

# A clarithromycin-heterorezisztens *Helicobacter pylori* fertőzések in situ diagnosztikája és klinikopatológiai jellemzése

Doktori tézis

**Dr. Kocsmár Éva**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Herszényi László, az MTA doktora, c. egyetemi tanár

Dr. Krenács Tibor, az MTA doktora, kutatóprofesszor

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Sótornyai Péter, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kovalszky Ilona, az MTA doktora, professor emerita

Dr. Rác Gergely, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2021

## 1. Bevezetés, elméleti háttér

A világszinten mintegy 4,4 milliárd embert érintő *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fertőzés kezelésének egyik alapszere a clarithromycin, azonban hatékonysága az ellene kialakuló rezisztencia (Cla-rezisztencia) gyakorisága miatt az utóbbi években nagymértékben csökkent.

A rezisztens fertőzések kétfelé bonthatóak aszerint, hogy a gyomrot kolonizáló baktériumok mindegyike hordozza-e a Cla-rezisztenciáért felelős valamelyik pontmutációt (homorezisztens fertőzés), vagy érzékeny és rezisztens baktériumok is megfigyelhetők (heterorezisztens fertőzés). Utóbbi tovább osztható az érzékeny és rezisztens baktériumok egymáshoz viszonyított helyzete alapján, ugyanis ha azok egymással keverednek, akkor *intraniche* típusú, ha pedig egymástól elkülönülve helyezkednek el, akkor az *interniche* típusú heterorezisztenciáról beszélünk. Munkánk során elsődleges célunk volt a heterorezisztens fertőzések klinikopatológiai jellemzőinek meghatározása. Az általunk használt *H. pylori* Cla-rezisztencia detektálását célzó fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) eljárás unikalitását az adja, hogy a baktériumok képi megjelenítésének köszönhetően alkalmas a heterorezisztens fertőzések kimutatására és annak altípusainak elkülönítésére is. Ezen fertőzések pontos diagnózisának feltétele azonban egy

olyan eljárás használata, melynek a baktériumok detektálásában mutatott magas szenzitivitása és specificitása lehetővé teszi a szövetmintában található összes kórokozó képi megjelenítését. Bár a *H. pylori* FISH-technika magas szenzitivitása ismert a Cla-rezisztencia diagnózisában, de a baktériumok kimutatásában mutatott diagnosztikus értékét mindeddig nem vizsgálták.

## 2. Célkitűzések

1. A *H. pylori* Cla-rezisztencia FISH-eljárás a baktérium kimutatásában mutatott diagnosztikus teljesítményének meghatározása (érzékenység, specificitás, pozitív és negatív prediktív érték), illetve az azt befolyásoló szöveti tényezők kimutatása.
2. A FISH eljárás használatával a Cla-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések valós gyakoriságának felmérése.
3. A Cla-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések diagnózisát befolyásoló mintavételi és egyéb metodikai tényezők szerepének vizsgálata.
4. A Cla-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések lehetséges kompartmentális típusainak vizsgálata és ezek egymáshoz viszonyított gyakoriságának meghatározása.
5. A Cla-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések klinikopatológiai jellemzőinek vizsgálata, különös tekintettel a

kialakulásukat befolyásoló lehetséges tényezőkre, azon belül is a gyógyszerfogyasztási előzmények szerepére a heterorezisztencia létrejöttében.

6. A Cla-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések terápiás kimenetelének vizsgálata.

### **3. Anyag és módszer**

Vizsgálatainkat a II. Sz. Patológiai Intézet formalin-fixált, paraffinba-ágyazott (FFPE) gyomorbiopsziás szövetmintáin végeztük. A vizsgálati protokoll a Helsinki Nyilatkozat (1975) etikai irányelveivel összhangban került felállításra és a Semmelweis Egyetem Regionális Etikai Bizottságának engedélyével zajlottak (#148/2007; 97#2012).

#### **Beteganyag I. - Immunhisztokémia és FISH összehasonlítása**

Retrospektív tanulmányunkban *H. pylori* immunhisztokémia (IHC) és FISH módszerek segítségével 2896 beteg gyomorbiopsziás mintáját vizsgáltuk a 2006-2008. évekből.

Az eredmények kiértékeléséhez a gyulladás aktivitása és a nyálkahártya *H. pylori* által indukált strukturális elváltozásainak megléte vagy hiánya alapján statisztikai kategóriákba soroltuk az eseteket. A kategóriák a következők voltak: 0) nincs krónikus gasztritisz a mintában /sine morbo/, 1) krónikus gasztritisz aktivitás és strukturális elváltozás nélkül, 2) krónikus gasztritisz

aktivitással, de strukturális elváltozás nélkül, 3) krónikus gastritisz aktivitás nélkül, de strukturális elváltozással, és 4) krónikus gastritisz aktivitással és strukturális elváltozással.

## **Beteganyag II. - A heterorezisztencia vizsgálata**

A Cla-heterorezisztencia tanulmányozásához 305 olyan beteg szövetmintáját használtuk, akiknél mind az antrum, mind a corpus területéről származó minta immunhisztokémiai (IHC) módszerrel *H. pylori*-pozitív volt. Az eradikáció sikerességét 6 hét elteltével végzett <sup>13</sup>C-UBT vizsgálat vagy a kontroll biopsziás minta szövettani eredményével kontrolláltuk.

## **Immunhisztokémiai vizsgálat**

Az IHC vizsgálatot pH 9,0 Tris-EDTA feltárást követően 1:350 arányban hígított, B0471 poliklonális nyúl anti-*Helicobacter pylori* elsődleges antitesttel (Dako) végeztük Ventana 320 vagy Ventana Benchmark XT immunfestő automatában iView illetve UltraView DAB Detection Kittel (Ventana Medical Systems). A baktériumdenzitás szempontjából az eseteket enyhe /1+/, mérsékelt /2+/, mérsékelt vagy súlyos /3+/ kategóriákba osztottuk.

## ***H. pylori* clarithromycin rezisztencia FISH**

A FISH reakciót a rutin festések és az IHC után a harmadik metszés lemezén végeztük BACTFish *H. pylori* Combi Kit

(Izinta Kft.) segítségével, a gyártó előírásának megfelelően. Ennek során specifikus oligonukleotid próbákat hibridizálunk a baktérium rRNS-ének meghatározott szakaszaihoz. A kórokozót a 16S rRNS fajspecifikus szakaszához kötődő, zölden jelölt *H. pylori*-specifikus próbával jelöljük. A Cla-rezisztenciát az ezért felelős három leggyakoribb 23S rRNS peptidil-transzferáz pontmutáció (A2143G; A2144G; A2143C) helyéhez kötődő narancs-vörös jelölésű próbákkal jelenítjük meg. A reakciókat Leica DM-RXA fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A zöld, vörös és kék csatornák összetett képén a Cla-érzékeny baktériumok zöld színben jelennek meg, a rezisztens baktériumok zöld és vörös fluoreszcenciája együttesen sárga színt eredményez. A baktériumdenzitás kiértékelése az IHC vizsgálatnál ismertetett módon történt.

A különböző módszerekkel diszkrét festődést mutató esetekben FISH reakciót végeztünk a rutin Giemsa-festett tárgylemezeken. Azokat az eseteket, amelyekben az ismételt FISH vizsgálattal baktériumokat láttunk, *H. pylori*-pozitívnak tekintettük az eredmények összesítése során.

### **Statisztikai analízis**

A kiértékeléshez kétoldalú Fisher-egzakt tesztet, Khi-négyzet tesztet, McNemar-tesztet, Kruskal-Wallis-tesztet és Spearman-rangkorrelációt alkalmaztunk. A különbségeket  $p < 0,05$  esetén

tekintettük szignifikánsnak. A többszörös összehasonlításokhoz a Holm-Bonferroni-féle post-hoc eljárást alkalmaztuk. A kapott eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a  $p$  érték kisebb volt, mint 0,05. Ez alól kivétel a Holm-Bonferroni eljárás volt, ahol a pontosabb  $p < 0,01$  értéket használtuk. A statisztikai elemzéseket a Statistica 12.0 (StatSoft Inc.), az SPSS Statistics ver. 23 (IBM Corp.) és R (3.51 verzió) szoftverekkel végeztük.

#### **4. Eredmények**

##### **Szenzitivitás, specificitás, pozitív / negatív prediktív értékek**

A 2896 beteg mintájának értékelése során IHC-val 795 esetben (27,5%), míg FISH eljárással 788 esetben (27,2%) találtunk *H. pylori* pozitivitást. A két módszer valamelyikével pozitív esetek száma összesen 804 volt (27,8%). A FISH-vizsgálat szenzitivitása 98%, specificitása pedig 99,6%, pozitív és negatív prediktív értéke 98,9% és 99,2% volt. Az immunhisztokémia esetében az érzékenység 98,8%, a specificitás pedig 99,2% volt, az eljárás pozitív és negatív prediktív értéke 98,0% és 99,6%-nak bizonyult.

##### **A „kifaragódás” szerepének vizsgálata**

Az IHC és FISH eljárásokkal eltérő eredményt adó 25 eset elemzése során 24 esetben (96,0%) csak 1+ baktériumdenzitást találtunk, vagyis a kórokozók csak elszórtan vagy kisebb

fókuszokban voltak jelen. Ezekben az esetekben feltehetően a szövetblokk ismételt metszése során a baktériumok hol megjelentek bizonyos metszési síkokban, hol kifaragódtak a mintából. Szintén ez magyarázhatja a rutin Giemsa festés során negatív, majd a két vizsgálóeljárással diszkrépáns eredményt adó esetek Giemsa-festett metszetén megismételt FISH-reakciók magas negativitási arányát (20/28, 71,43%). Ezek közé tartozott ráadásul négy, az eredeti FISH-sel pozitív eset is.

### **Az aktivitás, a nyálkahártyaszerkezeti változások és a baktériumdenzitás szerepe a diagnosztikus teljesítményben**

A két vizsgálóeljárás diagnosztikus teljesítménye között egyik statisztikai osztályban vagy ezek kombinációiban sem találtunk szignifikáns különbséget. Mind az IHC, mind a FISH-eljárás érzékenysége többnyire elérte, illetve meghaladta a 90%-ot, ennél alacsonyabb szenzitivitás csak a krónikus gasztritiszt nélkülöző (0. osztály), illetve az aktivitás nélküli, de strukturális elváltozással rendelkező krónikus gasztritiszes mintákban (3. osztály, FISH: 86,9%,) volt megfigyelhető. A baktériumok denzitása erős pozitív korrelációt mutatott az aktivitással. Az aktivitás hiánya csekély mértékben csökkentette az eljárások érzékenységét, a strukturális elváltozások jelenléte az IHC-ét nem, de a FISH érzékenységét diagnosztikailag nem jelentősen, ám statisztikailag szignifikánsan rontotta (98,0 vs. 95,9%).



## **A Cla-rezisztencia és a heterorezisztens fertőzés gyakorisága**

Ezen vizsgálatban 305 beteg Cla-rezisztencia FISH státuszát határoztuk meg, a betegeket Cla-érzékeny, -homorezisztens és -heterorezisztens csoportba soroltuk. 232 beteg esetében (76,1%) Cla-érzékeny, míg 73 beteg esetében (23,9%) Cla-rezisztens fertőzést találtunk. Ez utóbbi csoportból rezisztens kórokozót 65 esetben (21,3%) tartalmaztak az antrumból származó és 64 esetben (21%) a corpus minták. Az összes rezisztens eset közül 35 esetben homo- (11,5%) és 38 esetben heterorezisztens (12,5%) fertőzés volt jelen. Csaknem az összes (35/38) heterorezisztens betegnek legalább az egyik biopsziás mintája, tartalmazott mind Cla-érzékeny, mind Cla-rezisztens kórokozót, és a 38-ból 18 esetben (47,4%) különbözött az antrumból és a corpusból származó biopsziás minták rezisztenciastátusza.

## **A rezisztenciacsoportok klinikopatológiai különbségei**

Cla-rezisztenciát szignifikánsan gyakrabban találtunk nőknél (29,1%), mint férfiaknál (16,9%). Míg a fogékony csoport kiegyensúlyozott férfi-női arányt (83%:71%), a homorezisztens alcsoport pedig erős női túlsúlyt mutatott (7%:15%), addig a heterorezisztens fertőzöttek mérsékelt női túlsúllyal (10%:14%) egy köztes csoportot képviseltek a kettő között.

Az endoszkópos és szövettani elváltozások közül a peptikus fekélybetegség csak Cla-érzékeny fertőzésben szenvedőknél

fordult elő. A gasztroözofageális refluxbetegség (GERD) szignifikánsan gyakoribb volt a Cla-rezisztens fertőzöttekben (74,6% érzékeny vs. 84,2% hetero- vs. 91,4% homorezisztens).

### **Az antrum- és corpusminták rezisztenciafüggő eltérései**

A szemikvantitatív kiértékelés alapján 1+ és a magasabb (2+ vagy 3+) denzitásértékkel bíró minták összehasonlítása alapján a magasabb baktériumsűrűség szignifikánsan gyakrabban volt megfigyelhető az antrumból származó mintákban. A gyulladás aktivitása többnyire az antrumra lokalizálódott, homorezisztens fertőzöttekben gyakrabban volt jelen aktív gyulladás mindkét vizsgált régióban, mint a heterorezisztens fertőzésben szenvedő betegekben. A gyomornyálkahártya *H. pylori* fertőzéshez köthető strukturális elváltozásai is antrális túlsúlyt mutattak a teljes betegcsoportban, valamint az érzékeny és homorezisztens esetekben, a heterorezisztens fertőzésekben hasonló tendencia volt látható statisztikailag szignifikáns különbség nélkül.

### **A betegek eradikációs anamnézisének szerepe**

A betegek kórtörténetében korábbi eradikációs kísérlet szignifikánsan gyakoribb volt a Cla-rezisztens, mint a fogékony fertőzésű betegeknél, és a homorezisztens fertőzöttek esetében is szignifikánsan több korábbi eradikációs kísérletet találtunk, mint a heterorezisztenseknél (érzékeny: 8,6%; heterorezisztens: 26,3%; homorezisztens: 65,7%;). Hasonló tendenciát mutatott a

korábbi eradikációs kísérletek száma is; mind a homo-, mind a heterorezisztens betegek szignifikánsan gyakrabban estek át kettő vagy több kezelésem, mint az érzékeny fertőzések (érzékeny: 3,5%; heterorezisztens: 21%; homorezisztens: 54,3%).

### **A sikeres eradikációk aránya**

70 Cla-érzékeny, 20 -homorezisztens és 19 -heterorezisztens beteg esetében voltak a mintavételt követő eradikációs terápia részletei ismertek. Cla-tartalmú eradikációs sémák használatával a sikeresen eradikált esetek aránya az érzékeny betegcsoportban 93% (57/61) volt, míg a homorezisztens betegek körében csak 15% (2/13). Ugyanakkor a heterorezisztens esetekben 60% (6/10) volt a sikeres eradikációk aránya. A Cla-t nem tartalmazó kezelések egyes rezisztenciacsoportokban elért eredményei között nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést, melyet befolyásolhattak az alcsoportok alacsony esetszámai is.

### **5. Következtetések**

1. A *H. pylori* clarithromycin rezisztencia FISH eljárás az immunhisztokémiához hasonlóan magas szenzitivitású és specificitású a baktériumok detektálásában.
2. Diagnosztikus pontosságát a gyulladásmos aktivitás hiánya vagy a baktérium okozta nyálkahártyaléziók jelenléte csak kevésbé befolyásolja.

3. A *H. pylori* gócos, illetve elszórt elhelyezkedése a gyomor nyálkahártyáján álnegatív eredményre vezethet akár az IHC vagy a FISH használatával is, melynek esélyét többszörös mintavételezéssel és az egyes mintákból származó több metszet vizsgálatával lehet csökkenteni.
4. A *H. pylori* Cla-rezisztencia FISH eljárással vizsgált 305 beteg körében 23,9% bizonyult Cla-rezisztensnek, melyek között heterorezisztencia aránya 52% volt.
5. Ugyan a heterorezisztens esetek közel felében (47,4%) az antrum és a corpus baktériumainak rezisztenciastátusza különbözött, de a leggyakoribb (52,6%) az egyszerre mindkét régió belüli *intraniche* heterorezisztencia volt.
6. A heterorezisztencia *intraniche* típusának meghatározására alkalmatlan módszerek használata esetén kevesebb mint a felére csökkenne a heterorezisztens fertőzések aránya.
7. Amennyiben csak a gyomor egyik régiójából történik mintavétel, úgy a fertőzések több mint ötödében rejtve maradhat a Cla-rezisztencia diagnózisa.
8. A Cla-érzékeny *H. pylori* fertőzések között kiegyensúlyozott a férfi-nő arány, a homorezisztens alcsoport erős női túlsúlyt mutat, a heterorezisztens fertőzések pedig enyhe női túlsúllyal egy köztes csoportot képviselnek.

9. A Cla-érzékeny és -heterorezisztens fertőzöttekben a gyulladás aktivitása az antrumra volt jellemző, míg ez a homorezisztens esetekben nem volt megfigyelhető.
10. A peptikus fekély a Cla-érzékeny fertőzésekre jellemző, viszont a GERD leginkább a homorezisztens fertőzöttekben fordul elő, legritkább a Cla-érzékenyek között, míg a heterorezisztens csoportban köztes arányban található meg.
11. A Cla-homorezisztencia valószínűleg a korábbi sikertelen eradikációs kísérletek következménye, ám a heterorezisztens fertőzések feltehetően a korábbi nem-eradikációs célú makrolid használatával állhatnak összefüggésben.
12. Cla-tartalmú protokollok használatával a sikeres eradikációk aránya 90% feletti a Cla-érzékeny *H. pylori* fertőzésekben, 60% a heterorezisztens esetekben, míg a homorezisztens csoportban csak 15%.
13. Összefoglalva elmondható, hogy a clarithromycin-heterorezisztens *H. pylori* fertőzések klinikopatológiai, mikrobiológiai és terápiás jellemzőiket tekintve egy különálló alcsoportot képviselnek, amely számos tekintetben köztes tulajdonságokat mutat az érzékeny és homorezisztens csoportokhoz képest.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### **A disszertációhoz kapcsolódó közlemények**

**Kocsmár É\***, Szirtes I\*, Kramer Z, Szijártó A, Bene L, Buzás GM, Kenessey I, Bronsert P, Csanadi A, Lutz L, Werner M, Wellner UF, Kiss A, Schaff Z, Lotz G. Sensitivity of *Helicobacter pylori* detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity.

**HELICOBACTER.** 2017 Aug;22(4). (\*megosztott első szerzők)

**Impakt faktor: 4,123** 50%

**Kocsmár É**, Kocsmár I, Buzás GM, Szirtes I, Wacha J, Takáts A, Hritz I, Schaff Z, Rugge M, Fassan M, Kiss A, Lotz G. *Helicobacter pylori* heteroresistance to clarithromycin in adults - new data by in situ detection and improved concept.

**HELICOBACTER.** 2020 Feb;25(1):e12670.

**Impakt faktor: 5,753**

### **A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények**

**Kocsmár É**, Buzás GM, Szirtes I, Kocsmár I, Kramer Z, Szijártó A, Fadgyas-Freyler P, Szénás K, Rugge M, Fassan M, Kiss A, Schaff Z, Röst G, Lotz G. Primary and secondary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and mathematical modeling of the role of macrolides. **Nat Commun.** 2021 Apr 15;12(1):2255.

**Impakt faktor: 14,919**

Petrovics R, Söveges B, Egyed A, Knorr G, Kormos A, Imre T, Török G, Zeke A, **Kocsmár É**, Lotz G, Kele P, Németh K.

A rapid and concise setup for the fast screening of FRET pairs using bioorthogonalized fluorescent dyes. **Org Biomol Chem.** 2018 Apr 25;16(16):2997-3005.

**Impakt faktor: 3,49**

Enderle-Ammour K, Wellner U, **Kocsmar E**, Kiss A, Lotz G, Csanadi A, Bader M, Schilling O, Werner M, Bronsert P. Three-dimensional reconstruction of solid tumors: Morphological evidence for tumor heterogeneity. **Pathologe**, 2018 Dec;39(Suppl 2):231-235.

**Impakt faktor: 0,546**

**Kocsmár É**, Kocsmár I, Karczub J, Istók R, Kiss A, Schaff Z, Lotz G. Clinicopathological Characterization and Autopsy based Classification of the Cancer of Unknown Primary Origin (CUP) Syndrome. **Magy Onkol.** 2019 Jun 21;63(2):75-84.

Lotz G, Smuk G, **Kocsmár É**, Kocsmár I, Tímár J. Predictive Diagnostics of the Programmed Cell Death Receptor 1 (PD-1) - Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Inhibitory Therapies. **Magy Onkol.** 2019 Sep 18;63(3):183-191.

Kocsmár I, Pajor G, Gyöngyösi B, Székely E, Varga M, **Kocsmár É**, Kenessey I, Beöthe T, Süle N, Majoros A, Szendrői A, Nyírády P, Kiss A, Riesz P, Lotz G. Development and Initial Testing of a Modified UroVysion-Based Fluorescence In Situ Hybridization Score for Prediction of Progression in Bladder Cancer. **Am J Clin Pathol.** 2020 Jan 2;153(2):274-284.

**Impakt faktor: 2,493**

Smuk G, Pajor G, Szuhai K, Morreau H, Kocsmár I, **Kocsmár É**, Pajor L, Kajtár B, Sárosi V, Lotz G, Tornóczky T. Attenuated Isolated 3' Signal: A Highly Challenging Therapy Relevant ALK FISH Pattern in NSCLC. **Lung Cancer**. 2020 May;143:80-85.

**Impakt faktor: 5,705**

**Kocsmár É\***, Lotz G\*, Kiss A, Hoerner M, Petrova E, Freudenberg N, Csanádi Á, Kulemann B, Werner M, Bronsert P, Wellner UF. Prognostic impact of tumor budding and EMT in periampullary adenocarcinoma: A quantitative approach. **J Cancer**. 2020 Sep 17;11(22):6474-6483. (\*megosztott első szerzők)

**Impakt faktor: 4,207**

**Kocsmár É**, Kocsmár I, Szalai L, Lendvai G, Szijártó A, Schaff Z, Kiss A, Kovalszky I, Papp G, Lotz G. Cross-testing of major molecular markers indicates distinct pathways of tumorigenesis in gastric adenocarcinomas and synchronous gastrointestinal stromal tumors. **Sci Rep**. 2020 Dec 17;10(1):22212.

**Impakt faktor: 4,379**

Kim JJE, Kocsmár I, Buzás GM, Szirtes I, Rusz O, Diczházi C, Szijártó A, Hritz I, Schaff Z, Kiss A, **Kocsmár É\***, Lotz G\*. Efficacy of Clarithromycin Depends on the Bacterial Density in Clarithromycin-Heteroresistant *Helicobacter pylori* Infections: An In Situ Detected Susceptibility and Quantitative Morphometry-Based Retrospective Study. **Pathol Oncol Res**. 2021 Jun 29;27:1609863. (\*megosztott utolsó szerzők)

**Impakt faktor: 3,201**