοδο αραιώσης σε υγρό μέσο, εφαρμόζεται και στην περίπτωση βραδέως αναπτυσσόμενων βακτηρίων (Mégraud and Lehours,2007). Κατά τη διαδικασία ανίχνευσης της αντοχής, λεπτές πλαστικές λωρίδες (strips) τοποθετούνται στην επιφάνεια του τρυβλίου, στο οποίο βρίσκεται η καλλιέργεια *H. pylori*. Στη μία επιφάνεια κάθε λωρίδας αναγράφεται, στο άκρο ο κωδικός συγκεκριμένου αντιβιοτικού, συμβολισμένος με 2 ή 3 γράμματα, ενώ κατά μήκος της λωρίδας υπάρχει μια κλίμακα στην οποία αναγράφονται συγκεντρώσεις MIC (μg/mL). Η άλλη επιφάνεια κάθε λωρίδας είναι εμποτισμένη με συνεχή, εκθετικά διαβαθμισμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού, η οποία μεταφέρεται στο άγαρ, μετά την τοποθέτηση των λωρίδων στην επιφάνεια του τρυβλίου. Ακολουθεί επώαση για 5 ημέρες σε μικροαερόφιλες συνθήκες στους 37°C, για την ανάπτυξη του βακτηρίου και υπολογισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), βάσει της τομής της ζώνης αναστολής που δημιουργείται γύρω από συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού με τη βαθμονομημένη λωρίδα της δοκιμασίας E-test.

http://www.ilexmedical.com/files/E-test-Package-Insert/AST_WW.pdf

6.2 Γονοτυπική ανίχνευση

Όπως αναφέρθηκε και πρωτύτερα, η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά στην περίπτωση του *H. pylori* οφείλεται σε μεταλλάξεις σε γονίδια του χρωμοσωμικού DNA και όχι σε πλασμιδιακά, είτε προερχόμενα από άλλους οργανισμούς με οριζόντια μεταφορά, γονίδια

(Mégraud and Lehours,2007). Η ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων, σημειακών, πλαισιοτροποποιητικών κ.λπ., πραγματοποιείται με μοριακές μεθόδους, λιγότερο χρονοβόρες σε σχέση με τις φαινοτυπικές που στηρίζονται στην καλλιέργεια του μικροοργανισμού και διαρκούν έως και δύο εβδομάδες (Thung,2016).

6.2.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Με την PCR και σύγχρονες παραλλαγές αυτής, όπως η RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου), έχουμε τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε με επιτυχία την ευαισθησία του *H. pylori* στα αντιβιοτικά, ιδίως στην κλαριθρομυκίνη και συλλέξουμε δεδομένα που αφορούν την αντοχή, ακόμα και σε ασθενείς με λοίμωξη από περισσότερα του ενός στελέχη (Thung,2016). Σε περιπτώσεις που η ανίχνευση της αντοχής έγινε με μοριακές και φαινοτυπικές μεθόδους, διαπιστώθηκε ότι με την RT-PCR καταγράφησαν ανθεκτικά στελέχη, τα οποία λανθασμένα οι μέθοδοι που στηρίζονται στην καλλιέργεια ανίχνευαν ως ευαίσθητα, επιβεβαιώνοντας τη μεγαλύτερη ευαισθησία που χαρακτηρίζει την RT-PCR (Ducourneau,2016). Δυστυχώς, η αξιοπιστία του αποτελέσματος των μοριακών μεθόδων που στηρίζονται στην PCR, επηρεάζεται από την ποιότητα του DNA και την πιθανότητα επιμόλυνση, καθώς λόγω της υψηλής ευαισθησίας μπορεί να ανιχνευτούν μη ειδικά νεκροί μικροοργανισμοί ή άλλοι που δεν έχουν καλλιεργηθεί (Thung,2016).

6.2.2 PCR – RFLP (Ανάλυση πολυμορφισμών μήκους περιοριστικού θραύσματος)

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε ήδη από το 1996 για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *23S rRNA*, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη (Mégraud and Lehours,2007). Στην περίπτωση ύπαρξης μεταλλάξεων, αποκαλύπτονται θέσεις πρόσδεσης περιοριστικών ενζύμων, στο τμήμα που προκύπτει από την ενίσχυση, βάσει ειδικών για το γονίδιο, εκκινητών και συγκεκριμένα η θέση της μετάλλαξης A2142G αναγνωρίζεται ως περιοριστική θέση από το ένζυμο BsaI, η θέση μετάλλαξης A2143G από το ένζυμο BsbI και η A2142C από το BceAI (Mégraud and Lehours,2007). Η μέθοδος είναι απλή, παρουσιάζει όμως τα μειονεκτήματα της τεχνικής PCR, που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο (Mégraud and Lehours,2007).

6.2.3 Ανάγνωση αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος κλινικών στελεχών *H. pylori*

Οι μοριακές τεχνικές που αναφέρθηκαν, εφαρμόζονται για τη μελέτη τμήματος ή και ολόκληρης της αλληλουχίας ενός ή περισσότερων γονιδίων για τη διερεύνηση της ύπαρξης

μεταλλάξεων, που συνδέονται πιθανά με την ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά. Παρά το γεγονός ότι, παρέχουν το πλεονέκτημα ταχείας διάγνωσης, οι πληροφορίες που αντλούμε από τις τεχνικές αυτές, είναι περιορισμένες και συχνά δεν επιτρέπουν σε βάθος μελέτη περιστατικών που θα αποκάλυπταν πιθανά και άλλες πληροφορίες, όπως τον τρόπο μετάδοσης του παθογόνου και τα αίτια έναρξης μιας επιδημίας (Deurenberg,2017).

Πλέον, προσεγγίσεις όπως η Ανάγνωση αλληλουχίας Νέας Γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) εφαρμόζονται κυρίως στο ερευνητικό πεδίο, ενώ παράλληλα γίνεται προσπάθεια ένταξης τους στην κλινική πράξη, προκειμένου να καταστεί δυνατή η πλήρης αξιοποίηση των δυνατοτήτων και πλεονεκτημάτων της τεχνολογίας αυτής (Rossen,2018). Η Ανάγνωση Αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) μικροοργανισμών επιτρέπει την αναγνώριση και τυποποίησή μιας ποικιλίας παθογόνων σε σύνθετα πολυμικροβιακά δείγματα, συμπεριλαμβανομένων κλινικών, περιβαλλοντικών και δειγμάτων τροφίμων, χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας του οργανισμού (Rossen,2018). Επιπλέον, η τεχνική WGS χρησιμοποιείται κατά κόρον στη μελέτη μικροοργανισμών, όπως το *H. pylori*, για την αποκάλυψη γενετικών σχέσεων μεταξύ στελεχών κατά την εκπόνηση φυλογενετικών μελετών, και τον έλεγχο παρουσίας γονιδίων που σχετίζονται με τη λοιμοτοξική δράση, την παθογένεια αλλά και την αντοχή στα αντιβιοτικά (Deurenberg,2017, Rossen,2018). Σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες τεχνικές, αλλά και με παλαιότερες μεθόδους ανάγνωσης αλληλουχίας (Sanger Sequencing), η τεχνολογία NGS δεν απαιτεί χρήση εκκινητών ειδικών για το στόχο (Deurenberg,2017).

Για την εφαρμογή NGS τεχνολογίας χρησιμοποιούνται συσκευές ανάγνωσης αλληλουχίας τρίτης γενιάς όπως το MinION (Oxford Nanopore) και το Sequel (Pacific Biosciences). Η ανάγνωση αλληλουχίας στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε χρήση της συσκευής και τεχνολογίας Ion Torrent, PGM (Personal Genome Machine), η λειτουργία του οποίου στηρίζεται στην παρατήρηση των αλλαγών της τιμής του pH μετά την απελευθέρωση ενός πρωτονίου κατά την ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου από την πολυμεράση (Liu,2012). Αποτελεί την πρώτη συσκευή ανάγνωσης αλληλουχίας που δεν απαιτεί χρήση χρωστικών ή τροποποίηση των προστιθέμενων νουκλεοτιδίων, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο, μεγαλύτερη ταχύτητα, χαμηλότερο κόστος και μείωση του μεγέθους του οργάνου (Liu,2012).

7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο γονοτυπικός προσδιορισμός της αντοχής των *H. pylori* στελεχών έναντι της κλαριθρομυκίνης, της μετρονιδαζόλης και της λεβοφλοξασίνης, των τριών αντιβιοτικών δηλαδή που χορηγούνται κατά κύριο λόγο στο πλαίσιο θεραπευτικών σχημάτων για την εκρίζωση του *H. pylori*. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αλληλουχιών 6 γονιδίων αναφοράς, προερχόμενων από το στέλεχος αναφοράς *H. pylori* 26695, με αυτές των γονιδίων των 37 κλινικών πολυανθεκτικών στελεχών. Οι ακολουθίες προέρχονται από ανάγνωση αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος (WGS) και ο στόχος της μελέτης και σύγκρισης τους είναι ο εντοπισμός μεταλλάξεων και η διερεύνηση του ρόλου τους στο φαινόμενο της αντοχής στα αντιβιοτικά.

Συγκεκριμένα, στο πλαίσιο τη διερεύνησης του μηχανισμού αντοχής στην κλαριθρομυκίνη, μελετήθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου *23S rRNA*, ενώ αντίστοιχη εργασία πραγματοποιήθηκε για τα γονίδια *rdxA*, *frxA* και *rpsU*, που φαίνεται να εμπλέκονται στην εμφάνιση αντοχής στη μετρονιδαζόλη. Τέλος, μεταλλάξεις εντοπίστηκαν και κατεγράφησαν στα γονίδια *gyrA* και *gyrB* στελεχών και αξιολογήθηκε η σημασία τους στην ανάπτυξη αντοχής των στελεχών *H. pylori* στη λεβοφλοξασίνη. Σε κάθε περίπτωση, την ανάλυση ακολούθησε δοκιμασία Fisher's exact test για τη στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Β. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Διαχείριση στελεχών *H. pylori*

Για τις ανάγκες της παρούσας ερευνητικής εργασίας, μελετήθηκαν 38 στελέχη *H. pylori*, τα οποία απομονώθηκαν από γαστρικές βιοψίες που ελήφθησαν από ενήλικες Έλληνες συμπτωματικούς ασθενείς, μετά από ενδοσκόπηση ανωτέρω πεπτικού σε συνεργαζόμενες γαστρεντερολογικές κλινικές. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων έχει προηγουμένως ληφθεί η συγκατάθεση των ασθενών.

1.1. Απομόνωση και καλλιέργεια στελεχών *H. pylori* από κλινικά δείγματα

Βιοπτικό υλικό (συνήθως 2 βιοψίες) λήφθηκε από το άντρο και το σώμα του βλεννογόνου του στομάχου και κατά τη μεταφορά του από την τόπο λήψης, στο εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ (Ε.Ι.Π.) παρέμεινε αποθηκευμένο σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό μεταφοράς, (θειογλυκολικό νάτριο 0,5g/L, (Oxoid). Η επεξεργασία των δειγμάτων για την απομόνωση των βακτηριακών στελεχών *H. pylori*, έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής και περιελάμβανε έντονη ανάδευση (vortex) των ιστοτεμαχίων, μετά από προσθήκη αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων, για τη λύση και ομογενοποίηση του ιστού. Ακολούθησε καλλιέργεια των δειγμάτων με τον ενοφθαλμισμό του ομογενοποιημένου σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Columbia Blood Agar Base (Oxoid), εμπλουτισμένο με 8% (v/v) αίμα αλόγου, 5% (v/v) ορό αλόγου και 1% (v/v) Vitox (Oxoid) και επιπλέον περιέχει αντιβιοτικά (10 µg/ml βανκομυκίνη, 10 µg/ml τριμεθοπρίμη, 1000 IU πολυμυξίνη Β, 2 µg/ml αμφοτερικίνη Β, 10 µg/ml ναλιδιξικό οξύ, 30 µg/ml βακιτρακίνη και 5 µg/ml φθοροκυτοσίνη). Με τη χρήση ειδικού καταλύτη εξασφαλίστηκαν μικροαερόφιλες συνθήκες (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) (Campygen, Oxoid), απαραίτητες για την ανάπτυξη του βακτηρίου. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε ειδικά αεροστεγή δοχεία και επωάζονται μικροαερόφιλα σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C για διάστημα έως 7-10 ημερών. Σε καθημερινή βάση πραγματοποιείται έλεγχος των τρυβλίων για την παρουσία αποικιών, οι οποίες εξετάζονται και ταυτοποιούνται αρχικά μορφολογικά και στη συνέχεια με εφαρμογή της δοκιμασίας αντίδρασης ουρεάσης. Κάθε κλινικό στέλεχος που απομονώθηκε, καλλιεργήθηκε δύο φορές σε τρυβλία παρουσία του αιματούχου θρεπτικού Columbia Agar.

1.2. Κρυοσυντήρηση στελεχών *H. pylori*

Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα κατά τη φύλαξη των απομονωμένων στελεχών *H. pylori*. Σε τρυβλίο όπου αναπτύσσεται καλλιέργεια διακριτή μακροσκοπικά, λαμβάνεται το σύνολο της βιομάζας και επαναιωρείται μέσα σε αμπούλες κρυοσυντήρησης (cryovials), σε 1,8 ml

θρεπτικού υλικού Brain Heart Infusion Broth (BHIB) και 20% γλυκερόλη. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε κατάψυξη -80°C.

1.3. Απομόνωση γενωμικού DNA από καλλιέργεια *H. pylori*

Η απομόνωση γονιδιακού DNA από στελέχη *H. pylori* έγινε βάσει πρωτοκόλλου, όπως ορίζεται από τον παρασκευαστή του εμπορικού kit NucleoSpin Tissue της εταιρίας Macherey-Nagel. Πιο συγκεκριμένα, από το τρυβλίο, στο οποίο έχει καλλιεργηθεί το στέλεχος, λαμβάνεται μικρή ποσότητα βιομάζας που επαναιωρείται σε 0,5 ml dH₂O, για να ακολουθήσει στη συνέχεια φυγοκέντρηση σε 8000xg για 5 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 180 μl διαλύματος T1, το οποίο περιέχει ανιονικό αποδιατακτικό παράγοντα δωδεκανικό θειικό νάτριο-SDS, με παράλληλη προσθήκη 25 μl πρωτεϊνάσης K και επωάζεται για 1-3 ώρες (ή και κατά τη διάρκεια της νύχτας) στους 56°C. Τα βήματα που ακολουθούν είναι:

- Προσθήκη 200 μl διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης (χαοτροπικό άλας B3) και επώαση στους 75°C, για 10 min.
- Προσθήκη 210 μl 96-100% αιθανόλης και ισχυρή ανάδευση
- Μεταφορά συνολικού όγκου δείγματος σε στήλη πυριτίου και φυγοκέντρηση στα 11000xg για 1 λεπτό, για να επιτευχθεί προσκόλληση του DNA στη στήλη
- Πλύση του DNA με 500 μl διαλύματος BW (διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης)
- Πλύση του DNA με 600 μl διαλύματος B5.
- Έκλυση DNA με 100 μl διαλύματος 5mM Tris/HCl, pH 8.5 (Διάλυμα BE)
- Φυγοκέντρηση στα 11000xg για 1 λεπτό

2. Φαινοτυπική ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά με τη μέθοδο E-test

Η εφαρμογή της δοκιμασίας ευαισθησίας του Ελικοβακτηρίου στα αντιβιοτικά περιλαμβάνει την τοποθέτηση ταινιών (strips) εμποτισμένων με αντιβιοτικό σε διαβαθμισμένη συγκέντρωση, στην επιφάνεια τρυβλίου, στο οποίο έχει καλλιεργηθεί το βακτήριο. Χρησιμοποιούνται 5 διαφορετικές ταινίες για αντίστοιχο αριθμό αντιβιοτικών: κλαριθρομυκίνη, μετρονιδαζόλη, λεβοφλοξασίνη, αμοξικιλίνη και τετρακυκλίνη και 48 ώρες μετά την τοποθέτησή τους μετρείται η διάμετρος της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης, που έχει σχηματιστεί γύρω από συγκεκριμένη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην κάθε ταινία. Ο προσδιορισμός των ορίων αντοχής και η κατάταξη του στελέχους ως ανθεκτικό ή ευαίσθητο, γίνεται βάσει των οδηγιών που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή EUCAST, όπως παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας Β - 1: Κλινικά όρια όπως ορίζονται από το EUCAST 2019, για τα πέντε ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά.

Αντιβιοτικά	MIC (mg/L)	
	Ευαίσθητο ≤	Ανθεκτικό >
κλαριθρομυκίνη	0,25	0,5
μετρονιδαζόλη	8	8
λεβοφλοξασίνη	1	1
αμοξυκιλλίνη	0.125	0.125
τετρακυκλίνη	1	1

3. Ανάγνωση αλληλουχίας Πλήρους Γονιδιώματος κλινικών στελεχών *H. pylori*

Η εφαρμογή του WGS πραγματοποιήθηκε σε 38 στελέχη *H. pylori*, τα οποία βάσει προηγηθείσας φαινοτυπικής ανίχνευσης της ευαισθησίας στα τρία αντιβιοτικά κλαριθρομυκίνη (CLA), μετρονιδαζόλη (MET) και λεβοφλοξασίνη (LEV) καταχωρήθηκαν ως εξής:

- 11 ευαίσθητα στα τρία αντιβιοτικά (συμπεριλαμβάνεται 1 στέλεχος μετρίως ευαίσθητο στη MET και 1 μετρίως ευαίσθητο στην CLA).
- Μονοανθεκτικά: 9 CLA^R, 11 MET^R
- Διπλοανθεκτικά: 3 CLA^R&MET^R, 1 CLA^R & LEV^R, 3 MET^R& LEV^R

3.1 Προετοιμασία βιβλιοθήκης

Αρχικά, έγινε απομόνωση του ολικού γονιδιωματικού DNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναλύεται στην παράγραφο 1.3 και έλεγχος της καθαρότητάς του με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 260 nm/280 nm (οριακές τιμές 1,8-2,15) σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop (Thermo Scientific NucleoSpin Tissue Wilmington, DE, USA). για την πιστοποίηση απουσίας πρωτεϊνικών προσμίξεων. Εν συνεχεία, ελέγχθηκε η γονιδιωματική ακεραιότητα του DNA, καθώς η υψηλή ποιότητα του κι η απαλλαγή από προσμίξεις είναι απαραίτητες για την επιτυχία της αντίδρασης. Ο έλεγχος έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8% με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος TBE pH 8.3 (44.5 mM Tris, 44.5mM βορικού οξέος, 1 mM EDTA pH 8.0), παρουσία 0.5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου. Τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύθηκαν και φωτογραφήθηκαν υπό ακτινοβολία υπεριώδους με το σύστημα GelDoc (Biorad, Hercules, CA, USA).

3.1.1 Κατακερματισμός DNA

100 ng DNA από κάθε δείγμα υποβλήθηκαν σε ενζυμικό κατακερματισμό, με σκοπό τη δημιουργία θραυσμάτων μέσου μήκους 350-450 bp, τα οποία προορίζονται για το σχηματισμό βιβλιοθήκης από το IonPGM™ System με μήκος ανάγνωσης των 400 βάσεων (400-base-read). Η αντίδραση κατακερματισμού, είναι εξαιρετικά ευαίσθητη καθώς επηρεάζεται από την ακεραιότητα του δείγματος, το χρόνο επώασης και τους χειρισμούς του ερευνητή.

Στη λίστα που ακολουθεί, συνοψίζονται υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον κατακερματισμό του DNA:

Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit:

- Ion Shear™ Plus 10X Reaction Buffer
- Ion Shear™ Plus Enzyme Mix II
- Ion Shear™ Plus Stop Buffer
- Low TE

Υλικά εκτός του kit:

- 50-100 ng DNA
- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες, για αραίωση του δείγματος DNA
- Υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C
- Πάγος
- Προσφάτως παρασκευασμένη αιθανόλη 70%

Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Ανάμιξη 5 μl DNA (αραίωσης 1:10) με 195 μl διαλύματος αντίδρασης αποτελούμενο από dsDNA HS buffer και 1X HS reagent και ποσοτικοποίηση με τη χρήση φθοριομέτρου Qubit3 (Invitrogen).
- Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Qubit3, ρύθμιση της συγκέντρωσης του DNA στα 10 μg/μl με προσθήκη νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες.
- Παρασκευή διαλύματος αντίδρασης κατακερματισμού για κάθε δείγμα ξεχωριστά, τελικού όγκου 50 μl, με διαδοχική προσθήκη 10 μl DNA (100 ng), 25 μl νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες, 5 μl αντιδραστηρίου IonShear™ Plus 10X Reaction Buffer και τέλος 10 μl IonShear™ Plus Enzyme MixII.

- Ανάμιξη των συστατικών του διαλύματος με χρήση πιπέτας και επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για διάστημα 8 min, διάρκεια η οποία ορίζεται από τον κατασκευαστή βάσει του επιθυμητού μήκους θραυσμάτων (350-450 bp).
- Διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης με προσθήκη 5 μl αντιδραστηρίου IonShear™ Plus Stop Buffer, ανάδευση και μεταφορά του μίγματος σε πάγο.

3.1.2. Καθαρισμός του κατακερματισμένου DNA

Η διαδικασία καθαρισμού των θραυσμάτων μήκους 400 bp είχε ως εξής:

- Μεταφορά του διαλύματος αντίδρασης κατακερματισμού σε DNA LoBind tubes (Eppendorf) και προσθήκη 99 μl Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (1.8-φορές τον όγκο δείγματος) περιέχοντα παραμαγνητικά σφαιρίδια, στα οποία προσκολλώνται νουκλεϊκά οξέα μήκους άνω των 150 bp. Ανάδευση, παλμική φυγοκέντρηση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Παλμική φυγοκέντρηση και μεταφορά του μείγματος για 3 min σε μαγνητικό στατώ, το οποίο συγκρατεί τα σύμπλοκα σφαιριδίων-νουκλεϊκών οξέων στα τοιχώματα του σωληναρίου. Αφαίρεση και απόρριψη του υπερκειμένου.
- Διατήρηση του σωληναρίου σε μαγνητικό στατώ και δύο διαδοχικές πλύσεις με επαναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μl 70% αιθανόλης, επώαση για 30 sec με παράλληλη ανάδευση και κατόπιν αφαίρεση και απόρριψη του υπερκειμένου. Επώαση του δείγματος για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό την εξάτμιση υπολειμμάτων αιθανόλης.
- Έκλυση θραυσμάτων DNA από τα σφαιρίδια με προσθήκη 25 μl αντιδραστηρίου Low TE, ισχυρή ανάδευση, παλμική φυγοκέντρηση, επώαση για 1 min σε μαγνητικό στατώ και τελικά μεταφορά του υπερκειμένου, σε νέο PCR σωληνάριο. Σε αυτό το σημείο υπήρχε δυνατότητα συντήρησης του δείγματος σε θερμοκρασία από -30°C έως -10°C.

3.1.3. Πρόσδεση προσαρμογών και επιδιόρθωση εγκοπών (nick repair)

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται σε αυτό το βήμα της αντίδρασης:

Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit

- 10X Ligase Buffer
- DNA Λιγάση
- Πολυμεράση Nick επιδιόρθωσης
- Μίγμα τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTP Mix)
- Low TE

Ion Xpress™ Barcode Adapters Kit

- Ion Xpress™ P1 Adapter
- Ion Xpress™ Barcode X (1 barcode adapter per library)

Άλλα υλικά

- Νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες
- Agencourt™ AMPure™ XP Kit
- Προσφάτως παρασκευασμένη αιθανόλη 70%

Πίνακας Β - 2: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο πρόσδεσης προσαρμογών.

Συστατικά	Ποσότητα (ng/μl)
DNA	50-100 ng
10X LigaseBuffer	~25 μl
Ion P1 Adapter	10 μl
IonXpress™ Barcode X	2 μl
dNTP Mix	2 μl
Nuclease-free Water	2 μl
DNA Ligase	49 μl
Nick Repair Polymerase	8 μl
Σύνολο	100 μl

Σε σωληνάριο PCR 0.2 mL προστέθηκαν τα αντιδραστήρια με τη σειρά που αναφέρονται στον πίνακα, για κάθε δείγμα ξεχωριστά και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σύνδεσης προσαρμογών και επιδιόρθωσης εγκοπών στο θερμοκυκλοποιητή StepOnePlus Real-Time PCR System, (Applied Biosystems) στις ακόλουθες συνθήκες: 25°C για 15 min, 72°C για 5 min και αναμονή στους 4°C. Η δημιουργία των DNA βιβλιοθηκών ολοκληρώθηκε με το πέρας της αντίδρασης, με δυνατότητα αποθήκευσης στους -10°C έως -30°C.

Με τη δράση του ενζύμου λιγάσης (**Ion Xpress Plus Fragment Library**) ενσωματώθηκαν στα δίκλινα 5'-φωσφορυλιωμένα άκρα των θραυσμάτων DNA, συνθετικοί ολιγονουκλεοτιδικοί προσαρμογείς (adapters Ion Xpress Barcode Adapters), ένας γενικός (universal) και ένας ειδικός (corresponding), ο οποίος συμπεριλαμβάνει συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης (barcode) 6-8 νουκλεοτιδίων, τυχαία τοποθετημένων, διαφορετική για κάθε δείγμα. Σε επόμενο στάδιο, οι προσαρμογείς υβριδοποιούνται με συμπληρωματικούς

εκκινητές καθώς και αλληλουχίες συνδεδεμένες με σφαιρίδια Ion Sphere Particles (ISPs) για την ενίσχυση των θραυσμάτων DNA των βιβλιοθηκών.

3.1.4. Καθαρισμός του DNA που φέρει προσδεδεμένους προσαρμογείς

Στο διάλυμα κάθε βιβλιοθήκης έγινε προσθήκη όγκου 100 μl (1x τον όγκο του δείγματος) του συμπαράγοντα Agencourt™ AMPure™ XP και ακολούθησε διαδικασία, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.1.2. Η έκλουση των βιβλιοθηκών έγινε με προσθήκη 20 μl αντιδραστηρίου Low TE, έντονη ανάδευση, παλμική φυγοκέντρηση και μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το DNA που έχει εκλουσθεί σε EppendorfLoBind™ Tube 1,5mL. Η αποθήκευση του DNA έγινε στους -10°C έως -30°C.

3.1.5. Επιλογή μεγέθους βιβλιοθήκης

Απαιτούμενα υλικά:

- LowTE (περιλαμβάνεται στο Ion Plus Fragment Library Kit)
 - E-Gel™ iBase™ unit and E-Gel™ Safe Imager™ trans illuminator combo kit
 - E-Gel™ Size Select™ 2% Agarose Gel
 - Βιβλιοθήκες μήκους διαβασμάτων 400-βάσεων: 50bp DNA μάρτυρα μοριακών μεγεθών
- Η επιλογή μεγέθους βιβλιοθήκης 400 bp πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% ως εξής:
- Σύνδεση του υποδοχέα του gel (iBase) με τη συσκευή οπτικοποίησης (Safe Imager trans illuminator) και επιλογή του προγράμματος Size Select 2%. Τοποθέτηση του πήκτωματος E-Gel Size Select 2% Agarose Gel στον υποδοχέα.
 - Φόρτωμα 20 μl DNA (100 ng) κάθε δείγματος και 10 μl DNA ladder 50 bp (25 ng/ μl, αραιώσης 1:40 με low-TE) στα φρεάτια της πάνω σειράς, με εξαίρεση τις θέσεις #1, #4, #3, #8, όπου προστέθηκαν 25 μl νερού απουσία νουκλεασών. Ισόποση προσθήκη σε αντίστοιχα φρεάτια συλλογής της κάτω σειράς με νερό απουσία νουκλεασών.
 - Αρχικά, ηλεκτροφόρηση για 16 min, ενδεδειγμένος χρόνος για τη συλλογή βιβλιοθηκών μήκους 400 bp και κατόπιν συμπλήρωση των φρεατίων της κάτω σειράς με 10 μl νερού απουσία νουκλεασών. Στη συνέχεια, διακοπτόμενη ηλεκτροφόρηση 0.5 min με παράλληλη οπτικοποίηση, έως ότου το τμήμα 500 bp του ladder φθάσει στο φρεάτιο συλλογής, ένδειξη πως η βιβλιοθήκη μεγέθους περίπου 400 bp βρίσκεται στο φρεάτιο συλλογής. Διακοπή της ηλεκτροφόρησης, συλλογή του διαλύματος βιβλιοθήκης από το

φρεάτιο, προσθήκη 10 μl νερού απουσία νουκλεασών και επανασυλλογή (τελικός όγκος κάθε βιβλιοθήκης 30 μl)

3.1.6. Ενίσχυση και καθαρισμός της βιβλιοθήκης

Απαιτούμενα υλικά για την ενίσχυση:

Ion Plus Fragment Library Kit

- Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity
- Library Amplification Primer Mix
- Low TE

Χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον

- Agencourt™ AMPure™ XP Kit
- Προσφάτως παρασκευασμένη αιθανόλη 70%

Πίνακας Β - 3: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και τον καθαρισμό της βιβλιοθήκης

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity	100 μl
Library Amplification Primer Mix	5 μl
Unamplified library	25 μl
Σύνολο	130 μl

Για τον εμπλουτισμό των θραυσμάτων των βιβλιοθηκών, στα οποία έχουν προσδεθεί ο γενικός και ο αντίστοιχος barcode προσαρμογέας, πραγματοποιήθηκε PCR. Αρχικά, έγινε διαδοχική ανάμειξη 25 μl βιβλιοθήκης με συγκεκριμένο όγκο αντιδραστηρίων για κάθε δείγμα ξεχωριστά, όπως αναφέρεται στον Πίνακα. Το διάλυμα αντίδρασης τελικού όγκου 130 μl χωρίστηκε σε 2 αντιδράσεις των 65 μl, οπότε και μεταφέρθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), όπου η αντίδραση έλαβε χώρα υπό τις εξής συνθήκες:

- Αρχική αποδιάταξη αλυσίδων DNA στους 95°C για 5 min
 - Αποδιάταξη στους 95°C για 15 sec
 - Υβριδισμός εκκινητών στους 58°C για 15 sec
 - Επιμήκυνση στους 70°C για 1 min
 - Αναμονή στους 4°C
- } Επανάληψη της διαδικασίας
για 8 κύκλους

- Επιλέχθηκε μικρός αριθμός κύκλων επανάληψης προκειμένου να αποφευχθεί υπερενίσχυση, η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων και τυχόν λάθη κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της αντίδρασης PCR.

Στη συνέχεια, έλαβε χώρα καθαρισμός του προϊόντος με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων όπως αναφέρεται παραπάνω (παράγραφος 3.1.4), με έκλυση σε τελικό όγκο 20 μl και δυνατότητα αποθήκευσης της βιβλιοθήκης σε θερμοκρασία από -10°C έως -30°C

3.1.7. Ποιοτική αξιολόγηση βιβλιοθηκών

Η συγκέντρωση κάθε σημασμένης με ετικέτα (barcode) βιβλιοθήκης, υπολογίστηκε με ποσοτική PCR (qRT-PCR) (**Ion Library TaqMan Quantitation Kit**) σε θερμοκυκλοποιητή StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), παρουσία αραιωμένης βιβλιοθήκης ελέγχου *E. Coli* DH10 B. Η προετοιμασία των αντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκε σε πάγο ενώ η διαδικασία είχε ως εξής:

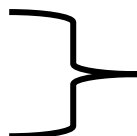
- 5 διαδοχικές, υποδεκαπλάσιες αραιώσεις της βιβλιοθήκης ελέγχου *E. Coli* DH10B, σε νερό απουσία νουκλεασών, τελικού όγκου 50 μl.
- 3 διαδοχικές αραιώσεις κάθε βιβλιοθήκης, λόγων 1:20, 1:2000 και 1:20000, σε τελικό όγκο 20 μl, 100 μl και 50 μl αντίστοιχα, με τη χρήση νερού απουσία νουκλεασών, με σκοπό η τελική της συγκέντρωση να εμπίπτει στο εύρος που ορίζει η πρότυπη καμπύλη της βιβλιοθήκης ελέγχου.

Πίνακας Β - 4: Αντιδραστήρια και ποσότητες αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική αξιολόγηση των βιβλιοθηκών

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Ion Library TaqMan qPCR Mix, 2X	10 μl
Ion Library TaqMan Quantitation Assay, 20X	1 μl
Νερό απουσία νουκλεασών	4 μl
DNA βιβλιοθήκης	5 μl
Σύνολο	20 μl

- Προετοιμασία μίγματος αντιδράσεων, με υπολογισμό του συνολικού αριθμού αραιώσεων των δειγμάτων εις τριπλούν και διαδοχική προσθήκη των αντιδραστηρίων του Πίνακα. Προσθήκη 5 μl DNA βιβλιοθήκης/πρότυπης βιβλιοθήκης ή νερού απουσία νουκλεασών. Μεταφορά των αντιδράσεων τελικού όγκου 20 μl στο θερμοκυκλοποιητή StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), υπό τις ακόλουθες συνθήκες:

- Απενεργοποίηση της UDG στους 50°C για 2 min
- Ενεργοποίηση πολυμεράσης στους 95°C για 20sec
- Ενίσχυση στους 95°C για 1sec
- Θέρμανση στους 95°C για 1sec
- Θέρμανση στους 60°C για 20sec



**Επανάληψη της διαδικασίας
για 40 κύκλους**

- Υπολογισμός αρχικής συγκέντρωσης δειγμάτων βιβλιοθηκών, λαμβάνοντας υπ' όψιν τη συγκέντρωση από την qPCR, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη καθώς και τον παράγοντα αραίωσης ως εξής:

**Αρχική συγκέντρωση βιβλιοθήκης = Συγκέντρωση που υπολογίστηκε από την qPCR (pM)
*παράγοντα αραίωσης.**

3.2. Προετοιμασία προτύπου - DNA template

Η προετοιμασία του DNA προτύπου έγινε με τη χρήση του Ion OneTouch 2 και ο εμπλουτισμός με το Ion OneTouch ES αντίστοιχα, συσκευές οι οποίες συναποτελούν το **Ion OneTouch2 system** ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε το kit **Ion PGM Hi-Q View OT2**. Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, οι DNA βιβλιοθήκες πολλαπλασιάστηκαν με emulsion PCR, συνδεδεμένες σε σφαιρίδια ISPs (Ion PGM Hi-Q View Ion Sphere Particles). Στη συνέχεια, έγινε εμπλουτισμός των template-positive ISPs, δηλαδή των σφαιριδίων που περιείχαν πολλαπλασιασμένα τμήματα βιβλιοθήκης.

Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Καταρχάς, αραίωση κάθε βιβλιοθήκης στα 100pM, βάσει της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε από την qPCR, με την προσθήκη LowTE buffer. Ένωση (pool) 8-10 (χωρητικότητα του chip) βιβλιοθηκών 100 pM, έως τελικό όγκο 20 μl, με σκοπό την ισόποση αντιπροσώπευση των θραυσμάτων κάθε μίας.
- Προετοιμασία του Ion OneTouch 2: Τοποθέτηση 2 recovery tubes με 150 μl recovery solution έκαστο καθώς και του recovery router. Εγκατάσταση νέου amplification plate και disposable injector. Προσθήκη διαλυμάτων Oil και Recovery στα αντίστοιχα tubes, έως ενδεδειγμένη στάθμη και τέλος άδειασμα του waste container.
- Αραίωση pooled βιβλιοθήκης, όπου κάθε δείγμα αντιπροσωπεύεται από 100 pg-400 pg DNA: 6.5 μl βιβλιοθήκης + 18.5 μl νερού απουσία νουκλεασών.
- Παρασκευή του amplification solution. Σε σωληνάριο 2 ml, όπου περιέχονται ήδη 800 μl Ion PGM Hi-Q View Reagent Mix, προστέθηκαν με τη σειρά τα εξής αντιδραστήρια:

Πίνακας Β - 5: Αντιδραστήρια κι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία προτύπου.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
Νερό απουσία νουκλεασών	25 μl
Ion PGM Hi-Q View Enzyme Mix	50 μl
Αραιωμένες βιβλιοθήκες	25 μl
Ion PGM Hi-Q View ISPs	100
Σύνολο	1000 μl

- Μεταφορά με τη χρήση πιπέτας 1000 μl του amplification solution στο sample port του Ion OneTouch Reaction Filter, στερεωμένο κάθετα σε στατώ. Προσθήκη 850 μl Ion OneTouch Reaction Oil εις διπλούν-ορατή η δημιουργία δύο φάσεων. Αναστροφή του Filter με αργή, δεξιόστροφη κίνηση και εφαρμογή των ports στους αντίστοιχους υποδοχείς του Ion OneTouch Reaction Filter. Έναρξη αντίδρασης προετοιμασίας template enriched ISPs, σύμφωνα με οδηγίες οθόνης αφής. Ολοκλήρωση αντίδρασης σε 6 ώρες περίπου.
- Αφαίρεση υπερκειμένου από τα 2 recovery tubes έως στάθμη των 100 μl. Προσθήκη 500 μl Ion OneTouch™ Wash Solution, επαναϊώρηση σφαιριδίων με vortex και ένωση διαλυμάτων σε καινούργιο σωληνάριο 1.5mL. Φυγοκέντρηση σε 15.500g για 2 min και αφαίρεση υπερκειμένου έως τη στάθμη των 100 μl.
- Σε 8 well strip (Ion OneTouch™ ES Supplies Kit), πλήρωση φρεατίων με σειρά από αριστερά (τετράγωνη άκρη) σύμφωνα με τον πίνακα.

Πίνακας Β - 6: Αντιδραστήρια κι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία προτύπου.

# φρεατίου	Συστατικό
#1	100 μl δείγματος template-positive ISPs
#2	130 μl MyOne™ Beads Wash Solution με Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads
#3	300 μl of Ion OneTouch™ Wash Solution
#4	300 μl of Ion OneTouch™ Wash Solution
#5	300 μl of Ion OneTouch™ Wash Solution
#6	Κενό
#7	300 μl Melt-Off Solution (280 μl Tween + 40 μl 1M NaOH)
#8	Κενό

Τοποθέτηση του 8 well strip στο Ion OneTouch™ ES, με την τετράγωνη άκρη προς τα αριστερά. Στη συνέχεια, εφαρμογή καινούργιου ρύγχους σε Tip Loader και PCR σωληναρίου 0.2mL με 10 μl Neutralization Solution σε αντίστοιχη υποδοχή. Έναρξη διαδικασίας εμπλουτισμού, διάρκειας περίπου 35 min. Συλλογή PCR σωληναρίου, όπου περιέχονται περί τα 230 μl εμπλουτισμένων ISPs προς ανάγνωση αλληλουχίας.

Για την παρασκευή σφαιριδίων ISPs (Ion PGM Hi-QView Ion Sphere Particles), εμπλουτισμένων με τις αλληλουχίες DNA που υπάρχουν στις βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν, χρησιμοποιήθηκε το IonOneTouch2 system, το οποίο αποτελείται από τα όργανα Ion OneTouch 2 και IonOneTouch ES και το kit **Ion PGM Hi-QView OT2**.

Παρασκευάστηκαν 1000 μl διαλύματος ενίσχυσης με την ανάμιξη των αντιδραστηρίων του kit (Ένζυμα, Συμπαραγοντες και ISPs) με 25 μl ποσότητας DNA βιβλιοθηκών (400 bp) αραιωμένων σε 100pm ISPs και κατά την ενίσχυση των κλώνων DNA προέκυψε εναιώρημα σφαιριδίων ενισχυμένων κλωνικά και μη κλωνικά, αλλά και κενών.

Ακολούθησε εμπλουτισμός με χρήση του οργάνου Ion OneTouch ES και του kit **Ion PGM Hi-Q View OT2**, για την απομάκρυνση των ISPs που δεν έλαβαν βιβλιοθήκη.

3.3. Ανάγνωση αλληλουχίας

Η ανάγνωση αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε σε Ion 318™ Chip, χωρητικότητας 8-10 δειγμάτων βιβλιοθηκών gDNA από *H. pylori*, με χρήση της συσκευής Ion PGMsystem, διαβασμάτων 400bp, σε 850 ροές εργασίας (workflows), σε συνδυασμό με το kit Ion PGM™ Hi-Q™View Sequencing. Η διαδικασία είχε ως εξής:

- Καθαρισμός του sequencer με νερό 18MΩ. Αρχικά, ξέπλυμα δοχείων και sippertubes με νερό 18MΩ. Πλήρωση δοχείου Wash1 με 250mL νερού 18MΩ και τοποθέτησή του μαζί με κενά δοχεία W2 και W3 στις αντίστοιχες θέσεις. Καθαρισμός sequencer σύμφωνα με οδηγίες οθόνης αφής.
- Πραγματοποίηση initialization. Καταρχάς, πλήρωση του δοχείου W2 με: 2L νερού 18MΩ, σύνολο του Ion PGM™Hi-Q™View Sequencing W2 Solution και 70 μl φρέσκου διαλύματος NaOH 100mM. Κατόπιν πλήρωση των δοχείων W1 και W3 με 350 μl φρέσκου διαλύματος NaOH 100mM και Ion PGM™Hi-Q™View Sequencing W3 Solution έως την ένδειξη των 50mL αντίστοιχα. Initialization παρουσία cleaning chip στον sequencer-διαδικασία επαναληπτικής μέτρησης pH (reiteration) και ρύθμιση στη βέλτιστη τιμή 7.55, διάρκειας έως 30 min. Παράλληλα, προετοιμασία Reagent bottles με ετικέτες και μεταφορά 20 μl stock solution αντίστοιχων dNTPs. Με καινούργια

γάντια, προσαρμογή νέων sippertubes και reagent bottles στους αντίστοιχους dNTP υποδοχείς. Με το πέρας του initialization, αυτόματη πλήρωση κάθε reagent bottle με 40 mL W2 solution και μέτρηση pH στο επιθυμητό εύρος, από συσκευή.

- Επιλογή χαρακτηριστικών του run (Plan Run) από Torrent Server, όπου επιλέγονται μεταξύ άλλων τα plugins (coverage analysis και variant caller) ο τύπος του chip (Ion 318™ ChipKit v2) ενώ εισάγεται και ο κωδικός της βιβλιοθήκης κάθε δείγματος.
- Προσθήκη 5 μl Control ISPs στο σύνολο του όγκου των εμπλουτισμένων, template-positive ISPs, σε σωληνάριο PCR 0.2mL. Φυγοκέντρηση στα 15.000g για 2 min. Απόρριψη του υπερκευμένου πλην 15 μl και προσθήκη 12 μl Sequencing Primer. Υβριδοποίηση του Sequencing Primer σε θερμοκυκλοποιητή στους 95°C και έπειτα στους 37°C για 2 min αντίστοιχα. Με το πέρας της αντίδρασης, προσθήκη 3 μl Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerase σε τελικό όγκο 30 μl. Ανάδευση διαλύματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
- Στο μεταξύ, χρήση του ίδιου cleaning chip με initialization και σύμφωνα με οδηγίες της οθόνης, καθαρισμός “fluidlines”. Απουσία γαντιών, γείωση για την αποφυγή ηλεκτροστατικών φαινομένων που ενδέχεται να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα του chip, με επαφή των δακτύλων σε ειδική επιφάνεια του sequencer. Από συσκευασία νέου chip, σημείωση τρέχοντος run και αντικατάσταση του cleaning chip. Σκανάρισμα του barcode και επιλογή Chip check. Κατόπιν επανατοποθέτηση του cleaning chip και άδειασμα του δοχείου αποβλήτων. Σε σταθερή επιφάνεια, προσεκτικό φόρτωμα ολικού όγκου ISPs με πιπέτα στο loading port και φυγοκέντρηση του chip για 30sec με πλευρά φορτώματος προς τα πάνω.
- Φόρτωμα του chip. Απουσία γαντιών, υπό γωνία 45°, αφαίρεση υγρών με χρήση πιπέτας. Αναποδογύρισμα του chip και φυγοκέντρηση 5sec σε ειδική συσκευή για απομάκρυνση εναπομειναντων υγρών. Ανάδευση δείγματος υπό γωνία 45° με εφαρμογή στο loading port πιπέτας, ρυθμισμένη στα 25 μl, προσεκτικά, απουσία φυσαλίδων. Κατόπιν απομάκρυνση του υγρού, αυξάνοντας σταδιακά τον όγκο αναρρόφησης της πιπέτας.
- Επιλογή και επικύρωση του plannedRun, εγκατάσταση του chip και εκκίνηση της ανάγνωσης αλληλουχίας, διάρκειας 4-7 ωρών.

4. De Novo Assembly

Το σύνολο των διαβασμάτων (400bp reads), που προέκυψαν από την ανάγνωση αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος (WGS) για κάθε ένα από τα 38 κλινικά στελέχη *H. pylori*

συναρμολογήθηκε σε μεγαλύτερα τμήματα με τη μέθοδο de novo assembly, με χρήση του προγράμματος SPAdes 3.13.1. Τα τμήματα αλληλουχίας (contigs) που προέκυψαν δε συνδέονται μεταξύ τους με φυσικό τρόπο, αλλά χωρίζονται από κενά, τμήματα δηλαδή που δε συμπληρώθηκαν κατά την ανάγνωση αλληλουχίας και στο σύνολο τους τα contigs σχηματίζουν ένα ικρίωμα (scaffold). Περαιτέρω συνένωση των contigs προς σχηματισμό πλήρους γονιδιώματος, δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με μεγάλη αξιοπιστία (Baker,2012). Ο αριθμός των διαβασμάτων που μπορεί να συνενωθεί και επομένως το μήκος των contigs, περιορίζεται από την ύπαρξη πολυμορφισμών, επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και τυχόν λαθών στην πορεία της διαδικασίας.

Για τα 37 από τα 38 στελέχη *H. pylori*, που υποβλήθηκαν στη διαδικασία του de novo assembly, το αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία ενός συνόλου contigs, που προέκυψαν από τη συνένωση των διαβασμάτων. Για το 38^ο στέλεχος ολοκληρώθηκε ανεπιτυχώς η πορεία συναρμολόγησης, επομένως το συγκεκριμένο στέλεχος εξαιρέθηκε από την περαιτέρω ανάλυση.

5. Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων

Η Βιοπληροφορική Ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση εφαρμογών του ευριστικού αλγορίθμου BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), με στόχο την εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών στις αλληλουχίες 6 γονιδίων, σε ένα στέλεχος αναφοράς και στα 37 κλινικά στελέχη. Οι μεταλλάξεις των γονιδίων αυτών έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στα τρία υπό μελέτη αντιβιοτικά, την κλαριθρομυκίνη, τη μετρονιδαζόλη και τη λεβοφλοξασίνη.

Οι αλληλουχίες των γονιδίων αναφοράς *23S rRNA*, *rdxA*, *frxA*, *rpsU*, *gyrA*, *gyrB* απομονώθηκαν από το πλήρες γονιδίωμα του στελέχους *H. pylori* 26695, με αριθμό αναφοράς στο NCBI: NC_000915.1, σε μορφή fasta.

Στο πίνακα που ακολουθεί, αναφέρονται οι επιμέρους παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνταξη των εντολών blast, για την κατασκευή των βάσεων δεδομένων και την αναζήτηση και ανάκτησή αλληλουχιών μέσα από αυτές:

Πίνακας Β - 7: Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνταξη εντολών κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση

Παράμετρος	Περιγραφή	
db	Όνομα BLAST βάσης δεδομένων	
dbtype	Τύπος βάσης δεδομένων	
entry	Όνομα - ταυτότητα αλληλουχίας	
input_type	Τύπος δεδομένων που εισάγονται	
line_length	Μέγιστο μήκος αλληλουχίας που εξάγεται	
out	Εξαγωγής δεδομένων	
outfmt 7	Παρουσίαση δεδομένων σε μορφή πίνακα	
qcovs	Ποσοστό μήκους στοίχισης της αλληλουχίας	
query	Όνομα αλληλουχίας αναζήτησης	
range	Εύρος επιλεγμένου μήκους της αλληλουχίας	
strand	Νουκλεοτιδική αλυσίδα που θα εξαχθεί	
title	Όνομα βάσης δεδομένων	
grep	εντοπίζει & εμφανίζει συγκεκριμένη φράση ή λέξη σε ένα αρχείο κειμένου	
std	Προεπιλεγμένες παράμετροι	
Επιμέρους παράμετροι της std	qseqid	Όνομα αλληλουχίας αναφοράς
	sseqid	Όνομα αλληλουχίας στη βάση δεδομένων
	pident	Ποσοστό ταυτόσημων στοιχίσεων
	length	Μήκος αλληλουχίας στοίχισης
	mismatch	Αριθμός λάθους ζευγαρωμάτων βάσεων
	gapopens	Αριθμός κενών στην αλληλουχία
	qstart	Αρχή αλληλουχίας αναφοράς
	qend	Τέλος αλληλουχίας αναφοράς
	sstart	Αρχή αλληλουχίας στη βάση δεδομένων
	ssend	Τέλος αλληλουχίας στη βάση δεδομένων
	evaluate	Αριθμός στοιχίσεων που αναμένεται να βρεθούν τυχαία σε βάση δεδομένων τέτοιου μεγέθους
	bitscore	κανονικοποιημένη βαθμολογία στοίχισης

5.1 Κατασκευή βάσεων δεδομένων

Για κάθε κλινικό στέλεχος *H. pylori* κατασκευάστηκε, με χρήση της εντολής **makeblastdb**, μία βάση δεδομένων BLAST, που περιείχε το σύνολο των αλληλουχιών (contigs) που προέκυψαν από τη συνένωση των διαβασμάτων (reads).

```
makeblastdb -in contigs.fasta -input_type fasta -dbtype nucl -title database -out database
```

Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία 37 βάσεων δεδομένων, μιας για κάθε στέλεχος κάθε ασθενούς.

5.2 Αναζήτηση αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων

Για την εύρεση της αλληλουχίας των 6 γονίδια του ενδιαφέροντός μας, μέσα στις 37 βάσεις δεδομένων και τη σύγκριση με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του στελέχους αναφοράς *H. pylori* 26695, εφαρμόστηκε η εντολή **blastn**. Πραγματοποιήθηκε, βάσει της αλληλουχίας αναφοράς, αναζήτηση της αλληλουχίας με τη μεγαλύτερη ομολογία και οι πληροφορίες που λήφθηκαν αφορούσαν το contig στο οποίο εντοπίστηκε η αλληλουχία, το ποσοστό ομοιότητας με την αλληλουχία αναφοράς, τον αριθμό σημειακών και πλαισιοτροποποιητικών μεταλλάξεων κ.ά. Η εντολή διαμορφώθηκε ως εξής:

```
blastn -db Hp_database -query reference_sequence.fasta -outfmt "7 std qcovs" -out alignment_results.out
```

5.3 Εξαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας από τη βάση δεδομένων

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 5.2, κάθε γονίδιο αναφοράς βρήκε στόχο στην ομόλογη νουκλεοτιδική αλληλουχία της εκάστοτε βάσης δεδομένων. Οι αλληλουχίες των γονιδίων των 37 κλινικών στελεχών *H. pylori* απομονώθηκαν με χρήση της εντολής **blastdbcmd**, η οποία επιτρέπει την εξαγωγή δεδομένων από μια BLASTβάση δεδομένων.

Η εντολή διαμορφώνεται ως εξής:

```
bblastdbcmd -db Hp_database -dbtype nucl -entry all -range start-stop -line_length sequence length -strand plus/ minus | grep "contig's_name"-A1 > gene_sequence.txt
```

6. Ανίχνευση μεταλλαγών

Η στοίχιση των απομονωμένων αλληλουχιών των έξι υπό μελέτη γονιδίων και η καταγραφή διαφορών στη νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία σε σχέση με τα 6 γονίδια του στελέχους αναφοράς *H. pylori* 26695, πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Bioedit 7.2.

7. Στατιστική Ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο GraphPad In Stat 3.0 (GraphPad Software) και πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 και το Fisher's exact test.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Αντοχή του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη

Από το σύνολο των 38 στελεχών που υποβλήθηκαν στη δοκιμασία ευαισθησίας, 25 χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα στην κλαριθρομυκίνη (CLA⁵) με τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, MIC από 0,016 mg/L μέχρι 0,358 mg/L, ενώ τα υπόλοιπα 12 ως ανθεκτικά στο αντιβιοτικό με εύρος τιμών MIC από 0,6 mg/L μέχρι και >256 mg/L. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον **πίνακα Γ-1**.

Πίνακας Γ - 1: Προσδιορισμός ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC, mg/L) των κλινικών δειγμάτων έναντι της κλαριθρομυκίνης (R: Ανθεκτικό, S: Ευαίσθητο στέλεχος στο αντιβιοτικό).

Στέλεχος	MIC (mg/L)	Ευαισθησία/Αντοχή	Στέλεχος	MIC (mg/L)	Ευαισθησία/Αντοχή
Hp-1	0,125	S	Hp-20	32	R
Hp-2	>256	R	Hp-21	0,032	S
Hp-3	0,032	S	Hp-22	0,064	S
Hp-4	0,25	S	Hp-23	0,023	S
Hp-5	0,125	S	Hp-24	0,047	S
Hp-6	0,047	S	Hp-25	0,094	S
Hp-7	0,358	S	Hp-26	0,064	S
Hp-8	0,016	S	Hp-27	0,023	S
Hp-9	>256	R	Hp-28	0,023	S
Hp-10	8	R	Hp-29	>256	R
Hp-11	0,016	S	Hp-30	6	R
Hp-12	0,064	S	Hp-31	>256	R
Hp-13	12	R	Hp-32	0,064	S
Hp-14	0,064	S	Hp-33	0,38	S
Hp-15	0,032	S	Hp-34	0,125	S
Hp-16	>256	R	Hp-35	0,016	S
Hp-17	12	R	Hp-36	>256	R
Hp-18	0,023	S	Hp-37	0,094	S
Hp-19	32	R	Hp-38	6	R

Σημειώνεται ότι για το στέλεχος Hp-38 δεν πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση, επομένως τα αποτελέσματα που αναλύονται στη συνέχεια, αφορούν τα υπόλοιπα 37 στελέχη.

1.1. Μεταλλάξεις στο γονίδιο 23S rRNA

Με χρήση του προγράμματος Bioedit 7.2 έγινε σύγκριση των αλληλουχιών του γονιδίου 23S rRNA, οι οποίες απομονώθηκαν από τα 37 στελέχη, με την αλληλουχία του γονιδίου αναφοράς, όπως αυτή προσδιορίζεται στο στέλεχος αναφοράς *H. pylori* 26695 (NC_000915.1). Πραγματοποιήθηκε καταγραφή των διαφορών ανάμεσα σε αυτές τις αλληλουχίες και παράθεσή τους στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας Γ - 2: Χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις στην αλληλουχία του γονιδίου 23S rRNA, συνδεδεμένες με την ανάπτυξη αντοχής στην κλαριθρομυκίνη και για τις οποίες πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση.

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Στελέχη που φέρουν νουκλεοτιδική αλλαγή (n)	Fisher's exact test	
		P value	Statistically Significant
A2146G	Hr-2, Hr-13, Hr-16, Hr-29, Hr-31	0.0018	V
A2147G	Hr-10, Hr-19, Hr-30, Hr-36	0,0075	V
A2146G & A2147G		< 0.0001	E

*V (very): στατιστικά πολύ σημαντική διαφορά

**E (extremely): στατιστικά πάρα πολύ σημαντική διαφορά

Σύμφωνα με τον **πίνακα Γ-2**, η αντικατάσταση της νουκλεοτιδικής βάσης αδενίνης από γουανίνη στις θέσεις 2146 και 2147 εντοπίζεται σε 5 και 4 ανθεκτικά στελέχη αντίστοιχα, όχι όμως σε ευαίσθητα στην κλαριθρομυκίνη στελέχη (**Εικόνα ΣΤ-1, Παράρτημα**). Μάλιστα, με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Fisher's exact για την παρουσία κάθε μετάλλαξης στο γονίδιο 23S rRNA ξεχωριστά, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη ($p < 0,05$), η οποία εμφανίζεται ακόμα μεγαλύτερη στη δοκιμασία ελέγχου, στην οποία αξιολογήθηκε η παρουσία των δύο μεταλλάξεων συνολικά στα ανθεκτικά στελέχη ($p < 0.0001$).

Πίνακας Γ - 3: Νουκλεοτιδικές αλλαγές του γονιδίου 23S rRNA, εντοπισμένες σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη, για τις οποίες πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση.

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Στελέχη που φέρουν νουκλεοτιδική αλλαγή (n)			Fisher's	exact test
	Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=12)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=25)	P value	Statistically Significant
C459T	14	7	7	0.0787	NS
A496G	20	9	11	0.0768	NS
C2924T	8	5	3	0.0549	NS
T247C	18	4	14	0.1739	NS
T471G	15	5	10	0.5995	NS
C977(T/G/A)	17	7	10	0.2434	NS
G1517(C/T)	7	1	6	0.2531	NS
G1567T	9	3	6	0.6242	NS
C1568A	9	3	6	0.6242	NS
A1825G	19	6	13	0.5930	NS
G1830A	19	6	13	0.5930	NS
T1834C	18	6	12	0.5930	NS
T2186C	3	2	1	0.2407	NS
G2868A	28	9	19	0.6242	NS
G2921A	12	3	9	0.3908	NS

*NS (not significant): Όχι στατιστικά σημαντικό

Το σύνολο νουκλεοτιδικών αλλαγών που καταγράφονται στον πίνακα Γ-3, εντοπίστηκε τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη και η καταγραφή έγινε σε συνδυασμό με τον υπολογισμό:

- του αριθμού στελεχών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό στελεχών
- του αριθμού ανθεκτικών (Hachem) σε σχέση με το συνολικό αριθμό των ανθεκτικών
- του αριθμού ευαίσθητων (CLA⁵) σε σχέση με το συνολικό αριθμό ευαίσθητων στελεχών.

Με την εφαρμογή της στατιστικής δοκιμασίας Fisher's exact διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει διαφορά στην παρουσία των μεταλλάξεων αυτών στο γονίδιο 23S rRNA ανάμεσα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη ($p > 0.05$). Παρ' όλ' αυτά, οι μεταλλάξεις **C459T**, **A496G** και **C2924T** φαίνεται να δίνουν στατιστικά οριακή κατανομή μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών και ενδεχομένως χρήζουν περισσότερο προσεκτικής ανάλυσης σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών. Επισημαίνεται στον πίνακα, με κόκκινο χρώμα, η αντικατάσταση της νουκλεοτιδικής βάσης θυμίνης από κυτοσίνη στη θέση 2186 (T2186C), καθώς βιβλιογραφικά αναφέρεται ως μετάλλαξη σχετιζόμενη με την ανάπτυξη αντοχής στην CLA, ωστόσο στην παρούσα εργασία κατεγράφη και σε ένα στέλεχος ευαίσθητο στο αντιβιοτικό.

Άλλες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν αποκλειστικά σε ανθεκτικά και όχι σε ευαίσθητα στελέχη είναι οι **A44G, G380T, G2224A** στο στέλεχος Hr-9, οι **G389A, G1342A** στο στέλεχος Hr-10, οι **C1003T, G2270C** στο στέλεχος Hr-31 και τέλος οι **C1582T, A20G, C948T, T77C** στα στελέχη Hr-16, Hr-17, Hr-20 και Hr-36 αντίστοιχα.

Πίνακας Γ - 4: Νουκλεοτιδικές αλλαγές του γονιδίου 23S rRNA εντοπισμένες σε μικρό αριθμό ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών.

Στελέχη που φέρουν Νουκλεοτιδική Αλλαγή (n)				
Νουκλεοτιδική αλλαγή	Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=12)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=25)	
G200A	3	2	1	Αλλαγές που εντοπίζονται σε μικρό αριθμό στελεχών
A234G	2	1	1	
247G/A	6	3	3	
A381G	4	2	2	
A407G	2	1	1	
C512T	2	1	1	
A724G	6	2	4	
C2777T	5	1	4	
G2923T	2	1	1	

Οι μεταλλάξεις που παρουσιάζονται στον **Πίνακα Γ-4**, όπως και εκείνες στον **πίνακα Γ-3**, εντοπίστηκαν σε ευαίσθητα αλλά και ανθεκτικά στελέχη, ωστόσο δεν πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Fisher's exact για την αξιολόγηση της στατιστικής σημασίας τους, καθώς αυτές βρέθηκαν σε πολύ μικρό αριθμό στελεχών.

Πέραν των όσων έχουν ήδη αναφερθεί, έχουν καταγραφεί και οι παρακάτω σημειακές μεταλλάξεις:

- οι αντικαταστάσεις A1179G, C1185G και T1691C σε όλα τα στελέχη (n=37/37)
- η μετάλλαξη G1517A σε όλα τα ανθεκτικά και σε 22/25 ευαίσθητα στελέχη (σύνολο n=34/37)
- η αντικατάσταση τριών νουκλεοτιδικών βάσεων TTA → AAT στις θέσεις 242-244 σε τέσσερα ευαίσθητα στελέχη (Hr-3, Hr-11, Hr-23, Hr-27).
- η αναστροφή TTA→AAT στις θέσεις 242-245 σε δύο ευαίσθητα (Hr-33, Hr-37) και δύο ανθεκτικά (Hr-9, Hr-30) στελέχη

Τέλος, κατά τη σύγκριση και μελέτη των αλληλουχιών, κατεγράφησαν πλακαιοτροποποιητικές μεταλλάξεις και συγκεκριμένα αναφέρεται η έλλειψη αδενίνης στη θέση 57 σε 36/37 στελέχη (εξαιρείται το ευαίσθητο στέλεχος Hr-11) και η έλλειψη γουανίνης στη θέση 211 σε ένα ανθεκτικό (Hr-19) και τέσσερα ευαίσθητα (Hr-18) στελέχη.

2. Αντοχή του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη

Ο φαινοτυπικός προσδιορισμός της αντοχής του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη είχε ως αποτέλεσμα το χαρακτηρισμό:

- 17 στελεχών ως ανθεκτικά με τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, MIC από 24 mg/L μέχρι και >256 mg/L,
- 1 στελέχους ως μετρίως ευαίσθητου (MET¹) με τιμή MIC 8 mg/L και
- 20 στελεχών ως ευαίσθητα (MET⁵) στο αντιβιοτικό με εύρος τιμών MIC γι' αυτά 0,016 mg/L μέχρι 1,5 mg/L.

Πίνακας Γ - 5: Προσδιορισμός ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC, mg/L) των κλινικών δειγμάτων έναντι της έναντι της μετρονιδαζόλης. (R: Ανθεκτικό, S: Ευαίσθητο, I: Μετρίως Ευαίσθητο στέλεχος στο αντιβιοτικό).

Στέλεχος	MIC (mg/L)	Ευαισθησία/Αντοχή	Στέλεχος	MIC (mg/L)	Ευαισθησία/Αντοχή
Hp-1	1,5	S	Hp-20	>256	R
Hp-2	0,094	S	Hp-21	>256	R
Hp-3	>256	R	Hp-22	0,75	S
Hp-4	4	S	Hp-23	256	R
Hp-5	0,38	S	Hp-24	>256	R
Hp-6	24	R	Hp-25	256	R
Hp-7	>256	R	Hp-26	>256	R
Hp-8	0,75	S	Hp-27	0,25	S
Hp-9	0,38	S	Hp-28	>256	R
Hp-10	>256	R	Hp-29	0,25	S
Hp-11	>256	R	Hp-30	0,38	S
Hp-12	1	S	Hp-31	0,25	S
Hp-13	0,016	S	Hp-32	32	R
Hp-14	>256	R	Hp-33	0,25	S
Hp-15	>256	R	Hp-34	0,75	S
Hp-16	0,19	S	Hp-35	8	I
Hp-17	0,75	S	Hp-36	0,38	S
Hp-18	>256	R	Hp-37	1,5	S
Hp-19	>256	R	Hp-38	0,25	S

Η γονοτυπική ανίχνευση της αντοχής πραγματοποιήθηκε με τη διερεύνηση μεταλλάξεων στις αλληλουχίες των γονιδίων *rdxA*, *frxA* και *rpsU* για καθένα από τα 37 στελέχη που υποβλήθηκαν επιτυχώς στη διαδικασία της ανάγνωσης αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος (WGS) και οι αλληλουχίες αυτών συναρμολογήθηκαν *de novo*.

2.1. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *rdxA*

Αποτέλεσμα της σύγκρισης της αλληλουχίας του γονιδίου *rdxA* που απομονώθηκε από τα 37 στελέχη, με την αλληλουχία του στελέχους αναφοράς *H. pylori* 26695 (NC_000915.1) ήταν η εύρεση και καταγραφή των διαφορών σε επίπεδο νουκλεοτιδικής και αμινοξικής ακολουθίας. Στον **πίνακα Γ-6** παρατίθενται μεταλλάξεις (**C94T**, **C193T** και **C242A**) στα ανθεκτικά στελέχη Hr-28, Hr-10, Hr-24, αποτέλεσμα των οποίων είναι η δημιουργία κωδικονίων λήξης (E32, Q65 και S81 αντίστοιχα) και επομένως ο πρόωρος τερματισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Πίνακας Γ - 6: Πρόωρα κωδικόνια λήξης, αποτέλεσμα αντικατάστασης μιας νουκλεοτιδικής βάσης σε τρία στελέχη ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	STOR CODON
Hr -28	G94T	GAA-->TAA	E32
Hr -10	C193T	CAA-->TAA	Q65
Hr -24	C242A	TCA-->TAA	S81

Πίνακας Γ - 7: Νουκλεοτιδικές & αμινοξικές αλλαγές στο γονίδιο *rdxA* που εντοπίζονται σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη και για τις οποίες πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση.

Στελέχη που φέρουν Αμινοξική Αλλαγή (n)				Fisher's exact test ²			
Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή	Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=17)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=20)	P value	Statistically Significant
A18C	CAA-->CAC	Q6H	14	6	8	0.5192	NS
GA(91-92)AC	ACA-->GAA	T31E	13	6	7	0.6267	NS
G269A	AGA-->AAA	R90K	17	7	10	0.4190	NS
C289T CAC(289-292)ACT	CAC->TAC CAC->ACT	H97(Y/T)	12	6	6	0.5024	NS
G352(A/T)	GCT->TC(A/T)	A118(T/S)	10	5	5	0.5259	NS
G392A	AGA->AAA	R131K	11	8	3	0.0630	NS
G514A	GTT->ATT	V172I	8	5	3	0.2543	NS
G523C	GAG->CAG	E175Q	7	4	3	0.4037	NS

*NS (non significant): Όχι στατιστικά σημαντικό

Οι αλλαγές σε επίπεδο νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας, καθώς και στα κωδικόνια που κωδικοποιούν τα εν λόγω αμινοξικά κατάλοιπα, οι οποίες εντοπίστηκαν τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη στελέχη, καταγράφονται στον **πίνακα Γ-7**.

Σε αυτόν καταγράφεται:

- ο αριθμός στελεχών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό στελεχών (n=37)
- ο αριθμός ανθεκτικών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό 17 ανθεκτικών στελεχών
- ο αριθμός ευαίσθητων (MET^S) που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό 20 ευαίσθητων στελεχών.

Εφαρμόστηκε η στατιστική δοκιμασία Fisher's exact και διαπιστώθηκε ότι ανάμεσα στελέχη σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στη μετρονιδαζόλη, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία των μεταλλάξεων αυτών στο γονίδιο *rdxA* ($p > 0.05$). Μόνο στην περίπτωση **G392A** παρατηρήθηκε οριακά μη-στατιστικά σημαντική κατανομή μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών και επομένως ενδεχομένως να χρήζει περαιτέρω ανάλυσης σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών.

Πίνακας Γ - 8: Αλλαγές νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας στο γονίδιο *rdxA* που εντοπίζονται μόνο σε ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη στελέχη.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή
Hr-11	A88G	AGC-->GGC	S30G
	GT(527-528)AC	CGT-->CAC	R176H
Hr-24	A329G	AAA-->AGA	K110R
Hr-20	C388A	CAA-->AAA	Q130K
Hr-25	C130T	CCA-->TCA	P44S
Hr-28	G488A	GGC-->GAC	G163D
Hr-19, Hr-24	A329G	AAA-->AGA	K110R

Στον **πίνακα Γ-8** καταγράφονται μεταλλάξεις του γονιδίου *rdxA*, που εντοπίζονται μόνο στα 6 από τα 17 στελέχη, που είναι ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη και μάλιστα κάθε μία από αυτές είναι μοναδική για το συγκεκριμένο στέλεχος, στο οποίο εμφανίζεται. Στον πίνακα παρατίθενται αλλαγές στη νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία, καθώς και στα

κωδικόνια που κωδικοποιούν τα εν λόγω αμινοξικά κατάλοιπα και χαρακτηριστικά αναφέρονται τρεις εξ' αυτών, οι S30G και R176H στο στέλεχος Hρ-11 και η K110R στα ανθεκτικά στελέχη Hρ-19, Hρ-24.

Πίνακας Γ - 9: Νουκλεοτιδικές & αμινοξικές αλλαγές στο γονίδιο *rdxA*, που εντοπίζονται σε περιορισμένο αριθμό στελεχών, ευαίσθητων και ανθεκτικών στη μετρονιδαζόλη.

Στελέχη που φέρουν Αμινοξική Αλλαγή (n)					
Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή	Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=17)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=20)
G47A	CGC-->CAC	R16H	2	1	1
A74G	CAT->CGT	H25R	3	2	1
G168A	ATG-->ATA	M56I	3	1	2
C173T	ACT-->ATT	T58I	2	1	1
T184G	TTA-->GTA	L62V	2	1	1
A192T	AAA-->AAT	K64N	4	3	1
T262C	TCT-->CCT	S88P	2	1	1
G292A	GGC-->AGC	G98S	2	1	1
C316T	CCG-->TCG	P106S	2	1	1
T322G	TCT-->GCT	S108A	3	1	2
T332C	GTT-->GCT	V111A	2	1	1
GT(367-368)AC	GTG-->ACG	V123T	2	1	1
GT(548-549)TG	GCA-->GTG	A183V	5	3	2
C589A	CAA-->AAA	Q197K	2	1	1
G610A	GTT-->ATT	V204I	5	3	2

Στον **Πίνακα 3-9** καταγράφονται μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε περιορισμένο αριθμό ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών και για τις οποίες δεν ακολούθησε αξιολόγηση της στατιστική σημαντικότητας. Εκτός των μεταλλάξεων που παρατίθενται στον πίνακα, έχει καταγραφεί επίσης, η αμινοξική αλλαγή D59S σε ένα ευαίσθητο στέλεχος και D59N στα υπόλοιπα 36 στελέχη.

Όσον αφορά στις πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις, έχουν βρεθεί

- ελλείψεις στις νουκλεοτιδικές θέσεις 384-388 (c.384_388insACAG), 406 (c.406delA) και 435 (c.435delG) στα στελέχη Hρ-14, Hρ-15 και Hρ-19 αντίστοιχα, στελέχη ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη.

- έλλειψη 6 αμινοξικών καταλοίπων (p.KRRQLL8_13del) στις θέσεις 8 έως 13 στο ανθεκτικό στέλεχος Hr-18.

Τέλος, σε όλα τα στελέχη, καταγράφονται και σιωπηλές μεταλλάξεις, δηλαδή αλλαγές στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων του γονιδίου *rdxA*, οι οποίες δεν οδηγούν σε αλλαγή αμινοξικού καταλοίπου (Πίνακες E-1, E-2, Παράρτημα)

2.2. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *frxA*

Μελετώντας τον πίνακα Γ-10, διαπιστώνουμε ότι οι μεταλλάξεις που αναφέρονται μόνο σε ανθεκτικά στελέχη, σχεδόν στο σύνολό τους είναι μοναδικές για κάθε στέλεχος, με εξαίρεση τις αλλαγές τις F42S και G73S που εντοπίζονται στα στελέχη Hr-6, Hr-11, Hr-15 και Hr-23.

Πίνακας Γ - 10: Αλλαγές νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας στο γονίδιο *frxA* που εντοπίζονται μόνο σε ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη στελέχη.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή
Hr-7	G369T	GAG-->GAT	E123D
Hr-14	C546A	AAC-->AAA	N182K
Hr-15	A14G	CAA-->CGA	Q5R
Hr-19	C254T	GCG-->GTG	A85V
Hr-19	G389A	AGC-->AAC	S130N
Hr-20	A544G	AAC-->GAC	N182D
Hr-23	G46A, A48G	GCA-->ACG	A16T
	A130G	ATC-->GTC	I44V
	G198T	ATG-->ATT	M66I
	G286A	GTT-->ATT	V96I
	A386C	AAT-->ACT	N129T
	AG(388-389)GA	AGC-->GAC	S130D
Hr-28	C484G	CCG-->GCG	P162A
Hr-6, Hr-11, Hr-15, Hr-23	T215C	TTT-->TCT	F72S
	G217A	GGT-->AGT	G73S
Hr-11, Hr-15	T219C	GGT-->GGC	G73S
Hr-10, Hr-30	G505A	GAA-->AAA	E169K
Hr-10, Hr-15	G517A	GCT-->ACT	A173T

Αναφέρονται επίσης οι μεταλλάξεις:

- E75D (A225T) στο ευαίσθητο στέλεχος Hr-9
- T110S (A328T) σε ένα ανθεκτικό (Hr-7) και ένα ευαίσθητο (Hr-35) στέλεχος και
- N111H (A331C) στο ανθεκτικό στέλεχος Hr-23 και στο ευαίσθητο Hr-33, για τις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική δοκιμασία, καθώς εντοπίστηκαν σε πολύ μικρό αριθμό στελεχών.

Από τη σύγκριση των 37 αλληλουχιών με την αλληλουχία του γονιδίου *frxA* του στελέχους αναφοράς διαπιστώνεται η ύπαρξη όχι μόνο σημειακών, αλλά και πλαισιοτροποποιητικών μεταλλάξεων και συγκεκριμένα των ελλείψεων:

- c.124delT στο ανθεκτικό στέλεχος Hr-11
- c.54delA σε 11 ανθεκτικά και 8 ευαίσθητα στελέχη
- c.216delT στο ευαίσθητο στέλεχος Hr-27

και της προσθήκης νουκλεοτιδίου με αζωτούχο βάση αδενίνη στη θέση 55 (c.55insA) στο ευαίσθητο στέλεχος Hr-1, η οποία έχει αποτέλεσμα τη δημιουργία stop codon στη θέση του αμινοξικού καταλοίπου 22.

Πίνακας Γ - 11: Νουκλεοτιδικές & αμινοξικές αλλαγές στο γονίδιο *frxA* που εντοπίζονται σε περιορισμένο αριθμό ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών.

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή	Στελέχη που φέρουν Αμινοξική Αλλαγή (n)			Fisher's exact test ²	
			Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=17)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=20)	P value	Statistically Significant
G19A	GTT-->ATT	V7I	11	3	8	0.1308	NS
C70T G71A	CGT-->AGT CGT-->CAT	R24(C/E)	2	0	2	0.2853	NS
C209T	GCG-->GTG	A70V	4	1	3	0.3668	NS
A352T	ATC-->TTC	I118F	4	1	3	0.3668	NS
A376T & G378T	ATG-->TTG	M126F	6	4	2	0.2531	NS
T577A	TGT-->AGT	C193S	4	3	1	0.2420	NS

*NS (non significant): Όχι στατιστικά σημαντικό

Οι αλλαγές σε επίπεδο νουκλεοτιδικής (γονίδιο *frxA*) και αμινοξικής αλληλουχίας, καθώς και στα κωδικόνια που κωδικοποιούν τα εν λόγω αμινοξικά κατάλοιπα, οι οποίες εντοπίστηκαν τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη στελέχη, καταγράφονται στον **πίνακα Γ-11**.

Σε αυτόν καταγράφεται:

- ο αριθμός στελεχών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό στελεχών (n=37)
- ο αριθμός ανθεκτικών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό 17 ανθεκτικών στελεχών
- ο αριθμός ευαίσθητων (MET^S) που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό 20 ευαίσθητων στελεχών.

Εφαρμόστηκε η στατιστική δοκιμασία Fisher's exact και διαπιστώθηκε ότι ανάμεσα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στη μετρονιδαζόλη στελέχη, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία των μεταλλάξεων αυτών στο γονίδιο *frxA* ($p > 0.05$).

Πέραν των σημειακών μεταλλάξεων που αναφέρονται στους πίνακες, έχει καταγραφεί και μία πλαισιοτροποποιητική αλλαγή και συγκεκριμένα έλλειψη αδενίνης στη θέση 54 (c.54delA), στα ανθεκτικά στελέχη Hr-3, Hr-6, Hr-7, Hr-10, Hr-11, Hr-14, Hr-18, Hr-20, Hr-24, Hr-26 και Hr-28 και στα ευαίσθητα Hr-12, Hr-16, Hr-17, Hr-22, Hr-29, Hr-30, Hr-34, Hr-35. Τέλος, για το γονίδιο *frxA* πραγματοποιήθηκε καταγραφή σιωπηλών μεταλλάξεων (Πίνακες E-3, E-4, Παράρτημα).

2.3. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsU*

Εικόνα Γ - 1: Παράθεση αμινοξικών αλληλουχιών, που κωδικοποιούνται από το γονίδιο *rpsU*, ανθεκτικών και ευαίσθητων στη μετρονιδαζόλη στελεχών, συγκριτικά με την ακολουθία του γονιδίου αναφοράς (στέλεχος *H. pylori* 26695).



Από την ανάκτηση των 37 νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, μήκους 213 ζευγών βάσεων του γονιδίου *rpsU* και τη σύγκρισή τους με αλληλουχία προερχόμενη από το στέλεχος αναφοράς *H. pylori* 26695 (NC_000915.1) διαπιστώθηκε η ύπαρξη μιας μοναδικής νουκλεοτιδικής αλλαγής, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή αμινοξικού καταλοίπου κι αυτή είναι η V56I, εντοπισμένη μόνο στο ευαίσθητο σε μετρονιδαζόλη στέλεχος Hr-1 (**Εικόνα Γ-1**). Οι υπόλοιπες αντικαταστάσεις βάσεων που εντοπίστηκαν, αποτελούν σιωπηλές μεταλλάξεις και δεν τροποποιούν την αμινοξική ακολουθία (**Πίνακας Ε-5**, Παράρτημα).

3. Αντοχή του *H. pylori* στη λεβοφλοξασίνη

Από το σύνολο των 38 στελεχών που υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ευαισθησίας στη λεβοφλοξασίνη κατεγράφησαν:

- 4 ως ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη (LEV^R) με τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, MIC από 4 mg/L μέχρι 32 mg/L
- 1 στέλεχος ως μετρίως ευαίσθητο (LEV^I) με τιμή MIC 0,75 mg/L

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 33 ως ευαίσθητα (LEV^S) στο αντιβιοτικό και το εύρος τιμών MIC γι' αυτά είναι 0,032-0,5 mg/L. Όπως και κατά τη γονοτυπική ανίχνευση της αντοχής στην κλαριθρομυκίνη και τη μετρονιδαζόλη, έτσι και στην περίπτωση της λεβοφλοξασίνης, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση μεταλλάξεων στις αλληλουχίες των γονιδίων *gyrA* και *gyrB* για καθένα από τα 37 στέλεχη που υποβλήθηκαν επιτυχώς στη διαδικασία της ανάγνωσης αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος (WGS) και οι αλληλουχίες αυτών συναρμολογήθηκαν *de novo*.

Πίνακας Γ - 12: Προσδιορισμός ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC, mg/L) των κλινικών δειγμάτων έναντι της μετρονιδαζόλης. (R: Ανθεκτικό, S: Ευαίσθητο, I: Μετρίως Ευαίσθητο στέλεχος στο αντιβιοτικό).

Στέλεχος	MIC (mg/L)	Ευαισθησία/Αντοχή	Στέλεχος	MIC (mg/L)	Ευαισθησία/Αντοχή
Hp-1	0,25	S	Hp-20	0,25	S
Hp-2	0,125	S	Hp-21	>32	R
Hp-3	0,125	S	Hp-22	0,38	S
Hp-4	0,75	I	Hp-23	0,032	S
Hp-5	0,19	S	Hp-24	0,032	S
Hp-6	0,094	S	Hp-25	0,125	S
Hp-7	4	R	Hp-26	32	R
Hp-8	0,25	S	Hp-27	0,094	S
Hp-9	0,064	S	Hp-28	0,064	S
Hp-10	0,125	S	Hp-29	0,032	S
Hp-11	0,064	S	Hp-30	0,094	S
Hp-12	0,75	S	Hp-31	0,19	S
Hp-13	0,125	S	Hp-32	0,5	S
Hp-14	0,25	S	Hp-33	0,38	S
Hp-15	0,125	S	Hp-34	0,19	S
Hp-16	0,064	S	Hp-35	0,032	S
Hp-17	0,094	S	Hp-36	8	R
Hp-18	0,064	S	Hp-37	0,75	S
Hp-19	0,38	S	Hp-38	0,064	S

3.1. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA*

Πίνακας Γ - 13: Αλλαγές νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας που εντοπίζονται μόνο σε ανθεκτικά στελέχη. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνεται η χαρακτηρισμένη μετάλλαξη D91Y στο γονίδιο *gyrA*, υπεύθυνη για την ανάπτυξη αντοχής στη λεβοφλοξασίνη

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Τριπλέτα	Αμινοξική αλλαγή
Hr-7	G271T	GAT → TAT	D91Y
	T1430C	GTC → GCC	V477A
	G1576A	GAA → AAA	E526K
	G1874A	CGC → CAC	R625H
	G1939A	GGC → AGC	G647S
Hr-21	G7A	GAT → AAT	D3N
	C1099T	CGC → TGC	R367C
Hr-26	G1244A	CGT → CAT	R415H
	GA(1360-1361)AG	GAT → AGT	D454S
	T1860A	AAT → AAA	N620K

Το αποτέλεσμα της σύγκρισης των 37 αλληλουχιών των κλινικών στελεχών με το γονίδιο *gyrA* του στελέχους αναφοράς ανέδειξε την απουσία σημειακών μεταλλαγών στην περιοχή QRDR (quinolone resistance-determining regions), η οποία όπως δηλώνει και το όνομά της εμπλέκεται στην ανάπτυξη αντοχής στη λεβοφλοξασίνη. Όπως αναφέρεται και στον **πίνακα Γ-12**, ένα μοναδικό ανθεκτικό στέλεχος, το Hr-7, έφερε τη μετάλλαξη D91Y, η οποία συνδέεται με την αντοχή στο εν λόγω αντιβιοτικό (Εικόνα ΣΤ-2, Παράρτημα). Οι υπόλοιπες αμινοξικές αλλαγές που αναφέρονται στον πίνακα Γ-12, είναι εκτός αυτής της περιοχής και αφορούν αποκλειστικά ανθεκτικά στελέχη.

Στον **πίνακα Γ-14** συγκεντρώνεται το σύνολο των νουκλεοτιδικών και των αντίστοιχων αμινοξικών αλλαγών που εντοπίζονται στην αλληλουχία του γονιδίου *gyrA* και στην πρωτεϊνική ακολουθία που κωδικοποιείται από αυτό. Οι μεταλλάξεις υπάρχουν τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη και καταγράφονται ως εξής:

- αριθμός στελεχών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό στελεχών
- αριθμός ανθεκτικών (LEV^R) που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το σύνολο των ανθεκτικών στελεχών
- αριθμός ευαίσθητων (LEV^S) που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το σύνολο των ευαίσθητων στελεχών

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας Γ - 14: Αλλαγές νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας στο γονίδιο *gyrA* που εντοπίζονται σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη.

Στελέχη που φέρουν Αμινοξική Αλλαγή (n)			Fisher's exact test				
Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή	Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=4)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=33)	P value	Statistically Significant
A1G & G3C	ATG --> GTC	M1V	16	1	15	0.4128	NS
A10C	AAT-->CAT	N4(H/R)	10	3	7	0.0522	NS
C14T	TCA-->TTA	S5L	14	3	11	0.1419	NS
G573T	ATG-->ATT	M191I	27	3	24	0.7086	NS
T566C	GTG-->GCG	V199(A/I)	23	1	22	0.1419	NS
G623A	GGA-->GAA	G208(E/A)	35	4	31	0.7928	NS
A1061G C1060T CA(1060-1061)AG	CAC-->CGC CAC-->TGC CAC-->AGC	H354(R/C/S)	30	4	26	0.4149	NS
C1136T	GCG-->GTG	A379V	4	2	2	0.0500	SS
GA(1190-1191)AG G1190A	CGA-->CAG CGA-->CAA	R397(Q/G)	19	2	17	0.6772	NS
A1208C	CAA-->CCA	Q403P	24	2	22	0.4407	NS
G1219A G1220T	GCG-->ACG GCG-->ATG	A407(T/V/S)	8	1	7	0.6404	NS
C1250G	ACT-->AGT	T417S	10	1	9	0.7086	NS
GA(1403-0104)AG G1403A	GGA-->GAG GGA-->AGA	G468(E/R)	15	1	14	0.4605	NS
A1484G	AAT-->AGT	N495S	12	1	11	0.6094	NS
C1571T	GCT-->GTT	A524V	14	2	12	0.4905	NS
AA(1895-1896)GC	GAA-->GGC	E632G	14	1	13	0.5095	NS
AGC(1897-1899)GGT	AGC-->GGT	S633G	9	1	8	0.6900	NS
G1910A	TGT-->TAT	C637Y	13	1	12	0.5593	NS
G1912A	GGT-->AGT	G638S	13	1	12	0.5593	NS
G2037T	GAG-->GAT	E679D	29	3	26	0.6404	NS
C2049G	ATC-->ATG	I683M	7	1	6	0.5851	NS
C2057A	ACT-->AAT	T686N	6	1	5	0.5236	NS
A2059G	ACT-->GCT	T687A	6	1	5	0.5236	NS
T2072G TA(2072-2073)AG	ATA-->AGA ATA-->AAG	I691(R/K)	13	2	11	0.4407	NS
A2081G	AAG-->AGG	K694R	21	3	18	0.4128	NS
A2126G	GAT-->GGT	D709G	12	2	10	0.3906	NS
G2198A G2197T	GGG-->GAG GGG-->TGG	G733(E/W)	34	4	30	0.7022	NS
G2221A	GTC-->ATC	V741I	16	2	14	0.5872	NS
A2234G	AAG-->AGG	K745R	6	2	4	0.1152	NS
A2407G	ATG-->GTG	M803V	7	1	6	0.5851	NS
C2456(A/T)	ACC-->A(A/T)C	T819(N/I)	18	3	15	0.2811	NS
T2458C	TCT-->CCT	S820P	12	3	9	0.0908	NS
T2461C & G2463T TCG(2461-2463)CAA TCG(2461-2463)CGT	TCG-->(C/T)C(G/T) TCG-->CAA TCG-->CGT	S821(P/Q/R)	18	3	15	0.2811	NS

Εφαρμόστηκε η στατιστική δοκιμασία Fisher's exact και διαπιστώθηκε ότι ανάμεσα στελέχη σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στη λεβοφλοξασίνη, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία των μεταλλάξεων αυτών στο γονίδιο *gyrA* ($p>0.05$). Εξάιρεση

αποτελεί η περίπτωση **A379V**, με τη διαφορά μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών να είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 5%. Αναφέρονται συμπληρωματικά και οι περιπτώσεις **N4(H/R)** και **S820P**, στις οποίες παρατηρήθηκε οριακά μη-στατιστικά σημαντική κατανομή μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Σε κάθε περίπτωση, η διερεύνηση του ρόλου των μεταλλάξεων του γονιδίου *gyrA* στο μηχανισμό αντοχής στη λεβοφλοξασίνη χρήζει περαιτέρω ανάλυσης σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών.

Στους πίνακες **E-6** και **E-7** του παραρτήματος, καταγράφονται και σιωπηλές σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες δεν οδηγούν στην προσθήκη διαφορετικού αμινοξικού καταλοίπου στην πρωτεΐνη.

Εκτός των σημειακών, πραγματοποιήθηκε και καταγραφή πλαισιοτροποποιητικών μεταλλάξεων και συγκεκριμένα των ελλείψεων, όπως αυτές αναφέρονται στον πίνακα:

Πίνακας Γ - 15: Πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* σε στελέχη *H. pylori*, ευαίσθητα και ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη.

Στέλεχος	Έλλειψη
<i>Hr-1, Hr-4, Hr-12, Hr-15, Hr-19, Hr-20, Hr-21, Hr-25, Hr-28, Hr-29, Hr-30, Hr-31, Hr-35, Hr-36</i>	c.2470-2472delAAT
<i>Hr-4</i>	c.1794delG
<i>Hr-8</i>	c.563-564delCT
<i>Hr-9</i>	c.208delA
<i>Hr-10</i>	c.2268delT
<i>Hr-19, Hr-35</i>	c.720delG
<i>Hr-25</i>	c.107delG
<i>Hr-34</i>	c.1414delA

Παρατηρείται, επιπρόσθετα, η ύπαρξη προσθήκης τριών νουκλεοτιδίων CGC στις θέσεις 1914-1916 (c.1914_1916insCGC) σε ένα ανθεκτικό στέλεχος (*Hr-36*) και στα ευαίσθητα στελέχη *Hr-3, Hr-4, Hr-8, Hr-9, Hr-11, Hr-12, Hr-23, Hr-24, Hr-27, Hr-38* και *Hr-34*, ενώ αναφέρεται επιπλέον η προσθήκη των νουκλεοτιδίων GGT στις θέσεις 1915-1917 (c.1915_1917insGGT) στο ευαίσθητο στέλεχος *Hr-18*.

3.2. Μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrB*

Πίνακας Γ - 16: Αλλαγές νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας που εντοπίζονται μόνο στα τέσσερα στελέχη, ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή
<i>Hr-7</i>	G746A	CGC-->CAC	R249H
<i>Hr-21</i>	C1975T	CTC-->TTC	L659F
<i>Hr-26</i>	G313A	GAT-->AAT	D105N
<i>Hr-36</i>	C2289T	GCG-->GTG	A763V

Από τη σύγκριση των 37 αλληλουχιών των κλινικών στελεχών με το γονίδιο *gyrB* του στελέχους αναφοράς, μόλις τέσσερις αμινοξικές αλλαγές σε ισάριθμα ανθεκτικά στελέχη αναφέρονται ως μοναδικές γι' αυτά και συνοψίζονται στον **πίνακα Γ-16**.

Πίνακας Γ - 17: Αλλαγές νουκλεοτιδικής (γονίδιο *gyrB*) και αμινοξικής αλληλουχίας που εντοπίζονται σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη

Στελέχη που φέρουν Αμινοξική Αλλαγή (n)						Fisher' s exact test	
Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αμινοξική αλλαγή	Ως προς το σύνολο (n=37)	Ως προς τα ανθεκτικά (n=4)	Ως προς τα ευαίσθητα (n=33)	P value	Statistically Significant
C167G	ACG-->AGG	T56R	11	3	8	0.0700	NS
T189G	GAT-->GAG	D63E	19	3	16	0.3228	NS
C446T	ACT-->ATT	T149I	27	2	25	0.2914	NS
A460G	ATC-->GTC	I154V	4	1	3	0.3804	NS
C500T	ACT-->ATT	T167I	4	1	3	0.3804	NS
A605G	AAA-->AGA	K202R	3	1	2	0.2978	NS
G655A	GAA-->AAA	E219K	17	1	16	0.3668	NS
G688A	GCT-->ACT	A230T	6	2	4	0.1152	NS
A715G	ATT-->GTT	I239V	3	2	1	0.0260	SS
T718G	TCG-->GCG	S240A	10	3	7	0.0522	NS
G775A	GCT-->ACT	A259T	7	1	6	0.5851	NS
G893A GGC(892-894)AAT	GGC-->GAC GGC-->AAT	G298(D/N)	37	4	33	10000	NS
A1636G	AGC-->GGC	S546G	9	2	7	0.2436	NS
G1873A	GGC-->AGC	G625S	6	2	4	0.1152	NS
A1930G AC(1930-1931)GT	ACG-->GCG ACG-->GTG	T644(A/V)	22	2	20	0.5395	NS
A2005C	AAT-->CAT	N669H	22	2	20	0.5395	NS

Στον **πίνακα Γ-17** συγκεντρώνεται το σύνολο νουκλεοτιδικών αλλαγών που εντοπίζονται στην αλληλουχία του γονιδίου *gyrB*, καθώς και οι αντίστοιχες αμινοξικές αλλαγές. Οι μεταλλάξεις υπάρχουν τόσο σε ευαίσθητα όσο και σε ανθεκτικά στελέχη και καταγράφονται ως εξής:

- αριθμός στελεχών που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το συνολικό αριθμό στελεχών
- αριθμός ανθεκτικών (LEV^R) που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το σύνολο των ανθεκτικών στελεχών
- αριθμός ευαίσθητων (LEV^S) που φέρουν μετάλλαξη σε σχέση με το σύνολο των ευαίσθητων στελεχών.

Μετά την εφαρμογή στατιστικής δοκιμασίας Fisher's exact, διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην παρουσία των μεταλλάξεων στο γονίδιο *gyrB* ανάμεσα σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στη λεβοφλοξασίνη στελέχη ($p > 0.05$). Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση **I239V**, με τη διαφορά μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών να είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο του 5%. Αναφέρονται ακόμη οι περιπτώσεις **T56R** και **S240A**, στις οποίες παρατηρήθηκε οριακά μη-στατιστικά σημαντική κατανομή μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών. Όπως ήδη αναφέρθηκε και στην περίπτωση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *gyrA*, θεωρείται απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό στελεχών, για την αποσαφήνιση του ρόλου των μεταλλάξεων στο μηχανισμό αντοχής στη λεβοφλοξασίνη.

Στους **πίνακες E-8** και **E-9** του παραρτήματος καταγράφονται σιωπηλές μεταλλάξεις, αλλαγές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *gyrB*, οι οποίες δε συνεπάγονται αλλαγή του αντίστοιχου αμινοξικού καταλοίπου.

Τέλος, υπάρχει μία μοναδική πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη, έλλειψη νουκλεοτιδικής βάσης θυμίνης στη θέση 160 (c.160delT) στο στέλεχος Hp-4, το οποίο είναι μετρίως ευαίσθητο στη λεβοφλοξασίνη.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μελέτη της επιδημιολογίας του *H. pylori* αναδεικνύει το φαινόμενο μείωσης του επιπολασμού της λοίμωξης σε μεγάλο αριθμό χωρών, με παράλληλη μείωση της εμφάνισης ασθενειών που σχετίζονται με αυτήν όπως, το πεπτικό έλκος και ο γαστρικός καρκίνος (Eusebi,2014). Ωστόσο, αντίστοιχα συμπεράσματα δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν για τον επιπολασμό της αντοχής στα χορηγούμενα αντιβιοτικά καθώς, είναι μεγάλη η απόσταση που πρέπει να διανύσουμε, για την επίτευξη εκρίζωσης, ήδη από την εφαρμογή του πρώτου θεραπευτικού σχήματος στους ασθενείς (Francesco,2011). Κύριος αιτιολογικός παράγοντας για την αποτυχία εκρίζωσης, είναι η ολοένα αυξανόμενη αντοχή του *H. pylori* στα αντιβιοτικά, ο επιπολασμός της οποίας μάλιστα, στην Ελλάδα, είναι 27,2% για την κλαριθρομυκίνη, 32,1% για τη μετρονιδαζόλη και 8,2% για τη λεβοφλοξασίνη (Martinez-Gonzalez,2015).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της γενετικής βάσης του μηχανισμού της αντοχής κλινικών στελεχών *H. pylori* σε τρία αντιβιοτικά, στην κλαριθρομυκίνη, τη μετρονιδαζόλη και τη λεβοφλοξασίνη και για την πραγματοποίησή της αξιοποιήθηκαν βιοπληροφορικά εργαλεία. Συγκεκριμένα, έγινε βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων από την ανάγνωση αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος (WGS) των στελεχών. Με τη μελέτη των αλληλουχιών του γονιδίου 23S rRNA των 37 στελεχών και τη σύγκριση τους με το στέλεχος αναφοράς *H. pylori* 26695, διαπιστώθηκε ότι 9 ανθεκτικά στελέχη στην κλαριθρομυκίνη έφεραν τις μεταλλάξεις A2146G ή A2147G, η παρουσία των οποίων έχει συσχετισθεί βιβλιογραφικά με την ανάπτυξη αντοχής έναντι του συγκεκριμένου αντιβιοτικού (Iwamoto,2014). Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι η κλαριθρομυκίνη προσδένεται στο V domain της πεπτιδυλ-τρανσφεράσης του βακτηριακού 23S rRNA και παρεμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση επομένως, οι προαναφερθείσες σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή αποτρέπουν τη σύνδεση του αντιβιοτικού, καθιστώντας το βακτήριο ανθεκτικό σε αυτό. Η σημαντική επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στην ευαισθησία του *H. pylori* στα αντιβιοτικά υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι, περιγράφονται στη βιβλιογραφία, σε εργασίες ερευνητικών ομάδων, οι οποίες προέρχονται από διαφορετικές χώρες ακόμη και ηπείρους, με χαρακτηριστική τη μελέτη που διεξήχθη στις Η.Π.Α., στην οποία συμμετείχαν ερευνητικά κέντρα από 4 πολιτείες (Park,2016). Στο Βιετνάμ επίσης, τα αυξημένα επίπεδα αντοχής στην κλαριθρομυκίνη φαίνεται να σχετίζονται κυρίως με την παρουσία της μετάλλαξης A2143G και λιγότερο της A2142G (αντιστοιχούν στις θέσεις 2147 και 2146, όπως αυτές ορίζονται στην παρούσα εργασία) (Van Huy,2018), ενώ αντίστοιχα ευρήματα αναφέρονται και σε μελέτη στην Αλγερία και το Ιράν (Bachir,2018, Eghbali,2016). Αντίθετα,

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε μελέτες στις οποίες συμμετέχουν ασθενείς από την Αίγυπτο, αναδεικνύουν το ρόλο της μετάλλαξης A2142G στην ανάπτυξη αντοχής στην κλαριθρομυκίνη, καθώς αναφέρουν αυτήν ως συνηθέστερα εμφανιζόμενη σε σχέση με την A2143G (Ramzy,2016, Ghai,2016). Επιπλέον, η βιβλιογραφικά χαρακτηρισμένη μετάλλαξη T2186C, η οποία έχει συσχετισθεί με την αντοχή στην κλαριθρομυκίνη, εντοπίστηκε στην παρούσα εργασία, σε δύο ανθεκτικά και σε ένα ευαίσθητο στελέχος. Παρόμοιες παρατηρήσεις για την συγκεκριμένη μετάλλαξη έχουν γίνει και στο παρελθόν από άλλους (Rimba,2008). Έτσι για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν είναι δυνατόν να γίνει άμεσα και με σαφή τρόπο συσχετισμός για την ανάπτυξη αντοχής έναντι της κλαριθρομυκίνης. Η αδυναμία συσχέτισης, υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι στα ανθεκτικά στελέχη στα οποία εντοπίστηκε η μετάλλαξη, υπάρχουν ήδη καταγεγραμμένες οι μεταλλάξεις A2146G είτε A2147G, ενώ ασφαλές συμπέρασμα δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί και από τη μελέτη των τιμών MIC, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη απόκλιση μεταξύ των τριών στελεχών. Προβληματισμούς εγείρει επίσης, η περίπτωση των τριών στελεχών, που δε φέρουν κάποια από τις παραπάνω μεταλλάξεις, ωστόσο φαινοτυπικά ταυτοποιήθηκαν ως ανθεκτικά. Καθώς, βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί αντίστοιχες περιπτώσεις, γίνεται αντιληπτή η αναγκαιότητα περαιτέρω διερεύνησης του φαινομένου της αντοχής, με τη μελέτη μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε γονίδια που κωδικοποιούν μόρια εμπλεκόμενα σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Ήδη προκύπτουν νέα δεδομένα για το γονίδιο *rpl22*, που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη L22 της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας, η οποία αλληλεπιδρά με όλα τα domains του 23S *rRNA* και το *infB*, το οποίο κωδικοποιεί τον παράγοντα έναρξης μετάφρασης IF-2, μια εκ των δράσεων του οποίου είναι η προστασία των δύο θέσεων του V domain του 23S *rRNA* από χημική τροποποίηση (Binh,2014). Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι, νέες μεταλλάξεις στα δύο γονίδια διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη αντοχής στην κλαριθρομυκίνη, ιδίως σε στελέχη που χαρακτηρίζονται από απουσία των κλασικών μεταλλάξεων (A2142G, A2143G) (Binh,2014). Επιπλέον, χρήσιμο είναι να πραγματοποιηθούν πειράματα στοχευμένης μεταλλαξογένεσης στο γονίδιο 23S *rRNA* σε θέσεις, στις οποίες οι μεταλλάξεις (C459T, A496G και C2924T) δίνουν στατιστικά οριακή κατανομή μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών, προκειμένου να αξιολογηθεί προσεκτικά η πιθανή συμβολή αυτών στην ανάπτυξη αντοχής.

Στο πλαίσιο διερεύνησης της αντοχής στη μετρονιδαζόλη, μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις των γονιδίων *rdxA*, *frxA* και *rpsU* σε στελέχη *H. pylori*, τα οποία είχαν ήδη χαρακτηριστεί βάσει φαινοτυπικής δοκιμασίας ευαισθησίας. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *rdxA*, που οδήγησαν

στην εμφάνιση κωδικονίου λήξης σε τρία ανθεκτικά στελέχη, είχαν ως αποτέλεσμα την πρόωρη διακοπή της διαδικασίας μετάφρασης και την παραγωγή μη λειτουργικής NADPH-αδρανούς στο οξυγόνο-νιτροαναγωγάσης (RdxA). Συνέπεια των παραπάνω, είναι η αδυναμία αναγωγής της νιτροομάδας της μετρονιδαζόλης από το ένζυμο και άρα η μη μετατροπή της πρόδρομης ουσίας στη δραστική της μορφή. Η παρουσία κωδικονίου λήξης στις θέσεις 32 και 65 επιβεβαιώνεται και από βιβλιογραφικά δεδομένα (Lee,2018, Jenks,1999, Kwon,2000), ενώ για τη θέση 81, εντοπίστηκε βιβλιογραφικά μόνο αμινοξική αντικατάσταση, γεγονός ωστόσο που ίσως υποδηλώνει αστάθεια σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στη θέση αυτή (Marais,2003). Επίσης, από τις πλαισιοτροποποιητικές μεταλλάξεις που σημειώθηκαν, αξίζει να αναφερθεί η έλλειψη 6 αμινοξικών καταλοίπων (p.KRRQLL8_13del), η οποία εντοπίστηκε σε αρχικό σημείο της αμινοξικής ακολουθίας, στο ανθεκτικό στέλεχος Hr-18 και πιθανόν να έχει επίδραση στη λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Στη θέση του κωδικονίου 8 έχει σημειωθεί και σε προηγούμενη μελέτη πλαισιοτροποποιητική μετάλλαξη, επρόκειτο όμως για προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου και όχι έλλειψη και μάλιστα μεγάλης έκτασης, όπως στην περίπτωση μας (Chua,2019). Αντισταθμιστικά λοιπόν ότι, το εύρημα ενδεχομένως χρήζει περαιτέρω μελέτης, για τη διαλεύκανση του ρόλου των μεταλλάξεων της δεδομένης περιοχής στην ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στη μετρονιδαζόλη. Όσον αφορά τις σημειακές μεταλλάξεις, οι T31E και R131K, οι οποίες βιβλιογραφικά αναφέρονται ως συνηθέστερα εμφανιζόμενες στα ανθεκτικά στελέχη, στην παρούσα εργασία καταγράφονται και σε μεγάλο αριθμό ευαίσθητων, επομένως είναι σημαντικό να διατηρήσουμε επιφυλάξεις για τη συσχέτιση τους με το φαινόμενο της αντοχής, ιδίως εφόσον, στις ήδη δημοσιευμένες εργασίες, δεν υπάρχουν πληροφορίες για τις θέσεις αυτές στα ευαίσθητα στελέχη (Butlor,2016). Σημειώνεται, ωστόσο, ότι η διαφορά στον αριθμό ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών με παρουσία της μετάλλαξης R131K είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η πραγματοποίηση πειραμάτων στοχευμένης μεταλλαξογένεσης θα αναδείξει το ρόλο που πιθανόν διαδραματίζει η παρουσία της αμινοξικής αυτής αντικατάστασης στην αντοχή στη μετρονιδαζόλη. Βιβλιογραφικά αναφέρεται, επίσης, ότι η μετάλλαξη A118T εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ανθεκτικά στελέχη, ωστόσο στην παρούσα εργασία, εντοπίζεται σε ίσο αριθμό ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών (Marques,2019). Πρόκειται για αντικατάσταση ενός μη πολικού, υδρόφοβου αμινοξέος (A) από ένα πολικό μη φορτισμένο (T) και η αλλαγή αυτή ενδέχεται να επηρεάζει τη σταθερότητα της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, εφόσον αυτή εξασφαλίζεται από τη σωστή κατανομή υδρόφιλων και

υδρόφοβων αμινοξέων και επομένως τη λειτουργικότητά της. Οι μεταλλάξεις Q6H, R16H, H25R, M56I, D59N, K64N, R90K, H97Y, G98S, P106S, S108A, V111A, V172I, A183V, Q197K και V204I έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά σε ανθεκτικά στελέχη, ωστόσο κατεγράφησαν και σε έναν αριθμό ευαίσθητων στελεχών, ενώ η μετάλλαξη H53R εντοπίστηκε μόνο στα ευαίσθητα και σε κανένα ανθεκτικό στέλεχος (Mirzaei,2014). Για τις μεταλλάξεις R16H και M56I, αναφέρεται ότι εμπλέκονται στη μείωση της συγγένειας της πρωτεΐνης RdxA για το φλαβινο-μονονουκλεοτιδίο και επομένως στην αποσταθεροποίηση του διμερούς (Marques,2019). Επιβεβαιώθηκε, ακόμη, η ύπαρξη μετάλλαξης G163D σε ένα ανθεκτικό στέλεχος και σε κανένα ευαίσθητο, όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά (Butlop,2016).

Στην περίπτωση του *frxA* γονιδίου, εντοπίζονται οι μεταλλάξεις F72S και G73S μόνο σε ανθεκτικά στελέχη και οι M126G και C193S κυρίως σε ανθεκτικά, ωστόσο βιβλιογραφικά έχει καταγραφεί παρουσία των τεσσάρων, και σε ευαίσθητα στελέχη εξίσου (Marques,2019). Η παρουσία των μεταλλάξεων σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη επιβεβαιώνει το φαινόμενο γενετικής πολυμορφικότητας του *H. pylori* και δυσχεραίνει τη δημιουργία ενός προφίλ καλά χαρακτηρισμένων μεταλλάξεων, άμεσα συνδεδεμένων με το φαινόμενο της αντοχής στη μετρονιδαζόλη. Το γεγονός αυτό δεν είναι τυχαίο, καθώς αλλαγές στην αμινοξική ακολουθία που έχουν ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της λειτουργίας του πρωτεϊνικού μορίου, έχουν καθοριστική επίδραση στην επιβίωση του βακτηρίου (Justino,2014). Βιβλιογραφικά, αναφέρεται ότι, η αντοχή στη μετρονιδαζόλη αναπτύσσεται κυρίως ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο *rdxA*, σε συνδυασμό ωστόσο με άλλους μηχανισμούς, όπως η λειτουργία αντλιών εκροής του αντιβιοτικού και οι μεταλλάξεις στα γονίδια *frxA* και *rpsU* (Justino,2014). Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε ωστόσο, ανέδειξε την παρουσία μιας μοναδικής μετάλλαξης με αντίκτυπο στην αλληλουχία αμινοξέων που κωδικοποιείται από το γονίδιο *rpsU* σε ένα ευαίσθητο στέλεχος, ενώ στα υπόλοιπα στελέχη σημειώνονται σιωπηλές μεταλλάξεις, κοινές για ανθεκτικά και ευαίσθητα, οι οποίες παρατίθενται στον **πίνακα 3-5** του παραρτήματος.

Η μετάλλαξη D91Y είναι καλά χαρακτηρισμένη και η παρουσία της άμεσα συνδεδεμένη με την ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στη λεβοφλοξασίνη, ωστόσο στην παρούσα μελέτη αυτή εντοπίζεται σε ένα μοναδικό, ανθεκτικό στέλεχος, το οποίο μάλιστα παρουσιάζει και τη μικρότερη τιμή MIC σε σχέση με τα υπόλοιπα ανθεκτικά στελέχη. Επιπλέον, σε 36/37 στελέχη εντοπίζουμε τον πολυμορφισμό GAT στο κωδικόνιο 86, ο οποίος σχετίζεται με την παρουσία πολυμορφισμού AAT ή AAC στο κωδικόνιο 87. Στην περίπτωσή μας, η τριπλέτα

AAT εντοπίζεται στο γονίδιο αναφοράς, ενώ η AAC σε 31/37 στελέχη, 3 εκ των οποίων είναι ανθεκτικά. Ένα μοναδικό στέλεχος, φέρει τον πολυμορφισμό T87, ο οποίος προσδίδει μεγαλύτερη ευαισθησία στις κινολόνες στον αντίστοιχο πληθυσμό, σε σχέση με τον πολυμορφισμό N87 (Cattoir,2007). Η μετάλλαξη A97V εντοπίστηκε σε ένα ευαίσθητο στέλεχος και όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία, δεν εμπλέκεται στην ανάπτυξη αντοχής στις φθοριοκινολόνες, παρότι βρίσκεται εντός της QRDR περιοχής (Tankovic,2003). Επιπρόσθετα, οι αμινοξικές υποκαταστάσεις M191I, V199A και G208(E/A) εντοπίζονται σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη, όμως ο μικρός αριθμός ανθεκτικών στελεχών, δε μας επιτρέπει να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για το ρόλο τους στην ανάπτυξη αντοχής των στελεχών *H. pylori* στις φθοριοκινολόνες (Farzi,2019). Από τη μελέτη των αλληλουχιών του γονιδίου *gyrB* στα 37 κλινικά στελέχη, διαπιστώθηκε σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη, η παρουσία των μεταλλάξεων D481E και R484K, οι οποίες βρίσκονται μεν στην QRDR περιοχή του γονιδίου, ωστόσο δεν εμπλέκονται στο φαινόμενο ανάπτυξης αντοχής έναντι της λεβοφλοξασίνης (Tankovic,2003).

Συνοψίζοντας, τα παραπάνω συμπεράσματα εξήχθησαν μετά από προσεκτική μελέτη και ανάλυση των δεδομένων που παρήγαγε η τεχνολογία ανάγνωσης αλληλουχίας πλήρους γονιδιώματος (WGS). Η μέθοδος αυτή μας επιτρέπει να εξετάσουμε το σύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού για την ανίχνευση μεταλλάξεων και πολυμορφισμών σε γονίδια του ενδιαφέροντός μας, αλλά και να παρακολουθήσουμε την εξέλιξη και να αναλύσουμε τη δυναμική των πολυανθεκτικών παθογόνων. Ωστόσο, η τεχνολογία WGS δεν έχει εδραιωθεί ακόμη στη διαγνωστική ρουτίνα των μικροβιολογικών εργαστηρίων, καθώς υπάρχουν ζητήματα που αποτελούν τροχοπέδη στην εφαρμογή της και τα οποία χρήζουν επίλυσης. Το κόστος παλαιότερα αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα για την εφαρμογή της τεχνικής σε μεγάλη κλίμακα, πλέον όμως το εμπόδιο έχει υπερπηδηθεί, αφού το κόστος ανάγνωσης αλληλουχίας 1mb DNA ανέρχεται στα 0,012 USD (<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>). Ο χρόνος διεκπεραίωσης του πρωτοκόλλου, αποτελεί ίσως το σημαντικότερο περιοριστικό παράγοντα για την εδραίωση του WGS στην κλινική πράξη, εφόσον θα πρέπει η ολοκλήρωση της διαδικασίας ανάγνωσης αλληλουχίας και η εξαγωγή συμπερασμάτων χρήσιμων στον κλινικό γιατρό, να γίνεται σε μικρότερο, ή τουλάχιστον στον ίδιο χρόνο με τις υπάρχουσες παραδοσιακές φαινοτυπικές μεθόδους (Rhoads,2018). Φυσικά, καθώς προχωρά και βελτιώνεται η τεχνολογία σε συνδυασμό με την ανάπτυξη νέων βιοπληροφορικών εργαλείων, επιτυγχάνεται μείωση του πολύτιμου χρόνου ανίχνευσης της

αντοχής του *H. pylori* στα αντιβιοτικά (Quick,2015, Votintseva,2017). Σημαντικό είναι, να ληφθεί υπ' όψιν το γεγονός ότι, απαιτούνται αλλαγές και προσαρμογές στη ροή εργασίας, καθώς στη διαδικασία περιλαμβάνεται τόσο εργαστηριακό-πειραματικό μέρος (προετοιμασία βιβλιοθήκης, ανάλυση αλληλουχίας) όσο και βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων που απαιτούν την ύπαρξη όχι μόνο διαθέσιμου εξοπλισμού, αλλά και ανθρώπινου δυναμικού που μπορεί να αναλάβει τη διεκπεραίωση μέρους ή και όλης της διαδικασίας (Rossen,2018).

Ειδικά για το ζήτημα ανίχνευσης της αντοχής του Ελικοβακτηρίου του πυλωρού στα αντιβιοτικά, ο προβληματισμός για την εφαρμογή του WGS έγκειται στο γεγονός, της έλλειψης συμφωνίας σε ορισμένες περιπτώσεις, μεταξύ των αποτελεσμάτων γονοτυπικής και φαινοτυπικής ανίχνευσης της αντοχής σε δεδομένο αντιμικροβιακό παράγοντα (Rhoads,2018, Rossen,2018). Πιθανή εξήγηση βρίσκεται στην ίδια τη φιλοσοφία και λογική της εφαρμογής των διαφορετικών μεθόδων. Το αποτέλεσμα της φαινοτυπικής δοκιμασίας βασίζεται στην αξιολόγηση της αντοχής που συνολικά παρουσιάζεται σε μια καλλιέργεια, η οποία ωστόσο έχει δημιουργηθεί από ένα σύνολο διαφορετικών κλώνων που υπάρχουν σε ένα μοναδικό δείγμα. Αντιλαμβανόμαστε ότι οι διαφορετικοί κλώνοι θα παρουσιάζουν διαφορές ως προς το γονότυπο και ίσως ως προς την αντοχή σε δεδομένο αντιβιοτικό, οι οποίες δεν αντικατοπτρίζονται στο σύνολό τους στο αποτέλεσμα της φαινοτυπικής δοκιμασίας. Η διαδικασία του WGS περιλαμβάνει ανάγνωση αλληλουχίας του DNA που προέρχεται από ένα μοναδικό κλώνο, πιθανόν μη αντιπροσωπευτικό του συνόλου των κλώνων που εντοπίζεται στο δείγμα, που υποβλήθηκε σε φαινοτυπική δοκιμασία ανίχνευσης. Συνέπεια των παραπάνω είναι ασυμφωνία των αποτελεσμάτων φαινοτυπικής και γονοτυπικής ανίχνευσης, η οποία θα μπορούσε να επιλυθεί με την αξιολόγηση της αντοχής μεγαλύτερου αριθμού κλώνων, εντοπισμένων σε ένα δείγμα, ωστόσο κυρίως λόγω κόστους και έλλειψης χρόνου δεν είναι δυνατόν για κάθε δείγμα ασθενούς να πραγματοποιείται απομόνωση DNA και γονοτύπηση του συνόλου ή έστω μέρους των κλώνων *H. pylori*. Είναι αντιληπτό, ότι ελλείπει αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων που χαρακτηρίζουν με ακρίβεια μεταλλάξεις και τις συνδέουν με σαφή τρόπο με το μηχανισμό απόκτησης αντοχής στα αντιβιοτικά, είμαστε ακόμη μακριά από την επίτευξη και του ευρύτερου στόχου, της εξατομικευμένης θεραπείας, κατά την οποία η διάγνωση, η πρόγνωση και η επιλογή θεραπευτικού σχήματος κατάλληλου για τον ασθενή θα βασίζεται στην παραγόμενη πληροφορία (Rhoads,2018).

Συνολικά τα ζητήματα που χρήζουν επίλυσης, αφορούν στην ανάλυση δεδομένων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του WGS και της βιοπληροφορικής ανάλυσης, με τρόπο τέτοιο, ώστε να προκύπτουν ασφαλή συμπεράσματα και πληροφορίες με αξία στην κλινική πράξη, σε μορφή κατανοητή από τους επιστήμονες και στον ελάχιστο δυνατό χρόνο (Rhoads,2014). Μέχρι στιγμής, η επεξεργασία δεδομένων γίνεται με πρωτόκολλα (pipelines) που αναπτύσσονται ή προσαρμόζονται από τα εργαστήρια, βάσει των ερευνητικών τους αναγκών, ώστε να επιτρέπουν ανάλυση των ίδιων δεδομένων με διαφορετικό τρόπο, με στόχο την εξαγωγή συμπερασμάτων κατά τη μελέτη π.χ. παραγόντων παθογένειας, αντοχής στα αντιβιοτικά ή για την πραγματοποίηση φυλογενετικών αναλύσεων (Rhoads,2014). Παρά τους φραγμούς στην εδραίωση της μεθόδου WGS στην κλινική πράξη, διαπιστώνεται μέσα και από την πορεία της παρούσας εργασίας, η χρησιμότητα της, στην ανίχνευση μεταλλάξεων σε μόρια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς δράσης των αντιβιοτικών, αλλά και ανάπτυξης αντοχής έναντι αυτών. Δεν υπάρχει αμφιβολία για τη σημασία αξιοποίησης της τεχνολογίας αυτής στην κλινική πράξη, όχι μόνο προς όφελος μεμονωμένων ασθενών, αλλά και της δημόσιας υγείας, επομένως κρίνεται αναγκαία η αυτοματοποίηση της ροής εργασιών στο βαθμό που αυτό είναι δυνατό και η επένδυση στην εκπαίδευση και κατάρτιση του εργαστηριακού προσωπικού, ώστε σταδιακά οι μέθοδοι ανάγνωσης αλληλουχίας επόμενης γενιάς να ενσωματωθούν στην εργαστηριακή «ρουτίνα» και στην κλινική πράξη.

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Reshetnyak V, Reshetnyak T. Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis; 2017.
2. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. **Gastroenterology**. 2017 2017/08/01/;153(2):420-9.
3. Mărginean MO, Mărginean CO, Meliț LE, Voidăzan S, Moldovan V, Bănescu C. The impact of host's genetic susceptibility on *Helicobacter pylori* infection in children. **Medicine (Baltimore)**. 2017;96(30):e7612-e.
4. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved Bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**. 1984 1984/06/16/;323(8390):1311-5.
5. Solnick JV, Vandamme P. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. In: **Helicobacter pylori: Physiology and Genetics**. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. Washington (DC): ASM Press; 2001.
6. Azevedo NF, Almeida C, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, Vieira MJ. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. **Appl Environ Microbiol**. 2007;73(10):3423-7.
7. Waskito LA, Salama NR, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**. 2018;23(S1):e12516.
8. Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature**. 1997 1997/08/01/;388(6642):539-47.
9. Draper JL, Hansen LM, Bernick DL, Abedrabbo S, Underwood JG, Kong N, et al. Fallacy of the Unique Genome: Sequence Diversity within Single *Helicobacter pylori* Strains. **mBio**. 2017;8(1):e02321-16.
10. Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbinteanu-Braticevici C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. **Journal of medicine and life**. 2017 Apr-Jun;10(2):112-7.
11. He C, Yang Z, Lu N. Imbalance of Gastrointestinal Microbiota in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. **Helicobacter**. 2016 Oct;21(5):337-48.
12. Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. **The Lancet Infectious diseases**. 2006 Nov;6(11):699-709.
13. Franceschi F, Gasbarrini A, Polyzos SA, Kountouras J. Extragastric Diseases and *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**. 2015;20(S1):40-6.
14. Leja M, Axon A, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**. 2016;21(S1):3-7.
15. Kodaman N, Pazos A, Schneider BG, Piazuolo MB, Mera R, Sobota RS, et al. Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2014 Jan 28;111(4):1455-60.
16. Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. The Human Microbiota as a Marker for Migrations of Individuals and Populations. **Annual Review of Anthropology**. 2011;40(1):451-74.
17. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. **Nature**. 2007 02/07/online;445:915.
18. Kotilea K, Bontems P, Touati E. Epidemiology, Diagnosis and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection. **Advances in experimental medicine and biology**. 2019 Apr 24.

19. Ahn HJ, Lee DS. Helicobacter pylori in gastric carcinogenesis. **World J Gastrointest Oncol.** 2015;7(12):455-65.
20. Hu Y, Zhu Y, Lu N-H. Novel and Effective Therapeutic Regimens for Helicobacter pylori in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. **Front Cell Infect Microbiol.** 2017;7:168-.
21. O'Connor A, O'Morain C. Helicobacter pylori infection in Europe: current perspectives. **Expert review of gastroenterology & hepatology.** 2013 Aug;7(6):541-8.
22. Zamani M, Ebrahimitabar F, Zamani V, Miller WH, Alizadeh-Navaei R, Shokri-Shirvani J, et al. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of Helicobacter pylori infection. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics.** 2018;47(7):868-76.
23. Burucoa C, Axon A. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter.** 2017;22(S1):e12403.
24. Mamishi S, Eshaghi H, Mahmoudi S, Bahador A, Hosseinpour Sadeghi R, Najafi M, et al. Intrafamilial transmission of Helicobacter pylori: genotyping of faecal samples. **British journal of biomedical science.** 2016;73(1):38-43.
25. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of Helicobacter pylori infection: A review. **Journal of Advanced Research.** 2015 2015/07/01/;6(4):539-47.
26. Zamani M, Vahedi A, Maghdouri Z, Shokri-Shirvani J. Role of food in environmental transmission of Helicobacter pylori. **Caspian J Intern Med.** 2017 Summer;8(3):146-52.
27. Kheyre H, Morais S, Ferro A, Costa A, Norton P, Lunet N, et al. The occupational risk of Helicobacter pylori infection: a systematic review; 2018.
28. Kao C-Y, Sheu B-S, Wu J-J. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomedical Journal.** 2016 2016/02/01/;39(1):14-23.
29. Chang W-L, Yeh Y-C, Sheu B-S. The impacts of H. pylori virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. **J Biomed Sci.** 2018;25(1):68-.
30. Sgouras D, Tegtmeier N, Wessler S. Activity and Functional Importance of Helicobacter pylori Virulence Factors. **Advances in experimental medicine and biology.** 2019 2019/04//.
31. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. **Biomed J.** 2016 Feb;39(1):14-23.
32. Yamaoka Y, Graham DY. Helicobacter pylori virulence and cancer pathogenesis. **Future Oncol.** 2014;10(8):1487-500.
33. Backert S, Neddermann M, Maubach G, Naumann M. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter.** 2016;21(S1):19-25.
34. Camilo V, Sugiyama T, Touati E. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter.** 2017;22(S1):e12405.
35. Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. **World J Gastroenterol.** 2010;16(10):1188-200.
36. El-Omar EM, Carrington M, Chow W-H, McColl KEL, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature.** 2000 2000/03/01/;404(6776):398-402.
37. Jia Z-f, Zhang S-l, Cao X-y, Zhou B-s, Jiang J. Interaction between Helicobacter pylori and host genetic variants in gastric carcinogenesis. **Future Oncology.** 2016;12(18):2127-34.
38. Sjomina O, Pavlova J, Niv Y, Leja M. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter.** 2018;23(S1):e12514.
39. Wen X, Wen D, Yang Y, Chen Y, Wang G, Shan B. Urban-Rural Disparity in Helicobacter Pylori Infection-Related Upper Gastrointestinal Cancer in China and the Decreasing Trend in Parallel with Socioeconomic Development and Urbanization in an Endemic Area. **Annals of global health.** 2017 May - Aug;83(3-4):444-62.

40. Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. Helicobacter pylori infection - recent developments in diagnosis. **World J Gastroenterol**. 2014;20(28):9299-313.
41. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of Helicobacter pylori: what should be the gold standard? **World J Gastroenterol**. 2014;20(36):12847-59.
42. Tongtawee T, Kaewpitoon S, Kaewpitoon N, Dechsukhum C, Leraanansaksiri W, Loyd RA, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori Infection. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**. 2016;17(4):1631-5.
43. Bessède E, Arantes V, Mégraud F, Coelho LG. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**. 2017;22(S1):e12404.
44. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. **Gut**. 2017;66(1):6-30.
45. Yeo YH, Shiu S-I, Ho HJ, Zou B, Lin J-T, Wu M-S, et al. First-line Helicobacter pylori eradication therapies in countries with high and low clarithromycin resistance: a systematic review and network meta-analysis. **Gut**. 2018;67(1):20-7.
46. Zagari RM, Rabitti S, Eusebi LH, Bazzoli F. Treatment of Helicobacter pylori infection: A clinical practice update. **European Journal of Clinical Investigation**. 2018;48(1):e12857.
47. Kalach N, Bontems P, Raymond J. Helicobacter pylori infection in children. **Helicobacter**. 2017;22(S1):e12414.
48. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, et al. The Toronto Consensus for the Treatment of Helicobacter pylori Infection in Adults. **Gastroenterology**. 2016 Jul;151(1):51-69.e14.
49. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon ATR, Bazzoli F, et al. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. **Gut**. 2012;61(5):646-64.
50. Liou J-M, Fang Y-J, Chen C-C, Bair M-J, Chang C-Y, Lee Y-C, et al. Concomitant, bismuth quadruple, and 14-day triple therapy in the first-line treatment of Helicobacter pylori: a multicentre, open-label, randomised trial. **The Lancet**. 2016 2016/11/12;388(10058):2355-65.
51. Georgopoulos SD, Martinez-Gonzales B, Xirouchakis E, Zampeli E, Grivas E, Spiliadi C, et al. Randomized clinical trial comparing ten day concomitant and sequential therapies for Helicobacter pylori eradication in a high clarithromycin resistance area. **European journal of internal medicine**. 2016 Jul;32:84-90.
52. De Francesco V, Hassan C, Ridola L, Giorgio F, Ierardi E, Zullo A. Sequential, concomitant and hybrid first-line therapies for Helicobacter pylori eradication: a prospective randomized study. **Journal of Medical Microbiology**. 2014;63(5):748-52.
53. Georgopoulos SD, Papastergiou V, Martinez-Gonzalez B, Xirouchakis E, Familias I, Sgouras D, et al. Hybrid therapy as first-line regimen for Helicobacter pylori eradication in a high clarithromycin resistance area: a prospective open-label trial. **Ann Gastroenterol**. 2018 Mar-Apr;31(2):205-10.
54. Zagari RM, Rabitti S, Eusebi LH, Bazzoli F. Treatment of Helicobacter pylori infection: A clinical practice update. **European journal of clinical investigation**. 2018 Jan;48(1).
55. Mohr KI. History of Antibiotics Research. In: **How to Overcome the Antibiotic Crisis : Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives**. Stadler M, Dersch P, eds. Cham: Springer International Publishing; 2016; p. 237-72.
56. Waksman SA. What is an antibiotic or an antibiotic substance? **Mycologia**. 1947 Sep-Oct;39(5):565-9.
57. Bentley R, Bennett JW. What is an antibiotic? Revisited. **Advances in applied microbiology**. 2003;52:303-31.
58. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**. 2017 Jul-Sep;33(3):300-5.

59. Crofts TS, Gasparini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. **Nat Rev Microbiol**. 2017;15(7):422-34.
60. Francesco VD, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal. **World J Gastrointest Pathophysiol**. 2011;2(3):35-41.
61. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. **Gastroenterology**. 2018 Nov;155(5):1372-82.e17.
62. Alba C, Blanco A, Alarcon T. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. **Current opinion in infectious diseases**. 2017 Oct;30(5):489-97.
63. Martinez-Gonzalez B, Psarakos P, Georgopoulos S. High incidence of *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance in Greece. A three-year multicenter laboratory surveillance study. **Helicobacter**. 2015;20(Suppl. 1).
64. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. **Gut**. 2013 Jan;62(1):34-42.
65. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**. 2017 Jun 28;9(6):e1403.
66. Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**. 2017;9(6):e1403-e.
67. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**. 2016;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
68. Iwamoto A, Tanahashi T, Okada R, Yoshida Y, Kikuchi K, Keida Y, et al. Whole-genome sequencing of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* characterizes unidentified variants of multidrug resistant efflux pump genes. **Gut pathogens**. 2014;6:27-.
69. Hachem CY, Clarridge JE, Reddy R, Flamm R, Evans DG, Tanaka SK, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. **Diagnostic microbiology and infectious disease**. 1996 Jan;24(1):37-41.
70. Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TT, Kwon DH, et al. Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. 2014 Jul;69(7):1796-803.
71. Chen J, Ye L, Jin L, Xu X, Xu P, Wang X, et al. Application of next-generation sequencing to characterize novel mutations in clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* strains with A2143G of 23S rRNA gene. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**. 2018 Mar 22;17(1):10.
72. Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers EJ, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. **The Lancet Infectious Diseases**. 2006 2006/11/01/;6(11):699-709.
73. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. **Frontiers in molecular biosciences**. 2014;1:19.
74. Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. **World journal of gastroenterology**. 2010 Mar 14;16(10):1188-200.
75. Lee SM, Kim N, Kwon YH, Nam RH, Kim JM, Park JY, et al. *rdxA*, *frxA*, and efflux pump in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*: Their relation to clinical outcomes. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2018;33(3):681-8.
76. Miftahussurur M, Shrestha PK, Subsomwong P, Sharma RP, Yamaoka Y. Emerging *Helicobacter pylori* levofloxacin resistance and novel genetic mutation in Nepal. **BMC Microbiol**. 2016;16(1):256-.

77. Miftahussurur M, Syam AF, Nusi IA, Makmun D, Waskito LA, Zein LH, et al. Surveillance of Helicobacter pylori Antibiotic Susceptibility in Indonesia: Different Resistance Types among Regions and with Novel Genetic Mutations. **PLoS One**. 2016;11(12):e0166199-e.
78. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**. 2010 05/04/online;8:423.
79. Suzuki H, Nishizawa T, Hibi T. Helicobacter pylori eradication therapy. **Future microbiology**. 2010 Apr;5(4):639-48.
80. Zamani M, Rahbar A, Shokri-Shirvani J. Resistance of Helicobacter pylori to furazolidone and levofloxacin: A viewpoint. **World J Gastroenterol**. 2017;23(37):6920-2.
81. Mégraud F, Lehours P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. **Clin Microbiol Rev**. 2007;20(2):280-322.
82. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, et al. Review article: the global emergence of Helicobacter pylori antibiotic resistance. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 2016;43(4):514-33.
83. Ducournau A, Bénéjat L, Sifré E, Bessède E, Lehours P, Mégraud F. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. **Clinical Microbiology and Infection**. 2016 2016/08/01/;22(8):715-8.
84. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, Garcia-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. **Journal of biotechnology**. 2017 Feb 10;243:16-24.
85. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 2018 Apr;24(4):355-60.
86. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2012;2012:11.
87. Baker M. De novo genome assembly: what every biologist should know. **Nature Methods**. 2012 03/27/online;9:333.
88. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. **Helicobacter**. 2014 Sep;19 Suppl 1:1-5.
89. Park JY, Dunbar KB, Mitui M, Arnold CA, Lam-Himlin DM, Valasek MA, et al. Helicobacter pylori Clarithromycin Resistance and Treatment Failure Are Common in the USA. **Digestive diseases and sciences**. 2016 Aug;61(8):2373-80.
90. Van Huy T, Thi Minh Thi H, Phan Tuong Quynh L, Viet Nhan N, Trung Nam P, Bianca P. Helicobacter pylori 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in chronic gastritis in Vietnam. **The Journal of Infection in Developing Countries**. 2018 07/31;12(07).
91. Bachir M, Allem R, Benejat L, Tifrit A, Medjekane M, Drici AE-M, et al. Molecular detection of mutations involved in Helicobacter pylori antibiotic resistance in Algeria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2018;73(8):2034-8.
92. Eghbali Z, Mojtahedi A, Moien Ansar M, Fakhrieh Asl S, Aminian K. Detection of 23SrRNA Mutations Strongly Related to Clarithromycin Resistance in Helicobacter pylori Strains Isolated From Patients in the North of Iran. **Jundishapur J Microbiol**. 2016;9(2):e29694-e.
93. Ramzy I, ELGAREM H, HAMZA I, GHAITH D, ELBAZ T, ELHOSARY W, et al. Genetic mutations affecting the first line eradication therapy of Helicobacter pylori-infected Egyptian patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2016;58.
94. Ghaith D, Elzahry M, Mostafa G, Mostafa S, Elsherif R, Ramzy I. Mutations affecting domain V of the 23S rRNA gene in Helicobacter pylori from Cairo, Egypt. **Journal of Chemotherapy**. 2016 2016/09/02;28(5):367-70.

95. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Novel Mutation in 23S rRNA That Confers Low-Level Resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008;52(9):3465-6.
96. Jenks PJ, Ferrero RL, Labigne A. The role of the rdxA gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 1999;43(6):753-8.
97. Kwon DH, Peña JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J. Frameshift mutations in rdxA and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 2000;46(5):793-6.
98. Marais A, Bilardi C, Cantet F, Mendz GL, Mégraud F. Characterization of the genes rdxA and frxA involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Research in Microbiology**. 2003 2003/03/01/;154(2):137-44.
99. Chua E-G, Debowski AW, Webberley KM, Peters F, Lamichhane B, Loke M-F, et al. Analysis of core protein clusters identifies candidate variable sites conferring metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Report**. 2019;7(1):42-9.
100. Butlop TR, Mungkote NT, Chaichanawongsaroj NT. Analysis of allelic variants of rdxA associated with metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*: detection of common genotypes in rdxA by multiplex allele-specific polymerase chain reaction. **Genetics and molecular research : GMR**. 2016 Sep 2;15(3).
101. Marques B, Donato MM, Cardoso O, Luxo C, Martinho A, Almeida N. Study of rdxA and frxA genes mutations in metronidazole resistant and susceptible *Helicobacter pylori* clinical isolates from the central region of Portugal. **Journal of global antimicrobial resistance**. 2019 Jan 15.
102. Mirzaei N, Poursina F, Moghim S, Rahimi E, Safaei HG. The mutation of the rdxA gene in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. **Advanced biomedical research**. 2014;3:90-.
103. Justino MC, Parente MR, Boneca IG, Saraiva LM. FrxA is an S-nitrosoglutathione reductase enzyme that contributes to *Helicobacter pylori* pathogenicity. **The FEBS Journal**. 2014;281(19):4495-505.
104. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier J-C, Megraud F, et al. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2007 2007/04/01/;29(4):389-96.
105. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q, Petit J-C, Soussy C-J. Single and Double Mutations in *gyrA* but Not in *gyrB* Are Associated with Low- and High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2003;47(12):3942-4.
106. Farzi N, Yadegar A, Aghdaei HA, Sadeghi A, Zali MR. High prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Iran: importance of functional and mutational analysis of resistance genes and virulence genotyping. **bioRxiv**. 2019:569814.
107. Rhoads DD. Lowering the Barriers to Routine Whole-Genome Sequencing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of clinical microbiology**. 2018 Sep;56(9).
108. Quick J, Ashton P, Calus S, Chatt C, Gossain S, Hawker J, et al. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella*. **Genome biology**. 2015 May 30;16:114.
109. Votintseva AA, Bradley P, Pankhurst L, Del Ojo Elias C, Loose M, Nilgiriwala K, et al. Same-Day Diagnostic and Surveillance Data for Tuberculosis via Whole-Genome Sequencing of Direct Respiratory Samples. 2017 May;55(5):1285-98.

110. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology and Infection**. 2018;24(4):355-60.
111. Rhoads DD, Sintchenko V, Rauch CA, Pantanowitz L. Clinical microbiology informatics. **Clin Microbiol Rev**. 2014 Oct;27(4):1025-47.

ΣΤ. Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α

Πίνακας ΣΤ - 1: Πίνακας κλινικών στελεχών *H. pylori*

Νέα Αρίθμηση	Κλινικά Στελέχη	Νέα Αρίθμηση	Κλινικά Στελέχη
<i>Hp</i> -1	BONES_017c_24012018_206	<i>Hp</i> -20	G1051_032a_20102017_183
<i>Hp</i> -2	G1005_030b_24102017_184	<i>Hp</i> -21	G1052_017b_20102017_183
<i>Hp</i> -3	G1013_017a_20072017_152	<i>Hp</i> -22	G1061_018b_20102017_183
<i>Hp</i> -4	G1017_018a_20072017_152	<i>Hp</i> -23	G1065_019b20102017_183
<i>Hp</i> -5	G1020_019a_20072017_152	<i>Hp</i> -24	G1066_020b_20102017_183
<i>Hp</i> -6	G1021_020a_20072017_152	<i>Hp</i> -25	G1068_018c_24012018_206
<i>Hp</i> -7	G1022_021a_20072017_152	<i>Hp</i> -26	G1070_021b_24102017_184
<i>Hp</i> -8	G1023_022a_20072017_152	<i>Hp</i> -27	G1073_022b_24102017_184
<i>Hp</i> -9	G1025_023a_20072017_152	<i>Hp</i> -28	G1075_023b_24102017_184
<i>Hp</i> -10	G1028_024a_20072017_152	<i>Hp</i> -29	G2011_024b_24102017_184
<i>Hp</i> -11	G1034_025a_20072017_152	<i>Hp</i> -30	G2012_025b_24102017_184
<i>Hp</i> -12	G1037_026a_20072017_152	<i>Hp</i> -31	G2023_026b_24102017_184
<i>Hp</i> -13	G1038_027a_20102017_183	<i>Hp</i> -32	G2028_027b_24102017_184
<i>Hp</i> -14	G1040_028a_20102017_183	<i>Hp</i> -33	G2030_019c_24012018_206
<i>Hp</i> -15	G1042_029a_20102017_183	<i>Hp</i> -34	G2034_020c_24012018_206
<i>Hp</i> -16	G1044_030a_20102017_183	<i>Hp</i> -35	G2037_021c_24012018_206
<i>Hp</i> -17	G1046_031a_20102017_183	<i>Hp</i> -36	G2041_028b_24102017_184
<i>Hp</i> -18	G1048_031b_24012018_206	<i>Hp</i> -37	G2043_029b_24102017_184
<i>Hp</i> -19	G1049_032b_24012018_206	<i>Hp</i> -38	G2048_022c_24012018_206

1. Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rdxA*

Πίνακας ΣΤ - 2: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rdxA* σε στελέχη ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο
Hr-3	A438G	CAA-->CAG
	G585A	GCG-->GCA
	C450T	GGC-->GGT
Hr-20	A597G	TCA-->TCG
	C130T	CCA-->TCA
Hr -24, Hr-25	G630A	TTG-->TTA
Hr-28	C48T	CGC-->CGT
	T333C	GTT-->GTC

Πίνακας ΣΤ - 3: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rdxA* σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στη μετρονιδαζόλη στελέχη.

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αριθμός στελεχών
T34C	TTA-->CTA	2
A36G	TTA-->TTG	7
T37C	TTA-->CTA	13
A39G	TTA-->TTG	7
T37C & A39G	TTA-->CTG	
C42T	AAC-->AAT	9
G45A	GAG-->GAA	10
T69C	GAT-->GAC	7
T84C	TTT-->TTC	4

C117T	ATC-->ATT	4
C120T	GCC-->GCT	7
G123A	AGG-->AGA	16
C141T	TAC-->TAT	2
G147A	ACG-->ACA	2
G150A	CAG-->CAA	9
A153G	CCA-->CCG	4
C173T	ACT-->ATT	2
A189G	AAA-->AAG	2
A192G	AAA-->AAG	6
T213C	TAT-->TAC	8
C216T	TTC-->TTT	27
G225A	GAG-->GAA	32
T262C	TCT-->CCT	2
C273T	CCC-->CCT	9
A288(C/G)	CCA-->CC(C/G)	11
C294T	GGC-->GGT	4
C297T	CAC-->CAT	15
A306G	CAA-->CAG	2
T309C	AAT-->AAC	20
C312T	CTC-->CTT	20
T315C	TAT-->TAC	16
G318A	CCG-->CCA	3

T322G	TCT-->GCT	3
A330G	AAA-->AAG	22
T333C	GTT-->GTC	3
C342T	ATC-->ATT	7
C345(G/A)	CCC-->CC(G/A)	7
C381T	CAC-->CAT	4
A411G	TTA-->TTG	2
C426T	ATC-->ATT	3
T429G	GCT-->GCG	3
A459G	TTA-->TTG	3
A465G	GGA-->GGG	4
G504A	AAG-->AAA	23
A513G	GAA-->GAG	8
C552T	TGC-->TTGT	5
C558T	ATC-->ATT	3
T561A	GCT-->GCA	4
C567T	GGC-->GGT	25
A578G	GCA-->GCG	5
T588C	AGT-->AGC	37
C589A	CAA-->AAA	37
A609G	AAA-->AAG	5
G618A	GCG-->GCA	23

2. ΣΙΩΠΗΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟ *frxA*

Πίνακας ΣΤ - 4: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *frxA* σε στελέχη ανθεκτικά στη μετρονιδαζόλη.

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο
<i>Hp</i> -18	C33T	CAC-->CAT
<i>Hp</i> -19	G402A	TTG-->TTA
<i>Hp</i> -23	T42C	TTT-->TTC
<i>Hp</i> -23	T96G	GCT-->GCG
<i>Hp</i> -32	A294G	AAA-->AAG
<i>Hp</i> -23	C372T	AAC-->AAT
<i>Hp</i> -23	C382T & C384G	CTC-->TTG
<i>Hp</i> -24	C234T	AGC-->AGT
<i>Hp</i> -25	G441A	GCG-->GCA
<i>Hp</i> -28	T639C	TAT-->TAC
<i>Hp</i> -15, <i>Hp</i> -23	T69C	CGT-->CGC
<i>Hp</i> -10, <i>Hp</i> -19	G541T	CTG-->TTG
<i>Hp</i> -7, <i>Hp</i> -10, <i>Hp</i> -23	G543A	CTG-->TCA
<i>Hp</i> -11, <i>Hp</i> -19, <i>Hp</i> -23	G594T	AAC-->AAT

Πίνακας ΣΤ - 5: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *frxA* σε στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα στη μετρονιδαζόλη

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αριθμός στελεχών
T63C	CCT-->CCC	7
C78(T/A)	TCC-->TC(T/A)	6
A114G	AGA-->AGG	16
G162A	TTG-->TTA	17
A165G	AAA-->AAG	13
G210A	GCG-->GCA	4
G222A	TTG-->TTA	34
G255A	GCG-->GCA	3
A261G	AAA-->AAG	5
C285T	TAC-->TAT	14
A291G	AAA-->AAG	28
A312G	AAA-->AAG	3
C327T	GAC-->GAT	2
T330C	ACT-->TCT	9
T336(C/A)	TCT-->TC(C/A)	33
C351A	ATC-->ATA	4
T399C	TCT-->TCC	2
T414C	GCT-->GCC	4
A534G	AAA-->AAG	11
G564A	GTG-->GTA	5
G567(T/A)	TCG-->TC(T/A)	5
T591C	CGT-->CGC	36
C618T	CGC-->CGT	17
G624A	AAG-->AAA	3

3. ΣΙΩΠΗΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟ *rpsU*

Πίνακας ΣΤ - 6: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *rpsU* σε στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα στη μετρονιδαζόλη

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αριθμός στελεχών
T48C	TAT-->TAC	14
G51A A49C & G51A	AGG-->AGA AGG-->CGA	6
G63A	AGG-->AAA	2
A66G	CAA-->CAG	2
A81G	TTA-->TTG	36
C96T	TGC-->TGT	2
T99C	CGT-->CGC	21
G108A	AGG-->AGA	2
G117A	GAG-->GAA	4
T120C	TCT-->TCC	3
G123A	AAG-->AAA	11
C150T	ATC-->ATT	3
C153T	AGC-->AGT	12
G165A	AAG-->AAA	31
T168C	GTT-->GTC	23
G171A	TTG-->TTA	24
T183C	TAT-->TAC	4
G201A	GAG-->GAA	31

4. ΣΙΩΠΗΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟ *gyrA*Πίνακας ΣΤ - 7: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* σε στελέχη ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο
<i>Hp-7</i>	C990T	ACC → ACT
<i>Hp-21</i>	C1692T	GGC → GGT
	C1635T	TTC → TTT
<i>Hp-26</i>	C249A	CCC → CCT
	A318G	TTA → TTG
	A768G	AAA → AAG
	G1242A	GAG → GAA
	G1293A	TTG → TTA
	C2424T	TGC → TGT
<i>Hp-36</i>	C1074T	AAC → AAT
	C2250T	ACC → ACT
	T2310C	ACT → ACC

Πίνακας ΣΤ - 8: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrA* σε στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα στη λεβοφλοξασίνη

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αριθμός στελεχών
T54C	GAT-->GAC	7
C87A	TCC-->TCA	9
C108T	CGC-->CGT	6
T129C	GAT-->GAC	8
C141(A/T)	CCC-->CC(A/T)	31
T153C	CGT-->CGC	4
C180(T/A)	GGC-->GG(T/A)	7
A189C	TCA-->TCC	37
C201T	TAC-->TAT	21
C246T	CAC-->CAT	4
T261C	AAT-->AAC	31
G291A	GCG-->GCA	5
C303T	TCC-->TCT	22
C333(T/A)	GGC-->GG(T/A)	9
C363T	GCC-->GCT	36
T459C	TAT-->TAC	11
C462T	GAC-->GAT	36
T465C	GAT-->GAC	34
T487C	TTA-->CTA	19
T537C	GCT-->GCC	15
G540A	GTG-->GTA	33
G543(A/C)	GGG-->GG(A/C)	13
C567T	CAC-->CAT	9
C582T	ATC-->ATT	1
C636T	ATC-->ATT	33
A639G	TTA-->TTG	20
T660C	GAT-->GAC	23
C666T	CCC-->CCT	9
T669C	ACT-->ACC	16
T672C	GGT-->GGC	4
C687T	GGC-->GGT	8
G690A	AAG-->AAA	9
G693A	GCG-->GCA	10
T696G	GGT-->GGG	10
G675A	GGG-->GGA	2
A726G	GGA-->GGG	37
A762G	AAA-->AAG	24
A765G	ACA-->ACG	21
T804C	TTT-->TTC	15
G849A	GCG-->GCA	5
G858A	AAG-->AAA	18

T876C	AGT-->AGC	35
G882T	GTG-->GTT	8
G891A	GAG-->GAA	6
A912G	AGA-->AGG	10
C936T	GAC-->GAT	2
G939A	GCG-->GCA	5
C963T	CAC-->CAT	8
C966T	CTC-->CTT	13
T981C	ACT-->ACC	27
A987C	GAA-->GAG	27
C1002T	ATC-->ATT	5
T1006C	TTA-->CTA	16
C1020T	TAC-->TAT	18
A1083G	AAA-->AAG	2
G1104T	ACG-->ACT	9
A1116G	TTA-->TTG	17
G1128A	AAG-->AAA	7
C1131T	GCC-->GCT	20
A1164C	GCA-->GCC	7
C1165T	CTA-->TTA	14
A1167G	CTA-->CTG	8
C1248T	TTC-->TTT	22
C1257T	AGC-->AGT	7
G1260A	GAG-->GAA	30
T1263C	ATT-->ATC	31
A1266G	CAA-->CAG	8
G1272A	AAG-->AAA	33
C1275T	GCC-->GCT	3
G1323A	AAG-->AAA	18
G1347A	TTG-->TTA	16
T1348C	TTG-->CTG	13
G1350A	TTG-->TTA	27
G1419A	GAG-->GAA	2
A1434G	AAA-->AAG	6
C1491T	GAC-->GAT	8
A1524G	GTA-->GTG	31
T1536C	AGT-->AGC	31
T1593(C/A/G)	GGT-->GG(C/A/G)	35
A1599G	AAA-->AAG	29
C1602(T/A)	GGC-->GG(T/A)	5
C1635T	TTC-->TTT	2
T1708C	TTG-->CTG	4
T1710A	TTG-->TTA	12
C1758G	GCC-->GCG	2
A1764G	GTA-->GTG	37
G1785T	CCG-->CCT	6
G1803A	GCG-->GCA	18
T1806C	ACT-->ACC	18
C1815T	ACC-->ACT	14
G1842A	TTG-->TTA	32
C1845T	CCC-->CCT	28

G1803A	GCG-->GCA	18
T1806C	ACT-->ACC	18
C1815T	ACC-->ACT	14
G1842A	TTG-->TTA	32
C1845T	GCC-->GCT	28
G1854(C/A)	ACG-->AC(C/A)	10
G1863(T/G)	GGC-->GG(T/G)	9
C1902T	AAC-->AAT	13
T1948C	TTA-->CTA	2
T1980C	GCT-->GCC	8
C2010T	GGC-->GGT	16
C2049(T/G)	ATC-->AT(T/G)	10
C2076(G/T)	GGC-->GG(G/T)	34
C2079T	ATC-->ATT	27
C2094T	AAC-->AAT	17
T2109C	GGT-->GGC	24
T2118C	GGT-->GGC	12
G2145A	TTG-->TTA	4
T2154C	AGT-->AGC	17
A2157G	GAA-->GAG	18
T2179C	TTA-->CTA	7
C2184T	GCC-->GCT	4
C2253T	GGC-->GGT	5
C2229T	GGC-->GGT	2
G2277A	GTG-->GTA	8
A2286G	GAA-->GAG	10
T2289C	AAT-->AAC	23
T2290C	TTG-->CTG	18
TT(2296-2298)CC	TTG-->CTC	2
C2304T	ATC-->1TT	2
A2313G	GCA-->GCG	11
A2319G	GCA-->GCG	26
C2328T	ATC-->ATT	16
T2337C	TCT-->TCC	21
T2346C	GAT-->GAC	21
C2367T	AAC-->AAT	12
C2397T	GCC-->GCT	7
T2427C	CCT-->CCC	3
T2458C	TCT-->CCT	12
T2460A	TCT-->TCA	4
G2475A	TTG-->TTA	17

5. ΣΙΩΠΗΛΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΟ *gyrB*

Πίνακας ΣΤ - 9: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *gyrB* σε στελέχη ανθεκτικά στη λεβοφλοξασίνη

Στέλεχος	Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο
Hp-7	C1224T	TGC-->TGT
	A1380G	CTA-->CTG
	T1575C	TAT-->TAC
	T1590C	CCT-->CCC
	G1605A	AAG-->AAA
Hp-36	A1392G	GAA-->GAG
Hp-26	A198T	TCA-->TCT
	C711T	CCC-->CCT
Hp-36	C495T	GGC-->GGT

Πίνακας ΣΤ - 10: Σιωπηλές μεταλλάξεις στο γονίδιο *ggrB* σε στελέχη ανθεκτικά και ευαίσθητα στη λεβοφλοξασίνη

Νουκλεοτιδική αλλαγή	Νέο κωδικόνιο	Αριθμός στελεχών
T81C	GGT-->GGC	37
C87T	ACC-->ACT	4
T96G	GGT-->GGG	2
G126A	GTG-->GTA	3
C162T	TGC-->TGT	3
T156C	GGT-->GGC	15
C181T	ACC-->ACT	37
T195G	GGT-->GGG	21
C204T	ATC-->ATT	32
T237C	GAT-->GAC	4
T240C	ATT-->ATC	14
T285A	ATT-->ATA	5
C312T	AAC-->AAT	25
A324G	AAA-->AAG	5
G372A	TTG-->TTA	11
C375T	AGC-->AGT	2
T414C	ATT-->ATC	37
A423G	CAA-->CAG	2
T441C	ATT-->ATC	23
T444C	CCT-->CCC	27
A471G	AAA-->AAG	2
C480T	AGC-->AGT	5
A534G	GAA-->GAG	9
A561G	TTA-->TTG	31
A567G	AAA-->AAG	12
T573C	TTT-->TTC	34
C594T	AAC-->AAT	27
T597C	GAT-->GAC	12
A603G	TTA-->TTG	4
G642A	GAG-->GAA	7
G702A	TTG-->TTA	3
T735C	GAT-->GAC	7
A759G	GAT-->GAC	13

C766T & A768G	CTA-->TTA	CTA-->TTG	20
T786C	TAT-->TAC		36
T798C	ACT-->ACC		5
T819C	ATT-->ATC		2
A831G	GAA-->GAG		34
T834(C/A)	GGT-->GG(C/A)		29
G846A	GAG-->GAA		4
A873G	AAA-->AAG		26
A876G	GCA-->GCG		37
G882A	TTG-->TTA		37
T888C	TAT-->TAC		17
T900C	AAT-->AAC		36
A918G	TCA-->TCG		30
C927T	ATC-->ATT		29
T936C	GAT-->GAC		36
G948C	GGG-->GGC		14
C978T	AGC-->AAT		6
T984G	CCT-->CCG		15
G987A	TTG-->TTA		17
G999A	CAG-->CAA		2
C1017T	GGC-->GGT		7
T1020C	AGT-->AGC		7
C1032A	CGC-->CGA		3
T1068C	CAT-->CAC		11
C1098T	GCC-->GCT		9
A1071G	CAA-->CAG		13
T1107C	ATT-->ATC		18
C1110T	GCC-->GCT		14
A1122T	CTA-->CTT		2
C1123T	CTA-->TTA		2
A1134G	AAA-->AAG		13
T1128C	GCT-->GCC		13
A1134G	AAA-->AAG		13
C1137T	GCC-->GCT		14
C1146T	GCC-->GCT		2
T1149C	AGT-->AGC		15
T1182C	GAT-->GAC		11

T1182C	GAT-->GAC	11
T1200C	ACT-->ACC	9
G1203A	TTG-->TTA	2
T1230C	AGT-->AGC	21
C1236T	GAC-->GAT	2
C1239T	CCC-->CCT	10
A1251G	GAA-->GAG	4
T1275C	AGT-->AGC	31
G1278A	GCG-->GCA	10
C1314T	TTC-->TTT	9
C1329T	CCC-->CCT	3
C1330T	CTA-->TTA	33
A1332G	CTA-->TTG	3
A1335G	AAA-->AAG	22
A1368G	TTA-->TTG	27
A1374G	AAA-->AAG	29
C1422T	TGC-->TGT	21
A1452G	AGA-->AGG	3
G1545A	TTG-->TTA	36
G1551A	CCG-->CCA	4
C1596T	TAC-->TAT	21
G1608A	AAG-->AAA	26
T1623C	ATT-->ATC	10
C1719T	AAC-->AAT	28
C1733T	GCA-->GTA	4
A1734(G/T)	GCA-->GC(G/T)	23
T1749C	TAT-->TAC	28
G1752A	GCG-->GCA	8
C1783T	CTA-->TTA	2
T1779C	AAT-->AAC	22
A1788G	GAA-->GAG	7
CTC(1801-1803)TTG	CTC-->TTG	22
T1812C	ACT-->ACC	4
C1821T	GCC-->GCT	18
A1860G	TTA-->TTG	8
G1887A	CAG-->CAA	3
C1905T	GCC-->GCT	15
C1917T	AGC-->AGT	3
A1920G	TTA-->TTG	34
C1929T	CAC-->CAT	13
A1944G	AAA-->AAG	16
C1962T	AAC-->AAT	20
C1963T	CTA-->TTA	19
T1974C	AAT-->AAC	25
C2016T	TAC-->TAT	16
G2031A	GAG-->GAA	11
T2034C	TAT-->TAC	3
A2040G	TTA-->TTG	5
C2043T	GAC-->GAT	37
A2049G	TTA-->TTG	15
G2157A	TTG-->TTA	24

C1905T	GCC-->GCT	15
C1917T	AGC-->AGT	3
A1920G	TTA-->TTG	34
C1929T	CAC-->CAT	13
A1944G	AAA-->AAG	16
C1962T	AAC-->AAT	20
C1963T	CTA-->TTA	19
T1974C	AAT-->AAC	25
C2016T	TAC-->TAT	16
G2031A	GAG-->GAA	11
T2034C	TAT-->TAC	3
A2040G	TTA-->TTG	5
C2043T	GAC-->GAT	37
A2049G	TTA-->TTG	15
G2157A	TTG-->TTA	24
G2193(A/C)	TTG-->TT(A/C)	31
C2202T	CTC-->CTT	3
A2217G	TTA-->TTG	24
C2226T	ACC-->ACT	2
C2235T	GTC-->GTT	7
T2301C	GAT-->GAC	15
A2307G	AAA-->AAG	10
A2310G	CAA-->CAG	17
C2311T & A2313G	CTA-->TTG	5

	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
23S rRNA -	AAATTGTA	GGAGGTGAAA	ATTCTCTCTTA	CCCGCGGCAA	GAGGGTAAGA	CCCCTGGGAC	CTTTACTACA	ACTTAGCACT	GCTAAATGGGA	ATAATCATGGG
Hp-2
Hp-9
Hp-10
Hp-13
Hp-16
Hp-17
Hp-19
Hp-20
Hp-29
Hp-30
Hp-31
Hp-36
Hp-1
Hp-3
Hp-4
Hp-5
Hp-6
Hp-7
Hp-8
Hp-11
Hp-12
Hp-14
Hp-15
Hp-18
Hp-20
Hp-22
Hp-23
Hp-24
Hp-25
Hp-26
Hp-27
Hp-28
Hp-32
Hp-33
Hp-34
Hp-35
Hp-37

Εικόνα ΣΤ - 1: Στοιχισμένες αλληλουχίες της περιοχής του γονιδίου 23S rRNA, στην οποία εντοπίζονται οι καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις A2146G, A2147G και T2186C, οι οποίες συνδέονται με την ανάπτυξη αντοχής του *H. pylori* στην κλαριθρομυκίνη. Εικόνα από το υπολογιστικό πρόγραμμα Bioedit.

	80	90	100	110	120	130	140		
Ανθεκτικά									
Στελέχη									
gyrA-Hp2	ARIVGDVIGK	YHPHGDNNAVY	D	ALVLRMAQDF	SMRLELVDGQ	GNFGSIDGDN	AAAMRYTEAR	MTKASEEILR	140
Hp-7									140
Hp-21									140
Hp-26									140
Hp-36									140
Ευαίσθητα									
Στελέχη									
Hp-1									140
Hp-2									140
Hp-3									140
Hp-5									140
Hp-6									140
Hp-8									140
Hp-9									140
Hp-10									140
Hp-11									140
Hp-12									140
Hp-13									140
Hp-14									140
Hp-15									140
Hp-16									140
Hp-17									140
Hp-18									140
Hp-19									140
Hp-20									140
Hp-22									140
Hp-23									140
Hp-24									140
Hp-25									140
Hp-27									140
Hp-28									140
Hp-29									140
Hp-30									140
Hp-31									140
Hp-32									140
Hp-33									140
Hp-34									140
Hp-35									140
Hp-37									140
Hp-4									140

Εικόνα ΣΤ - 2: Στοιχισμένες αλληλουχίες της περιοχής του γονιδίου *gyrA*, στην οποία εντοπίζονται οι καλά χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις D91Y και N87T. Εικόνα από το υπολογιστικό πρόγραμμα Bioedit.

"Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον».

