
Ορολογική διάγνωση

Παρασκευή Καραμπογιά-Καραφυλλίδη

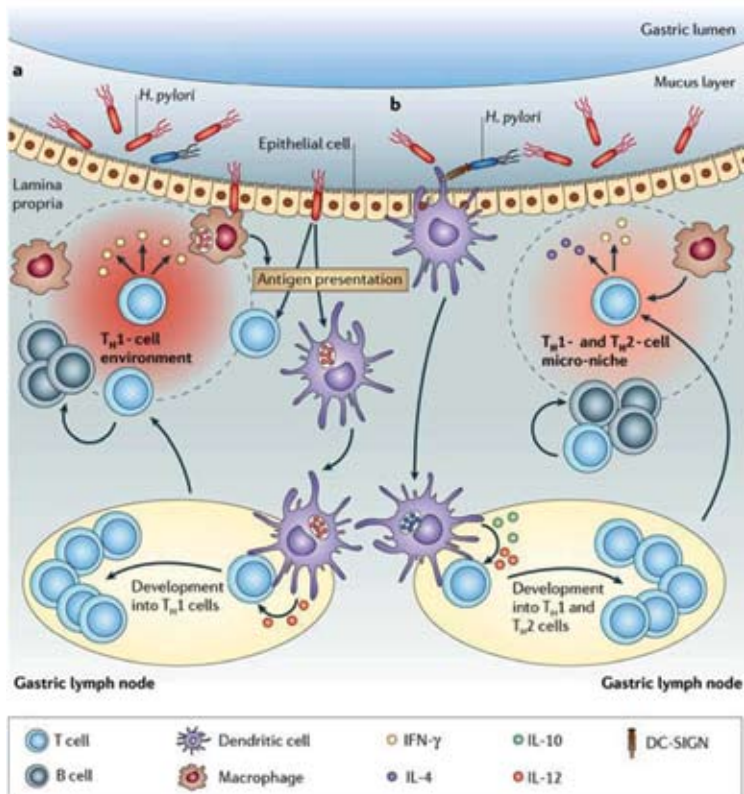
Η λοίμωξη του στομάχου από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (*Hp*) προκαλεί έντονη τοπική και συστηματική ανοσολογική απάντηση.^{1,2} Το *Hp* προκαλεί χρόνια φλεγμονή στο βλεννογόνο του στομάχου με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πολυμορφοκυττάρων, Τ και Β λεμφοκυττάρων. Τα πολυμορφοκύτταρα απελευθερώνουν ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες, παράγοντες νέκρωσης του όγκου (TNF) και κυτοκίνες (Εικόνα 1). Τα Β λεμφοκύτταρα διεγείρονται ανοσολογικά και παράγουν ειδικά IgG, IgM και IgA αντισώματα έναντι διαφόρων αντιγονικών στοιχείων του *Hp*. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν στον ορό, στο γαστρικό υγρό, στον σίελο και στα ούρα. Όπως παρατηρήθηκε από μελέτες που έγιναν σε εθελοντές οι οποίοι μολύνθηκαν με *Hp*, 14 ημέρες μετά τη μόλυνση, ανιχνεύονται πρώτα ειδικά IgM αντισώματα ακολουθούμενα από IgA.³ Τα IgG αντισώματα ανιχνεύονται μετά 22-30 ημέρες. IgM αντισώματα πρακτικά δεν ανιχνεύονται διότι η οξεία λοίμωξη ανακαλύπτεται σπάνια.

IgA αντισώματα αναπτύσσονται σε 39-82% των ατόμων, IgG αντισώματα αναπτύσσονται στο 98% των ατόμων, ακόμη και σε παιδιά, επειδή η λοίμωξη από *Hp* είναι χρόνια.⁴

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την ορολογική ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων έναντι του *Hp* όπως:

- Σύνδεση συμπληρώματος⁵
- Συγκολλητινοαντίδραση με σωματίδια latex⁶
- Ανοσοενζυμική μέθοδος (EIA)⁷

Βιοπαθολόγος, Αναπληρώτρια Διευθύντρια Μικροβιολογικού Τμήματος, Γ.Ν.Α. "Γ. Γεννηματάς"



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 1. Ανοσολογική απάντηση του ξενιστή σε λοίμωξη από *Hp*.

- Ανοσοχρωματογραφία⁸
- Ανοσοαποτύπωση (Immunoblot, Westernblot)⁹

Η ανοσολογική απάντηση παρουσιάζει σημαντικό βαθμό ετερογένεια λόγω των αντιγονικών διαφορών των στελεχών του *Hp*.

Τα στελέχη του *Hp* έχουν γενετικές διαφορές ειδικά μεταξύ Δύσης και Άπω Ανατολής. Μερικοί ερευνητές προτείνουν τη χρησιμοποίηση τοπικών στελεχών σαν αντιγόνα αλλά προτιμότερη είναι η χρησιμοποίηση "δεξαμενής" αντιγόνων από διάφορα στελέχη *Hp*.^{10,11,14} Κατάλληλο αντιγόνο θεωρείται εκείνο το οποίο έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Υψηλή αντιγονικότητα
- Εκφράζεται σε πολλά στελέχη *Hp*

- Είναι κεκαθαρμένο και δεν δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα βακτήρια.

Ανοσοενζυμική μέθοδος (EIA)

Η αναζήτηση των αντισωμάτων στον ορό με EIA έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη διάγνωση της λοίμωξης από Ηρ.¹¹⁻¹⁴ Ανιχνεύονται ειδικά αντισώματα IgG, IgA είτε έναντι ολοκλήρου του βακτηρίου είτε έναντι ειδικών αντιγόνων όπως είναι το CagA.

Στο εμπόριο διατίθενται αρκετές εμπορικές συσκευασίες (kits) για EIA οι οποίες χρησιμοποιούν μείγμα ειδικών αντιγόνων είτε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Μεταξύ των διαφόρων εμπορικών kits υπάρχουν μεγάλες διαφορές. Επειδή η ευαισθησία και η ειδικότητα της EIA ποικίλλει ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο kit συνιστάται να γίνεται αξιολόγηση της μεθόδου στον τοπικό πληθυσμό και αναπροσαρμογή του «cut off» ώστε να επιτευχθεί η μεγαλύτερη δυνατή διαγνωστική ακρίβεια. Η χρησιμοποίηση kit με υψηλή διαγνωστική ακρίβεια (>95%) δίνει αποτελέσματα συγκρίσιμα με αυτά της βιοψίας και της δοκιμασίας ουρίας.

Παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της EIA είναι:

- Η ποιότητα του αντιγόνου
- Το διαχωριστικό όριο (cut off) της εξέτασης πάνω από το οποίο τα άγνωστα δείγματα αξιολογούνται ως θετικά
- Ο χρόνος λήψης του δείγματος

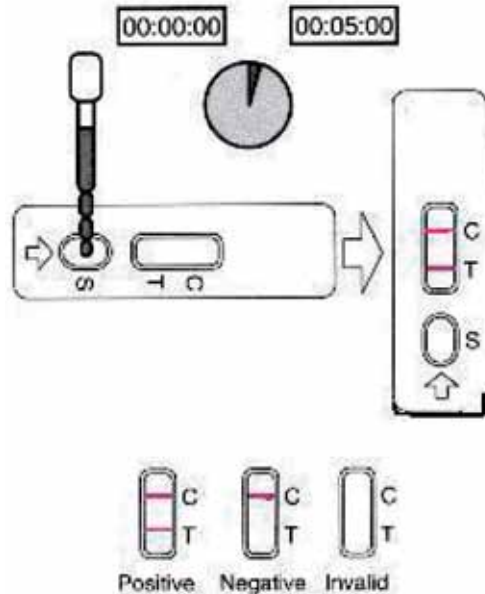
Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να παρατηρηθούν εάν η ορολογική διάγνωση επιχειρηθεί στην αρχή της λοίμωξης. Η αργή πτώση των αντισωμάτων μετά από την εκρίζωση δίνει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η ειδικότητα της EIA θεωρείται ικανοποιητική. Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική προγνωστική αξία (PPV) και η αρνητική προγνωστική αξία (NPV) κυμαίνονται διεθνώς¹² από 95,6-98,4%, 88,6-92,6%, 92,4-91,5% και 97,4-96,2% αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τον Ελληνικό πληθυσμό¹⁵ είναι για μεν τα IgG: 91%, 88%, 95%, και 79% για δε τα IgA 86%, 82%, 94%, 64% και 95%.

Εκτός από την κλασική EIA για την ανίχνευση IgG αντισωμάτων έναντι αντιγόνων του Ηρ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταχείες ανοσοενζυμικές μέθοδοι όπως είναι η ανοσοχρωματογραφία.^{8,12}

Ανοσοχρωματογραφία

Στηρίζεται στη διάχυση IgG αντισωμάτων μέσω μιας σταγόνας ορού ή ολικού αίματος από το δάκτυλο μέσω μιας μεμβράνης (Εικόνα 2) και ανοσοενζυμική αντίδραση. Η μέθοδος είναι ταχεία και δίνει αποτέλεσμα σε 10'. Μπορεί δε να εφαρμοστεί



Εικόνα 2. Ανοσοχρωματογραφία.

από τον κλινικό γιατρό στο ιατρείο του. Η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι 90% και 82% αντίστοιχα.¹²

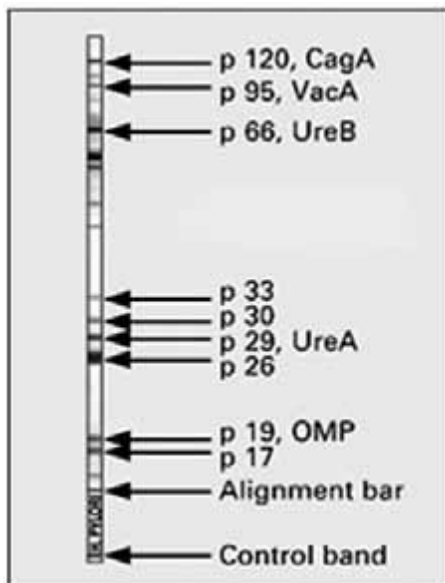
Δεν συνιστάται στην κλινική πράξη. Η διαγνωστική της αξία υπολείπεται της κλασικής EIA. Η μέθοδος είναι χρήσιμη για ταχεία διάγνωση και επιδημιολογικές έρευνες σε χώρους με υψηλή συχνότητα λοίμωξης από *Hp*.

Ανοσοαποτύπωση (Immunoblot, Western blot)

Στην ανοσοαποτύπωση⁹ τα αντιγόνα διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά σύμφωνα με το Μοριακό Βάρος τους, μεταφέρονται σε ταινία νιτροκυτταρίνης όπου αντιδρούν με τα ειδικά αντισώματα και εμφανίζονται κατόπιν εφαρμογής μεθόδου EIA (Εικόνα 3).

Με την ανοσοαποτύπωση ανιχνεύονται αντισώματα έναντι των αντιγόνων CagA, VacA, UreaA, UreB, τα οποία θεωρούνται παθογνομονικά για ορισμένα νοσήματα. Εμπορικά kit ανοσοαποτύπωσης έδωσαν καλά αποτελέσματα σε μελέτες που έγιναν τόσο σε Ευρωπαίους όσο και σε Ασιάτες.¹¹ Η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του CagA με WB χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση οξείας από χρόνια λοίμωξη από *Hp* με καλά αποτελέσματα.^{10,16,17}

Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική προγνωστική αξία και η αρνητική διαγνωστική αξία είναι 95,6%, 92,6%, 91,5% και 97,4% αντίστοιχα.¹²



Εικόνα 3. Immunoblot.

Συνιστάται ως δεύτερη μέθοδος όταν ο προσδιορισμός των IgG και IgA αντισωμάτων με την EIA δίνει αμφίβολα αποτελέσματα.

Οι ορολογικές μέθοδοι έχουν το πλεονέκτημα¹² ότι δεν είναι επεμβατικές, είναι αξιόπιστες, μπορούν να εφαρμοστούν σε πολλά δείγματα ταυτόχρονα, είναι χρήσιμες για διαγνωστικούς και επιδημιολογικούς σκοπούς, δεν επηρεάζονται από την πρόσφατη λήψη φαρμάκων (PPI αντιβιοτικά) και την τοπική κατάσταση του βλεννογόνου του στομάχου (όπως αιμορραγούντα έλκη, ατροφική γαστρίτιδα ή MALT λέμφωμα).

Μειονεκτήματα¹² των ορολογικών μεθόδων είναι η μη δυνατότητα διάκρισης ενεργού από παλαιά λοίμωξη διότι τα IgA και τα IgG αντισώματα παραμένουν για πολλά χρόνια. Επίσης δεν προσφέρονται για παρακολούθηση της θεραπείας διότι οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων αργούν πολύ να πέσουν.

Αξιολόγηση του ορολογικού ελέγχου σε παιδιά

Πολυκεντρική Ευρωπαϊκή μελέτη^{12,19} από 18 κέντρα σε 15 χώρες και σε 3016 παιδιά ηλικίας 2-17 ετών κατέδειξε την ορολογική ανίχνευση αντισωμάτων ως δεύτερη σε ευαισθησία και ειδικότητα μέθοδο μετά τη δοκιμασία με ουρία.

Επειδή οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων σε παιδιά μικρότερα των 10 ετών είναι χαμηλοί απαιτείται αναπροσαρμογή του "cut off" των διαφόρων ορολογικών μεθόδων.

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της ορολογικής ανίχνευσης IgG αντισωμάτων σε παιδιά αναφέρεται 88,7-90,2% και 93,4% αντίστοιχα.¹²

Αξιολόγηση του ορολογικού ελέγχου σε άτομα μεγαλύτερα των 45 ετών

Η διάγνωση της λοίμωξης από *Hp* σε ηλικιακές ομάδες άνω των 45 ετών παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες λόγω του υψηλού ποσοστού νοσημάτων του γαστρικού βλεννογόνου και της λήψης αντιβιοτικών για διάφορα νοσήματα. Έχουν περιγραφεί ασθενείς με θετικά αντισώματα για *Hp* και αρνητική την ιστολογική εξέταση και την καλλιέργεια, οι οποίοι έπασχαν από ατροφική γαστρίτιδα.^{12,18,20} Η ανίχνευση των ειδικών IgG και IgA αντισωμάτων σε άτομα μεγαλύτερα των 45 ετών δεν αποτελεί ένδειξη ενεργού λοίμωξης από *Hp*. Ο ορολογικός έλεγχος συνιστάται να εφαρμόζεται σε περιπτώσεις γαστρικής ατροφίας, αιμορραγούντων ελκών, MALT λέμφωμα και πρόσφατης λήψης φαρμάκων όπως PPI και αντιβιοτικών.

Διαγνωστική αξία του ορολογικού ελέγχου μετά τη θεραπεία εκρίζωσης του *Hp*

Ο ορολογικός έλεγχος έχει μικρή διαγνωστική αξία για την εκτίμηση της εκρίζωσης του *Hp* διότι τα αντισώματα αργούν πολύ να πέσουν. Απαιτείται συγκριτική μελέτη του τίτλου των αντισωμάτων προ και μετά τη θεραπεία με την ίδια ορολογική μέθοδο και με το ίδιο εμπορικό kit. Η πτώση του τίτλου των αντισωμάτων > 30-50% σε 6-12 μήνες είναι ένδειξη επιτυχούς εκρίζωσης του *Hp* με υψηλή ειδικότητα (84-97%) αλλά χαμηλή ευαισθησία (58%).^{21,23,24}

Οδηγίες της Ευρωπαϊκής ομάδας μελέτης του *Hp* (Maastricht III 2005)

Το 2005 σε συνάντηση της Ευρωπαϊκής ομάδας μελέτης του *Hp* στο Maastricht εξεδόθησαν οι ακόλουθες οδηγίες που αφορούν τον ορολογικό έλεγχο:²⁴

- Ο ορολογικός έλεγχος πρέπει να γίνεται μόνο με kit που έχουν υψηλή διαγνωστική αξία (>95%).
- Ο ορολογικός έλεγχος έχει διαγνωστική αξία μόνο σε ασθενείς με αιμορραγούντα έλκη, γαστρική ατροφία, Malt λέμφωμα, πρόσφατη λήψη PPIs και αντιβιοτικών
- Οι ταχείες ανοσοσενζυμικές μέθοδοι που εφαρμόζονται από κλινικούς γιατρούς στο γραφείο δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται.
- Η ανίχνευση αντισωμάτων στα ούρα και στον σίελο ενδείκνυται μόνο για επιδημιολογικούς και όχι για διαγνωστικούς σκοπούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Suarez G, Reyes V, Beswick E. Immune response to *H. pylori*, World J Gastroenterol 2006;12:5593-5598.
2. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights into the failure of the Immune response and perspectives on Vaccine studies. Gastroenterology 2007;133:288-308.
3. Morris AJ, Ali MR, Nicholson GI, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Long-term follow up of voluntary ingestion of *Helicobacter pylori*. Ann Int Med 1991;114:662-663.
4. Andersen LP, Wewer AV, Christiansen KM, et al. The humoral immune response to *Helicobacter pylori* infection in children with recurrent abdominal pain. APMIS 1994;102:457-464.
5. Goossens H, Glupczynski Y, Burette A, et al. Evaluation of a commercially available complement fixation test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and for follow-up after antimicrobial therapy. J Clin Microbiol 1992 ;30:3230-3233.
6. Hirschl AM, Hirschl MM, Berger J, Rotter ML. Evaluation of a commercial latex test for serological diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in treated and untreated patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991;10:971-974.
7. Alemohammad MM, Foley TJ, Cohen H. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. J Clin Microbiol 1993 ;31:2174-2177.
8. Talley NJ, Lambert JR, Howell S, Xia HH, Lin SK, Agréus L. An evaluation of whole blood testing for *Helicobacter pylori* in general practice. Aliment Pharmacol Ther 1998;12:641-645.
9. Nilsson I, Ljungh A, Aleljung P, Wadström T. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. J Clin Microbiol 1997;35:427-432.
10. Lepper PM, Moricke A, Vogt K, Bode G, Trautmann M. Comparison of different criteria for interpretation of immunoglobulin G immunoblotting results for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11:569-576.
11. Hoang TT, Rehnberg AS, Wheeldon TU, et al. Comparison of the performance of serological kits for *Helicobacter pylori* infection with European and Asian study populations. Clin Microbiol Infect 2006;12:1112-1117.
12. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007 ;20:280-322.
13. Vaira D, Holton J, Menegatti M, et al. Blood tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. Italian Helicobacter pylori Study Group. Gut 1998;43:S39-46.
14. Makrithatis A, Hirschl AM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2004;1:7-14.
15. Ladas S, Malamou H, Giota G, et al. Prospective evaluation of a whole-blood antibody test (Flex Pack *Hp*) for in-office diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in untreated patients. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000;12:722-731.
16. Ekström AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyrén O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. Gastroenterology 2001;121:784-791.
17. Ekesbo R, Toth E, Fork FT, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection in a population in southern Sweden analysed by histopathology, immunoblot and ELISA serology. Eur J Gastroenterol Hepatol 2006;18:589-593.

18. Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, et al. A negative *Helicobacter pylori* serology test is more reliable for exclusion of premalignant gastric conditions than a negative test for current *H. pylori* infection: a report on histology and *H. pylori* detection in the general adult population. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:302-311.
19. Mégraud F. and European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. Comparison of non-invasive tests to detect *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. *J Pediatr* 2005;146:198-203.
20. Kokkola A, Sipponen P, Rautelin H, et al. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on the natural course of atrophic gastritis with dysplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:515-520.
21. Lerang F, Haug JB, Moum B, et al. Accuracy of IgG serology and other tests in confirming *Helicobacter pylori* eradication. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:710-715.
22. Fallone CA, Loo VG, Barkun AN. Utility of serology in determining *Helicobacter pylori* eradication after therapy. *Can J Gastroenterol* 1998;12:117-124.
23. Kosunen TU, Seppälä K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992;339:893-895.
24. Malfertheiner P, Mégraud 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.