

Οροδιαγνωστική ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA)

Αθηνά Χαρισιάδου

Οι μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του *Helicobacter pylori* (HP) διακρίνονται σε: α) επεμβατικές και β) μη επεμβατικές.

Στις μη επεμβατικές ανήκουν: 1) η δοκιμή αναπνοής-ουρίας, στην οποία δεν θα αναφερθούμε, γιατί ούτε αφορά το αντικείμενο του Σεμιναρίου της ειδικότητάς μας, ούτε είναι εύκολα προσπελάσιμη λόγω του υψηλού κόστους και του ειδικού εξοπλισμού, που χρειάζεται και 2) οι ορολογικές μέθοδοι, που στοχεύουν στην αναζήτηση αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς. Για τον προσδιορισμό των αντισωμάτων έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές όπως: α) συγκολλητινοαντίδραση, β) αναστολή αιμοσυγκόλλησης, γ) σύνδεση συμπληρώματος, δ) έμμεσος ανοσοφθορισμός, ε) ανοσοαποτύπωση (Western blot) **αλλά** οι πλέον χρησιμοποιούμενες είναι οι ανοσοενζυματικές μέθοδοι (ELISA).

Η λοίμωξη από HP προκαλεί τοπική και συστηματική ανοσολογική απάντηση. Τα τοπικά αναπτυσσόμενα αντισώματα είναι κυρίως της τάξεως των IgA και IgG ανοσοσφαιρινών στο σίελο, αλλά ο προσδιορισμός τους αποδείχθηκε μικρότερης ευαισθησίας από τον αντίστοιχο προσδιορισμό στον ορό.¹ Η συστηματική απάντηση περιλαμβάνει IgM ανοσοσφαιρίνες στον ορό, η παρουσία των οποίων είναι παροδική, ακολουθούμενη από τις ειδικές IgA και IgG ανοσοσφαιρίνες, που διατηρούνται καθ' όλη τη διάρκεια της λοίμωξης.

Η ELISA προσφέρει τα περισσότερα πλεονεκτήματα. Δίνει ποσοτικά αποτελέσματα, ολοκληρώνεται σε δύο ώρες, είναι αντικειμενική και μπορεί να αυτοματοποιηθεί, έτσι ώστε να εξετάζονται πολλά δείγματα σε μια μέρα².

Αρχή της μεθόδου

Είναι μέθοδος με την οποία αντιγόνο ή αντίσωμα ανιχνεύονται σε κατάλληλο υπόστρωμα χρησιμοποιώντας αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο.³

Η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανοσοενζυμικής μεθόδου εξαρτάται από το αντιγόνο, που έχει προσροφηθεί στο πλαστικό της πλάκας προσδιορισμού.

Στις ανοσοενζυμικές μεθόδους του εμπορίου **πρώτης γενεάς** χρησιμοποιούνται “αδρά αντιγόνα” μερικώς κεκαθαρμένα. Αυτά προέρχονται από κατακερματισμό βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους ή όξινο εκχύλισμα του βακτηριακού τοιχώματος με γλυκίνη. Στις **δεύτερης γενεάς** τις μεθόδους χρησιμοποιούνται κεκαθαρμένα πρωτεϊνικά αντιγόνα, όπως είναι θερμοανθεκτικές πρωτεΐνες, υπομονάδες ή ολόκληρο το ένζυμο ουρεάση, η πρωτεΐνη 128 Kda και η πρωτεΐνη HSP60.⁴ Χρησιμοποιώντας αυτές τις πρωτεΐνες παρατηρήθηκε μείωση της ευαισθησίας και αύξηση της ειδικότητας. Με το σκεπτικό αυτό πολλές εταιρείες συνδυάζουν 2 ή περισσότερα κεκαθαρμένα αντιγόνα προκειμένου να πετύχουν αύξηση της ευαισθησίας. Πρέπει να σημειωθεί, ότι ανιχνεύοντας αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 128 Kda έχουμε επιτυχία διάγνωσης 12δακτυλικού έλκους σε 100% των ασθενών. Και τούτο, διότι η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από το γονίδιο Cag A που είναι υπεύθυνο για το 12δακτυλικό έλκος.⁴

Πόσο καλά είναι τα Εμπορικά Kits;

Έχουν γίνει πολλές συζητήσεις, ως προς την εκτίμησή τους. Οι Laheij και συν. μελέτησαν και σύγκριναν τα αποτελέσματα 36 διαφορετικών Kits του εμπορίου. Η απόδοσή τους υπήρξε αρκετά ικανοποιητική με μέσο όρο ευαισθησίας και ειδικότητας 92% (85-96%) και 83% (73-92%) αντίστοιχα.⁵

Εκείνο που πρέπει να τονισθεί είναι ότι πριν χρησιμοποιηθεί ένα εμπορικό Kit, θα πρέπει να προσδιορίζεται το cut-off της μεθόδου για τον πληθυσμό, που θα χρησιμοποιηθεί και ασφαλώς πολύ περισσότερο όταν πρόκειται για παιδιά.

Εφαρμογές ELISA

Οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται:

1. Για επιδημιολογικές μελέτες, προκειμένου να ελέγξουμε τον επιπολα-

- σμό σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες, όπως α) η ηλικία⁶, β) τα διαφορετικά κοινωνικοοικονομικά στρώματα², γ) την μετάδοση της νόσου.⁸
2. Για παρακολούθηση αποτελεσματικότητας της θεραπείας (follow-up). Ο τίτλος αντισωμάτων σε άτομα με *HP* λοίμωξη είναι υψηλός. Μετά όμως από μια επιτυχή θεραπεία 6 μηνών θα πρέπει να φθάσει στο 50% του αρχικού⁹. Ήδη από τις 6 εβδομάδες θα πρέπει να έχουμε κάποια μείωση¹⁰. Τονίζουμε, όμως, ότι η σύγκριση του τίτλου στον ορό πριν και στον ορό μετά τη θεραπεία, θα πρέπει να γίνει ταυτόχρονα, την ίδια μέρα, στο ίδιο εργαστήριο και από τον ίδιο εξεταστή, μόνο τότε τα αποτελέσματά μας είναι συγκρίσιμα.
3. Αποτελεί κριτήριο για ενδοσκοπικό έλεγχο ή θεραπεία σε άτομα <45 με δυσπεψία και με ή χωρίς συμπτώματα¹¹.

Έχει επικυρωθεί από τη Συνθήκη του Maastricht, ότι άτομα ηλικίας <45 χρόνων με δυσπεψία, όχι ανησυχητικά συμπτώματα και τίτλο αντισωμάτων θετικό πρέπει να υποβληθούν σε θεραπεία.

Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι: Η ορολογική διάγνωση (με ανοσοενζυμική τεχνική) της λοίμωξης από *HP* είναι μη επεμβατική, αξιόπιστη, εύκολη στην εκτέλεση και φτηνή μέθοδος, η οποία συνεκτιμώμενη με τα άλλα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα αποτελεί ένα σημαντικό βοήθημα στη διάγνωση και παρακολούθηση της έκβασης της νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fallone CA, Elizov M, Cleland P, et al. Detection of *Helicobacter pylori* infection by saliva IgG testing. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1145-9.
2. Μεντής Α, Τζουβελέκης Λ. Το *Helicobacter pylori* στις γαστροπάθειες. Εργαστηριακές - Διαγνωστικές μέθοδοι. *ΕΚΜΕΔ* 1991; 4:159-78.
3. Παυλάτου Μ. Ανοσολογία (τρίτη έκδοση), 1997.
4. Μεντής Α. Διαγνωστική της λοίμωξης από *Helicobacter pylori*. Ανασκόπηση των πρόσφατων δεδομένων. *ΕΚΜΕΔ* 1995; 3:173-9.
5. Laheij R, Straatman H, Jansen J and Verbeek A. Evaluation of commercially available *Helicobacter pylori* serology Kits: a review". *J Clin Microb* 1998; 36:2803-9.
6. Charissiadou A, Giannaki M, Geombre K, Panagiotou I, Roma E and Pangalis A. *Helicobacter pylori* IgG antibodies in symptomatic and randomised pediatric population. 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Seville-Spain, 28-31 March, 1993.
7. Χαρισιάδου Α, Καρακατσάνη Ζ, Ζαχαριάδου Λ, Πάγκαλη Α, Χαϊδίας Α. *Helicobacter pylori* σε διαφορετικές ομάδες παιδικού πληθυσμού. 18^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας, Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα, 1998.

8. Charissiadou A, Giannaki M, Pangalis A, Roma and Panagiotou I. *Helicobacter pylori* seropositivity in Families of infected children in Greece. 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vienna (Austria), March 26-30, 1995.
9. Hirschl AM, Brandstatter G, Dragosics B, et al. Kinetics of specific IgG antibodies for monitoring the effect of anti-*Helicobacter pylori* chemotherapy". J Infect Dis 1993; 168:763-6.
10. Cutler A, Schubert A, Schubert T. Role of *Helicobacter pylori* serology in evaluating treatment success. Dig Dis Sci 1993; 38:2262-6.
11. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. [European *Helicobacter pylori* study Group (EHPSC)]. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report (Review). Gut 1997; 41:8-13.