

## Ανοσοαποτύπωση

*Ευαγγελία Πετρίδου*

Η ανοσοαποτύπωση είναι μια από τις καλύτερες μεθόδους ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης σε γέλη, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων.<sup>1</sup> Ονομάζεται και Western Blotting παίρνοντας το 1<sup>ο</sup> συνθετικό κατά “γεωγραφική” αναλογία του Southern Blotting που αφορά στην ανάλυση του DNA, και το 2<sup>ο</sup> συνθετικό από τη μέθοδο μεταφοράς ως αποτύπωμα του ηλεκτροφορήματος από την αρχική γέλη στην ταινία νιτροκυτταρίνης.

Η ανοσοαποτύπωση έχει πολλές κλινικές εφαρμογές καθώς καθιστά δυνατή την ανίχνευση ποικίλων αντισωμάτων έναντι διαφόρων πρωτεϊνικών αντιγόνων βακτηρίων και ιών. Συγκριτικά με την τεχνική της Elisa, η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει όχι μόνο την ανίχνευση αλλά και τον καθορισμό ενός προφίλ-προτύπου αντισωμάτων, και χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο, στην ανάλυση αμφίβολων αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την Elisa (HIV, Ηπατίτιδες).

Η εφαρμογή της ανοσοαποτύπωσης στη μελέτη του *Helicobacter pylori* (*Hp*) παρέχει τη δυνατότητα ορολογικής ανίχνευσης μιας ποικιλίας αντισωμάτων anti-*Hp* μετά την επαφή του προς εξέταση ορού με τα αντιγόνα του *Hp* που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση και έχουν μεταφερθεί σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (NK). Η κλινική σημασία αυτών των προτύπων των αντισωμάτων φαίνεται να είναι μεγάλη καθώς έχει συνδυαστεί με ποικιλία ιστικών βλαβών που προκαλεί το Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού όπως χρόνια ενεργό

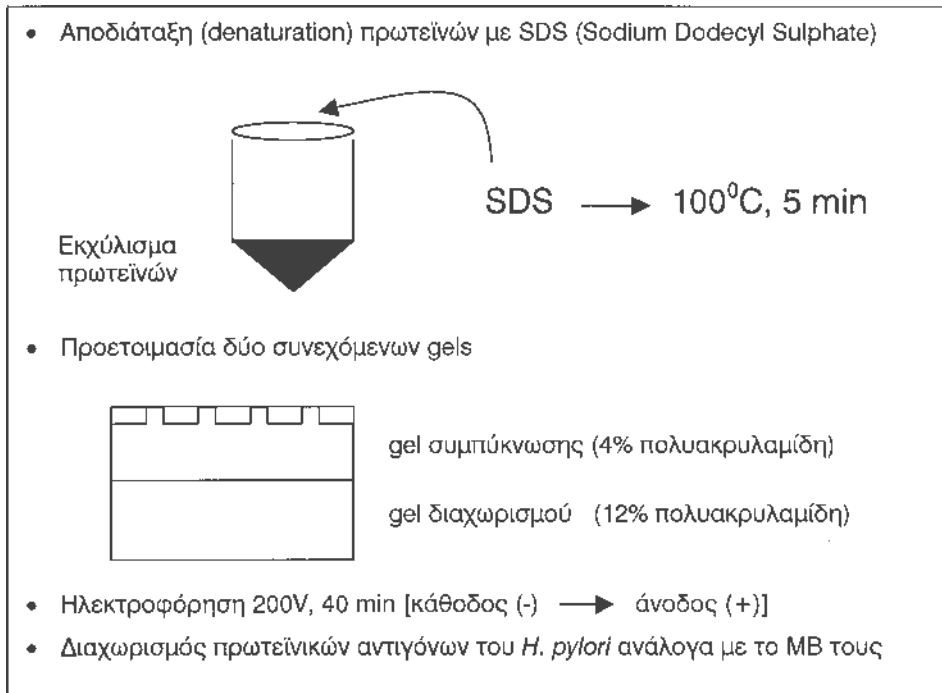
γαστρίτιδα, ατροφική γαστρίτιδα, εντερική μεταπλασία, πεπτικό έλκος, και γαστρικό καρκίνο.<sup>2-6</sup>

### Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Εκχύλιση πρωτεϊνών από καλλιέργεια του *Ελικοβακτηριδίου*.
2. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS κατά Laemmli (SDS PAGE) (Εικόνα 1).

Οι πρωτεΐνες πριν από την ηλεκτροφόρηση αποδιατάσσονται (denaturation) με θέρμανση στους 100°C για 5 min παρουσία του ανιονικού αποδιατακτικού παράγοντα SDS, (Sodium Dodecyl Sulfate) που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς, απελευθερώνει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και συνδέεται με αυτές ανάλογα με το Μοριακό Βάρος (MB) τους, εξουδετερώνοντας το



**Εικόνα 1.** Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη νιτροκυτταρίνης παρουσία SDS κατά Laemmli (SDS PAGE).



- έκπλυση x4 με TSBB και επώαση για 1 h με αντιανθρώπεια IgG αντισώματα σημασμένα με αλκαλική φωσφατάση, που ανιχνεύουν τα IgG αντισώματα του ορού που έχουν προσκολληθεί στα αντιγόνα του Ελικοβακτηριδίου.
- έκπλυση x4 με TSBB και προσθήκη υποστρώματος BCIP (5 bromo 4 chloro 3 indolyphosphate) με nitroblue tetrazolium ως χρωμογονικό δείκτη. Η αντίδραση σταματά μετά από 15 min με έκπλυση με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O. Τα συμπλέγματα αντιγόνου – αντισώματος εμφανίζονται ως μπλε ζώνες στην ταινία NK.

Η όλη διαδικασία απλοποιείται με τη χρήση έτοιμων ταινιών NK και αντιδραστηρίων Western Blot που διατίθενται στο εμπόριο όπως το Helic. Pylori της DPC ή το Helico blot 2.0 System της Genelabs Diagnostics.

### Αποτελέσματα

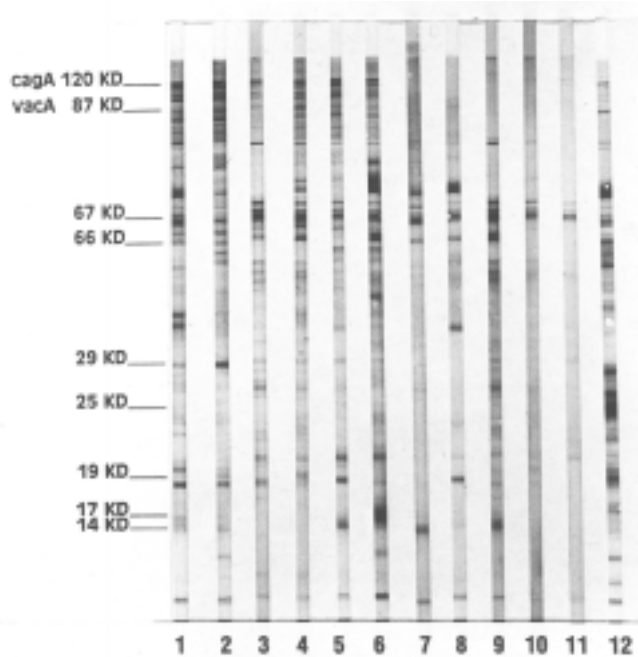
Με την ανοσοαποτύπωση μπορούν να ανιχνευθούν αντισώματα έναντι των ακόλουθων αντιγόνων των στελεχών του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού:

- 125 Kda = είναι η πρωτεΐνη Cag A, προϊόν του *cagA* (cytotoxin gene A), υψηλής ειδικότητας για το *Hp* και ο πιο σημαντικός παράγοντας λοιμογόνου δύναμης.
- 87 Kda = είναι η πρωτεΐνη VacA, προϊόν του *vacA* (vacuolating cytotoxin geneA), υψηλής ειδικότητας για το *Hp* και ένας επίσης σημαντικός παράγοντας λοιμογόνου δύναμης του μικροβίου.
- 67 Kda = είναι η πρωτεΐνη των βλεφαρίδων του *Hp*. Δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα καμπυλοβακτηρίδια.
- 66 και 30 Kda = είναι υποομάδες του ενζύμου της ουρεάσης (UreA και UreB), υψηλής ειδικότητας για το *Hp*.
- 35,25,19,17,14 Kda = είναι πρωτεΐνες με αδιευκρίνιστο ακόμα ρόλο.

Παρουσία δύο τουλάχιστον αντισωμάτων έναντι των υψηλής ειδικότητας αντιγόνων του *Hp* (120-87-66-30) επιβεβαιώνουν την ύπαρξη του μικροβίου (Εικόνα 3).

### Συμπεράσματα

Η δοκιμασία της ανοσοαποτύπωσης είναι μια άριστη ορολογική μέθοδος ελέγχου του πληθυσμού για λοίμωξη από *Hp*, με υψηλή ευαισθησία 96-99% και ειδικότητα 93-95%. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που ελαττώνουν την ειδικότητα της μεθόδου, οφείλονται στη μεταβολή των επιτόπων κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνικών αντιγόνων με την επεξεργασία τους με το SDS.



**Εικόνα 3.** Παραδείγματα ταινιών νιτροκυτταρίνης με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης στους ορούς 12 ασθενών του υλικού μας. Αριστερά φαίνονται τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνικών αντιγόνων του *H. pylori*. Οι οροί στις θέσεις 1 έως 6 καθώς και ο 12 είναι *H. pylori* θετικοί με θετικούς τους παράγοντες λοιμογόνου δύναμης CagA και VacA. Οι οροί 7 έως 9 είναι θετικοί ως προς το *H. pylori* γιατί έχουν τουλάχιστον 3 από τα υψηλής ειδικότητας αντιγόνα του *H. pylori* με αρνητικούς όμως τους παράγοντες λοιμογόνου δύναμης CagA και VacA. Στις θέσεις 10 και 11 βρίσκονται *H. pylori* αρνητικοί ασθενείς γιατί δεν έχουν τουλάχιστον 3 από τα υψηλής ειδικότητας απαιτούμενα αντιγόνα.

Η μέθοδος παρέχει σημαντικότερες πληροφορίες για τα στελέχη του *Hp*, επιτρέποντας την κατάταξή τους σε υψηλής και χαμηλής παθογένειας, ανάλογα με την παρουσία ή όχι αντισωμάτων antiCagA και antiVacA. Υπάρχει πληθώρα μελετών που δείχνουν ότι η λοίμωξη με στελέχη *Hp* που φέρουν τα γονίδια *cagA/vacA* εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εξέλιξης ενεργού γαστρίτιδας και δωδεκαδακτυλικού έλκους καθώς και ατροφικής γαστρίτιδας και γαστρικού καρκίνου.

Σε μια δική μας εργασία<sup>7</sup> με 66 *Hp*(+) ασθενείς εκ των οποίων οι 42 (63,6%) είχαν Δωδεκαδακτυλικό Έλκος (ΔΕ) και οι 24 (36,4%) Δυσπεψία Χωρίς

Έλκος (ΔΧΕ), η δοκιμασία της ανοσοαποτύπωσης κατέδειξε ότι στους μεν ασθενείς με ΔΕ το 95,2% ήταν anti CagA και anti VacA(+), ενώ στους ασθενείς με ΔΧΕ το 66,7% ήταν anti CagA (+) και το 41,7% anti VacA(+). Η διαπίστωση της παρουσίας CagA/VacA σε στατιστικώς σημαντικότερο ποσοστό στους ασθενείς με ΔΕ σε σχέση με τους ασθενείς με ΔΧΕ σε ένα μικρό δείγμα του Ελληνικού πληθυσμού, έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχα ευρήματα στο διεθνή χώρο.

Συγκριτικά με την τεχνική της ELISA, η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει όχι μόνο την ανίχνευση αντισωμάτων αλλά και τον καθορισμό ενός προφίλ-προτύπου αντισωμάτων.<sup>8-13</sup> Με την ανοσοαποτύπωση αποκαλύπτεται η ύπαρξη ενός μεγάλου πολυμορφισμού της ανοσολογικής απάντησης στη λοίμωξη από *Hp* από άτομο σε άτομο. Οι οροί διαφορετικών ασθενών αναγνωρίζουν διάφορα τμήματα του ίδιου αντιγονικού παρασκευάσματος και κάθε ασθενής φαίνεται να έχει το δικό του προφίλ αντισωμάτων.<sup>9</sup> Τα αίτια αυτού του πολυμορφισμού δεν έχουν ακόμα διευκρινιστεί καθώς η κλινική έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή είναι εξαιρετικά πολύπλοκη. Σημαντικό ρόλο πιθανόν να παίζουν παράμετροι όπως η καταγωγή, η ηλικία του ασθενή, η βαρύτητα και η παλαιότητα της λοίμωξης.<sup>14,15</sup>

Συγκριτικά με τις μοριακές τεχνικές, έχει παρατηρηθεί ότι η ανίχνευση αντισωμάτων anti CagA με την ανοσοαποτύπωση είναι πιο ευαίσθητη από την αναζήτηση με μοριακό υβριδισμό του γονιδίου *cagA* από στελέχη που πάρθηκαν με βιοψία.<sup>16,17</sup> Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι στους ασθενείς που φέρουν συγχρόνως στελέχη *cagA*(+) και *cagA*(-), η άμεση ανίχνευση του *Hp* από γαστρική βιοψία μπορεί να ανιχνεύσει μόνο έναν τύπο στελεχούς λόγω της ετερογενούς κατανομής των στελεχών στο γαστρικό βλεννογόνο.

Συμπερασματικά, η ανοσοαποτύπωση είναι μια ταχεία και αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης της λοίμωξης από το *Helicobacter pylori* καθώς και ανίχνευσης των υψηλής λοιμογόνου δύναμης στελεχών του μικροβίου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Renner SW. Immunoblotting and dot immunoblotting. Emerging techniques in protein immunochemistry. Arch Pathol Lab Med 1988;112(8): 780-6.
2. Tytgat GNJ, Noach LA, Rauws EAJ. *Helicobacter pylori* infection and duodenal ulcer disease. Gastroenterol Clin North Amer 1993;22:127-39.
3. Sipponen P, Hyvarinen H. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. Scand J Gastroenterology 1993;28(196):3-6

4. Parsonnet J, Freedmann GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991;325:1127-31.
5. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. Am J Surg Path 1995;19(Suppl 1):537-43.
6. Forman D, Coleman M, Debacker G, et al. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet 1993;341:1359-62.
7. Πετρίδου Ε, Λιάτσος Χ, Ροκκάς Θ. Η δοκιμασία της ανοσοαποτύπωσης (Western blotting) και η σημασία της στη λοίμωξη του *Helicobacter pylori*. Εφηρμ Κλιν Μικρ Εργ Διαγν 1997;2(4):190-7.
8. Andersen LP, Espersen F. Immunoglobulin-G antibodies to *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms investigated by the Western immunoblot technique. J Clin Microbiol 1992;30:1743-51.
9. Bazillou M, Fendri C, Castel O, Ingrand P, Fauchere JL. Serum antibody response to the superficial and released components of *Helicobacter pylori*. Clin Diagn Lab Immunol 1994;1(3):310-7.
10. Bolin I, Lonroth H, Svennerholm AM. Identification of *Helicobacter pylori* by immunological dot blot method based on reaction of a species-specific monoclonal antibody with a surface-exposed protein. J Clin Microbiol 1995;33:381-4.
11. Faulde M, Cremer J, Zoller L. Humoral immune response against *Helicobacter pylori* as determined by immunoblot. Electrophoresis 1993;14:945-51.
12. Faulde M, Schroder JP, Sobe D. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection by detection of immunoglobulin G antibodies using an immunoblot technique and enzyme immunoassay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:589-94.
13. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telgord JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect Immun 1995;63:94-8.
14. Fauchere JL, Bassilou M. Reponse de l'hote a l' infection gastrique par *Helicobacter pylori*. La Lettre de l' Infectiologue 1993;5:172.
15. Fauchere JL. Reponse immunitaire de l'hote contre *Helicobacter pylori*: valeur diagnostique et interet pratique dans la maladie ulcereuse duodenale. Med et Hyg 1994;52:1808.
16. Glupczynski Y. The diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a microbiologist's perspective. Rev Med Microbiol 1994;5:199-208.
17. Weiss J, Mecca J, De Silva E, Gassner D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection in dyspeptic patients. J Clin Microbiol July 1997:1663-8.