

Διαγνωστική προσπέλαση της λοίμωξης από Ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (από την πλευρά του Μικροβιολόγου)

Ελένη Μαλάμου-Λαδά

Κατά τα τελευταία χρόνια έγιναν σημαντικές πρόοδοι στη διάγνωση της λοίμωξης από *H. pylori* με την εφαρμογή νέων ανοσολογικών και μοριακών μεθόδων.

Περιγράφονται και αξιολογούνται οι παλαιότερες και νεώτερες μέθοδοι που μπορούν να εφαρμοσθούν από τους Μικροβιολόγους για την καλύτερη διάγνωση και θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori*.

Αναζήτηση του μικροβίου

Το *H. pylori* μπορεί να αναζητηθεί σε κλινικά δείγματα με καλλιέργεια σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά και με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR).

Καλλιέργεια υλικού βιοψίας γαστρικού βλεννογόνου

Είναι η βασική μέθοδος για τη διάγνωση της λοίμωξης από *H. pylori*.
Απαιτούνται δείγματα, από το άντρο και από το σώμα του στομάχου,

τα οποία μεταφέρονται στο Εργαστήριο με κατάλληλα υλικά μεταφοράς όπως Brucella broth + 20% glycerol, cysteine, Albimi broth + 20% glycerol, Stuart transport medium, Portagerm pylori medium κ.ά. Τα υλικά μεταφοράς εξασφαλίζουν επιβίωση των *H. pylori* για μακρότερο χρονικό διάστημα, ιδιαίτερα εάν συντηρηθούν στους -20°C ή στους -70°C.¹

Τα δείγματα ομογενοποιούνται και εμβολιάζονται σε εμπλουτισμένα πρόσφατα παρασκευασμένα θρεπτικά υλικά, εκ των οποίων το ένα είναι μη εκλεκτικό και το άλλο είναι εκλεκτικό. Κατάλληλα μη εκλεκτικά υλικά είναι το Brain heart infusion agar και το Brucella agar εμπλουτισμένα με 7% αίμα ίππου, ενώ τα εκλεκτικά υλικά περιέχουν τα αντιβιοτικά vancomycin 10 mg/lit, amphotericin B 10 mg/lit και cefsulodin ή trimethoprim 5 mg/lit.²

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό τους με τα υπό εξέταση δείγματα, επωάζονται σε μικροαερόφιλες συνθήκες (N₂ 80-90%, CO₂ 5-10%, O₂ 5-10%) επί επτά ημέρες.

Η ταυτοποίηση του *H. pylori* είναι εύκολη και γίνεται: α) από τη μορφολογία των αποικιών (διαφανείς, γυαλιστερές, διαμέτρου 1-2 mm, με ελαφρά αιμόλυση αρχικά, που επιτείνεται μετά παράταση της επώασης), β) τη χαρακτηριστική εικόνα στη Gram χρώση (Gram αρνητικά σπειροειδή ή καμπύλα βακτηρίδια με κοκκοειδείς μορφές σε παλιά καλλιέργηματα) και γ) τις βιοχημικές ιδιότητες (θετική αντίδραση της οξειδάσης και καταλάσης, διάσπαση της ουρίας).

Η ευαισθησία της καλλιέργειας κυμαίνεται στις διάφορες μελέτες από 70-98% η δε ειδικότητα ανέρχεται σε 100%.

Η καλλιέργεια της βιοψίας του γαστρικού βλεννογόνου εφαρμόζεται όταν απαιτείται η απομόνωση του μικροβιακού στελέχους για τη μελέτη της αντοχής του στα αντιβιοτικά, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις αποτυχίας της θεραπείας της λοίμωξης, τη μελέτη των χαρακτήρων παθογένειας και για τη μελέτη της επιδημιολογίας της λοίμωξης.

Το *H. pylori* μπορεί να απομονωθεί από τα κόπρανα με καλλιέργεια μετά από πρόκληση διάρροιας³ και από το γαστρικό υγρό μετά από πρόκληση εμέτου.⁴

Αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR)

Το γονίδιο του *H. pylori* έχει χαρτογραφηθεί πλήρως από το 1997, οπότε και δημοσιεύτηκε η ακριβής νουκλεοτιδική του αλληλουχία.

Το DNA του *H. pylori* μπορεί να αναζητηθεί με PCR σε υλικά βιοψίας γαστρικού βλεννογόνου και έχει γίνει μία συνήθης εξέταση σε πολλά εργαστήρια. Εν τούτοις δεν βελτίωσε τη διαγνωστική προσέγγιση της λοίμωξης και το ενδιαφέρον πλέον είναι περιορισμένο.⁵

Η εφαρμογή της PCR για την αναζήτηση του *H. pylori* στα κόπρανα φαίνεται να έχει εξαιρετική ειδικότητα αλλά χαμηλή ευαισθησία (73%).⁶ Η PCR έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την αναζήτηση γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένη λοιμογόνο δύναμη των στελεχών *H. pylori*, μετά από καλλιέργεια ή απευθείας σε υλικό βιοψίας γαστρικού βλεννογόνου. Επιπλέον, μέθοδοι που βασίζονται στην PCR έχουν χρησιμοποιηθεί για την τυποποίηση στελεχών *H. pylori*.

Αναζήτηση αντιγόνου του *H. pylori* στα κόπρανα

Κατά το 1997, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά ανοσοενζυμική μέθοδος με την οποία ανιχνεύονταν αντιγόνο του *H. pylori* στα κόπρανα.⁷

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της λοίμωξης από *H. pylori* με ευαισθησία και ειδικότητα που κυμαίνονται από 88-100% και 83-100% αντίστοιχα.⁸ Υπάρχει όμως προβληματισμός για την αξιοπιστία της μεθόδου όσον αφορά την παρακολούθηση της πορείας της λοίμωξης. Η μέθοδος έχει υψηλό κόστος, είναι όμως απλή, μη διεισδυτική και ως εκ τούτου μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί και στα παιδιά.

Αναζήτηση αντισωμάτων έναντι του *H. pylori* σε βιολογικά υγρά

Η λοίμωξη από *H. pylori* προκαλεί σε υψηλό ποσοστό (98%) των ατόμων έντονη τοπική και συστηματική χυμική ανοσολογική απάντηση, η οποία παραμένει ανιχνεύσιμη, επί μήνες ή και έτη.

Η αναζήτηση αντισωμάτων στον ορό, κυρίως IgG, με ανοσοενζυμική μέθοδο (ELISA) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη διάγνωση της λοίμωξης από *H. pylori* με ευαισθησία και ειδικότητα που κυμαίνονται στις διάφορες μελέτες από 86-100% και 76-98% αντίστοιχα.

Τα IgG αντισώματα μπορούν να ανιχνευθούν και σε πλήρες αίμα με ταχεία (4-10 min) ELISA από τον κλινικό ιατρό. Η διαγνωστική αξία της μεθόδου υπολείπεται της κλασικής ELISA που εφαρμόζεται στον ορό και ως εκ τούτου δεν συνιστάται στην κλινική πράξη.⁹ Τελευταία, ο ποσοτικός προσδιορισμός των IgG αντισωμάτων χρησιμοποιείται και για την παρακολούθηση της πορείας της λοίμωξης από *H. pylori*. Μείωση του τίτλου των IgG αντισωμάτων >25% εντός 4-6 μηνών, θεωρείται ικανοποιητικός δείκτης της πορείας της λοίμωξης.¹⁰

Αντισώματα IgG έναντι του *H. pylori* ανιχνεύονται στα ούρα¹¹ και στο σίελο¹² με ικανοποιητικά αποτελέσματα αλλά η διαγνωστική αξία τους δεν υπερέρχει εκείνης των αντισωμάτων του ορού.

Η αναζήτηση με ανοσοαποτύπωση αντι CagA αντισωμάτων στον ορό, για τον καθορισμό των CagA θετικών στελεχών, φαίνεται να είναι χρήσιμη για την πρόγνωση της πορείας της λοίμωξης από *H. pylori*¹³ αλλά απαιτείται ακόμα περισσότερη μελέτη του θέματος.

Ο προσδιορισμός των IgA αντισωμάτων έναντι του *H. pylori* έχει ευαισθησία που κυμαίνεται από 39-82%. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται, ως δεύτερης γραμμής εξέταση, όταν ο προσδιορισμός των IgG αντισωμάτων δίνει αμφίβολα ή αρνητικά αποτελέσματα, επί σοβαρής υποψίας *H. pylori* λοίμωξης.

Έλεγχος ευαισθησίας του *H. pylori* στα αντιβιοτικά

Το *H. pylori* εμφανίζει αντοχή σε αντιβιοτικά, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της λοίμωξης, όπως στις μακρολίδες και νιτροϊμιδαζόλες.

Η αντοχή στη μετρονιδαζόλη κυμαίνεται από 15-50% και οφείλεται σε πολλαπλές μεταλλάξεις στο NADPH γονίδιο (rdxA).¹⁴ Υπάρχει όμως αρκετός προβληματισμός ως προς τα ακριβή αποτελέσματα αντοχής, ο οποίος αποδίδεται σε δύο λόγους. Ο πρώτος λόγος είναι ότι τα αποτελέσματα των MICs της μετρονιδαζόλης επηρεάζονται από τις συνθήκες επώασης και ο δεύτερος λόγος, ότι σε ένα άτομο μπορεί να συνυπάρχουν ευαίσθητοι και ανθεκτικοί στη μετρονιδαζόλη πληθυσμοί του ίδιου στελέχους.

Η αντοχή στην κλαριθρομυκίνη, η οποία άρχισε να εμφανίζεται κατά τα μέσα του 1990, έφθασε στο τέλος του 1990 σε ποσοστά 8-15%.¹⁵ Οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη στο 23SrRNA γονίδιο στη θέση 2143 ή 2144.¹⁶

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας του *H. pylori* στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι μέθοδοι, όπως E test, διάχυση των αντιβιοτικών με δισκία, αραίωση των αντιβιοτικών σε ζωμό ή άγαρ.

Η National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) προτείνει τη μέθοδο αραίωσης των αντιβιοτικών σε Müller Hinton agar εμπλουτισμένο με 5% ερυθρά προβάτου.¹⁷ Επιπλέον η ύπαρξη μετάλλαξης του στελέχους, που προσδίδει αντοχή στις μακρολίδες, μπορεί να ανιχνευθεί εντός ολίγων ωρών με PCR, η οποία μπορεί να εφαρμοσθεί άμεσα και σε υλικό βιοψίας γαστρικού βλεννογόνου.¹⁸

Με τις προαναφερθείσες συμβατικές και μοριακές τεχνικές το Μικροβιολογικό Εργαστήριο μπορεί να συμβάλλει αποτελεσματικά στη διάγνωση και τη θεραπεία της λοίμωξης από *H. pylori*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Heep M, Scheibl K, Degrell A, Lehn N. Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999;37:3764-6.
2. Hachem CY, Clarridge JE, Evans DG, Graham DY. Comparison of agar based media for primary isolation of *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 1995;48:714-6.
3. Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. JAMA 1999;282:2240-5.
4. Leung WK, Slu KLK, Kwok CKL, Chan SY, Sung JY. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastrooral transmission. Am J Gastroenterol 1999;94:2881-4.
5. Gzyl A, Dzierzanowska D, Rosynek E, Celinska-Cedro D, Dura W, Berg DE. PCR-based diagnosis of *Helicobacter* infection in Polish children and adults. J Med Microbiol 1999;48:349-56.
6. Gramley WA, Asghar A, Erierson HF, Powell SM. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J Clin Microb 1999;37:2236-40.
7. Kozak K, Larka C, Nickol A, Yi A. Detection of *H. pylori* antigen in stool specimens using a novel enzyme immunoassay. Abstracts of the 97th Meeting of the American Society of Microbiology. Miami Beach, May 1997.
8. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new noninvasive antigen-based assay. Lancet 1999;354:30-3.
9. Hawthorne AB, Morgan S, Westmoreland D, Stenson R, Thomas GAO, Newcombe RG. A comparison of two rapid whole-blood tests and laboratory serology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999;11:863-5.
10. De Boer WA, Lerang F. Serology for follow up of *Helicobacter* therapy. Eur J Gen Pract 1999;5:162.
11. Miwa H, Hirose M, Kikuchi S, et al. How useful is the detection kit for antibody to *Helicobacter pylori* in urine (URINELISA) in clinical practice? Am J Gastroenterol 1999;94:3460-3.
12. De Pascalis R, Del Pezzo M, Nardone G, Budillon G, Lavitola A. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for determining salivary immunoglobulin G response to *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999;37:430-2.
13. Rokkas T, Liatsos C, Karameris A, Petridou E, Papatheodorou G, Kalafatis E. Serologic detection of CagA positive *Helicobacter pylori* strains predicts the presence of peptic ulcer in young dyspeptic patients. Gastrointest Endosc 1999;50:511-5.
14. Goodwin A, Kersulyte D, Sissin G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg D, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Mol Microbiol 1998;28:383-93.
15. Jovene MR, Romano M, Pelloni AP, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in 80 clinical isolates of *H. pylori*. Chemotherapy 1999;45:8-14.

16. Versalovic J, Shortridge D, Kibler K, et al. Mutations in 23SrRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:477-80.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Ninth informational supplement. NCCLS document M100-S9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, 1999.
18. Gramley WA, Asghar A, Frierson Jr HF, Powell RJ. Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1999;37:3746-8.