

# Καλλιέργεια και test ευαισθησίας

Ανδρέας Μεντής

## Καλλιέργεια του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού

Η καλλιέργεια είναι η μέθοδος που έκανε εφικτή την ανακάλυψη του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού (*Επ*) πριν από 25 χρόνια. Τη δεκαετία του '80 χρησιμοποιήθηκε κυρίως για τη διάγνωση της λοιμώξεως από *Επ*, με την πάροδο όμως του χρόνου η σημασία της για την απομόνωση του βακτηρίου μειώθηκε κυρίως λόγω της αναπτύξεως αξιόπιστων, μη επεμβατικών, μεθόδων ανίχνευσης της παρουσίας του μικροβίου. Σήμερα, η καλλιέργεια χρησιμοποιείται για την τυποποίηση στελεχών του *Επ*, τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δραστηριότητας και αποτελεί τη μοναδική επιλογή για απομόνωση του *Επ* για ερευνητικούς σκοπούς.

Η διαγνωστική ακρίβεια της καλλιέργειας εξαρτάται κυρίως από την προσήλωση στις τεχνικές λεπτομέρειες της μεθόδου και μπορεί να φθάσει σε ευαισθησία το 98% και σε ειδικότητα το 100%.<sup>1</sup> Τα σφάλματα που επηρεάζουν τη διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου μπορεί να γίνουν κατά τη γαστροσκόπηση, τη λήψη και μεταφορά των βιοψιών καθώς και κατά τη διαδικασία απομόνωσης του *Επ*.

## Γαστροσκόπηση – Λήψη βιοψιών

Το τελικό αποτέλεσμα της καλλιέργειας του *Επ* εξαρτάται κατά πολύ από την ποιότητα του δείγματος που θα φθάσει στο εργαστήριο. Κατ' αρχάς ο ασθενής δεν θα πρέπει να έχει λάβει αντιβιοτικά ή PPI τις τελευταίες δύο εβδομάδες από τη λήψη

---

Ιατρός Βιοπαθολόγος, Διευθυντής Διαγνωστικού Τμήματος, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur

βιοψίας στομάχου για καλλιέργεια. Σημαντική είναι η σωστή προετοιμασία του γαστροσκοπίου, το οποίο πρέπει να απολυμαίνεται για την αποφυγή μετάδοσης *Επ* ή άλλων μικροβίων από τον ένα ασθενή στον επόμενο και για να μην αναπτύσσονται μικρόβια της χλωρίδας του ανωτέρω πεπτικού και αναπνευστικού συστήματος. Πρέπει όμως να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι παραμονή έστω και ιχνών απολυμαντικής ουσίας μετά το ξέπλυμα του γαστροσκοπίου μπορεί να μειώσει την πιθανότητα αναπτύξεως του *Επ*. Τέλος, σε περίπτωση που το pH του στομάχου δεν είναι επαρκώς όξινο, είναι δυνατόν να υπεραναπτυχθούν μικρόβια της χλωρίδας του στομάχου που θα κάνουν την απομόνωση του *Επ* λίαν δυσχερή.

Ο αριθμός, αλλά και τα σημεία λήψεως της βιοψίας από το βλεννογόνο του στομάχου παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαγνωστική ακρίβεια της καλλιέργειας, καθόσον η κατανομή του μικροβίου μπορεί να μην είναι ομοιογενής στο βλεννογόνο. Για το λόγο αυτό συστήνεται η λήψη δύο τεμαχίων βιοψίας από το άντρο και από ένα τεμάχιο από το πρόσθιο και οπίσθιο τοίχωμα του στομάχου. Εάν δεν είναι εφικτό να ληφθούν όλες αυτές οι βιοψίες, συστήνεται η λήψη ενός τεμαχίου βιοψίας από το άντρο, σε απόσταση 2 cm από τον πυλωρό.<sup>1</sup> Πρέπει να θυμόμαστε ότι μετά λήψη αντιεκκριτικών παραγόντων, το *Επ* μπορεί να βρίσκεται μόνο στο σώμα του στομάχου και όχι στο άντρο. Τέλος, τα δείγματα για καλλιέργεια πρέπει να λαμβάνονται πριν από τα δείγματα για ιστολογική εξέταση, διότι η μεταφορά έστω και ιχνών συντηρητικού, μπορεί να καταστήσει το *Επ* μη βιώσιμο για καλλιέργεια.

### **Μεταφορά του δείγματος**

Το *Επ* είναι ένας πολύ ευαίσθητος μικροοργανισμός και απαιτείται προστασία κατά τη μεταφορά του δείγματος από αφυδάτωση, επαφή με το οξυγόνο του ατμοσφαιρικού αέρα και έκθεση σε θερμοκρασία δωματίου. Εάν ο χρόνος που απαιτείται για τη μεταφορά στο εργαστήριο είναι μικρότερος των 4 ωρών, μπορεί το τεμάχιο(α) βιοψίας να τοποθετηθούν σε φυσιολογικό ορό.<sup>2</sup> Εάν όμως απαιτείται περισσότερος χρόνος πρέπει απαραίτητα να χρησιμοποιηθεί υλικό μεταφοράς, όπως θειογλυκολικός ζωμός, ή άλλο εμπορικά διαθέσιμο υλικό μεταφοράς όπως το Portagerm και η μεταφορά να γίνει σε θερμοκρασία 4°C εντός το πολύ 24 ωρών. Εάν υπάρχει το ενδεχόμενο να καθυστερήσει η μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο περισσότερο από 24 ώρες, θα πρέπει η βιοψία αρχικά να καταψυχθεί σε βαθιά κατάψυξη -70°C ή σε υγρό άζωτο και η μεταφορά να γίνει σε ξηρό πάγο.

### **Επεξεργασία της βιοψίας**

Είναι κρίσιμο σημείο και πολλές αποτυχιές απομόνωσης του *Επ* στο παρελθόν έχουν αποδοθεί στην παράλειψη ομογενοποίησης της βιοψίας. Αυτή μπορεί να γίνει με μηχανικούς ή ηλεκτρικούς λειοτριβητές (grinder), ή πιο απλά με τη χρήση μικρών

αποστειρωμένων υάλινων σφαιρών και έντονη ανάδευση (vortex). Με τον τρόπο αυτό απελευθερώνεται μεγάλος αριθμός βακτηρίων από τη βιοψία ώστε αυτά να μπορέσουν να αναπτυχθούν στο υλικό καλλιέργειας στο επόμενο στάδιο.

### **Καλλιέργεια βιοψίας**

Το υλικό καλλιέργειας του *Επ* πρέπει να βασίζεται σε υλικά που ευνοούν την ανάπτυξη αναερόβιων και μικροαερόβιων βακτηρίων όπως το υλικό Brain Heart Infusion broth το Wilkins-Chalgren agar ή το Columbia agar και να περιέχει αίμα αλόγου και άλλους τροφικούς παράγοντες, καθώς και αντιβιοτικά για την αναστολή βακτηρίων των φυσιολογικών χλωρίδων και μυκήτων του περιβάλλοντος. Τα υλικά καλλιέργειας πρέπει να χρησιμοποιούνται φρέσκα. Οι μικροαερόβιες συνθήκες καλλιέργειας είναι σημαντικές και φαίνεται ότι όλα τα συστήματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των συνθηκών αυτών κατά την καλλιέργεια του μικροβίου είναι ικανοποιητικά. Για τη φαινοτυπική ταυτοποίηση του μικροβίου συνυπολογίζονται η εμφάνιση των αποικιών, η μικροσκοπική εμφάνιση και κυρίως η παρουσία των ενζύμων καταλάσης και ουρεάσης. Προσοχή όμως χρειάζεται στην ταυτοποίηση *Επ* από δείγματα εκτός του βλεννογόνου του στομάχου, όπως από κόπρανα, σέλο, ή το περιβάλλον. Στις περιπτώσεις αυτές δεν αρκούν οι ανωτέρω περιγραφείσες φαινοτυπικές μέθοδοι, αλλά απαιτείται η επιβεβαίωση με μοριακές μεθόδους με στόχευση τουλάχιστον δύο γονιδίων.

### **Διαγνωστική ακρίβεια καλλιέργειας από άλλα κλινικά υλικά, εκτός βλεννογόνου στομάχου**

Έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης του *Επ* με καλλιέργεια από άλλα κλινικά δείγματα εκτός του γαστρικού βλεννογόνου, με διαγνωστική ακρίβεια κυμαινόμενη σε διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα, αν και η καλλιέργεια γαστρικού υγρού έχει το πλεονέκτημα ότι αντανακλά την παρουσία του *Επ* σε όλο το στομάχι, είναι όμως επεμβατική μέθοδος και η ευαισθησία της είναι μικρότερη του 60%. Προσπάθειες απομόνωσης του βακτηρίου από τα κόπρανα δεν απέδωσαν, αντίθετα όμως η καλλιέργεια μετά λήψη δείγματος με το Enterotest string test φαίνεται ότι έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Στη μέθοδο αυτή κάψουλα ζελατίνης με νάιλον ίνα καταπίνεται από τον ασθενή, και παραμένει για 1 ώρα στο στομάχι, οπότε η ζελατίνη πέπτει. Μετά την πάροδο της ώρας η ίνα αφαιρείται και το απώτερο άκρο της καλλιεργείται. Η ευαισθησία της μεθόδου αυτής κυμαίνεται από 38-97% στη διεθνή βιβλιογραφία.<sup>3</sup> Σε περιπτώσεις τέλος αιμορραγίας του ανωτέρω γαστρεντερικού συστήματος, η ευαισθησία της καλλιέργειας έχει υπολογισθεί γύρω στο 50%.<sup>4</sup>

### **Διαγνωστική ακρίβεια καλλιέργειας *Ep* μετά θεραπεία**

Είναι γνωστό ότι τα αντιβιοτικά μπορεί να αναστείλουν την ανάπτυξη του *Ep* στα καλλιεργητικά υλικά, ακόμη και αν δεν έχει επιτευχθεί η εκρίζωση του βακτηρίου. Επιπλέον, η καλλιέργεια είναι επεμβατική μέθοδος και για τους λόγους αυτούς η μέθοδος αυτή δε συστήνεται για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας εκρίζωσης.

### **Συμπέρασμα**

Η καλλιέργεια είναι μέθοδος η οποία για να δώσει καλά αποτελέσματα απαιτεί την τήρηση των προϋποθέσεων που προαναφέρθηκαν. Στην καθημερινή πράξη έχει παραμερισθεί από άλλες, μη επεμβατικές μεθόδους, θεωρείται όμως ακόμη χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο με ευαισθησία μεγαλύτερη του 90% και ειδικότητα 100%. Αποτελεί την ιδανική μέθοδο για τη δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και την τυποποίηση των στελεχών καθώς και για τη διερεύνηση της χωροταξικής κατανομής των διαφόρων στελεχών του μικροβίου στο ανθρώπινο στομάχι. Τέλος, είναι αναντικατάστατη για ερευνητικές μελέτες όπου απαιτείται η παρουσία του μικροβίου ζωντανού.<sup>5</sup>

### **Διαγνωστική ακρίβεια μεθόδων προσδιορισμού αντοχής *Ep* στα αντιβιοτικά**

Η ανάπτυξη αντοχής του *Ep* στα αντιβιοτικά συνιστά την κυριότερη αιτία αποτυχίας εκρίζωσης του *Ep* μετά χορήγηση θεραπείας. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση αντοχής στην κλαριθρομυκίνη όπως διαπιστώθηκε και σε πρόσφατη μετα-ανάλυση που περιέλαβε στοιχεία από 20 μελέτες. Στη μετα-ανάλυση αυτή, σε συνολικά 1975 ασθενείς των οποίων το θεραπευτικό σχήμα περιλάμβανε PPI και το συνδυασμό αμοξικιλίνης και κλαριθρομυκίνης, το ποσοστό εκρίζωσης σε ασθενείς με ευαίσθητα στελέχη ήταν 87,8%. Το ποσοστό αυτό μειωνόταν στο 18,3% σε ασθενείς με στελέχη που παρουσίαζαν αντοχή στην κλαριθρομυκίνη.<sup>6</sup> Αντίθετα, η επίδραση της αντοχής στη μετρονιδαζόλη στην εκρίζωση του *Ep* δεν είναι τόσο εμφανής.<sup>6</sup> Σύμφωνα με το Maastricht III, η καλλιέργεια και η δοκιμή ευαισθησίας πρέπει να εκτελούνται συστηματικά στις ακόλουθες περιπτώσεις: 1) Πριν τη χρήση κλαριθρομυκίνης, εάν η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη είναι μεγαλύτερη του 15-20% στον πληθυσμό, 2) Μετά 2 αποτυχημένες απόπειρες εκρίζωσης και 3) Από εργαστήρια αναφοράς για την παρακολούθηση της πρωτοπαθούς αντοχής στα αντιβιοτικά.<sup>7</sup> Στην Ελλάδα, η πρωτοπαθής αντοχή στην κλαριθρομυκίνη φαίνεται ότι είναι πολύ υψηλή (26% στους ενήλικες το 2007, Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur, αδημοσίευτες παρατηρήσεις).

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της αντοχής διακρίνονται σε φαινοτυπικές και γονοτυπικές. Εκ των φαινοτυπικών, η μέθοδος της ενσωματώσεως αντιβιοτικού στο άγαρ θεωρείται μέθοδος αναφοράς για την αξιολόγηση των άλλων μεθόδων και χρησιμοποι-

είται για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αντοχής σε μεγάλο αριθμό στελεχών από ερευνητικά εργαστήρια. Για την καθημερινή πράξη η μέθοδος Epsilonometer αποτελεί την πλέον πρακτική μέθοδο. Στα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνονται η δυνατότητα ποσοτικού αποτελέσματος με έκφραση της MIC, και επιπλέον είναι προσαρμοσμένη σε βακτήρια που μεγαλώνουν αργά, όπως το *Επ*. Σύγκριση της μεθόδου της ενσωματώσεως αντιβιοτικού στο άγαρ και της μεθόδου Epsilonometer κατέδειξε ταυτότητα ταξινόμησης των στελεχών ως προς την αντοχή ή ευαισθησία στην κλαριθρομυκίνη και αμοξικιλίνη. Αντίθετα, στην περίπτωση της μετρονιδαζόλης η σύμπτωση των αποτελεσμάτων ήταν μόλις 68,5%.<sup>1</sup> Η διαπίστωση αυτή έρχεται να επιβεβαιώσει παλαιότερες παρατηρήσεις για τον προσδιορισμό αντοχής των στελεχών *Επ* στη μετρονιδαζόλη, σύμφωνα με τις οποίες: 1) Για τη μετρονιδαζόλη υπάρχει έλλειψη ενδο- και δι-εργαστηριακής επαναληψιμότητας, 2) Προ-επάωση των υλικών σε αναερόβια ατμόσφαιρα έχει δείξει ότι καθιστά τη μετρονιδαζόλη πιο δραστική και 3) Στελέχη με υψηλή MIC μπορούν να εκριζωθούν πιθανόν λόγω του μεταβλητού οξειδοαναγωγικού δυναμικού στο στομάχι. Για τους λόγους αυτούς σύμφωνα με το Maastricht III δεν συστήνεται ο συστηματικός (σε ρουτίνα) έλεγχος αντοχής στο αντιβιοτικό αυτό λόγω των δυσκολιών προσδιορισμού αντοχής στη μετρονιδαζόλη και συνιστάται να γίνουν περαιτέρω προσπάθειες προτυποποίησης της μεθόδου.

Οι μοριακές μέθοδοι βασίζονται στο ότι η αντοχή του *Επ* στην πλειονότητα των περιπτώσεων οφείλεται σε ένα περιορισμένο αριθμό χρωμοσωμικών μεταλλάξεων οι οποίες μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν με μοριακές μεθόδους. Οι μοριακές μέθοδοι εφαρμόζονται με επιτυχία για την ανίχνευση των μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στην κλαριθρομυκίνη σε επίπεδο ρουτίνας. Ιδιαίτερα χρήσιμη φαίνεται ότι είναι εμπορικά διαθέσιμη μέθοδος για την ανίχνευση αντοχής στην κλαριθρομυκίνη από τα κόπρανα.<sup>8</sup> Για τα άλλα αντιβιοτικά οι μοριακές μέθοδοι δεν εφαρμόζονται σε επίπεδο ρουτίνας. Πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν επίσης ότι με τις μοριακές μεθόδους μπορούν να ανιχνευθούν ανθεκτικά στελέχη μόνον εφόσον αυτά παρουσιάζουν μεταλλάξεις που είναι γνωστές και δεν θα ανιχνευθούν ανθεκτικά στελέχη των οποίων η αντοχή οφείλεται σε μεταλλάξεις που δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007;20:280-322.
2. Heep M, Scheibl K, Degrell A, et al. Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999;37:3764-3766.
3. Torres J, Camorlinga P, Perez Perez G et al. Validation of the string test for the recovery of *Helicobacter pylori* from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. J Clin Microbiol 2001;39:1650-1651.

4. Gisbert J, Abaira V. Accuracy of *Helicobacter pylori* diagnostic tests in patients with bleeding peptic ulcer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:848-863.
5. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakis K, et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2007;45:488-495.
6. Megraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004;53:1374-1384.
7. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56:772-781.
8. Schabereiter-Gurtner C, Hirsch A, Dragosics B, et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42:4512-4518.