

Streszczenie rozprawy doktorskiej
„Profil oporności szczepów *Helicobacter pylori*”
ppor. mgr Aldona Bińkowska

Promotor: prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak

Niepowodzenia w terapii zakażeń *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) są najczęściej spowodowane przez ciągły wzrost oporności szczepów na stosowane leki. Mechanizmy powstawania oporności na antybiotyki u szczepów *H. pylori* nie są jasne i wciąż wymagają głębszego poznania.

Celem pracy była próba wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę, lewofloksacynę i metronidazol.

W pracy przebadano 170 szczepów *H. pylori* izolowanych z wycinków błony śluzowej żołądka dzieci (123) i osób dorosłych (47) z różnymi chorobami przewodu pokarmowego. Lekowrażliwość szczepów *H. pylori* określono metodą pasków nasączonych antybiotykiem w gradiencie stężeń (E-test, Biomerieux). Ponadto w pracy wykorzystano techniki biologii molekularnej (PCR, multipleks PCR oraz sekwencjonowanie klasyczne fragmentów DNA).

Wśród 170 szczepów *H. pylori* pochodzących od dzieci i osób dorosłych 26% było wrażliwych, 74% opornych na co najmniej jeden z badanych antybiotyków, natomiast aż 32% stanowiły szczepy wielooporne. 56% szczepów *H. pylori* było opornych na MTZ, przy czym prawie połowa z nich (24%) była oporna tylko na MTZ. Szczepy *H. pylori* oporne na CH stanowiły 46%, a tylko 17% było opornych jedynie na CH. Oporność na LEV występowała u 6% badanych szczepów *H. pylori* i 1% był oporny tylko na LEV. Wszystkie badane szczepy były wrażliwe na AMC i TET. Szczepy oporne na klarytromycynę częściej występowały u dzieci niż u dorosłych. Nie stwierdzono związku między opornością szczepów *H. pylori* a obecnością genów *cagA* oraz *vacA*.

Spośród 170 szczepów, dla których określono wrażliwość na klarytromycynę do dalszych badań wybrano 106 szczepów. Wśród szczepów opornych na CH 72% posiadało mutację A2143G, w tym 56% miało pojedynczą mutację, u pozostałych 10% wykryto następujące mutacje: A2143G + T2182C, A2143G + A2223G, A2143G + A2174G oraz A2143G + C2195T + A2223G.

Wystąpienie oporności na CH jest obarczone 23x wyższym ryzykiem u szczepów z mutacją A2143G niż u szczepów dzikich. Wraz ze wzrostem liczby mutacji w genie *23s rRNA* procent szczepów wrażliwych statystycznie istotnie spada ($p=0,00000$), a stopień oporności jest większy ($p=0,00928$). Dla oporności na klarytromycynę kluczowa jest mutacja A2143G, co jest istotne statystycznie ($p=0,00000$). Szczepy z mutacją A2143G charakteryzują się niższymi wartościami MIC w porównaniu do szczepów z mutacją A2142G.

Oporność szczepów *H. pylori* na fluorochinolony najczęściej wiąże się z mutacjami w genie *gyrA* w kodonach 87 i 91, a także w genie *gyrB*. Do analizy mutacji w genach *gyrA* oraz *gyrB* zakwalifikowano 22 szczepy *H. pylori*, w tym 10 szczepów opornych na lewofloksacynę jako grupę badaną oraz 12 szczepów wrażliwych jako grupę kontrolną.

Wśród opornych na fluorochinolony szczepów *H. pylori* najczęściej obserwowano mutacje w kodonie 91, które występowały u 40% szczepów, przy czym mutacja Asp91Gly była u 20%, Asp91Asn u 10% oraz Asp91Tyr u 10%. Mutacja w kodonie 87 była u 20% szczepów, gdzie dochodziło do zmiany asparaginy na lizynę. Po analizie statystycznej całej badanej sekwencji wykazano, że obecność izoleucyny w pozycji 191 genu *gyrA* zmniejsza ryzyko oporności na fluorochinolony o 87%. Obecność alleli GCG w pozycji 122 genu *gyrA* zwiększa ryzyko wystąpienia oporności na lewofloksacynę 8 razy.

W dalszym etapie pracy przeprowadzono analizę częstości mutacji występujących w genie *rdxA*, który uznaje się za istotny w mechanizmie oporności na metronidazol. Do sekwencjonowania genu *rdxA* zakwalifikowano 19 szczepów *H. pylori* opornych oraz 16 szczepów wrażliwych na metronidazol. W niniejszej pracy dochodziło do mutacji w tych samych pozycjach genu *rdxA* u szczepów opornych i wrażliwych na metronidazol. Niektóre pojedyncze mutacje punktowe spowodowały powstanie kodonów stop.

Streszczenie rozprawy doktorskiej
„Profil oporności szczepów *Helicobacter pylori*”
w języku angielskim

Treatment failure of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is caused mainly by progressive antibiotic resistance among *H. pylori* strains. Mechanisms of this drug resistance are unclear and required further research.

This aim of the study was the explanation of mechanisms of resistance among *H. pylori* strains to clarithromycin, levofloxacin and metronidazole.

In the study, 170 *H. pylori* strains, isolated from gastric biopsy specimens taken from children (123) and adults (47) suffered from different gastrointestinal diseases, were examined. The antimicrobial susceptibility of *H. pylori* strains was determined using the E-test (BioMerieux), according to the EUCAST breakpoints. Additionally, genomic DNA from these isolates was sequenced to detect mutations associated with antimicrobial resistance by using different molecular methods (PCR, PCR multiplex and the classical sequencing of DNA fragments).

Among 170 *H. pylori* strains from children and adults, 26% of them were fully sensitive and 74% were resistant to at least one of examined antibiotic, whereas 32% of strains were multidrug resistant. 56% of *H. pylori* strains were resistant to MTZ and almost a half of them (24%) were resistant only to MTZ. 46% of tested strains were resistant to CH, but only 17% of them were resistant to CH. Resistance to LEV was detected in 6% of the isolates and 1% of strains was resistant only to LEV. All isolated strains were susceptible to amoxicillin and tetracycline.

The presence of *H. pylori* strains resistant to clarithromycin was significantly more frequent in children than in adults. There was no association between the antibiotic resistance of *H. pylori* strains and presence of *cagA* and *vacA* genes.

A total of 106 *H. pylori* strains out of 170 tested for clarithromycin sensitivity were chosen for further molecular studies. Among the clarithromycin-resistant strains, the A2143G point mutation was found in 72% of them. In 56% of these strains, only this point mutation was detected, whereas in 10% of them, the other point mutations were identified, such as: A2143G + T2182C, A2143G + A2223G, A2143G + A2174G oraz A2143G + C2195T + A2223G.

Strains harboring the A2143G mutation showed 23-fold higher risk for the presence of resistance to clarithromycin than wild strains. The increasing number of

point mutations in *23s rRNA* gene leads to decrease in the percentage of clarithromycin-susceptible strains ($p=0,00000$) as well as increase in the rates of antimicrobial resistance ($p=0,00928$). The most important mutation in resistance to clarithromycin seemed to be A2143G mutation ($p=0,0000$). The strains with A2143G mutation possessed lower MIC value than strains with A2142G mutation.

H. pylori resistance to fluoroquinolones is linked to mutations at positions 87 and 91 of *gyrA* gene and mutations in *gyrB* gene. To detect mutations in *gyrA* and *gyrB* gene, 22 *H. pylori* strains were analysed, of which 10 were resistant to levofloxacin and 12 were susceptible (control group).

Among levofloxacin-resistant *H. pylori* strains, the most common mutation, present in 40% of strains, was at position of *gyrA* 91, whereas Asp91Gly was in 20%, Asp91Asn in 10% and Asp91Tyr in 10% of strains. Mutation at position 87 in *gyrA* was detected in 20% of strains, where it was a change from Asp to Lys. The presence of Ile at 191 position in *gyrA* gene decreased risk for development of resistance to fluoroquinolones in about 87%. The presence of GCG allele at 122 position in *gyrA* gene may increase 8-fold risk for development of resistance to levofloxacin among *H. pylori* strains.

In the next step, the relationship between metronidazole resistance and mutations of *rdxA* gene was analysed. To sequenced *rdxA* gene, 19 metronidazole-resistant and 16 metronidazole-susceptible strains (control group) were taken. The same mutations at *rdxA* gene were identified in both metronidazole-resistant and susceptible strains. The presence of stop codons was associated with some certain point mutations.