

A *Helicobacter pylori* kimutatásának DNS-alapú diagnosztikai módszerei

Ruzsovics Ágnes, Molnár Béla, Tulassay Zsolt

A *Helicobacter pylori* DNS-ét specifikusan azonosító kimutatási módszerek megbízható diagnosztikai eszközök. Ehhez általános *H. pylori*-struktúrákat és -virulenciafaktorokat használnak, így az ureaseA, a cagA, a vacA vagy az iceA gént. A DNS-alapú polimeráz láncreakció (PCR) módszerhez a DNS-t vagy bakteriális RNS-t a gyomorbiopsziából, a gyomornedvből, a székletből vagy a szájnyalvákból nyerhetjük. A polimeráz láncreakcióval a baktérium kvantitatív módon határozható meg, és genotípusa megközelítőleg 100%-os szenzitivitással és specifitással azonosítható. A *H. pylori* mennyiségi meghatározásának újabb iránya figyelhető meg a real-time PCR alkalmazásával. A FISH (fluoreszcens in situ hibridizáció) és az RFLP (restrikciós hosszpolimorfizmus) módszerek használatával lehetőség nyílik az antibiotikum-rezisztencia rutinszerű kimutatására. A baktérium DNS-szerkezete és virulenciafaktorai az oligonukleotid-microarray-vel (csip) azonosíthatók, ez specifikusan ismeri fel és különbözteti meg a paramétereket.

A *Helicobacter pylori* DNS-alapú kimutatása érzékeny módszer, alkalmazása azonban összetett laboratóriumi felszerelést és többletköltséget igényel.

molekuláris technikák, DNS, PCR, csip, kvantifikáció, tipizálás, polimorfizmuskimutatás

IDENTIFYING HELICOBACTER PYLORI WITH DNA-BASED ASSAYS

The DNA-based assays have the potential to be a powerful diagnostic tool given its ability to specifically identify *H. pylori* DNA. Markers used include general *H. pylori* structures and pathogenetic factors like ureaseA, cagA, vacA, iceA.

DNA or bacterial RNA for polymerase chain reaction (PCR) assays can be collected from gastric biopsy, gastric juice, stool, buccal specimens. PCR can yield quantitative and genotyping results with sensitivity and specificity that approaches 100%. A clear trend in the direction of the determination of quantitative *H. pylori* infection by real-time PCR can be observed. Fluorescent in situ hybridisation (FISH) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) are suggested for routine antibiotic resistance determination. To identify the DNA structure of organism and its virulence factors may be feasible by using oligonucleotide microarray specifically recognising and discriminating bacterial DNA and various virulence factors.

DNA based *H. pylori* diagnosis yields higher sensitivity, however, specificity requires sophisticated labour environment and associated with higher costs.

molecular technology, DNA, PCR, chip, quantification, typing, demonstration of polymorphism

dr. Ruzsovics Ágnes (levelező szerző/correspondent), dr. Molnár Béla, dr. Tulassay Zsolt:
Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Sz. Belgyógyászati Klinika;
Magyar Tudományos Akadémia és Semmelweis Egyetem Gasztroenterológiai és Endokrinológiai
Kutatócsoport/Semmelweis University, Faculty of Medicine, 2nd Department of Internal Medicine;
Gastroenterology and Endocrinology Research Group of National Academy of Science
and Semmelweis University;
H-1088 Budapest, Szentkirályi u. 46. E-mail: agnesr@elender.hu

Érkezett: 2004. február 25. Elfogadva: 2004. április 27.

Az Orvosi genomika rovat szerkesztésében nyújtott segítségéért a szerkesztőség köszönetet mond dr. Falus Andrásnak.

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) alkalmazkodik az emberi gyomorhoz és nagyfokú polimorfizmusra képes. A baktérium fontos jellemzője a genom-DNS nagy változatossága; genetikai változatossága miatt képlékeny genetikai állományú. A baktérium számára ez a plaszticitás szelektív előny, amelyet a gazdaszervezettel együttműködve évtizedek alatt alakít ki (1).

A *H. pylori*-fertőzés kimutatására számos invazív és nem invazív diagnosztikai módszer áll rendelkezésre, jelenleg minden tanulmány alapvető diagnosztikai módszere az endoszkópia. Az utóbbi években kifejlesztett molekuláris módszerek megoldást jelentenek a baktérium kimutatásának problémáira. Klinikai mintákból nyert baktérium-DNS-ből PCR-módszerrel a kis mennyiségben jelen lévő fertőző ágens is kimutatható. Munkánkban áttekintést adunk a *H. pylori*-kimutatás DNS-alapú diagnosztikai módszereiről.

A *Helicobacter pylori* DNS-ének kimutatása különböző mintákból

A *H. pylori* kimutatásában a molekuláris módszerek használata és jelentősége megnövekedett napjainkban; különösen a PCR-technikát fejlesztették, és ezt ajánlják a *gyomorbiopsziás minták* vizsgálatára. A PCR alapú módszer azonosítja a *H. pylori* típusait, és jól használható a baktérium DNS-ének amplifikálására friss és paraffinba ágyazott biopsziás mintákból (2). Számos PCR-teszthez alkalmazott *H. pylori*-primer ismert már. *Young és Kawamura* munkacsoportjai szerint a *gyomornedv*-alapú PCR-módszer a hagyományos biopsziára épülő kimutatási technikák jó alternatívája lehetne (3, 4). Az antrumbiopszia *H. pylori*-sűrűsége mintegy 10^5 – 10^6 cfu/g; ez a mennyiség a fertőzés súlyosságától függően változik, a gyomornedvbe kerülve azonban kevés baktérium marad életképes. A gyomornedvből viszont átlagosan $1,75 \times 10^1$ cfu/ml életképes *H. pylori* tenyészthető.

Széketmintából tenyésztett *H. pylori*-ureáz gén kimutatását is elvégezték PCR segítségével, de a módszer érzékenysége nem megfelelő, és helye még nem bizonyított a rutindiagnosztikai tesztek között (5). A széketmintából PCR-rel kimutatott *H. pylori*-DNS aránya kevés. A módszer korlátját a széketminták esetén általában enzimgátlók jelenlétével magyarázzák (6, 7). Az immunmágneses szeparálás alapján működő PCR a durva összetevőkből összegyűjti a baktériumot, így csökkenti a PCR-gátlók jelenlétét.

Sziliciumdioxid-gél oszlopkromatográfia használatával a nukleinsavak összegyűjthetők a széket sejtjeinek oldatából (8).

Victoria és munkatársai visszatérő stomatitis aphtosa miatt kezelt (RAS) betegek *szájnyálkahártya-keneteiben*

Amplifikáció: Ismert primerek közötti DNS-szekvencia exponenciális felszaporítása.

Deletio: A kromoszóma kisebb-nagyobb szakaszának hiánya.

Genom: A sejtben lévő kromoszómák (DNS), illetve a bennük található gének összessége.

Polimorfizmus: A két, egymással homológ, adott helyen kódolt gén szekvenciája; ezek egy (vagy kevés) nukleotidban különböznek.

Primer: Olyan egyszálú DNS- (vagy RNS-) oligonukleotid, amelyik egy ismert nukleotidszekvenciával komplementer, így ahhoz hibridizálható (párosodási szabály). Az adott típusú polimeráz lánckezdését teszi lehetővé, innen indulva másolja a templátszálat és építi fel az azal komplementer polinukleotid láncot.

Próba: Olyan jelölt nukleinsavszakasz, amely megegyezik egy adott DNS- (vagy RNS-) szekvenciával (vagy annak komplementere).

Transzkripció: Atírás, a DNS-ben lévő genetikai információ alapján a komplementer RNS-lánc előállítás.

vizsgálták PCR segítségével a *H. pylori* jelenlétét. Módszerük érzékenysége és specificitása jelentős, mivel két primer készletet használtak, amely jelentősen csökkenti a nem specifikus termékek képződésének lehetőségét (9).

A DNS izolálása

A DNS-kinyerés legáltalánosabb protokollja paraffinos szövetmintából a fehérjeoldó kezelés, hozzáadott organikus oldószeres tisztítással és alkoholos kicsapással vagy a nélkül. Ennek alternatívája a sejtoldás desztillált vízben vagy főzése kelátképző gyantát tartalmazó oldattal. A kevés sejt vizsgálatára használt gyanták a DNS degradációját azáltal akadályozzák meg, hogy a kelátképző fémionok katalizálják a DNS törését magas hőmérsékleten és kis iontartalmú oldatban (10).

A paraffinos mintákból nyert DNS általában gyenge minőségű, a fixáció és a főzési eljárás miatt töredezett DNS-ből csak kis méretű termékek amplifikálhatók. A biopsziás minták emésztése proteináz K-val több ép DNS-t eredményez, és a PCR érzékenységét is növelheti (6, 11, 12).

Goodwin és Banerjee mikrohullámot alkalmazó eljárással különböző eukaryotaorganizmusokból izolált teljes DNS-t (13, 14). Ez a paraffinos mintákra használt DNS-kinyerési módszer 0,1–10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ közötti DNS-koncentrációt eredményezett, és alkalmazhatóság szempontjából felveszi a versenyt a korábban használt izolálási technikákkal.

A Roche által gyártott, egy lépéses homogenizáló-oldó eljárás (TriPure Reagent) a sejtek darabolását és az endogén nukleázok denaturálását is elvégzi. Ez a reagens DNS-mentes RNS, RNS-mentes DNS és fehérje izolálására egyaránt használható.

A DNS-technikák fontos alkalmazási területe a pontmutációk kimutatása; ezek kódolják a *Helicobacter pylori* terápiájában használt antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát.

1. TÁBLÁZAT

DNS-kivonási módszerek és várható eredményeik különböző mintákból

Minta	Kivonási módszer	Eredmény (µg DNS)	DNS-méret
Friss vagy fagyasztott teljes vér (antikoagulánssal)	proteináz K	3–6 (200 µl)	30–50 kb
	gélextrakció forgó oszloppal	4–12 (200 µl)	100 bp–10 kb
Buffy coat (mononukleáris sejtréteget tartalmazó felülúszó)	proteináz K	20 (200 µl)	30–50 kb
	forgó oszlop	25–50 (200 µl)	70 bp–10 kb
Tenyésztett sejt	proteináz K	15–20 (10 ⁶ sejt)	30–50 kb
	mikrohullám-miniprep	0,1–10 ng/µl (>10 ¹¹ sejt)	200 bp–2 kb
	TriPure reagens	5–7 (10 ⁶ sejt)	–
Friss vagy fagyasztott szövet	forgó oszlop	30–40 (10 ⁷ sejt)	100 bp–25 kb
	proteináz K	5–10 (25 mg szövet)	30–50 kb
	TriPure reagens	2–4 (/mg szövet)	–
Paraffinba ágyazott szövet	forgó oszlop	5–30 (25 mg szövet)	>50 kb
	főzés és proteináz K	35–50 (200 µl)	<950 bp
	kelátképző gyanta	4–6 (100 µl)	100 bp–2 kb
Különböző eukaryotaorganizmus	mikrohullám-miniprep	22,5–25 ng/µl	200 bp–2 kb
	proteináz K	1–3 (10 ⁹ sejt)	30–50 kb
	forgó oszlop	>10 (10 ⁹ sejt)	100 bp–10 kb

kb: kilobázis, bp: bázispár

Számos ismert módszer alapja a *szilíciumdioxid-membrán technológia*: egyszerű DNS-izolálást biztosít vérből vagy testnedvekből, forgóoszlop- vagy vákuum-eljárás segítségével. Specializált kötőpufferek állnak rendelkezésre, ezek elősegítik a DNS molekulaméret szerinti szelektív adszorpcióját.

A *gélextrakciós rendszerrel* a DNS-darabok tisztítása végezhető a nukleinsavak szilíciumdioxid-gél-részecskékhez történő kötődése alapján.

A *gélfiltráció* alapú gyors és eredményes eljárás egyenlő nagyságú pórusokkal ellátott apró golyók segítségével különíti el méretük alapján a molekulákat.

A Qiagen által előállított BioRobot EZ1 egy egyszerű, zárt rendszer; 1-6 mintából nagy mennyiségben képes DNS tisztítására, a kvantitatív PCR- és genotípus-meghatározással párhuzamosan (1. táblázat).

Polimeráz lánreakció

A polimeráz lánreakció (PCR) érzékenyebb és specifikusabb eljárásnak bizonyult, mint a tenyésztés, a szöveten vagy az ureáz-CLO teszt (15). Fokozott érzékenysége miatt a PCR eredményesen használható diagnosztikai módszer akkor is, ha a kórokozók csak kis számban vannak jelen, lassan nőnek vagy bonyolult az azonosításuk (16–19). Jelentős érzékenysége ellenére a módszer eredményét befolyásolhatják azonban a klinikai mintákban jelen lévő, álnegatív eredményhez vezető összetevők. Ennek oka abban állhat, hogy a minta kevés baktériumot tartalmaz és a keresett DNS nagy része elvész a tisztítási eljárás során (20). A PCR érzékenységének csökkenését okozhatja az is, hogy csak egy biopsziás mintát vizsgálunk, amely nem ad választ a gyomor különböző részein történt baktériumkolonizációra, vagy a baktérium csak elszórtan van jelen és a mintából nyert

DNS nem tartalmazza a bakteriális DNS-t (21–23). A *H. pylori*-fertőzöttek körében gyakori *cagA*-pozitív és -negatív törzsek szimultán kolonizációja során a nagyobb sűrűségű kolónia benövi a kisebbet, és ez elégtelen PCR-eredményhez vezethet (23).

Real-time PCR

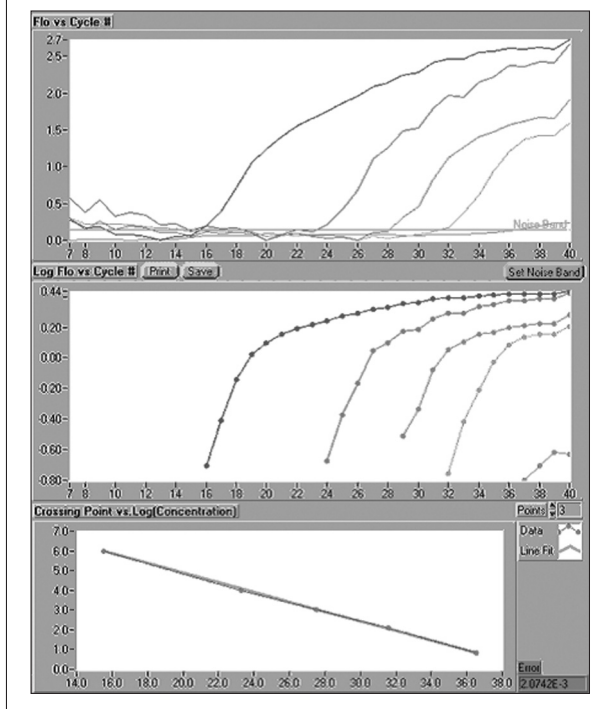
A kvantitatív real-time PCR forradalmasította a PCR-diagnosztikát. Zárt kapillárisrendszere lehetővé teszi a *H. pylori*-törzsek genotípusának egyszerű és gyors meghatározását, és a mutáció kimutatását is (20, 24). A hagyományos PCR-hez képest az is előnye, hogy csökkenti a kontamináció lehetőségét, s a módszer mennyiségi meghatározást is lehetővé tesz.

A PCR-reakció komponenseinek vagy a reakció termékeinek fluoreszcens jelölése esetén a készülék a PCR folyamán ciklusonként keletkező fluoreszcens jeleket megméri, és mintánként kijelzi. Az így keletkező kinetikus görbe – a beépített szoftver és az előzetesen felvett, ismert mennyiségű DNS-t tartalmazó minta (kalibrátor) segítségével – alkalmas a minták kvantitatív értékelésére. Minél korábbi ciklusban válik láthatóvá a kinetikus görbe, annál magasabb a kiindulási kópiák száma (annál több a DNS). A rendszer szoftvere a minta és a kalibrátor kinetikus görbéje alapján automatikusan kiszámolja a minta kiindulási mennyiségét. A mintánk *H. pylori*-DNS-ének mennyiségi meghatározásánál a készülék összehasonlítja a mért értékeket egy ismert *H. pylori*-DNS-minta görbéjével (25, 26) (1. ábra).

Csipek használatával a baktérium-törzsek egész genomjának különbségei is kimutathatók.

1. ÁBRA

Real-time PCR készülék szoftvere által készített mennyiségi meghatározás



A restrikciós hossz polimorfizmusa

Bizonyos gének fiziológiás körülmények között sem teljesen azonosak egyes egyéneknél. E DNS-polimorfizmuson alapuló legismertebb vizsgálat a *restrikciós fragmentumok hosszúságbeli polimorfizmusának vizsgálata* (RFLP). Ebben az esetben két összehasonlítható DNS-szakasz egy adott restrikciós enzim hatására különböző helyeken különbözik egymástól, ezért a két DNS-t azonos restrikciós enzimmel emésztve, eltérő méretű fragmentumokat nyerünk. Néhány tanulmányban a PCR-RFLP módszerrel sikeresen vizsgálták a *H. pylori* genotípusát és polimorfizmusát. A *H. pylori* clarithromycinrezisztenciájával kapcsolatos A és G mutációt kimutató módszert többször módosítva, javult a technika gyorsasága és specifitása (27, 28).

Fluoreszcens in situ hibridizáció

A módszer az in situ hibridizáció elvén működik. A denaturált DNS-t – a két szál egymástól el van választva – jelölt egyszálú próbával reagáltatjuk. Amennyiben a jelölt szálak az ismeretlen DNS-mintában számukra komplementer szakaszokat találnak, azokhoz hibridizálnak. A próbákat azonban nem radioaktív, hanem hisztokémiai úton detektálható fluoreszcens festékkel jelölik. Ezzel a módszerrel a diagnosztikus és prognosztikus jelentőségű genetikai rendellenességek rövid idő alatt kimutathatók. *Moreno* és munkacsoportja használt *fluoreszcens in situ hibridizációt* (FISH) *H.*

pylori kimutatására vízmintákból. Eredményeik alapján a FISH-technika érzékenyebb módszernek bizonyult a PCR-nél (29).

Más molekuláris módszerek

Ezekben a módszerekben szigorú feltételek mellett PCR-termékeket hibridizálnak próbákhoz, és a keletkezett hibridek kalorimetrikusan – a fajlagos hő mérésével – mutathatók ki. A DNS-enzim immunszé (DEIA) kimutató rendszer enzimkapcsolt immunszorbens módszer, jelölt dupla szálú DNS monoklonális antitesttel. A PCR-LiPA (LiPA: line probe assay) számos mutációkimutató technika alternatívája; nagyszámú minták tesztelésére is jól alkalmazható. Más, komplexebb mikrotiterlemez-alapú rendszerek – például a PCR-oligonukleotid-hasítás módszer (OLA): ebben jelölt „fogó” (capture) és „jelző” (reporter) próbákat vagy kettősen jelölt próbákat használnak – jól alkalmazhatóak a mutáció kimutatására, általában azonban még nem elfogadottak (24).

Csipechnika

Tekintve, hogy egyre több organizmus genomjának szekvenciája válik ismertté, számos új, a génfunkciók szisztematikus vizsgálatát lehetővé tevő technika fejlődött ki. A DNS-microarray – bioscip, DNS-csip vagy gén array néven is ismert – olyan új eljárás, amely nagyszámú gén nagy felbontású azonosítását teszi lehetővé a jelölt DNS hibridizációja által. Az eljárás során, valójában reverz-blottolási technika segítségével, több ezer különböző DNS-molekula-részlet van szilárd hordozóhoz, általában aktivált üvegfelülethez kötve. A cDNS-csipeket RNS-expresszió vizsgálatára, az oligonukleotid csipeket pedig szekvenciameghatározásra használják. A hibridizált molekulák vizsgálata információt ad a génexpresszió, -polimorfizmus vagy -mutáció jelenlétéről és a különböző típusú betegségek génprofiljáról (30). A kiindulási anyag mennyiségi korlátja miatt a DNS-t gyakran PCR-rel kell megsokszorozni, mielőtt a hibridizációt elvégeznék. A csipek használatával magyarázatot kapunk a gyakori betegségek okára és következményeire.

Israel és munkatársai bemutatták, hogy melyek azok a gének, amelyek gyakoriak a gyomorfekélyt, illetve nyombélfekélyt okozó *H. pylori*-törzsekben. E tanulmány szemlélteti azt, hogy csipek használatával a baktériumtörzsek egész genomjának különbségei is kimutathatók (31). *Nagasako* munkacsoportja is vizsgálta a szervezet sejtjeinek módosult génexpresszióját *cagA*-negatív és -pozitív *H. pylori*-törzsszel fertőzött mintákban, valamint a kapcsolatot a megváltozott génexpresszió és a sejtválasz között (32). A *H. pylori* indukálta lymphomaképződést tanulmányozta *Mueller* munkacsoportja; azonosította a molekuláris markereket a betegség különböző stádiumában, valamint meghatározta a transzkripciós válasz sejteredetét

(33). Kimutatták, hogy a betegség meghatározott molekuláris változásokat követ, és gének olyan csoportját azonosították, amelyeknek expressziója prognosztizálja a betegség előrehaladását.

A csiptechnika ma még nem alkalmazható kis deletiók, pontmutációk és átrendeződések kimutatására. Költsége és korlátozott elérhetősége – az igény növekedésével és a termékpalletta bővülésével – a közeljövőben változni fog. Így nagyszámú csipvizsgálatból származó adatok különböző matematikai eljárásokkal elemezhetők, ismeretlen génfunkciók deríthetők fel, diagnosztikai jelentőségű genotípusok válhatnak azonosíthatókká.

Klinikai alkalmazás

A DNS-technikák fontos alkalmazási területe a pontmutációk kimutatása; ezek kódolják a *H. pylori* terápiájában használt antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát. Számos korábbi munka szerint a *H. pylori* metronidazolrezisztenciáját az *rdxA* gén különböző módosulása okozza; ez a gén az oxigénérzékeny NADPH nitroreduktáz enzimet kódolja. Ez az enzim alakítja a metronidazol aktív metabolittá, amely közvetlenül toxikus a baktériumra (34). Nem teljesen ismert, hogy az *rdxA* gén inaktivációja az egyetlen mechanizmus-e a *H. pylori* metronidazolrezisztenciájának kialakulásában (24, 34, 35).

A *H. pylori*-eradikáció sikertelenségének egyik leggyakoribb oka az amoxicillinrezisztencia. Nem ismert azonban, hogy a *H. pylori*-törzsekben kimutatott speciális különbségek hozzájárulnak-e a kezelés elégtelenségéhez. Jelenleg még nem áll rendelkezésünkre molekuláris teszt a *H. pylori* amoxicillinrezisztenciájának kimutatására (36).

Német tanulmányban kimutatták, hogy a *H. pylori* *rpoB* génjének aminosavcsereje rifamycinrezisztenciát okoz (37). *H. pylori*-fertőzésben clarithromycinrezisztenciát is igazoltak, ennek alapja a PCR-RFLP módszerrel kimutatott 23SrRNS gén mutációja (24, 38).

Megbeszélés

A *H. pylori* nagyfokú polimorfizmusra képes; ez a kolonizáció alatti adaptív változás következménye lehet azért, hogy a baktériumtörzs alkalmazkodjon az immunrendszerhez. A *H. pylori*-genom olyan, több mint ezer génből álló „magot” tartalmaz, amely a genetikailag különböző gazdaszervezetekhez történő alkalmazkodásban szerepet játszó funkcionális fehérjéket és több specifikus gént kódolja (39).

A *H. pylori* kimutatására számos diagnosztikai teszt áll rendelkezésünkre. A klinikai gyakorlatban a viszonylag jelentős érzékenységgű és specifitássalú tesztek mindegyikének korlátjai vannak. A molekuláris diagnosztikai módszerek fejlődése megoldást jelentett a baktériumkimutatás problémáira. A bakteriális DNS amplifikációja PCR-módszerrel gyors eredményre vezet, kis mennyiségű baktérium jelenlétének kimutatására is (40). Jelenleg csak a biopsziás minta PCR-vizsgálata megközelítően 100%-os érzékenységgű és specifitássalú. A *H. pylori*-DNS molekuláris kimutatásának előnye az, hogy meghatározza a baktériumtörzs genotípusát, valamint adatot nyújt a virulenciafaktorok jelenlétéről vagy hiányáról. A real-time PCR és a DNS-szakaszok nukleinsav-szekvenciájának meghatározása (szekvenálás) tért hódított az antibiotikumrezisztencia gyors kimutatásában és a kevert fertőzések azonosításában is, különösen akkor, ha az eredmény közvetlenül a gyomorbiopsziából megítélhető anélkül, hogy tenyésztésre szükség lenne. A PCR-vizsgálat speciális laboratóriumi felszerelést igényel, napjainkban rutinszerűen még nem hozzáférhető.

A legújabb csiptechnika kimutatja a *H. pylori* genetikai állományának eltéréseit. Így az utóbbi években a DNS- és oligonukleotid-csipechnológia játszott növekvő szerepet a genetikai tanulmányokban a gyógyszerhatás-vizsgálatokban, a toxikológiai kutatásokban és a diagnosztikai mikrobiológiában. A csiptechnika használatáról és kivitelezéséről – előrelátható előnyei és széles körű felhasználhatósága ellenére – még kevés elérhető adattal rendelkezünk, s ez megnehezíti a technika standardizálását.

IRODALOM

- Han FC, Gong M, Ng HC, et al. Identification of *H. pylori* strain specific DNA sequences between two clinical isolates from NUD and gastric ulcer by SSH. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1747-51.
- Ho S, Hoyle JA, Lewis FA, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991;29:2543-9.
- Young KA, Akyon Y, Rampton DS, et al. Quantitative culture of *Helicobacter pylori* from gastric juice: the potential for transmission. *J Med Microbiol* 2000;49:343-7.
- Kawamura O, Murakami M, Araki O, et al. Relationship between gastric disease and deletion of *cag* pathogenicity island genes of *Helicobacter pylori* in gastric juice. *Dig Dis Sci* 2003;48:47-53.
- Kelly SM, Pitcher MCL, Farmery SM, et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* 1994;107:1671-4.
- Gramley WA, Asghar A, Frierson HF, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. *J Clin Microbiol* 1999;37:2236-40.
- Monteiro L, Bounemaïson D, Vekris A, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997;35:995-8.
- Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol* 2001;50:1021-9.
- Victoria JMN, Kalapothakis E, Silva JFC, et al. *Helicobacter pylori* DNA in recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2003;32:219-3.
- Sepp R, Szabó I, Uda H, et al. Rapid techniques for DNA

- extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J Clin Pathol* 1994;47:318-23.
11. Valentine JL, Arthur RR, Mobley HLT, et al. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:689-95.
 12. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, et al. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:192-200.
 13. Goodwin DC, Lee SB. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Bio Techniques* 1993;15:438-44.
 14. Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP et al. Microwave-based DNA extraction from paraffin embedded tissue for PCR amplification. *BioTechniques* 1995;18:769-73.
 15. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, et al. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut* 1994;35:905-8.
 16. Chen W, Li D, Cannan RJ, et al. Common presence of *Helicobacter* DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls. *Dig Liver Dis* 2003;35:237-43.
 17. Mohammadi M, Oghalaie A, Mohajerani N, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin and its allelic mosaicism as a predictive marker for Iranian dyspeptic patients. *Bull Soc Pathol Exot* 2003;96:3-5.
 18. Ferinati F, Cardin R, Russo VM, et al. *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter* 2003;8:227-34.
 19. Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, et al. Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41:976-80.
 20. Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadström T, et al. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:54-8.
 21. Ruzsovics A, Molnar B, Unger Z, et al. Determination of *Helicobacter pylori* cagA, vacA genotypes with real-time PCR melting curve analysis. *J Physiol Paris* 2001;95:369-77.
 22. Ashton-Key M, Diss TC, Isaacson PG. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol* 1996;49:107-11.
 23. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998;36:944-8.
 24. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:285-9.
 25. Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, et al. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica* 1998;2:8-11.
 26. Costa JM, Ernault P, Bretagne S. Rapid and quantitative detection of *Toxoplasma Gondii* by PCR. *Biochemica* 1999;3:6-8.
 27. Sapone A, Vaira D, Trespidi S, et al. The clinical role of cytochrome p450 genotypes in *Helicobacter pylori* management. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1010-5.
 28. Colding H, Hartzen SH, Mohammadi M, et al. Performance of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *Helicobacter pylori* ureB gene in differentiating gene variants. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:57-60.
 29. Moreno Y, Ferrus MA, Alonso JL, et al. Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *Helicobacter pylori* in water. *Water Res* 2003;37:2251-6.
 30. Maughan NJ, Lewis FA, Smith V. An introduction to arrays. *J Pathol* 2001;195:3-6.
 31. Israel DA, Salama N, Arnold CN, et al. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;107:611-20.
 32. Nagasako T, Sugiyama T, Mizushima T, et al. Up-regulated smad5 mediates apoptosis of gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem* 2003;278:4821-5.
 33. Mueller A, O'Rourke J, Grimm J, et al. Distinct gene expression profiles characterise the histopathological stages of disease in *Helicobacter*-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:1292-7.
 34. Jenks PJ, Ferrero RL, Labigne A. The role of the rdxA gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:753-8.
 35. Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Dailidiene D, et al. Sequential inactivation of rdxA (HP0954) and frxA (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* 2000;182:5082-90.
 36. Dore MP, Osato MS, Realdi G, et al. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1999;43:47-54.
 37. Heep M, Beck D, Bayerdörffer E, et al. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1497-9.
 38. Pan ZJ, Su WW, Tytgat GNJ, et al. Assessment of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* among patients in Shanghai and Guangzhou, China, by primer-mismatch PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:259-61.
 39. Zambon CF, Navaglia F, Basso D, et al. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2003;56:287-91.
 40. Agarwal M, Dixon RA. A study to detect *Helicobacter pylori* in fresh and archival specimens from patients with interstitial cystitis, using amplification methods. *BJU Int* 2003;91:814-6.



A PREHOSPITÁLIS TOXIKOLÓGIAI ELLÁTÁS ALAPISMERETEI
AZ ISMERETLEN MÉRGEZÉS DILEMMÁJA
A VEGYI TERRORIZMUS PROBLÉMÁJA – FELKÉSZÜLÉS A VÉDEKEZÉSRE

Időpont: 2004. június 17. 13.00–17.00

Helyszín: Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Családorvosi Intézet, Szemészeti Klinika; Szeged, Korányi fasor 10. III. emelet, előadóterem.

Előadók: Marosi György, Béleczi Lajos

Regisztrációs díj: 4000 Ft, pontérték: 4 kreditpont.

Információ: telefonszám: (06-62) 545-553, e-mail: hajnalf@model.szote.u-szeged.hu, honlap: <http://www.szote.u-szeged.hu>