

Pregledni prispevek/Review article

DIHALNI TEST S SEČNINO – NJEHOVO MESTO V DIAGNOSTIKI

UREA BREATH TEST – ITS ROLE IN DIAGNOSTICS

Joško Osredkar

Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Klinični center, Njegoševa 4, 1525 Ljubljana

 Prispelo 2003-07-21, sprejeto 2003-11-04; ZDRAV VESTN 2004; 73: 13-7

Ključne besede: *Helicobacter pylori*; invazivni in neinvazivni diagnostični testi; dihalni test s sečnino

Izvleček – Izhodišča. Vsako leto mnogo pacientov obišče svoje osebne zdravnike in navaja prebavne motnje, najpogosteje gre za funkcionalno dispepsijo ali gastroezofagealni refluks. Mnogi pacienti imajo dejansko želodčno razjedo ali razjedo v dvanajstniku, ki jo običajno povzroča bakterija *Helicobacter pylori* (HP) in je ozdravljiva. Ker ozdravitev okužbe običajno pozdravi razjedo in preprečuje ponovni razrast, je bistvenega pomena pravilna diagnoza. Za postavitve diagnoze imamo več možnosti: s serološkimi testi določimo protitelesa proti bakteriji, endoskopska biopsija nam daje material za izvedbo hitrega ureaznega testa, biopti lahko obarvamo s specialnimi barvili, celice lahko kultiviramo. Na žalost so te metode invazivne, drage in vedno ne tudi dovolj natančne. Za serološke teste potrebujemo kri, iz tega rezultata pa lahko izvedemo samo to, ali je bil pacient pred časom izpostavljen bakteriji, ne pa, ali je bakterija tudi trenutno prisotna. Endoskopska biopsija lahko detektirata trenutno okužbo – CLO ureazni test nam omogoča hitro določitev bakterije HP v bioptu – sta pa to metodi, ki sta invazivni, za pacienta neprijetni. Test, ki je široko dostopen in je občutljiv, specifičen in neinvaziven, je dihalni test s sečnino za detekcijo okužbe s HP. Ko okužena oseba pogoltne odmerke sečnine, ki je označena z izotopom ogljika (^{13}C ali ^{14}C), HP v želodčni mukozni cepi sečnino na amoniak in ogljikov dioksid, ki ima v tem primeru tudi izotop (^{13}C ali ^{14}C). Ogljikov dioksid se absorbira v krvni obtok in se nato izloča z izdihanim zrakom prek pljuč. Pacient izdihne zrak v epruveto oziroma balon, v izdihanem zraku pa izmerimo delež izotopa. Dihalni test s sečnino je specifičen za HP (samo tiste bakterije, ki proizvajajo ureazo) in občutljiv (označena sečnina se porazdeli po celotni površini želodca in tako odraža celotno ureazno aktivnost) ter daje ponovljive rezultate.

Zaključki. Opisani so invazivni in neinvazivni testi za odkrivanje okužbe s *Helicobacter pylori*. Podrobneje je predstavljen dihalni test s sečnino, ki ima po priporočilih Evropskega združenja gastroenterologov tudi svoje mesto. Dihalni test s sečnino naj bi bil kot pripomoček pri diagnozi v ambulantni splošnega zdravnika.

Key words: *Helicobacter pylori*; invasive and noninvasive diagnostic tests; urea breath test

Abstract – Background. Each year many patients visit their physicians complaining of digestive symptoms, most commonly functional dyspepsia (»indigestion«) or gastroesophageal reflux (»heartburn«). However, many patients with abdominal discomfort are actually suffering from gastric or duodenal ulcers that are commonly caused by *H. pylori* and thus are curable. Clearing the infection usually heals the ulcer and prevents relapse, so an accurate diagnosis is important. There are several options for diagnosing *H. pylori* infection: serology to detect antibodies against the bacterium; endoscopic biopsy for urease testing (*H. pylori* produce a urease that breaks down urea to ammonia and carbon dioxide); histology with special stains; or culture. Unfortunately, these procedures are invasive, expensive and not always accurate. Serological tests require a blood sample and tell only that a patient has been exposed to *H. pylori* at some time in the past, but not whether the patient is currently infected. Endoscopy and biopsy can detect current infection – the CLO test urease test allows rapid detection of *H. pylori* in gastric biopsy specimens – but endoscopy and biopsy are unpleasant medical procedures.

Recently, noninvasive, sensitive, specific, easy to perform and patient's well accepted methods had been developed known as urea breath test (UBT). When an infected person swallows a dose of urea labeled with an isotope of carbon – carbon-13 (^{13}C) or carbon-14 (^{14}C) – *H. pylori* in the gastric mucosa break down the labeled urea to form ammonia and labeled carbon dioxide. The carbon dioxide is absorbed into the bloodstream and excreted via the lungs. The patient then exhales into a device that measures the level of carbon dioxide. The urea breath test is specific for *H. pylori* (it detects only urease-producing bacteria), it is sensitive (the labeled urea reaches a large area of the stomach and thus reflects total gastric urease activity) and the results can be reproduced.

Conclusions. Invasive and noninvasive diagnostic tests for *H. pylori* are described. In a more detailed frame UBT is presented, the test which is recommended in certain instances by European Gastroenterologic Society. The UBT should be available for use in the doctor's office to provide a rapid diagnosis.

Uvod

Bakterija *Helicobacter pylori* je vpletena v nastanek velikega števila bolezni želodčne sluznice. Odkritje te bakterije in njenega pomena pri želodčnih boleznih je eno najpomembnejših odkritij v gastroenterologiji v zadnjih 20 letih (1). Ker je povzročiteljica kroničnih želodčnih vnetij, razjede na dvanajstniku in želodcu in tudi sokrivec raka na želodcu, je pomembno, da to bakterijo z zdravljenjem odstranimo. Za spremljanje uspešnosti zdravljenja imamo na voljo več različnih metod, ki so bolj ali manj prijazne do bolnika. Ena od prijaznejših metod je t. i. dihalni test s sečnino.

Mikrobiološke značilnosti bakterije *Helicobacter pylori*

Bakterija *Helicobacter pylori* (HP) je gramnegativna, $0,3 \times 3$ do $5 \mu\text{m}$ velika spiralna bakterija, ki se lahko svedrasto giblje s pomočjo štirih do šestih bičkov (sl. 1).



Sl. 1. *Helicobacter pylori* na celicah želodčne sluznice (elektronski mikroskop).

Figure 1. *Helicobacter pylori* bacteria on gastric mucosa cells (electronic microscope).

Specializirana je za življenje na želodčni sluznici. Bakterija izloča encim ureazo, ki razgrajuje sečnino (ureo) na amoniak in bikarbonat (2).

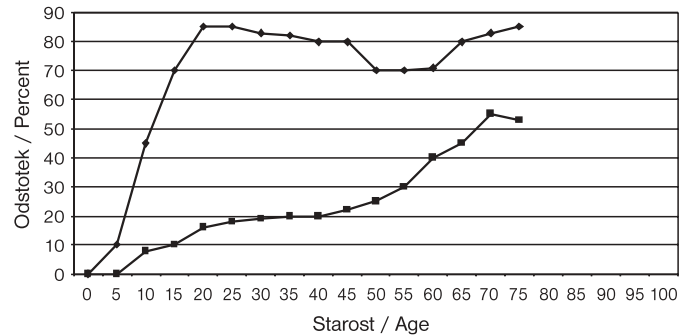
Epidemiologija okužbe z bakterijo HP

Razširjenost okužbe z bakterijo HP je glede na razvitost držav različna (sl. 2).

Prevalenca okužbe s *Helicobacter pylori* najbolj korelira s socialno-ekonomskim položajem. V nerazvitem svetu z nizkim standardom (ekonomskim in higienskim) se večina prebivalstva okuži že v otroštvu, medtem ko se v razvitem svetu odstotek okuženosti poviša po 50. letu starosti, prekuženost pa je večja pri revnejšem sloju. Višja prekuženost z bakterijo v razvitem svetu pri starejših prebivalcih je po vsej verjetnosti posledica slabih higienskih navad in slabših ekonomskih razmer (3).

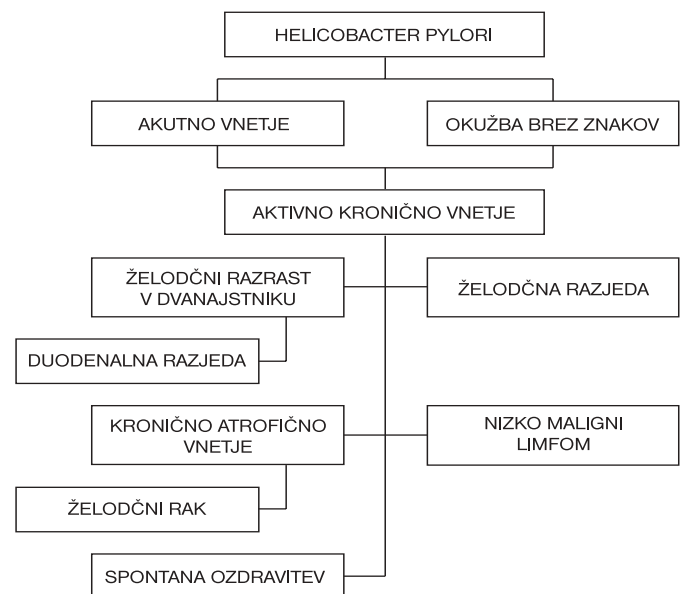
Možne posledice okužbe s HP

Okužba s HP je najpogostejša okužba pri ljudeh, saj je z njo okužena več kot polovica človeštva. Pri približno petini okuženih se pojavijo različne težave oziroma bolezni (sl. 3).



Sl. 2. Odstotek prebivalcev v razvitih državah (spodnja linija) in v deželah v razvoju (zgornja linija), okuženih s *H. pylori*.

Figure 2. Incidence of *Helicobacter pylori* infection in developed countries (lower line) and in developing countries (upper line).



Sl. 3. Možni izidi okužbe z bakterijo *H. pylori*.

Figure 3. Possible outcomes of infections caused by *H. pylori*.

Kakšne bodo težave, je odvisno od same vrste bakterije (različni sevi), od obrambnih sposobnosti gostitelja, od dejavnikov okolja in tudi od starosti gostitelja v času okužbe.

Diagnostika okužbe s HP

Kot rečeno, se v približno 20% primerov okužbe s HP razvije klinično pomembna bolezen. Za potrjevanje prisotnosti okužbe ob različnih težavah imamo na voljo več postopkov in testov, ki jih delimo v dve skupini:

- invazivne diagnostične metode in
- neinvazivne diagnostične metode (razpr. 1).

HP je bakterija, ki proizvaja velike količine ureaze in ta ji omogoča, da preživi v izrazito kisli sredini želodčnega soka. Čeprav je HP bolj odporna proti želodčni kislini kot druge bakterije, pa se ob prihodu v želodec prav tako sreča z agresivnostjo želodčnega soka. Prav zaradi tega je gibljiva, kar ji omogoča, da se umesti v sloj med sluzjo in epitelijem in v tem, manj kislem miljeju tvori velike količine ureaze. Ureaza je prisotna v citoplazmi bakterijske celice z namenom, da oskrbuje celico z amoniakom in dušikom, ki sta nujna grad-

nika aminokislilin. Druga naloga ureaze je nevtralizacija želodčne kisline. Ureaza katalizira hidrolizo sečnine na amoniak in karbamat. Karbamat se naprej spontano hidrolizira z nastankom amoniaka in karbonsilne kisline. V reakciji z vodo iz amoniaka nastaja amonijev hidroksid, kar vodi do hitrega porasta pH vrednosti in alkalizacije okolice bakterije. Poleg ureaze ima pomembno vlogo pri regulaciji kislosti tudi ATP-aza P-tip.

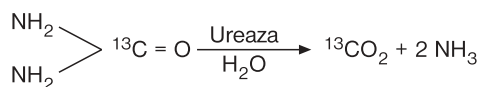
Razpr. 1. *Diagnostične metode za ugotavljanje okužbe z bakterijo H. pylori.*

Table 1. *Diagnostic methods for Helicobacter pylori infection.*

Invazivne Invasive	<ul style="list-style-type: none"> - Hitri bioptični ureazni test (HUT) - Rapid urease test - Faznokontrastni mikroskopski pregled svežega biopta - Phase contrast microscopy test - Histološka preiskava biopta - Histology of gastric biopsy - Kultura - Culture - Reakcija verižne polimeraze (PCR) - Gastric biopsy PCR
Neinvazivne Noninvasive	<ul style="list-style-type: none"> - Serološke preiskave (določanje protiteles IgG in IgA) - Serology (IgG and IgA antibodies detection) - Dihalni test s sečnino (^{13}C ali ^{14}C) - Urea breath test (^{13}C or ^{14}C) - Dokazovanje HP v blatu - Stool culture

Hitri bioptični ureazni test (HUT)

Temelji na sposobnosti razgradnje sečnine (uree) s pomočjo bakterijskega encima ureaze v amonijev ion in bikarbonat:



Med reakcijo pride do spremembe pH, kar zaznamo s pH indikatorjem. Hitrost reakcije je premosorazmerna koncentraciji HP v vzorcu in je lahko v nekaterih primerih zaradi majhnega števila bakterij rezultat tudi lažno negativen. Lažno pozitivne rezultate dobimo zelo redko, ker je HP edina bakterija, ki v tako veliki koncentraciji tvori ureazo. Segrevanje medija z vzorcem lahko pospeši reakcijo, ne vpliva pa na občutljivost in specifičnost. Skoraj vsi »CLO-testi« imajo občutljivost in specifičnost med 90 in 95%.

Zdravnik test opravi takoj ob gastrokopiji na odvzetem koščku želodčne sluznice (biopt). Pozitivni rezultat je potrditev okužbe.

Fazno kontrastni mikroskopski pregled svežega biopta

Bioptični vzorec brez barvanja lahko pregledamo s fazno kontrastnim mikroskopom.

Histološka preiskava biopta

To je metoda z visoko občutljivostjo. Zdravnik pri gastrokopiji odvzame vzorec na dveh različnih mestih. Te vzorce obarvamo s posebnimi barvili in jih pregledamo pod mikroskopom. Ta preiskava nam da še veliko drugih odgovorov, ne samo to, ali je prisotna okužba s HP.

Kultura

Ob histološki preiskavi in dihalnem testu je kultura ena od treh metod, ki jih imenujemo »zlati standard«. Odvzeti košček sluznice naneseemo na gojišče in v 3–14 dneh dobimo rezultat. Ta test je uporaben za ugotavljanje rezistence (zmanjšanja občutljivosti) bakterije na HP.

Reakcije verižne polimerizacije (PCR)

PCR je zelo občutljiva genetska metoda, ki jo lahko uporabimo tako za določanje bakterijske DNK kot tudi za ugotavljanje rezistence na antibiotike.

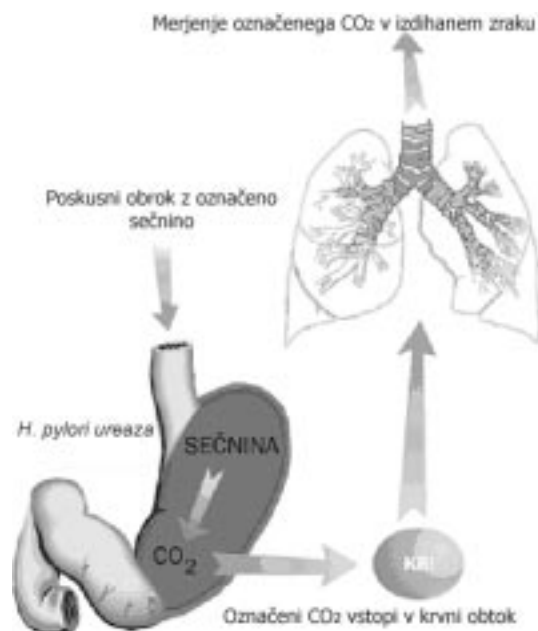
Serološke preiskave

Serološke preiskave so za bolnika nekoliko bolj prijazne, saj so prve v skupini neinvazivnih preiskav. Ker okužba s HP povzroči tvorbo protiteles, lahko po določenem času določimo koncentracijo teh protiteles v krvi, želodčnem soku, slini ali blatu. Določitev teh protiteles ni uporabna pri ugotavljanju uspešnosti terapije z antibiotiki.

Dihalni test z uporabo s ^{13}C označene sečnine (uree) (Dihalni test s sečnino – SDT)

Tako kot hitri ureazni test, ki ga zdravnik naredi ob gastrokopiji, tudi dihalni test temelji na isti reakciji. Uporaba principa dihalnega testa sta istočasno predlagala dva avtorja: Graham (4) in Marshall (5). Zelo hitro po prvih objavah je test zaradi enostavnosti, visoke občutljivosti in specifičnosti ter zanesljivosti v diagnostiki primarne okužbe prešel v široko uporabo. Danes, petnajst let po uvedbi v diagnostiko, še vedno ostaja nekaj nejasnosti v zvezi s ponovljivostjo, razvija pa se tehnologija in širijo se indikacije. Princip testa temelji na že predstavljeni reakciji sečnine in ureaze. S testom določamo celokupno encimsko aktivnost. Pri testu damo pacientu določeno količino sečnine, ki ima namesto ^{12}C v molekuli ^{13}C . Ko v želodcu ureaza, ki jo izloča HP, razgradi testno sečnino, se ^{13}C pojavi v bikarbonatnem anionu. Bikarbonatni anion se absorbira v kri in se kot CO_2 oziroma $^{13}\text{CO}_2$ izloči v izdihanem zraku. Če izmerimo razmerje $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ pred tem, ko bolniku damo označeno sečnino, in po tem, ko je bolnik popil označeno sečnino, bo to razmerje ob prisotnosti bakterije spremenjeno. Če je povečanje razmerja za več kot 4 %, je rezultat pozitiven. V zadnjem času se pojavljajo objave, kjer mejno vrednost postavljajo celo na 3 % oziroma 2,5 % (6). Izotop ^{13}C je povsem neškodljiv in je primeren tudi za uporabo pri otrocih, nosečnicah in doječih materah.

Princip dihalnega testa s sečnino je prikazan na sliki 4.



Sl. 4. Princip dihalnega testa s sečnino.

Figure 4. Urea breath test principle.

Dokazovanje HP v blatu

V zadnjem času se je pojavil tudi test, pri katerem dokazujemo HP v blatu. Princip določanja je dokazovanje specifičnega antigena, ki se pojavi v blatu po okužbi organizma s HP. S peroksidazo konjugirana poliklonalna anti HP protitelesa so nanesena na mikrotitersko ploščo in reagirajo s HP antigenom v razredčenem vzorcu blata. Pozitivni rezultat je definiran kot tisti, kjer je absorbanca večja ali enaka 0,160.

Občutljivost in specifičnost posameznih testov

Občutljivost in specifičnost testov, ki jih uporabljamo v diagnostiki okužbe s HP, lahko podajamo na dva načina. Prvi je t. i. »zlati standard« – oblikovan glede na rezultate testiranja z invazivnimi metodami (kultivacija, histološki pregled in urezni CLO test), drugi način pa je t. i. »empirični pristop«, ki je oblikovan glede na rezultate testiranja z vsemi metodami. Najpopolnejše podatke o uporabljenih testih lahko povzamemo po študiji, ki je bila objavljena leta 2001 v reviji *The American Journal of Gastroenterology* (7), in so prikazani v razpredelnici 2.

Razpr. 2. Občutljivost, specifičnost in napovedne vrednosti različnih testov za diagnostiko okužbe s *H. pylori*.

Table 2. Sensivity, specificity and positive predicting values (PPVs) of different tests for diagnosing *H. pylori* infection.

Metoda Method	Obč./Spec.* Sens./Spec.*	Obč./Spec.** Sens./Spec.**	PPV*/PPV*** PPV*/PPV***	NPV*/NPV*** NPV*/PPV***
Invazivne metode Invasive methods				
Kultivacija Culture	100/100	93,8/100	100/100	100/94,9
Histološki pregled Histology	95,6/100	93,8/98,2	100/97,8	96,4/94,8
CLO test CLO test	88,6/100	83,0/96,4	100/95,1	91,5/87,1
PCR PCR	93,2/96,2	91,5/96,4	95,3/95,6	94,3/92,9
Neinvazivne metode Noninvasive methods				
Dihalni test s sečnino Urea breath test	93,3/98,1	93,8/100	97,7/100	94,6/94,9
Serološki test Serology	95,6/92,6	95,8/94,6	91,5/93,9	96,2/96,4
Helicoblot Helicoblot	95,6/92,6	95,8/94,6	91,5/93,9	96,2/96,4
Test v blatu Stool test	88,9/94,4	89,6/92,9	90,9/93,5	90,7/91,2

* - zlati standard / gold standard

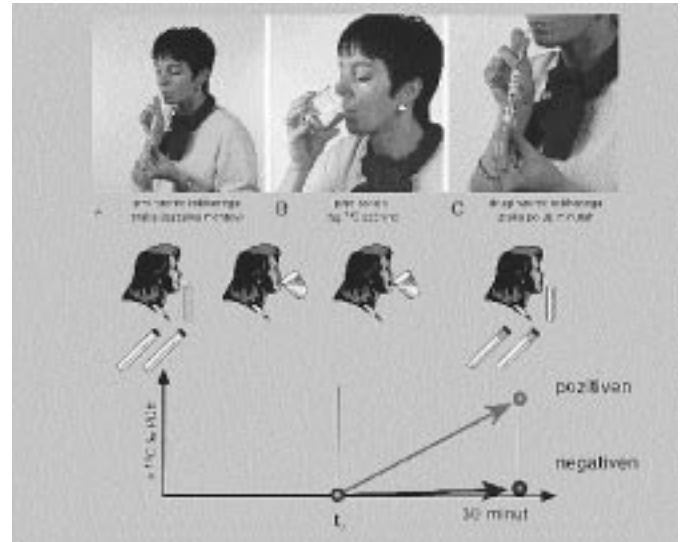
** - empirični pristop / empirical approach

Postopek izvedbe dihalnega testa

- Odvzem vzorcev za 0. (bazalno) meritev.** Pacient 2-krat pihne skozi slamico v zeleni epruveti (bazalno) toliko zraka, da se epruveta orosi. Epruveto takoj zamašimo.
- V tem času **izpolnimo formular** s pacientovimi podatki (oziroma dopolnimo).
- Bolnik nato popije testni obrok**, ki je sestavljen na bazi citronske kisline. Ker je v testnem kompletu že prisoten testni napitek, nam tega obroka ni treba posebej pripravljati.
- Zaužitje ¹³C sečnine** (pet minut po 0. - bazalnem - pihanju). Pacientu damo popiti raztopino sečnine (75 mg sečnine). Ob prvem požirku sprožimo štoparico.

- Odvzem naslednjih vzorcev:** Naslednji vzorec vzamemo po **30 minutah** (v določenih primerih lahko vzamemo tudi več vzorcev, vsakič izvedemo enak postopek).
- Epruvete pripravimo za **merjenje na aparatu**.

Postopek izvedbe dihalnega testa s sečnino je prikazan na sliki 5.



Sl. 5. Postopek izvedbe dihalnega testa s sečnino.

Figure 5. Urea breath test procedure.

Zaključki

Dokazovanje prisotnosti okužbe s *Helicobacter pylori* je pomembna sestavina pri obravnavi pacientov s peptično razjedo. Prav tako je priporočljivo, da se ugotovi prisotnost bakterije pri pacientih z dispepsijo. Če endoskopija ni indicirana iz ostalih razlogov, so za ugotavljanje prisotnosti okužbe s HP primerni neinvazivni diagnostični postopki. Do nedavnega so bili najbolj uporabljeni testi določanja protiteles v krvi. Zaradi določenih pomanjkljivosti teh testov se danes v večji meri priporočata dva testa, in sicer dihalni test s sečnino in določanje protiteles v blatu. Oba testa sta pokazala dovolj visoko občutljivost in specifičnost, da sta primerna za ugotavljanje prisotnosti okužbe. V državah Evropske unije se po priporočilih »Maastrichta 2« uporabljata oba testa, tako dihalni test s sečnino kot test antigena v blatu.

Kako pristopiti k zdravljenju okužbe s HP, je predmet že dalj časa trajajočih razprav. V zadnjih letih imamo na tem področju dve evropski priporočili, po katerih je treba diagnostiko okužbe s HP pričeti v ambulantni primarne ravni. Izbor diagnostičnih postopkov za odkrivanje okužbe s HP je odvisen od intenzitete simptomov in starosti bolnika. Evropska skupina predlaga različni protokol pri pacientih, starejših od 45 let, kot tudi pri tistih, ki imajo dominantno prisotne simptome gastroezofagealnega refluksa. V skupini pacientov pod 45 let, brez alarmantnih simptomov, lahko diagnostični postopek začne zdravnik na primarni ravni z enim od neinvazivnih diagnostičnih postopkov (v prvi vrsti je to dihalni test s sečnino ali pa dokazovanje protiteles v blatu). V primeru pozitivnega rezultata se priporoča eradikacijska terapija. To je t. i. pristop »test and treat«. Uspeh terapije prav tako kontroliramo z neinvazivnim testom. V primeru pacientov nad 45 let oziroma ob prisotnosti alarmantnih simptomov se pacient napoti k gastroenterologu. To je t. i. pristop »search and treat« (8).

Literatura

1. Marshall BJ. History of discovery of *C. pylori*. In: Blaser MJ ed. *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York: Igaku-Shoin, 1989: 7-24.
2. Riegg SJ, Dunn BE, Blaser MJ. Microbiology and pathogenesis of *Helicobacter pylori*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin J, Greenber HB, Guerront RL eds. *Infection in gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1995; 535-50.
3. Graham DY, Malaty H, Evans DG, Evans DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the US. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterol* 1991; 100: 1495-501.
4. Graham DY, Klein PD, Evans DJ. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1987; 1: 1174-7.
5. Marshall BJ, Surveyor I. Carbon-14 urea breath test for the diagnosis of *Campylobacter pylori* associated gastritis. *J Nucl Med* 1988; 29: 11-6.
6. Sheu BS, Lee SC, Yang HB. Lower-dose ¹³C-urea breath test to detect *Helicobacter pylori* infection - comparison between infrared spectrometer and mass spectrometry analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1359-63.
7. Monteiro L, Mascarel A, Sarrasqueta AM et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 353-8.
8. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morian C et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-80.