

Nieinwazyjne testy diagnostyczne w kierunku zakażenia *Helicobacter pylori*

dr hab n. med. Elżbieta Poniewierka, specjalista chorób wewnętrznych i gastroenterologii
18-06-2009

Jaki test, komu i dlaczego?

W 2005 roku laureatami Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii zostali australijscy naukowcy: gastroenterolog Barry J. Marshall i patolog Robin J. Warren. Nagrodę otrzymali za odkrycie i opisanie bakterii *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) odpowiedzialnej za zapalenie żołądka i współistniejącą chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy. Zakażenie pałeczką *Helicobacter pylori* występuje na całym świecie, dotyczy wszystkich grup społecznych i obejmuje 50% populacji ludzkiej. Częstość występowania infekcji *H. pylori* wzrasta wraz z wiekiem a okres życia, w którym nastąpi zakażenie zależy od warunków socjoekonomicznych. Większość infekcji *H. pylori* zostaje nabyta we wczesnym dzieciństwie, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Zalecenia, dotyczące leczenia zakażenia wyróżniają choroby żołądka, w których leczenie przeciwbakteryjne jest silnie zalecane i te, w których jest ono tylko doradzane.

Leczenie silnie zalecane:

- wrzody trawienne i ich powikłania
- chłoniaki żołądka typu MALT
- przewlekłe zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka przebyta resekcja żołądka z powodu raka krewni I stopnia chorych na raka żołądka życzenie wyrażone przez pacjenta (po pełnej konsultacji z lekarzem)

Leczenie doradzane

- dyspepsja czynnościowa
- choroba refluksowa przełyku (u chorych wymagających długotrwałego leczenia przeciwwydzielniczego)
- przed zamierzonym leczeniem niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi

Leczenie infekcji *H. pylori* zgodnie z aktualnymi wytycznymi opiera się na inhibitorach pompy protonowej, klarytromycynie i amoksycylinie lub metronidazolu a czas trwania leczenia przeciwbakteryjnego wynosi 10-14 dni.

Ocenę skuteczności eradykacji należy dokonać po 4-6 tygodni od zakończenia leczenia, najlepiej za pomocą testu oddechowego lub oznaczenia antygenu *H. pylori* w kale. Można też wykonać test urazowy lub badanie histopatologiczne wycinka pobranego w czasie badania endoskopowego.

W diagnostyce zakażeń *H. pylori* wykorzystuje się cechy charakterystyczne tej bakterii oraz fakt, że miejscem jej występowania jest błona śluzowa żołądka. Istnieje wiele różnych metod wykrywania zakażenia *H. pylori*, które różnią się między sobą stopniem inwazyjności, różnym czasem oczekiwania na wynik oraz czułością i swoistością. Ponieważ żadna z metod diagnostycznych zakażenia *H. pylori* nie jest w 100% czuła ani swoista, wskazane byłoby użycie dwóch testów diagnostycznych w celu stwierdzenia zakażenia. W praktyce klinicznej za „złoty standard” uważa się zastosowanie łącznie testu urazowego i oceny histologicznej – wymaga to jednak badania endoskopowego żołądka i wiąże się ze wzrostem kosztów badania.

Badania diagnostyczne w kierunku zakażenia *H. pylori* dzieli się na badania inwazyjne i nieinwazyjne. Badania inwazyjne wymagają pobrania od pacjenta fragmentu błony śluzowej żołądka.

Do metod inwazyjnych zalicza się:

- test ureazowy (RUT)

- badania histopatologiczne
- hodowlę
- badania molekularne

Do metod nieinwazyjnych zalicza się:

- badania serologiczne
- test na wykrywanie antygeny H. pylori w kale
- mocznikowy test oddechowy (UBT)

Metody serologiczne

Metody serologiczne służą do oceny odpowiedzi humoralnej przeciwko H. pylori, której efektem jest pojawienie się przeciwciał klasy IgG i IgA w surowicy. W praktyce stosuje się immunoenzymatyczny test ELISA oraz test oparty na technice Western-blot (immunoblot). Najczęściej do wykrywania obecności swoistych przeciwciał dla H. pylori używa się testów immunoenzymatycznych (Enzyme Linked Immunosorbent Assay –ELISA), w których źródłem antygenów bakteryjnych są ekstrakty struktur powierzchniowych i cytoplazmatycznych komórek bakteryjnych lub ich sonifikaty. Zasada metody ELISA opiera się na poszukiwaniu przeciwciał, które wiążą się z antygenem opłaszczonym na ścianie dołku mikropłytki reakcyjnej. Powstające kompleksy antygen-przeciwciało wykrywane są przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkim immunoglobulinom, które zostały związane z enzymem np. peroksydazą chrzanową.

Aktywność peroksydazy określa się wprowadzając do miejsca reakcji mieszaninę substratu dla enzymu (H₂O₂) z chromogenem. Pod wpływem peroksydazy chrzanowej nadtlenek wodoru zostaje rozłożony do wody i aktywnego tlenu, co powoduje utlenienie chromogenu i zabarwienie produktu reakcji. Po zahamowaniu reakcji kwasem siarkowym następuje zmiana zabarwienia powstałego produktu a jego intensywność mierzy się spektrofotometrycznie. Uzyskana wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do stężenia poszukiwanych przeciwciał w badanej surowicy. Technika Western-blot pozwala oznaczać w badanych surowicach przeciwciała skierowane przeciw pojedynczym antygenom bakteryjnym, które zostały wcześniej rozdzielone za pośrednictwem elektroforezy w żelu poliakrylamidowym, a następnie przeniesione na membranę nitrocelulozową. W teście tym poszczególne antygeny eksponowane są na bardzo małej powierzchni nitrocelulozy, co zapewnia wyższą koncentrację i wysoką czułość. Najczęściej metodą tą wykrywane są przeciwciała przeciw białkom CagA i VacA.

Użycie techniki immunoblot jest szczególnie zalecane w razie fałszywie ujemnych lub wątpliwych wyników uzyskanych w testach ELISA. Przyczyną fałszywie ujemnych wyników (u chorych zakażonych) w testach ELISA może być ich niewystarczająca czułość, zróżnicowanie szczepów H. pylori będących źródłem antygenów lub początkowa faza infekcji, w której brak jest przeciwciał w klasie IgG. Zaletą badań serologicznych jest ich mała inwazyjność i prostota wykonania. Czulość tych metod ocenia się na 84-99% a ich swoistość na 86-95%.

Testy serologiczne mają głównie zastosowanie w badaniach epidemiologicznych na dużych populacjach. Z uwagi na fakt, iż przeciwciała anty H. pylori w klasie IgG utrzymują się do dwóch lat od chwili zakażenia, a ich poziom obniża się bardzo powoli, ich obecność nie może być wiarygodnym markerem czynnej infekcji ani wykładnikiem skuteczności leczenia.

Test do wykrywania antygeny H. pylori w kale

Test do oznaczania antygeny H. pylori w kale jest metodą, w której wykorzystuje się reakcję immunoenzymatyczną do wykrywania obecności antygeny H. pylori przy pomocy poliklonalnych bądź monoklonalnych przeciwciał umieszczonych na mikropłytkce i przy udziale reakcji peroksydazowej. W wielu pracach wykazano, że u osób zakażonych H. pylori znaczna koncentracja tych bakterii i ich antygenów występuje w jelicie grubym. W związku z tym wysoki poziom antygenów H. pylori w kale może być wskaźnikiem aktualnego zakażenia tymi bakteriami. Na podstawie tych obserwacji opracowano nieinwazyjne testy immunoenzymatyczne i immunochromatyczne, do oznaczania antygeny H. pylori w kale. Testy używane do bezpośredniego

wykrywania antygenu H. pylori w kale różnią się między sobą jakością przeciwciał. Ich czułość i swoistość wynosi około 90%.

Prowadzone badania w wielu ośrodkach wykazały, że czułość i swoistość tych testów są porównywalne do testu oddechowego, dlatego też mogą być stosowane nie tylko do wstępnej diagnostyki infekcji H. pylori, ale również do monitorowania skuteczności eradykacji w 4-6 tygodniu po zakończeniu leczenia, a także do diagnostyki nawrotów infekcji H. pylori

Mocznikowy test oddechowy (UBT)

Mocznikowy test oddechowy (urea breath test –UBT) po raz pierwszy został opisany w 1987 roku przez Grahama i wsp. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność H. pylori do produkcji ureazy.

Zasada testu opiera się na spożyciu mocznika znakowanego węglem C13 lub C14. W żołądku dochodzi do rozkładu mocznika na amoniak i znakowany dwutlenek węgla. Dwutlenek węgla występujący w postaci gazowej jest absorbowany przez błonę śluzową żołądka i poprzez krew dostaje się do płuc skąd jest wydalany z wydychanym powietrzem. Próbki powietrza, zerowa – przed spożyciem i 30 minut po podaniu znacznika zostają przeanalizowane przy pomocy masowego spektrometru lub spektrofotometru podczerwieni. Wypełnione powietrzem torebki umieszcza się w odpowiednich portach umieszczonych w przednim panelu spektrofotometru. Każdy z tych portów połączony jest z zaworem elektro-pneumatycznym sterowanym przez komputer. Powietrze jest wypompowywane z torebki przy pomocy pompy membranowej poprzez detektory zawartości $^{12}\text{CO}_2$ i $^{13}\text{CO}_2$. i następuje dokładny pomiar stosunku izotopu $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ do próbek badanych.

Przez ostatnie lata test oddechowy (UBT) został zmodyfikowany. Zmieniono, głównie w celu obniżenia kosztów badania, dawki mocznika, z 350mg, którą zastosował w swojej pracy Graham, poprzez 100mg użytą przez Logana, do 75 mg (1mg/kg ciała), i ta dawka jest najczęściej stosowana i dostępna w zestawie do wykonania testu . Czas trwania badania został skrócony z 60 minut do 30 minut dla mocznika w formie tabletki a do 20 minut w formie kapsułki.

Dla zapewnienia odpowiednio długiego kontaktu mocznika z ureazą bakteryjną stosuje się posiłek testowy. W pierwszych pracach stosowano posiłki zawierające tłuszcze, powodujące wydłużony czas opróżniania żołądkowego. W chwili obecnej stosuje się sok pomarańczowy lub jabłkowy, który obniża pH dwunastnicy, powodując zmniejszenie aktywności motorycznej antrum i relaksację trzonu żołądka. Przez wiele lat weryfikowano w teście oddechowym punkt odcięcia (cut-off), na podstawie, którego odróżnia się osoby zakażone od niezakażonych. Najczęściej stosuje się wartość 5‰, zaproponowaną przez Logana i wsp., ale wielu badaczy proponuje wartość 4‰, a w kilku pracach oparto się na 3,5‰ a nawet 3‰. Mocznik do badania może być znakowany dwoma izotopami węgla: C13, który nie jest radioaktywny i może być stosowany u dzieci i kobiet w ciąży oraz izotop radioaktywny C14, którego koszt jest niższy, ale pozostaje konieczność posiadania odpowiedniego zaplecza z pracownią izotopową. Czułość i swoistość testu oddechowego UBT jest bardzo wysoka i wynosi 90-100%. Nadaje się on idealnie do oceny leczenia eradykacyjnego. Przy stosowaniu testu UBT należy pamiętać o pewnych jego ograniczeniach. Stosowanie inhibitorów pompy protonowej oraz inhibitora receptora H2 może być przyczyną fałszywie negatywnych wyników. Zaleca się odstawienie tych leków na 5-7 dni przed wykonaniem badania. Również wskazane jest, aby test był wykonany nie wcześniej niż miesiąc po stosowanej antybiotykoterapii oraz leczeniu preparatami bizmutu

Istniejące metody wykrywające bezpośrednio i pośrednio obecność H. pylori stawiają przed badającym problem wyboru właściwego zestawu testów. O wyborze metody często decyduje nie wartość diagnostyczna, ale jej dostępność. Duże znaczenie ma także aspekt ekonomiczny czyli cena stosowanej metody. Europejskie Towarzystwo Gastroenterologiczne zaleca następujące testy diagnostyczne w celu oceny zakażenia *Helicobacter pylori*:

- badanie endoskopowe z biopsją (metoda histologiczna i szybki test ureazowy), test oddechowy ze znakowanym mocznikiem oraz oznaczanie antygenu w kale ma bardzo wiarygodne zastosowanie

dla diagnozowania zakażenia H. pylori i dla potwierdzenia skuteczności eradykacji.

- testy serologiczne lub testy oparte na badaniu krwi pełnej są zadawalające dla diagnozowania zakażenia H. pylori i zupełnie nieodpowiednie dla potwierdzenia skuteczności eradykacji. Stosuje się często w badaniach epidemiologicznych.
- laboratoryjny test ELISA (surowica) jest bardzo wiarygodny dla diagnozowania zakażenia H. pylori, ale nieodpowiedni dla potwierdzenia skutecznej eradykacji.

Dwie ostatnie metody diagnostyczne stosuje się do badań epidemiologicznych.