

Występowanie przeciwciał dla białka CagA i cytotoksyny wakuolizującej VacA u dzieci z zakażeniem *Helicobacter pylori*

The prevalence of anti-CagA and anti-VacA antibodies in children with *Helicobacter pylori* infection

Grażyna Gościński¹, Monika Biernat¹, Joanna Grabińska¹, Barbara Iwańczak²

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

²II Klinika Pediatrii Gastroenterologii i Żywnienia Akademii Medycznej we Wrocławiu

Przegląd Gastroenterologiczny 2009; 4 (2): 79–82

Słowa kluczowe: *Helicobacter pylori*, dzieci, Western blot, VacA, CagA.

Key words: *Helicobacter pylori*, children, Western blot, VacA, CagA.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Grażyna Gościński, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Akademia Medyczna, ul. Chatubińskiego 4, 50-368 Wrocław, tel. +48 71 784 12 76, e-mail: gosgra@mbio.am.wroc.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Zakażenie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) nabywa się najczęściej w dzieciństwie. Rodzaj występujących zmian chorobowych zależy nie tylko od czynników wirulencji drobnoustroju, ale również od odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Cel: Określenie częstości występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko swoistym dla *H. pylori* antygenom CagA (120 kDa) i VacA (95 kDa) u dzieci z różnymi schorzeniami przewodu pokarmowego.

Materiał i metody: Przedmiotem badań były próbki surowicy pochodzące od dzieci ($n = 200$) w wieku 4–18 lat, z przewlekłym zapaleniem żołądka ($n = 130$), chorobą wrzodową żołądka lub dwunastnicy ($n = 39$), chorobą refluksową przełyku (*gastroesophageal reflux disease* – GERD) ($n = 19$) i chorobą trzewną ($n = 12$). Obecność przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko *H. pylori* wykrywano w surowicy metodą ELISA i Western blot.

Wyniki: Spośród przebadanych 200 próbek surowicy najczęściej wykrywano przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi CagA *H. pylori*, bo aż u 70% dzieci. U pacjentów z przewlekłym zapaleniem żołądka obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom o ciężarze 120 i 95 kDa wykazano u 61,54 i 37,69% badanych, a u dzieci z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy u 92,31 i 82,05%. U dzieci z chorobą trzewną przeciwciała anti-CagA oraz anti-VacA występowały w 83,33 i 75% przypadków. Największą częstość pojawiania się przeciwciał anti-VacA oraz anti-CagA obserwowano u najmłodszych dzieci (84,2% przypadków).

Wnioski: Przeciwciała skierowane przeciwko CagA i VacA występują częściej u dzieci z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy niż z przewlekłym zapaleniem żołądka. Duża częstość występowania przeciwciał dla cytotoksyny wakuolizującej VacA i białka CagA u małych dzieci może wynikać ze znacznego odsetka zakażeń szczepami CagA+, VacA+ na terenie Dolnego Śląska.

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is acquired mainly in childhood. The type of clinical manifestation is associated not only with specific virulence factors of these organisms but also with host immunological response.

Aim: The aim of the study was to determine the frequency of IgG antibodies against *H. pylori* specific antigens CagA (120 kDa) and VacA (95 kDa) in children with different gastroduodenal diseases.

Material and methods: Serum samples taken from children ($n = 200$), aged 4-18 years, with chronic gastritis ($n = 130$), peptic and duodenal ulcer disease ($n = 39$), gastroduodenal reflux disease (GERD) ($n = 19$) and coeliac disease ($n = 12$), were examined. The presence of anti-*H. pylori* IgG antibodies was detected in patients' sera by ELISA and Western blot.

Results: Among examined samples antibodies against *H. pylori* CagA were observed in 70% of cases. In children with chronic gastritis the percentage of antibodies against 120 kDa, 95 kDa *H. pylori* antigens was 61.54 and 37.69%, whereas in subjects with peptic and duodenal ulcers it was 92.31 and 82.05% respectively. In patients with coeliac disease the level of anti-CagA and anti-VacA antibodies was as high as 83.33 and 75%. The highest frequency of the presence of anti-*H. pylori* specific antibodies was observed in the youngest children (84%).

Conclusions: Specific antibodies against CagA and VacA are observed more frequently in children with peptic and duodenal ulcer than in patients with chronic gastritis. A high prevalence of the presence of antibodies against VacA and CagA in very small children could be associated with high rate of infection caused by CagA+, VacA+ *H. pylori* strains in Lower Silesia region.

Wprowadzenie

Zakażenie *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), które jest nabywane najczęściej w dzieciństwie, dotyczy więcej niż połowy populacji całego świata. Jednak tylko u ok. 10–20% zakażonych osób infekcja prowadzi do rozwoju przewlekłego zapalenia żołądka, wrzodów żołądka, raka żołądka lub też chłoniaków typu MALT. Zjadliwość pałeczek *H. pylori* ściśle wiąże się z obecnością określonych czynników wirulencji, takich jak białko CagA, cytotoksyna wakuolizująca VacA, zdolność produkcji ureazy, liczne enzymy oraz rzęski warunkujące zdolność ruchu.

W ostatnich latach utrwalił się pogląd, że na przebieg zakażenia *H. pylori* mają wpływ nie tylko właściwości drobnoustroju, ale także genetyczne czynniki gospodarza i uwarunkowania środowiskowe [1–3]. Szczególnie istotne znaczenie przypisuje się obecnie indywidualnej zdolności chorego do odpowiedzi na infekcję. Rodzaj i typ odpowiedzi immunologicznej może istotnie wpływać na przebieg tego zakażenia. Kolonizacja błony śluzowej żołądka przez pałeczki *H. pylori* wyzwała miejscową i uogólnioną odpowiedź immunologiczną organizmu gospodarza. Ogólnoustrojowa odpowiedź humoralna manifestuje się obecnością w surowicy przeciwciał klasy IgM, IgA i IgG, skierowanych przeciwko swoistym antygenom *H. pylori*, takim jak białka błony zewnętrznej, rzęski, ureaza, lipopolisacharyd (LPS), CagA i VacA [4]. U większości pacjentów zakażonych *H. pylori* wykrywa się przeciwciała IgG, podczas gdy przeciwciała IgA są obecne u mniej niż połowy osób.

Tabela I. Częstość występowania przeciwciał anti-VacA oraz anti-CagA w surowicy dzieci z różnymi schorzeniami przewodu pokarmowego
Table I. The frequency of anti-VacA and anti-CagA antibodies in serum samples of children with different gastroduodenal diseases

Rozpoznanie kliniczne	Obecność przeciwciał		Brak przeciwciał
	anti-VacA	anti-CagA	
przewlekłe zapalenie żołądka (n = 130)	49 (37,69%)	80 (61,54%)	50 (38%)
choroba trzewna (n = 12)	9 (75%)	10 (83,33%)	2 (14,29%)
GERD (n = 19)	9 (47,37%)	14 (73,68%)	5 (33,33%)
choroba wrzodowa żołądka i/lub dwunastnicy (n = 39)	32 (82,05%)	36 (92,31%)	3 (33,33%)
razem (n = 120)	99 (49,5%)	140 (70%)	60 (30%)

Cel

Celem pracy było określenie częstości występowania przeciwciał klasy IgG przeciwko swoistym dla *H. pylori* antygenom CagA (120 kDa) i VacA (95 kDa) u dzieci z różnymi schorzeniami przewodu pokarmowego.

Materiał i metody

Przedmiotem badań były próbki surowic zgromadzone w latach 1998–2007 w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, pochodzące od 200 dzieci w wieku 4–18 lat, diagnozowanych i leczonych w II Katedrze i Klinice Pediatrii Gastroenterologii i Żywienia Akademii Medycznej we Wrocławiu. Byli to pacjenci, u których na podstawie badania endoskopowego i histopatologicznego rozpoznano przewlekłe zapalenie żołądka, chorobę wrzodową żołądka i/lub dwunastnicy, chorobę refluksową przełyku (*gastroesophageal reflux disease* – GERD) i chorobę trzewną. Od pacjentów pobierano wycinki śluzówki żołądka do badań bakteriologicznych oraz próbki krwi do badań serologicznych.

Obecność przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko *H. pylori* wykrywano w surowicy metodą ELISA i Western blot (EUROIMMUN) zgodnie z instrukcją producenta. Test Western blot zawiera paski nitrocelulozy z rozdzielonym elektroforetycznie ekstraktem antygenów *H. pylori* o masie: 17, 19,5, 26, 29, 30, 33, 95 kDa (VacA) i 120 kDa (CagA). Odczytu dokonano poprzez porównanie prób badanych z wzorcową surowicą kontrolną dostarczoną przez producenta testu.

Wyniki

W grupie 200 przebadanych dzieci z dolegliwościami ze strony górnego odcinka przewodu pokarmowego na podstawie obrazu klinicznego, badania endoskopowego i histopatologicznego rozpoznano u 130 pacjentów przewlekłe zapalenie żołądka, a u 39 chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy. U 12 dzieci stwierdzono chorobę trzewną, a u 19 GERD. Dzieci podzielono na grupy wiekowe: 2–6, 7–12 i 13–18 lat. U wszystkich przebadanych chorych odnotowano obecność *H. pylori* w wycinkach błony śluzowej żołądka, co potwierdzono w badaniach bakteriologicznych. U wszystkich dzieci w surowicy wykazano również przeciwciała klasy IgG skierowane przeciwko *H. pylori*. Przeciwciała wykryto za pomocą testu ELISA.

Spośród przebadanych 200 próbek surowicy najczęściej występowały przeciwciała skierowane przeciwko antygenowi CagA *H. pylori* (tab. I). Wykryto je u 140 z 200 (70%) badanych dzieci. Przeciwciała anti-VacA (95 kDa) wykryto u 49,5% chorych. W grupie dzieci z przewlekłym zapaleniem żołądka obecność przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom o masie

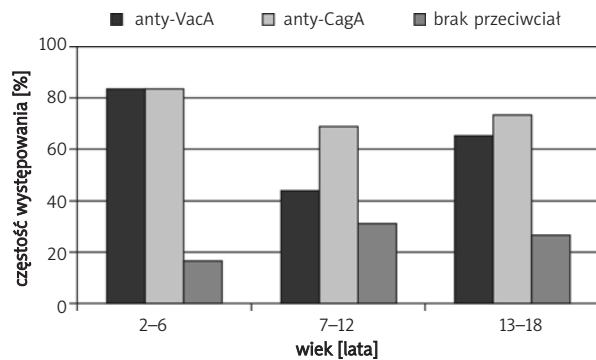
120 i 95 kDa wykazano odpowiednio u 61,54 i 37,69% badanych. U dzieci z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy przeciwciała anti-CagA i anti-VacA wykrywano odpowiednio u 92,31 i 82,05% badanych.

W surowicy dzieci z chorobą trzewną przeciwciała anti-CagA oraz anti-VacA występowały w 10 (83,33%) i 9 (75%) przypadkach. U dwójki dzieci nie wykryto przeciwciał przeciwko tym antygenom. U dzieci z GERD obecność przeciwciał w surowicy skierowanych przeciwko antygenom o masie 120 i 95 kDa stwierdzono odpowiednio w 14 (73,68%) i 9 przypadkach (47,37%).

Największą częstość występowania przeciwciał anti-VacA oraz anti-CagA obserwowano u najmłodszych dzieci (4–6 lat) (ryc. 1). Ich obecność stwierdzono u 16 z 19 pacjentów (84,2%). U 7–12-latków przeciwciała anti-VacA i anti-CagA wykazano u 22 (43,13%) i 35 chorych (68,62%). W grupie dzieci najstarszych częstość występowania przeciwciał anti-CagA oraz anti-VacA wynosiła odpowiednio 73,91 i 65,22%.

Omówienie

Na podstawie występowania przeciwciał anti-CagA i anti-VacA można pośrednio ustalić, czy do zakażenia doszło przez szczepy *H. pylori* typu I (CagA+, VacA+) czy typu II (CagA-, VacA-). Szczepy o fenotypie I uważa się za bardziej wirulentne, a zakażenie częściej wiąże się z powstawaniem wrzodów żołądka i dwunastnicy [5, 6]. Analizując obecność przeciwciał anti-VacA i anti-CagA u dzieci z różnymi schorzeniami przewodu pokarmowego, wykazano, że największą częstość notowano u dzieci z chorobą wrzodową żołądka (odpowiednio 82 i 92%) oraz z celiakią (75 i 83%). Przeciwciała skierowane przeciwko białku CagA były wykrywane najczęściej – u 70% badanych dzieci. W grupie chorych na przewlekłe zapalenie żołądka częstość występowania swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom CagA i VacA wynosiła odpowiednio 62 i 38%. Duży poziom przeciwciał anti-VacA i anti-CagA u dzieci z chorobą wrzodową żołądka w porównaniu z grupą z *gastritis chronica* notowali Alarcón i wsp. [7]. W badaniach przeprowadzonych w Turcji wykazano związek między obecnością przeciwciał skierowanych przeciw cytotoksynie wakuolizującej i białku CagA a występowaniem choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy oraz raka żołądka [8]. Związek między wysokim poziomem przeciwciał anti-CagA a stopniem nasilenia zmian zapalnych w śluzówce żołądka był również postulowany przez innych autorów [9–11]. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Luzzo i wsp. [12] wykazano, że u dzieci zakażonych *H. pylori* obecność przeciwciał anti-CagA korelowała z gęstością nacieku zapalnego w śluzówce żołądka i większym stopniem



Ryc. 1. Częstość występowania przeciwciał anti-VacA oraz anti-CagA w surowicy dzieci w poszczególnych grupach wiekowych

Fig. 1. The frequency of anti-VacA and anti-CagA antibodies in children's sera in different age groups

nasilenia zmian zapalnych. Schumann i wsp. [13] badali charakter odpowiedzi immunologicznej u pacjentów z rakiem żołądka i bez zmian nowotworowych w przewodzie pokarmowym. Dowiedli, że wysokie poziomy swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom pałeczek *H. pylori* – CagA (116 kDa) i VacA (89 kDa) – występują częściej u chorych na raka żołądka. Autorzy ci sugerują, że oznaczenie przeciwciał w surowicy osób z infekcją *H. pylori* może mieć istotne znaczenie dla prognozowania skutków zakażenia i rozwoju raka żołądka. Z kolei amerykańscy badacze wykazali dużą częstość występowania przeciwciał anti-*H. pylori* u pacjentów z dyspepsją czynnościową [14].

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że najwyższy poziom przeciwciał anti-CagA i anti-VacA występował u dzieci najmłodszych 4–6-letnich i wynosił 84%. Wynik ten tłumaczy dużą częstość zakażenia pałeczkami *H. pylori* w tej grupie wiekowej – najczęściej ma ono postać ostrego procesu zapalnego w śluzówce żołądka. Jednakowy wysoki poziom przeciwciał anti-VacA i anti-CagA sugeruje, że geny kodujące te antygeny ulegają koekspresji. Poziom przeciwciał anti-VacA i anti-CagA u badanych dzieci stopniowo zmniejszał się wraz z wiekiem, ale wciąż utrzymywał się na dużym poziomie. Częste (98,6%) występowanie przeciwciał skierowanych przeciwko swoistym antygenom *H. pylori* u dzieci zakażonych *H. pylori* wykazali Oleastro i wsp. [15]. Jafarzadeh i wsp. [16] badający obecność przeciwciał anti-CagA w populacji dzieci zdrowych w podobnych grupach wiekowych zaobserwowali natomiast, że u dzieci w wieku 1–5 lat przeciwciała występowały u 59,57% badanych, u 6–10-latków – u 75%, natomiast u dzieci powyżej 10. roku życia przeciwciała wykrywano w 79,45% przebadanych prób surowicy.

Wyniki analiz autorów niniejszej pracy wykazały, że swoiste przeciwciała skierowane przeciwko antygenom *H. pylori* CagA i VacA były wykrywane z podobną częstością u dzieci z GERD (66,67%) i z innymi schorzeniami przewodu pokarmowego. Wielu badaczy postuluje ochronny wpływ szczepów CagA+ *H. pylori* na przebieg GERD, które – indukując zanik błony śluzowej trzonu żołądka – doprowadzają do zahamowania wydzielania kwasu solnego i tym samym do złagodzenia objawów choroby [17].

Udział zakażenia *H. pylori* w rozwoju choroby trzewnej jest przedmiotem wielu dyskusji. Chłoniaki MALT żołądka i limfocytarne zapalenie żołądka są chorobami, których związek zarówno z celiakią, jak i z zakażeniem *H. pylori* jest udowodniony [18]. Duża częstość występowania przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom VacA i CagA stwierdzona w badaniach autorów wskazuje na konieczność kontynuowania badań w większej grupie pacjentów z chorobą trzewną.

Badania serologiczne ze względu na nieinwazyjność, prostą i łatwo dającą się automatyzować technikę wykonania są szczególnie wartościowe w przypadku dzieci. Podejmuje się próby ustalenia pewnych typowych antygenów pałeczek *H. pylori*, rozpoznawanych przez przeciwciała zawarte w surowicy chorych, których obecność mogłaby świadczyć o aktualnym zakażeniu tym drobnoustrojem.

Wnioski

Przeciwciała skierowane przeciwko antygenom CagA (120 kDa) i VacA (95 kDa) występują częściej u dzieci z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy niż z przewlekłym zapaleniem żołądka.

Dużą częstość występowania przeciwciał dla cytotoksyny wakuolizującej VacA i białka CagA u małych dzieci może wynikać ze znacznego odsetka zakażeń szczepami CagA+, VacA+ na terenie Dolnego Śląska.

Obecność przeciwciał anty-CagA i anty-VacA u 70–80% osób z chorobą trzewną wskazuje na potrzebę diagnostyki zakażeń *H. pylori* w tym schorzeniu.

Piśmiennictwo

1. Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 1: 10-4.
2. Ozen A, Ertem D, Pehlivanoglu E. Natural history and symptomatology of *Helicobacter pylori* in childhood and factors determining the epidemiology of infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 398-404.
3. Sgouros SN, Bergele C. Clinical outcome of patients with *Helicobacter pylori* infection: the bug, the host, or the environment? *Postgrad Med J* 2006; 82: 338-42.
4. Suarez G, Reyes VE, Beswick JE. Immune response to *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5593-8.
5. Andersen LP. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 12-5.
6. Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2008; 134: 306-23.
7. Alarcón T, Martínez MJ, Domingo D, et al. Study of cagA and vacA in *Helicobacter pylori* from children according to age. *Intersci Conf Antimicrob Agents* 2000; 40: A127.
8. Sezikli M, Guliter S, Apan TZ, et al. Frequencies of serum antibodies to CagA and VacA in a Turkish population with various gastroduodenal diseases. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 1239-43.
9. Shimoyama T, Fukada S, Nakasato F, et al. Relation of CagA seropositivity to cagPAI phenotype and histological grade of gastritis in patients with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3751-5.
10. Suriani R, Colozza M, Cardesi E, et al. CagA and VacA *Helicobacter pylori* antibodies in gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 2008; 22: 255-8.
11. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, et al. Risk of cancer in asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and antibody levels. *Int J Cancer* 2008; 23: 917-926.
12. Luzza F, Pensabene L, Imeneo M, et al. Antral nodularity and positive CagA serology are distinct and relevant markers of severe gastric inflammation in children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002; 7: 46-52.
13. Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, et al. Serum antibody positivity for distinct *Helicobacter pylori* antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 223-8.
14. Shmueli H, Obure S, Passaro DJ, et al. Dyspepsia symptoms and *Helicobacter pylori* infection, Nakuru, Kenya. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1103-7.
15. Oleastro M, Matos R, Cabral J, et al. Evaluation of a Western Blot Test, Helico Blot 2.1, in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in pediatric population. *Helicobacter* 2002; 7: 210-5.
16. Jafarzadeh A, Rezayati MT, Nemati M. Specific serum immunoglobulin G to *H. pylori* and CagA in healthy children and adults (south-east of Iran). *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3117-21.
17. Pereira-Lima JC, Marques DL, Pereira-Lima LF, et al. The role of cagA *Helicobacter pylori* strains in gastro-oesophageal reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 643-7.
18. Szafarska-Popławska A. Celiac disease and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Pol* 2004; 11: 159-62.