

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Možnost diagnostiky *Helicobacter pylori*
(bakalářská práce)

Hradec Králové 2010

Jana Fejová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

.....

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří svými cennými připomínkami, radami a odbornými materiály přispěli k vypracování této bakalářské práce. Zejména bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. a Ing. Petrovi Vaníkovi.

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
3. Historie	10
3.1. Epidemiologie	10
3.2. Morfologie a růstové vlastnosti	11
3.3. Faktory patogenity	12
3.4. Prozánětlivé působení	13
3.5. Léčba infekce	15
3.6. Rezistence na ATB	16
4. Laboratorní průkaz	17
4.1. Invazivní průkaz	17
3.1.1. Endoskopie	17
3.1.2. Rychlý ureázový test	17
3.1.3. Kultivace	18
3.1.4. Molekulární techniky	19
3.1.5. Histologie	20
3.2. Neinvazivní průkaz	21
3.2.3. Dechové testy	21
3.2.4. Přímý průkaz antigenu	22
3.2.5. Sérologické testy	22
4. Experimentální část	24
4.1. Eia Helicobacter MONO IgG	25
4.1.3. Princip testu	25
4.1.4. Složení soupravy	25
4.1.5. Pracovní postup	26
4.1.6. Interpretace výsledků	27
4.2. Amplified IDEA™ Hp Star	28
4.2.3. Princip testu	28
4.2.4. Složení soupravy	29
4.2.5. Pracovní postup	29
4.2.6. Interpretace výsledků	31

4.3. Anti Helicobacter pylori CagA ELISA gig	31
4.3.3. Princip testu	31
4.3.4. Složení soupravy	32
4.3.5. Pracovní postup	32
4.3.6. Interpretace výsledků	33
4.4. Westernblot Helicobacter pylori IgG	34
4.4.3. Princip testu	34
4.4.4. Složení soupravy	35
4.4.5. Pracovní postup	35
4.4.6. Interpretace výsledků	36
5. Výsledky	36
6. Diskuse	39
7. Závěr	40
8. Literatura	41
9. Přílohy	43
9.1. Seznam grafů	43
9.2. Seznam tabulek	43
9.3. Seznam obrázků	43

Souhrn

Jana Fejová

Možnost diagnostiky *Helicobacter pylori*

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalytika

Cíl práce

V této práci jsem se pokusila shrnout poznatky o mikroorganismu *Helicobacter pylori*, možnosti diagnostiky infekce této bakterie a její eradikace. První část obsahuje základní charakteristiku *H.pylori*, historii jejího objevu, základní morfologické znaky, antigenní struktury a možnosti léčby. V dalších částech jsou shrnuty dostupné diagnostické postupy infekce *H.pylori* a jejich praktické využití v klinické laboratoři.

Metody

Ke stanovení IgG protilátek jsem použila metodu Eia MONO IgG, ke stanovení protilátek IgG proti CagA metodu ELISA IgG a k detekci specifických protilátek IgG proti separovaným antigenům *H.pylori* metodu Westernblot.

Výsledky

Bylo vyšetřeno 12 pacientů s přetrvávajícími zažívacími potížemi, bez specifických příznaků infekce *H.pylori*. U 5 pacientů byla zvýšena hladina protilátek třídy IgG což velmi dobře koresponduje s nálezem pozitivních zón získaných metodou Westernblot, u jednoho pacienta byli pozitivní protilátky třídy IgG proti CagA *H.pylori* a u jednoho pacienta byla zvýšena také hladina protilátek proti CagA antigenu, opět potvrzeno nálezem odpovídající pozitivní zóny Westernblotu.

Závěr

Cílem této práce bylo shrnout poznatky o *H.pylori*, poukázat na možnosti diagnostiky této infekce, porovnat výhody a nevýhody používaných diagnostických metod při praktickém provedení v laboratoři.

Abstract

Jana Fejová

Possibility of diagnoses *Helicobacter pylori*

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Medical bioanalysis

Background

In this work I tried to summarize knowledge about the microorganism - *Helicobacter pylori* (further only *H.pylori*), possibilities of diagnostics of infection and eradication of this bacteria. The first part contains general characteristics of *H. pylori*, history of its discovery, basic morphological marks, antigen structures and therapy options. In further parts available diagnostic processes of *H. pylori* infection are summarized and its practical use in clinical laboratory.

Methods

To determine the IgG antibodies used MONO IgG EIA method, the determination of IgG antibodies to CagA IgG ELISA method and to detect specific IgG antibodies against *H.pylori* antigens separated Western blot method.

Results

I examined 12 patients with persistent digestive problems, without any specific symptoms of *H.pylori* infection. In 5 patients had increased levels of IgG antibodies which very well corresponds with results obtained using the positive zones Western blot, one patient was positive for antibodies of IgG anti-*H.pylori* CagA and one patient was also increased levels of antibodies against CagA antigen, again confirmed by finding the corresponding Western blot positive zone.

Conclusion

The aim of this study was to summarize findings about *H.pylori*, noted the possibility of diagnosing this infection, to compare the advantages and disadvantages of diagnostic methods used in the practical implementation in the laboratory.

Seznam zkratek

AP1	activator protein 1
ATB	antibiotika
ATP	adenosintrifosfát
cag A	cytotoxicity associated gene A
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme–linked immunosorbent assay
HpSA	<i>Helicobacter pylori</i> stool antigen
iceA	induce by contactwith epithelium
Ig	imunoglobulin
IL-8	interleukin 8
IRUT	immunological rapid urease test
MAPK	mitogen activating fhosphokinase
NFκB	nuclear factor κB
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain-1
PCR	polymerase chain reaction
RICK	receptor-interacting serine-threonine kinase
T4SS	Type 4 secretion system
TLR4	toll-like receptor 4
TMB	tetrametylbenzidin
vacA	vacuolize enzyme gene of <i>Helicobacter pylori</i>

1.Úvod

Infekce *H.pylori* je celosvětově jednou z nejrozšířenějších nákaz a je příčinou řady závažných onemocnění jako je např. dyspepsie. Objev infekce *H.pylori* byl převratný a k jeho definitivnímu uznání bylo potřeba několik let. Většina pacientů s dyspepsií vyhledává pomoc u praktických lékařů, kteří pak podle klinické situace pacienta volí další postup, včetně odeslání ke specialistům gastroenterologům. Praktičtí lékaři mohou indikovat sérologické vyšetření *H.pylori* metodou ELISA, gastroenterologové provádějí endoskopické vyšetření a odběr bioptického materiálu k diagnostice *H.pylori*. Výběr testu k detekci závisí na klinické situaci pacienta. V laboratoři se k diagnostice *H.pylori* používá základní screening celkových protilátek nebo vyhledávání patologických kmenů této bakterie.

2. Teoretická část

2.1. Historie

V roce 1983 vykultivovali Warren a Marschall tuto bakterii z odebraného materiálu ze žaludeční sliznice od nemocného s chronickou gastritidou.

Původně navržený název *Campylobacter pyloridis* byl postupně zpřesněn na nynější název *Helicobacter pylori* (Bednář et al., 1996).

2.2. Epidemiologie

H.pylori je hlavní příčinou chronické gastritidy a významnou roli hraje i u většiny nemocných s vředovou chorobou, rakovinou žaludku a s žaludečními lymfomy (Izrael, Peek, 2001). Infekce může předcházet rozvoji dyspepsie a je spojována s různými gastrointestinálními příznaky u lidí bez historie vředové choroby (Rosenstock et al., 1997). Infekce *H.pylori* je pravděpodobně jednou z nejčastějších bakteriálních infekcí, které postihují lidstvo (Kopáčová et al. 2002). V České republice v posledních 15 letech prevalence infekce *H. pylori* dramaticky poklesla (ze 70 % v roce 1993 na 35 % v roce 2006). Tento pokles je možno vysvětlit především relativně příznivými a zlepšujícími se socio-ekonomickými podmínkami po pádu komunistického režimu (Bureš et al., 2008).

Prevalence infekce *H. pylori* v populaci roste s věkem, což je vysvětlováno infekcí u vyšších věkových skupin, získanou za horších sociálních podmínek v dětství. K infekci dochází s největší pravděpodobností již před 5. rokem života. Byl zjištěn již v novorozeneckém a kojeneckém období života. Výskyt postupně stoupá s věkem během celého dětství. U dětí v rozvojových zemích mezi 2. až 8. rokem života je roční nárůst infekce asi 10 %, zatímco údaje ze Severní Ameriky ukazují pouze nárůst 1 % za rok. Protože infekce je získána typicky u dětí a je celoživotní, u velké části starších lidí (nad 60 let) je výskyt patologických změn pravděpodobně dlouhodobým důsledkem infekce v dětství, kdy životní standard byl na významně nižší úrovni. Prevalence v rozvinutých zemích se liší významně v závislosti

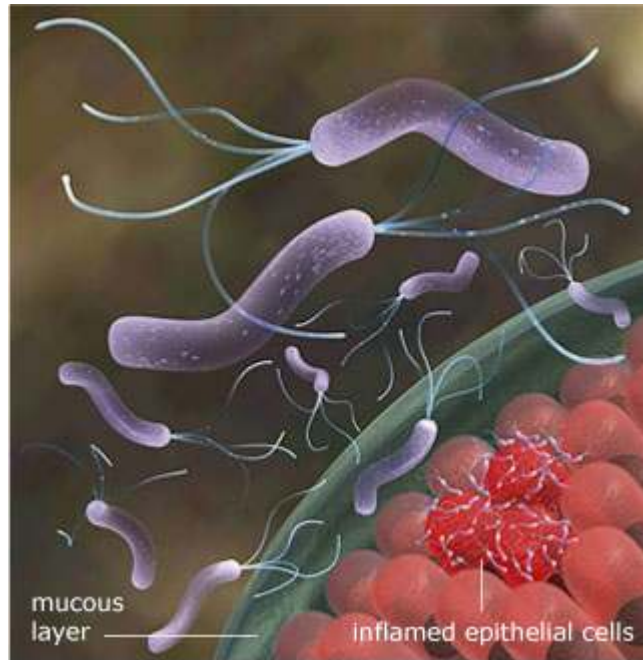
na etnickém původu a věku. Ve studiích z Německa a Švýcarska byli domácí žáci infikováni méně často než žáci cizího původu. Spontánní vymizení infekce *H. pylori* ze žaludeční sliznice je velmi vzácné, bylo pozorováno hlavně u kojenců a batolat. *H. pylori* infekce u dospělých je chronická a nevymizí bez specifické terapie. V posledních desetiletích byl zaznamenán dramatický pokles výskytu *H. pylori* v západních průmyslově vyspělých společnostech (Severní Amerika, Evropa, Japonsko). Tento pokles je nápadnější u dětí než u dospělých. Trend poklesu výskytu infekce *H. pylori* odpovídá současnému trendu snížení výskytu závažných chorob vyvolaných *H. pylori* (žaludeční rakovina, duodenální vředy). Hlavními důvody jsou pravděpodobně obecné zlepšování socioekonomických podmínek, hygienického standardu jako prevence přenosu buď přímo eliminací organismu z prostředí, nebo nepřímo prevencí průjmových onemocnění (Sýkora, 2006).

Někteří lidé mohou získat infekci i v dospělosti. Způsob přenosu není plně objasněn, pravděpodobnější je přenos z osoby na osobu oro-orální nebo feko-orální cestou. Reinfekce po eradikaci je u dospělých spíše vzácná (Krejsek a Kopecký, 2004). *H. pylori* byl prokázán celosvětově ve všech věkových kategoriích.

2.3. Morfologie a růstové vlastnosti

Mikroskopický obraz je výrazný. V žaludku má tvar zahnutých tyček nebo písmene S, dlouhých až 3 μm , tyčky jsou umístěny zejména v hlenu (Bednář et al., 1996). Je striktně mikroaerofilní a k růstu potřebuje CO_2 . Na rozdíl od kampylobakterů, které mají jeden holý bičík, *H. pylori* má trs polárních bičíků chráněných pochvou (Greenwood et al., 1999). Bičíky jsou na konci paličkovitě rozšířené (Bednář et al., 1996). *H. pylori* je zakřivená gram-negativní obarvená tyčinka. Je biochemicky nepříliš aktivní. Jeho unikátní schopnost přežít a množit se v žaludeční sliznici je dána vysokou tvorbou ureázy (Krejsek a Kopecký, 2004).

H. pylori roste v mikroaerobní atmosféře, neroste ani na vzduchu, ani v anaerobním prostředí, růstová teplota se pohybuje mezi 25-42 °C, v rozmezí pH 6,9 - 8,5 (Sedláčková, 1996).



Obrázek 1. – *Helicobacter pylori*
(www.science.org.au/nobel/2005/images/invasion.jpg).

2.4. Faktory patogenity

Patogenitou se obecně rozumí schopnost druhu vyvolat onemocnění. Této definici *H.pylori* vyhovuje. Jeho přítomnost je vždy spojena s chronickou aktivní gastritidou a eradikace mikroba je následována zhojením (Sedláčková, 1996).

H.pylori je patogenní pouze pro člověka. Je prokazován takřka ve 100% u nemocných s vředovou chorobou (Bednář *et al.*, 1996).

Jednotlivé kmeny *H.pylori* se mohou od sebe výrazně odlišovat ve svém genetickém základu a následně i v biologických vlastnostech. Kmeny *H.pylori*, které nezpůsobují závažnější poškození žaludeční sliznice, jsou označovány jako typ II. Kmeny *H.pylori* s výrazným patogenetickým potenciálem se označují jako typ I.

Jako jeden z prvních faktorů patogenity *H.pylori* byl identifikován protein Cag A, kodovaný genem *cag A* (Krejsek a Kopecký, 2004).

Cag protein je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem virulence (Mutaz *et al.* 2010). Kmeny *H.pylori*, které exprimují protein Cag A, jsou spojeny s vyšší mírou poškození žaludeční sliznice a jsou přednostně izolovány od osob s duodenálními

nebo žaludečními vředy. Jejich účinkem je sliznice žaludku poškozována ve zvýšené míře, protože protilátky proti proteinu Cag A jsou výrazně častěji nalézány u nemocných s atrofickou gastritidou a adenokarcinomem žaludku. Kmeny *H.pylori*, které nesou gen Cag A, velmi často koexprimují také gen vac A, kódující toxin schopný indukovat vakuolizaci epitelových buněk žaludku.

Až nečekaně vysoká schopnost *H. pylori*, který neinvaduje do slizniční vrstvy, indukovat mohutnou zánětovou odpověď, je pravděpodobně spojen s funkcí proteinů, které jsou rovněž kódovány z ostrovů patogenity. Jedná se o geny označované jako pic A a B, které se nacházejí poblíž genu cag A. Prostřednictvím těchto genů, ale jistě i dalšími faktory, je virulentními kmeny *H. pylori* indukován zánět žaludeční sliznice, ve kterém nakonec mohou dominovat poškozující prvky (Krejsek a Kopecký, 2004).

Schopnost *H.pylori* produkovat ureázu a štěpením močoviny za vzniku amoniaku zvyšovat pH zajišťuje bakterii rezistenci proti kyselému pH. Bylo prokázáno, že mutanty *H. pylori*, které neprodukují ureázu, jsou nevirulentní.

Ureáza je produkována ve vysoké koncentraci, enzym se uvolňuje do prostředí z povrchu bakterie a ureáza je při nízkém pH prostředí aktivní. Vyšší pH prostředí snižuje produkci ureázy, jinak by příliš vysoké pH bakterii samo usmrtilo a enzym by fungoval jako enzym sebevražedný (Sedláčková, 1996).

H. pylori dále produkuje enzymy s proteolytickými aktivitami. Za prokázanou se má schopnost tvořit fosfolipázu A a C. Tyto enzymy mohou narušovat projektivní slizniční bariéry a podílet se na rozvoji chronické gastritidy (Krejsek a Kopecký, 2004).

2.5. Prozánětlivé působení

H. pylori svými faktory virulence podněcuje zánětlivou odpověď na žaludeční stěně.

Jedna z cest působení bakterie je přes sekreční systém vytvořený geny cag-PAI. Vytvořený kanál T4SS umožňuje přenést protein Cag A přes membránu epitelové buňky žaludku. Po jeho fosforylaci se následně aktivuje kaskáda MAP-

kináz vedoucí k aktivaci NFκB a AP1 (aktivator protein 1), což vede k produkci prozánětlivých faktorů. Stejně tak může přes T4SS projít i proteoglykan stěny gramnegativní bakterie, který cestou NOD1 a RICK aktivuje rovněž NFκB a tím i produkci cytosinů a dalších zánětlivých mediátorů.

H. pylori ovšem může svým lipopolysacharidem působit i skrze TLR4, čímž rovněž přes NFκB podněcuje zánětlivou reakci (*web wikipedia*).

Kolonizace žaludeční sliznice *H. pylori*, která vede k indukci tvorby chemokinů, způsobí, že se IL-8 a další chemokiny poutají na glykosaminoglykanové struktury žaludeční sliznice a vytvářejí tak gradient chemoatraktivních látek, které zajistí cílenou migraci neutrofilů do postižené oblasti žaludečního epitelu.

Indukce cytokinů v epitelových buňkách žaludeční sliznice je podstatně vyšší účinkem kmenů *H. pylori*, které jsou Cag A pozitivní v porovnání s Cag A negativními kmeny.

Infekce *H. pylori* vede k indukci protilátek namířených proti molekulám, které se nacházejí na neinfikované žaludeční sliznici. Lipopolysacharid *H. pylori* obsahuje krevně skupinové cukerné antigeny Lewis X a Lewis Y. Cestou molekulových mimikrů je rozvíjena autoimunitní reaktivita u osob s infekcí *H. pylori*. Navíc se ukazuje, že antigeny Lewis S a Lewis Y jsou vyjádřeny na membránové H⁺,K⁺ ATPázové pumpě, která je prokazatelně terčem autoimunitní imunopatologické reaktivity u nemocných s autoimunitní atrofickou gastritidou, která u některých nemocných lidí ústí v perniciozní anemii.

Infekce *H. pylori* je zřetelným příkladem infekce úspěšným bakteriálním patogenem. Přesto, že *H. pylori* obsahuje nebo produkuje mnoho silně imunogenních molekul, je imunitní odpověď namířená k jeho eradikaci u většiny infikovaných osob málo účinná či dokonce neúčinná. Dokonce je možno říci, že zánětová reakce, která má *H. pylori* eradikovat z povrchu žaludeční sliznice, představuje pravděpodobně pro hostitele významnějšího poškozujícího činitele, než je vlastní patogenetické působení *H. pylori*. Na rozvoji poškozujícího zánětu ve sliznici žaludeční sliznice indukované infekcí *H. pylori* se významně podílí specifická buněčná imunita (*Krejsek a Kopecký, 2004*).

2.6. Léčba infekce

Úspěšnost eradikace je závislá na více vlivech, mezi které patří složení a délka léčby, spolupráce pacienta a resistance na antibiotika. Zlatým standardem léčby je v současnosti trojkombinace, podávaná po dobu sedmi dnů, zahrnující dvě antibiotika a antisekretorikum. U infikovaných pacientů je nejúčinnější *klaritromycin*, což vede k vymýcení přibližně 40% onemocnění, pokud je podáván dvakrát denně po dobu 10 až 14dnů (*Johannes et al., 2006*).

Z antibiotik se používá *amoxycillin*, *makrolidy* (*klaritromycin*, *roxitromycin*, *azitromycin*), *nitroimidazol* a *tetracyklin*. Jako antisekretorikum je u nás používán do kombinace inhibitor protonové pumpy (PPI) ve standardní dávce (*Omeprazol* 2x20mg, *Lansoprazol* 2x30mg). Alternativou je *Ranitidin-bismut-citrát*, ale u nás není pro praxi dostupný (*Seifert, 2001*).

Užívání těchto léků má za následek účinných terapií proti *H. pylori*, v souladu s mírou eradikace více než 80%. Různé trvání léčby, dávky a kombinace léků byly studovány, ale žádné nedosáhly úrovně vyšší než 90 až 95%. Selhání jsou zejména ve vztahu k nedostatečnému dodržování léčby, často v důsledku vedlejších účinků, a na přítomnost antimikrobiální resistance (*Johannes et al., 2006*).

Pacienti by měli od svých praktických lékařů dostat plnou informaci o indikovaných lécích, očekávání jejich efektu a o případných nežádoucích účincích. Ty se mohou projevit nejčastěji gastrointestinálními příznaky nebo alergickými reakcemi (*Seifert, 2001*).

2.7. Resistance na antibiotika

H. pylori se může stát resistantním na běžně užívaná antibiotika. Informace o resistenci *H. pylori* na ATB je třeba aktivně sledovat.

Stupeň resistance na *metronidazol* v České republice se udává 20-30%, v okolních zemích až 40%. Pokud resistance na *metronidazol* převýší 25%, pak je lépe se jeho použití v eradikační léčbě vyhnout.

Průměrná resistance na *klaritromycin* je ve většině zemí Evropy okolo 5%, poněkud vyšší v Belgii a Francii (12%). V České republice již přesahuje podle posledních údajů 4%. Resistance na *amoxycilin* je vzácná.

Součástí eradikačních schémat pro 2. volbu je tetracyklin. Další antimikrobiální látky se testují (Seifert, 2001).

3. Laboratorní průkaz

Diagnostické postupy k průkazu infekce *H.pylori* je možné rozdělit na invazivní, při kterých je nutné získat vzorek žaludeční sliznice a neinvazivní, prováděné ze séra nebo stolice pacienta.

3.1. Invazivní průkaz

3.1.1 ENDOSKOPIE

Diagnostický průkaz se provádí z bioptického vzorku žaludeční sliznice, která byla odebrána nemocnému v průběhu gastroduodenoskopického vyšetření (*Krejsek, Kopecký, 2004*).

Vzorky sliznice se odebírají k histologickému a mikrobiologickému vyšetření. Vícečetné biopsie zaručují větší záchytnost zánětu i bakterií k dosažení optimálních diagnostických výsledků. Obecně se doporučuje aby byli použity nejméně dva odlišné testy z vícečetných biopsií, které by optimalizovaly diagnostické výsledky (*Sedláčková, 1996*).

3.1.2. RYCHLÝ UREÁZOVÝ TEST

Rychlý ureázový test je nejběžnější metoda k průkazu *H. pylori*.

Principem rychlého ureázového testu je změna zabarvení acidobazického indikátoru, která provází rozklad močoviny na amoniak a oxid uhličitý při přítomnosti bakteriální ureázy ve vyšetřovaném vzorku žaludeční sliznice. Sama žaludeční sliznice žádnou ureázu neprodukuje, takže pozitivita testu u pacienta jasně ukazuje na infekci ureáza-pozitivními bakteriemi. *H. pylori* uvolňuje ureázu ze svého povrchu ve velkém množství, neboť mu zvýšením pH v jeho okolí umožňuje přežití v kyselém žaludečním prostředí. Tento enzym hydrolyzuje v žaludku přítomnou močovinu na amoniak a amid kyseliny uhličitě, který se znovu rozkládá na amoniak a kyselinu uhličitou. Ve vodném prostředí vzniká z amoniaku hydroxid amonný, který způsobí zvýšení pH.



Obrázek 2. - ureázové testy
(<http://www.mona.php5.cz/metody1.html>).

Komerčně vyráběné ureázové testy obsahují substrát (močovinu) a acidobazický indikátor (např. fenolovou červeň) a mívají formu gelu, do kterého se vzorek zatlačí, nebo jsou to zkumavky s médiem. Přítomnost *H. pylori* se pak při vyšetření biopticky odebraného vzorku žaludeční sliznice tímto testem projeví změnou barvy indikátoru.

Tento finančně nenákladný test je velmi jednoduchý a výsledek lze hodnotit i bez konzultace s mikrobiologem. Při husté kolonizaci sliznice se pozitivita testu projeví během několika málo minut, standardně se odečítá po 2 hodinách. To umožňuje celkové zkrácení času potřebného pro stanovení správné diagnózy a tím i rychlé zahájení účinné terapie.

Variantou tohoto testu se v poslední době stává imunologický rychlý ureázový test (iRUT), který využívá specifických protilátek proti ureáze *H. pylori* a eliminuje tak možnost zkřížené reaktivity s jinými ureáza-pozitivními bakteriemi při zachování rychlosti a přesnosti původního testu (*web mona*).

3.1.3 KULTIVACE

Kultivace se řadí mezi nejpřesnější způsoby vyšetření přítomnosti *H. pylori*, které umožňuje i podrobnější stanovení infikujícího kmene. Provádějí ho pouze některé laboratoře a kvůli své náročnosti a finančním nákladům rozhodně nepatří k rutinním vyšetřením.

H. pylori je kultivačně velmi náročná bakterie, která vyžaduje mikroaerofilní prostředí ve směsi 5% O₂, 10% CO₂ a 85% N₂ (*web mona*).

Pro kultivaci se osvědčili bohaté kultivační půdy se základem Columbia agar, Brucella agar, Oxoid agar č. 2 a Muller – Hintonův agar (*Sedláčková, 1996*).

Jejich základem je agar obohacený koňskou nebo beraní krví a koňským nebo telecím sérem. Do agaru se přidávají komerčně připravené růstové faktory, směs antibiotik, které potlačují růst jiných bakterií a *amfotericin B* proti kontaminaci plísněmi (*web mona*). Inkubace se provádí při 37 °C po dobu 4-7 dnů. Po inkubaci se vytvoří na povrchu kultivačních půd drobné šedavé lesklé kolonie o průměru asi 1-2 mm. U některých kmenů jsou kolonie obklopeny úzkou zónou hemolýzy. U nemocných s klinickými obtížemi roste *H. pylori* většinou masivně a na selektivních půdách v čistých kulturách (*Sedláčková, 1996*).

3.1.4 MOLEKULÁRNÍ TECHNIKY

Pro průkaz přítomnosti nukleových kyselin *H.pylori* se nejčastěji využívá polymerázová řetězová reakce (PCR), která byla vyvinuta v roce 1983.

PCR prokazuje cílový fragment deoxyribonukleové kyseliny po jeho namnožení (amplifikaci), které je zahájeno přidáním specifického primeru (*Sedláčková, 1996*). Použití v oblasti *H. pylori* se týká nejen detekce bakterie, ale také jeho kvantifikace a detekce specifických genů (*Mégraud, 2007*).

Vlastní reakční cyklus probíhá v cykléru v amplifikačních zkumavkách, které se naplní roztokem obsahujícím DNA izolovanou ze vzorku a reakční směsí. Reakční směs obsahuje vhodně zvolené primery, deoxynukleotidtrifosfáty, termostabilní DNA–dependentní DNA–polymerázu (např. Taq DNA polymerázu izolovanou z bakterie *Thermus aquaticus*) a pufr s obsahem hořčnatých iontů. Jako cílové fragmenty pro amplifikaci se využívají cca 20–100 bází dlouhé sekvence DNA, které jsou druhově nebo rodově specifické a mají nízkou pravděpodobnost vzniku bodových mutací. V případě *H. pylori* jde nejčastěji o sekvence DNA kódující geny

pro tvorbu ureázy, gen *cag A*, *vac A* nebo *ice A*. Specifické primery, které jsou při metodě PCR použity, jsou komplementární k oběma antiparalelním vláknům DNA, ale neměly by být komplementární k sobě navzájem.

PCR probíhá ve třech časově a teplotně odlišných fázích. Jednotlivé fáze jsou iniciovány pouze změnou teploty a doba jejich trvání je závislá na délce amplifikovaných úseků DNA. Po jednom cyklu PCR dá původní dvouřetězcová vznik dvěma amplikonům, z nichž každý má jedno vlákno původní DNA a jedno nově syntetizované. Počet amplikonů exponenciálně roste a přibližně po 30 cyklech (tj. při teoretickém počtu amplikonů 2^{30}) je koncentrace hledaného fragmentu dostatečná, aby mohl být spolehlivě detekován buď elektroforeticky nebo pomocí hybridizačních sond.

Metodou PCR lze spolehlivě prokázat přítomnost *H. pylori* nejen ve vzorcích žaludeční sliznice odebraných při biopsii, ale i v jiném biologickém materiálu (např. ve slinách nebo stolici). Je možné ji aplikovat i pro identifikaci této bakterie v zevním prostředí, které obsahuje i mnoho jiných mikroorganismů. Pro metodu PCR je postačující množství templátové DNA mezi 1 a 500 ng a je proto možné ji použít i když je vzorku genetického materiálu málo (*web mona*).

3.1.5. HISTOLOGIE

Při endoskopickém vyšetření žaludku je možno odebrat kartáčkem vzorek setřením hlenové vrstvy, která pokrývá sliznici. Hlen se rozetře na podložní sklo a po zaschnutí a fixaci se barví. Podle cíle vyšetření jsou různé metody barvení preparátů. K diagnostice zánětu je to rutinní barvení hematoxylin – eozin. K identifikaci bakterií *H.pylori* se obvykle používají barvení Warthin – Starry (stříbření) a barvení podle Giemsa, která jsou více sensitivní a specifická než obvyklé barvení preparátů hematoxylin – eosin (*Sedláčková, 1996*).

3.2. Neinvazivní průkaz

Neinvazivní testy se nejčastěji indikují v následujících dvou situacích:

1. Průkaz infekce *H.pylori* u pacientů mladších než 45 let a dyspepsií horního typu při absenci tzv. alarmujících příznaků (anémie, váhový úbytek), přičemž se předpokládá, že při pozitivním nálezů bude následovat eradikace infekce.
2. K ověření úspěšné eradikací léčby, není-li indikováno kontrolní endoskopické vyšetření (*Alušíková et al., 2010*).

3.2.1. DECHOVÉ TESTY

Dechový test je jednoduchý a bezpečný test sloužící ke zjišťování aktivní infekce *H. pylori* (*web clevelandclinig*).

Dechový test s močovinou značenou uhlíkem ^{13}C je dnes považován za zlatý standard průkazu infekce způsobené *H. pylori*. Princip testu je založen na detekci značeného oxidu uhličitého, jenž vzniká štěpením substrátu enzymem ureázou, která je jako povrchový protein produkována bakterií *H. pylori*. Metoda testu byla popsána již v roce 1987 a existuje řada modifikací, které se liší především v množství podávaného substrátu (50-100 mg), v podání roztoku kyseliny citrónové nebo přírodního pomerančového džusu a v časovém intervalu odběru vzorků vydechovaného vzduchu. Pacient musí být pro provedení testu na lačno (nejméně 2 hodiny nesmí jíst, pít a kouřit). Odebírají se dva nebo tři vzorky vydechovaného vzduchu do zkumavky. Následuje vypití 200 ml roztoku kyseliny citrónové nebo přírodního, neslazeného pomerančového džusu a po 5 - 10 minutách je podáno 100 mg močoviny značené atomem uhlíku ^{13}C (dětem je podáváno poloviční množství). Přesně po 30 minutách jsou odebrány dva nebo tři vzorky vydechovaného vzduchu do zkumavek stejným způsobem jako na začátku testu. Pro hodnocení testu je stanoveno kritérium změny poměru $^{13}\text{CO}_2$: $^{12}\text{CO}_2$ větší než 5 promile mezi vzorkem v čase T_{30} oproti vzorku T_0 . Na výsledek testu má vliv motilita a anatomie žaludku, porušené vyprazdňování, léčba inhibitory protonové pumpy, antibiotiky nebo preparáty vizmutu. Doporučeno je proto provádět dechový test 4-6 týdnů po ukončení eradikační terapie (*web dialab*).

3.2.2 PŘÍMÝ PRUKAZ ANTIGENU

HpSA je somatický antigen, který se nachází ve stolici osob infikovaných *H. pylori* a opět vymizí do 4 týdnů po ukončení úspěšné eradikace. Principem testů pro jeho průkaz je reakce tohoto antigenu s polyklonálními nebo monoklonálními protilátkami. Vzniklý komplex antigen–protilátka lze detekovat některou z imunologických metod, např. metodou ELISA nebo imunochromatografickým testem. Tento způsob diagnostiky infekce *H. pylori* je nenáročný na přístrojové vybavení, při použití imunochromatografického testu je evaluace možná bez laboratorní techniky během několika minut přímo v ordinaci, výsledky metody ELISA lze vyhodnotit fotometricky (*web mona*).

3.2.3. SÉROLOGICKÉ METODY

Žaludeční sliznice člověka reaguje na kolonizaci *H. pylori* většinou zánětem, který je provázen lokální i systémovou imunitní reakcí spojenou s tvorbou specifických protilátek IgG, IgA a IgM. Samotná imunitní reakce sice k eliminaci této bakterie nestačí, ale lze ji využít k rozpoznání infekce v případech, kdy je kontraindikováno invazivní vyšetření. Sérologické metody jsou tedy založeny na detekci specifických protilátek proti *H. pylori* v séru pacienta.

Výsledky sérologických testů je nutno vždy interpretovat v souladu s ostatními vyšetřeními, symptomy onemocnění a klinickým nálezem. Protilátky proti *H. pylori* mohou být přítomny v séru pacienta i několik měsíců nebo let po úspěšné farmakoterapii, pozitivní výsledek tohoto testu nemusí tedy vždy indikovat akutní infekci gastrointestinálního traktu. Negativní výsledek znamená, že v séru není detekovatelné množství protilátek a k tomu může dojít také v časně fázi onemocnění, u imunokompromitovaných pacientů, dětí nebo starých lidí.

Pro toto vyšetření se asepticky odebere vzorek venózní krve a sérum se připravuje běžnou laboratorní technikou. Před odběrem není nutné lačnění pacienta, ale silně lipemická séra mohou vést k chybnému výsledku. Příčinou nejednoznačných výsledků sérologického vyšetření může být rovněž hemolyzované nebo mikrobiálně kontaminované sérum a často nedodržení pracovního postupu.

V sérologických testech pro diagnostiku infekce *H. pylori* se obvykle vyšetřují protilátky třídy IgG. Protilátky třídy IgM mohou být detekovatelné v časných stádiích aktivní infekce. Hladiny protilátek IgG a IgA stoupají v průběhu infekce a pokud není eradikována, zůstávají vysoké. Po úspěšné eradikaci hladiny obou těchto tříd protilátek klesají na poloviční hodnoty, svého maxima z doby akutní infekce se ale dostávají až cca po půl roce od ukončení farmakoterapie. Specifické protilátky proti *H. pylori* jsou detekovatelné i v moči a slinách pacienta.

Nejčastější metodou pro stanovení protilátek proti *H. pylori* v séru pacienta je metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Jedná se o nekompetitivní imunochemickou metodu, která má obvykle „sendvičové uspořádání“. Vhodný antigen *H. pylori* je zakotven na pevné fázi, např. plastické mikrotitrační destičce. Po inkubaci a odstranění nenavázaného antigenu promytím, se přidává vyšetřované naředěné sérum. Vzniklý komplex je potom detekován sekundárním enzymem značenou protilátkou proti lidskému imunoglobulinu a výsledek se hodnotí denzitometricky. Touto metodou lze detekovat i velmi malá množství protilátek ve vzorku (*web mona*).



Obrázek 3. – mikrotitrační destička
(<http://www.mona.php5.cz/metody1.html>).

Další metodou, která využívá schopnosti mnoha typů antigenů vázat se na erythrocyty či jiné inertní částice a vytvářet tak stabilní reagens pro stanovení specifických protilátek je HEMAGLUTINAČNÍ TEST a LATEXOVÁ AGLUTINACE. Tyto metody jsou využívány k rychlému a technicky nenáročnému screeningu přítomnosti infekce *H.pylori*.

Metoda WESTERN BLOTTING slouží především k analýze protilátkové specifity na molekulární úrovni. Jedná se o přenos elektroforézou separovaných

bakteriálních antigenů na nitrocelulózovou membránu. Specifické protilátky, které se naváží na tyto elektroforeticky přenesené antigeny, jsou pak detekovány ELISA systémem.

4. Experimentální část

Experimentální část práce se zabývá laboratorní diagnostikou *H.pylori* neinvazivními metodami - průkazem protilátek IgG, stanovením antigenu ve stolici, průkazem protilátek CagA IgG a detekcí specifických protilátek IgG proti separovaným antigenům *H.pylori*.

Standartní vyšetřovací postup na OKB v Rychnově nad Kněžnou je stanovení hladin protilátek proti *H.pylori* IgG a IgA ELISA metodami a v případě positivity jednoho z parametrů je u vzorku sledována přítomnost protilátek proti CagA antigenu. Pro zhodnocení diagnostického postupu infekce *H.pylori* jsem vybrala vzorky 12 pacientů, kteří vyhledali praktického lékaře nebo gastroenterologa s přetrvávajícími zažívacími obtížemi. U vzorků jsem provedla stanovení protilátek třídy IgG proti *H.pylori* metodou EIA Helicobacter MONO IgG, stanovení protilátek CagA IgG metodou Anti-*Helicobacter pylori* CagA ELISA IgG, a vyšetření specifických protilátek IgG proti CagA metodou Westernblot. Stanovení antigenu *H.pylori* ve stolici nebylo provedeno vzhledem k obtížnému shánění vzorků od pacientů.

4.1. EIA Helicobacter MONO IgG (Test – line Clinical Diagnostics)

Imunoenzymatická souprava pro stanovení IgG protilátek proti *Helicobacter pylori* v lidském séru nebo plazmě.

4.1.1. PRINCIP TESTU

Souprava je určena pro stanovení IgG protilátek proti klinicky signifikantnímu kmenu *H.pylori* s obsahem proteinů Cag A a Vac A v lidském séru a plazmě metodou EIA, typ sendvič, tj. pevná fáze – antigen – protilátka – značená protilátka. Značenou protilátkou je prasečí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgG konjugovaná křenovou peroxidázou. Stanovení peroxidázové aktivity se provádí pomocí substrátu s TMB. Pozitivita se projevuje modrým zbarvením, které se zastavovacím roztokem změní na žluté, jehož intenzita se měří na fotometru při vlnové délce 450nm.

4.1.2. SLOŽENÍ SOUPRAVY

- Potážená destička s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek
- Negativní kontrola = lidské sérum bez protilátek *H.pylori*
- CUT-OFF = lidské sérum obsahující protilátky proti *H.pylori* v hraniční koncentraci
- Pozitivní kontrola = lidské sérum obsahující protilátky proti *H.pylori*
- Konjugát = prasečí imunoglobulin proti lidským IgG značený peroxidázou
- TMB – Complete = jednosložkový chromogenní substrátový roztok, obsahující TMB a H₂O₂
- Ředící roztok vzorků = pufr se stabilizátory bílkovin
- Promývací roztok = koncentrovaný pufr
- Zastavovací roztok = obsahuje kyselinu sírovou 1 mol/l. Pozor žíravina!

4.1.3. PRACOVNÍ POSTUP

1. Všechny reagentie necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Dávkuje ředící roztok vzorků, kontroly a ředěné vzorky podle pracovního schématu (viz. Tabulka 1.).
 - pipetujeme 100 μ l ředícího roztoku vzorků do jamky A1 (blank)
 - pipetujeme 100 μ l negativní kontroly do 1 jamky
 - pipetujeme 100 μ l CUT – OFF do 2 jamek
 - pipetujeme 100 μ l pozitivní kontroly do 1 jamky
 - pipetujeme 100 μ l testovaných vzorků ředěných 1+100 do zbývajících jamek.
3. Destičku přikryjeme víčkem a inkubujeme 30 minut při 37°C.
4. Odsajeme obsah jamek a 5x promyjeme pracovním promývacím roztokem. Jamky plníme po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepeme zbytky roztoků do svého materiálu.
5. Dávkuje do všech jamek 100 μ l konjugátu.
6. Destičku přikryjeme víčkem a inkubujeme 30 minut při 37°C.
7. Odsajeme obsah jamek a 5x promyjeme pracovním promývacím roztokem. Jamky plníme po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepeme zbytky roztoku do svého materiálu.
8. Dávkuje do všech jamek 100 μ l jednosložkového substrátu TMB – Complete.
9. Destičku přikryjeme víčkem a inkubujeme 15 minut při 37°C v temnu.
10. Zastavíme reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
11. Změříme na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu roztoků v jamkách proti blanku (jamka A1), a to do 30 minut po zastavení reakce.

Tabulka 1. Pracovní schéma

A	BL	VZ 4	VZ12									
B	NK	VZ 5										
C	CO	VZ 6										
D	CO	VZ 7										
E	PK	VZ 8										
F	VZ 1	VZ 9										
G	VZ 2	VZ 10										
H	VZ 3	VZ11										

BL = ředící roztok (blank)

NK = negativní kontrola

CO = CUT-OFF

PK = pozitivní kontrola

VZ 1-12 = vzorky pacientů

4.1.4. INTERPRETACE VÝSLEDKU

Výpočet Indexu pozitivity (IP)

IP= absorbance vzorku / průměrná absorbance CUT – OFF

Tabulka 2. Interpretační kritéria

Index positivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,9	negativní
0,9 až 1,1	hraniční
větší než 1,1	pozitivní

Vyšetření vzorků hraničních, tj. s indexem positivity 0,9 až 1,1 je zapotřebí opakovat z nového odběru s časovým odstupem minimálně 3 týdny.

4.2. Amplified IDEIA™ Hp StAR (DakoCytomation AG)

Amplifikovaný enzymoimunoanalytický test pro detekci *H. pylori* ve stolici.

4.2.1. PRINCIP TESTU

Amplified IDEIA™ Hp StAR je sendvičový enzymoimunoanalytický test využívající imunoanalytickou amplifikační technologii pro stanovení antigenů *H.pylori* ve stolici.

Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryty monoklonálními protilátkami specifickými pro antigeny *H.pylori*.

Supernatant suspenze stolice a konjugát protilátek značených křenovou peroxidasou jsou amplifikovány do jamek v témže kroku. Během inkubace se antigeny *H.pylori* přítomné ve vzorku vážou na specifické monoklonální protilátky imobilizované na povrchu jamky a na peroxidasou značené monoklonální protilátky, čímž se vytváří sendvičový komplex.

Nenavázaný konjugát se odstraní promytím mikrotitračních jamek a poté se do jamek přidá jednosložkový bezbarvý substrát (TMB). Vázaná křenová peroxidasa v konjugátu oxiduje TMB za vzniku modře zbarveného produktu. Přidáním

zastavovacího roztoku se zbarvení změní na žluté. Intenzita zbarvení se stanoví spektrofotometricky.

4.2.2. SLOŽENÍ SOUPRAVY

- Mikrotitrační destička s navázanou protilátkou
- Vzorový ředící roztok – fosforečnanový pufr s antimikrobiálním činidlem
- Promývací roztok – fosforečnanový pufr s detergentem a antimikrobiální činidlem
- Pozitivní kontrola – inaktivovaný frakcionovaný lyzát *H.pylori*
- Negativní kontrola
- Konjugát – specifické monoklonální protilátky proti antigenům *H.pylori* konjugované s křenovou peroxidasou
- Roztok substrátu (TMB)
- Zastavovací roztok – 1M H₂SO₄

4.2.3. PRACOVNÍ POSTUP

1. Příprava vzorku: napipetujeme 500μl vzorkového ředícího roztoku do zkumavky, pomocí aplikátoru přidáme vzorek stolice o velikosti hrášku do zkumavky s ředícím roztokem, promícháme a suspenzi centrifugujeme 5 minut při 5000 ot/min.
2. Necháme vytemperovat mikrotitrační destičku a do jednotlivých jamek pipetujeme dle pracovního schématu (viz. Tabulka 3.).
 - 50μl supernatantu vzorku stolice
 - 50μl pozitivní kontroly
 - 50μl negativní kontroly
3. Přidáme 50μl konjugátu do každé jamky.
4. Inkubujeme při 18-27°C na třepačce po dobu 60 minut.

5. Promývání: v automatické promývačce promývacím roztokem.
6. Do každé jamky přidáme 100 μ l roztoku substrátu a inkubujeme při laboratorní teplotě, v temnu. Po 10 minutách zastavíme reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku.
7. Změříme absorbanci do 15 minut po zastavení reakce při vlnové délce 450nm (měřící filtr) a 620nm (referenční filtr).

Tabulka 3. Pracovní schéma

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	VZ 7										
B	PK	VZ 8										
C	VZ 1	VZ 9										
D	VZ 2	VZ 10										
E	VZ 3	VZ 11										
F	VZ 4	VZ 12										
G	VZ 5											
H	VZ 6											

PK = negativní kontrola

NK = pozitivní kontrola

VZ 1-12 = vzorky pacientů

4.2.4. INTERPRETACE VÝSLEDKU

Stanovení absorbance při dvou vlnových délkách (450nm a 620nm).

Vzorky s absorbancí $\geq 0,150$ jsou pozitivní

Vzorky s absorbancí $< 0,150$ jsou negativní

Pozitivní výsledek stanovení indikuje přítomnost antigenů *H. pylori*. Negativní výsledek stanovení indikuje nepřítomnost antigenů *H. pylori* nebo koncentraci antigenů pod detekčním limitem testu.

4.3. Anti- Helicobacter pylori CagA ELISA IgG (Euroimmun)

4.3.1. PRINCIP TESTU

ELISA testovací souprava poskytuje semikvantitativní *in vitro* test pro protilátky třídy IgG proti *H.pylori* Cag A antigenu v séru nebo v plazmě. Testovací souprava obsahuje mikrotitrační proužky s osmi oddělenými činidly potáhnutými antigenem *H.pylori* Cag A. Při prvním kroku reakce se zředěné vzorky inkubují. Jestliže je výsledek pozitivní, specifické protilátky IgG se sloučí s antigeny. Na dokázání přítomnosti kombinovaných protilátek se provede druhá inkubace s použitím enzymu označeným anti – IgG což vyvolá barevnou reakci.

4.3.2. SLOŽENÍ SOUPRAVY

- Mikrotitrační destička s navázanými antigeny
- Kalibrátor
- Pozitivní kontrola (lidské sérum s navázanou IgG protilátkou)
- Negativní kontrola (lidské sérum s navázanou IgG protilátkou)
- Konjugát – protilátky IgG konjugované s peroxidázou
- Pufr
- Promývací pufr – 10x naředěný
- Roztok substrátu – chromogenní
- Zastavovací roztok

4.3.3. PRACOVNÍ POSTUP

1. Příprava vzorku: naředíme si sérum pacienta v poměru 1:101 s ředícím roztokem
2. Pipetujeme dle pracovního schématu: (viz. Tabulka 4.)
 - 100 μ l kalibrátoru
 - 100 μ l pozitivní kontroly
 - 100 μ l negativní kontroly
 - 100 μ l naředěného vzorku
3. Necháme 30 minut temperovat při laboratorní teplotě.
4. Na automatické promývačce 3x promyjeme promývacím pufrem.
5. Pipetujeme 100 μ l konjugátu do každé jamky. Inkubujeme 30 minut při laboratorní teplotě.
6. Na automatické promývačce 3x promyjeme promývacím pufrem.
7. Pipetujeme 100 μ l chromogenního substrátu do každé jamky a inkubujeme 15 minut při laboratorní teplotě.
8. Pipetujeme 100 μ l zastavovacího roztoku do každé jamky ve stejném pořadí jako jsme pipetovali substrát.

9. Do 30 minut fotometricky změříme intenzitu zbarvení při vlnové délce 450nm (měřící filtr) a 620nm (referenční filtr).

Tabulka 4. Pracovní schéma

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cal	VZ 6										
B	PK	VZ 7										
C	NK	VZ 8										
D	VZ 1	VZ 9										
E	VZ 2	VZ 10										
F	VZ 3	VZ 11										
G	VZ 4	VZ 12										
H	VZ 5											

Cal = kalibrátor
 PK = pozitivní kontrola
 NK = negativní kontrola
 VZ 1 – 10 = vzorky pacientů

4.3.4. INTERPRETACE VÝSLEDKU

Výpočet Indexu positivity (IP)

IP= absorbance vzorku nebo kontroly / absorbance kalibrátoru

Tabulka 5. Interpretační kritéria

Index positivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,8	negativní
0,9 až 1,1	hraniční
větší než 1,1	pozitivní

V případě hraničního výsledku by měl být odebrán další vzorek po sedmi dnech a otestován spolu s prvním vzorkem. Porovnání obou vzorků nám ukáže důkladné zhodnocení titru.

4.4. Westernblot *Helicobacter pylori* IgG (TEST – Line s.r.o. Clinical Diagnostics)

Souprava k detekci specifických protilátek IgG proti separovaným antigenům *H.pylori* v lidském séru nebo plazmě.

4.4.1. PRINCIP TESTU

Antigenní extrakt *H.pylori* bohatý na vysoce specifické antigeny (zejména Cag A) je podle molekulových hmotností elektroforeticky rozdělen a poté přenesen na nitrocelulóзовou membránu. Tato membrána je dále upravena blokováním nespecifických vazebných míst a po promytí a vysušení nařezána na jednotlivé stripy obsažené v soupravě. Při použití soupravy jsou jednotlivé stripy inkubovány s vyšetřovaným vzorkem, přičemž dochází k vazbě specifických protilátek přítomných ve vzorku na příslušné antigenní linie. Po promytí jsou stripy dále inkubovány s konjugátem. Vizualizace je provedena inkubací se substrátovým roztokem. Po vybarvení jsou jednotlivé stripy vysušeny a vyhodnoceny pomocí přiložené šablony, popřípadě za použití vyhodnocovacího softwaru. Pro stanovení

validity testu obsahuje souprava protokol s vyobrazením validačního stripu, který odpovídá pozitivní kontrole obsažené v soupravě.

Stripy obsahují tzv. cut-off linii, která slouží ke kontrole funkčnosti a citlivosti soupravy a usnadňuje vyhodnocení testu.

4.4.2. SLOŽENÍ SOUPRAVY

- WB Stripy – testovací proužky s přeneseným, elektroforeticky rozděleným antigenem
- Negativní kontrola
- Pozitivní kontrola
- Konjugát
- Substrátový roztok
- Univerzální roztok – pufr pro ředění vzorků
- Inkubační vanička pro blot
- Pracovní návod
- Protokol s vyobrazením validačního stripu
- Samolepící fólie

4.4.3. PRACOVNÍ POSTUP

1. Před použitím vše vyndáme z krabice a temperujeme 60 minut při laboratorní teplotě.
2. Do vaničky pipetujeme podle počtu vzorků 2 ml univerzálního roztoku do každé jamky.
3. Pinzetou uchopíme strip pouze v oblasti etikety, odlepíme z podložky a přeneseme do každé inkubační jamky jeden WB strip. Stripy ponecháme na třepačce v univerzálním roztoku, rovnoměrně smáčíme po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
4. Odsajeme z jamek univerzální roztok.
5. Do jamek pipetujeme 1,5 ml naředěných vzorků a inkubujeme na třepačce 1 hodinu při laboratorní teplotě. Kontroly se již neředí.

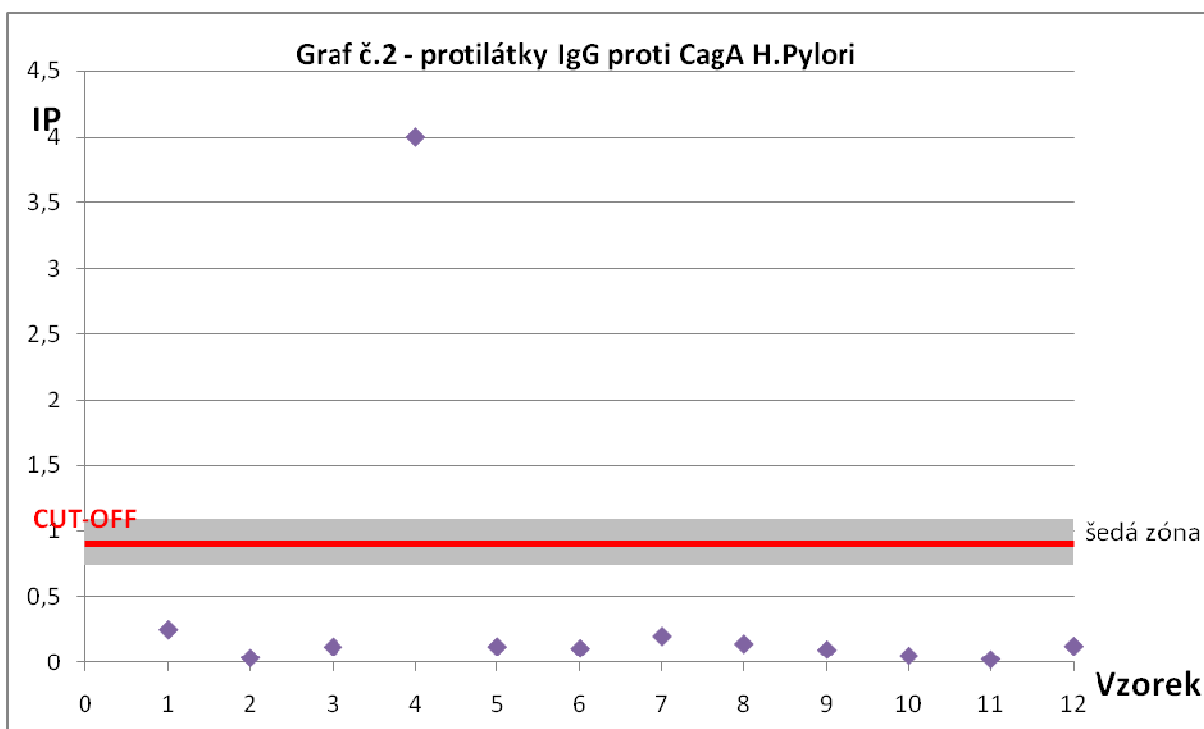
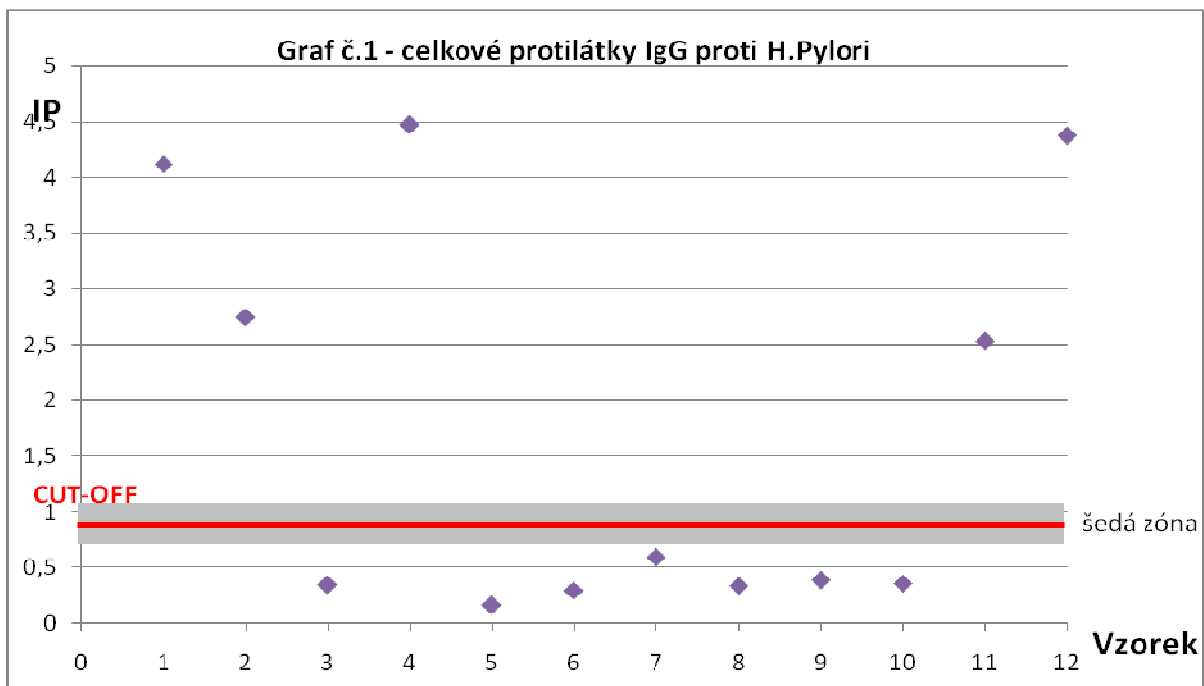
6. Po skončení inkubace odsajeme naředěné vzorky.
7. Jamky se stripy promyjeme 3 x 1,5 ml univerzálního roztoku na třepačce po dobu 5 minut.
8. Po odsátí univerzálního roztoku pipetujeme do každé jamky 1,5 ml konjugátu a inkubujeme na třepačce 1 hodinu při laboratorní teplotě.
9. Odsajeme roztok konjugátu.
10. Jamky se stripy promyjeme 3 x 1,5 ml univerzálního roztoku na třepačce vždy po dobu 5 minut.
11. Odsajeme univerzální roztok a pipetujeme do každé jamky 1,5 ml substrátového roztoku a inkubujeme na třepačce 10 minut.
12. Odsajeme substrátový roztok a promyjeme každý strip 2 x 2 ml destilované vody na třepačce vždy po dobu 5 minut.
13. Vyjmeme stripy z vaničky a vlhké je přeneseme do vyznačených rámečků na vyhodnocovacím protokolu kde je naneseno lepidlo.
14. Necháme volně vysušit. Po vysušení stripy vyhodnotíme pomocí přiložené šablony nebo pomocí softwaru.

4.4.4. INTERPRETACE VÝSLEDKU

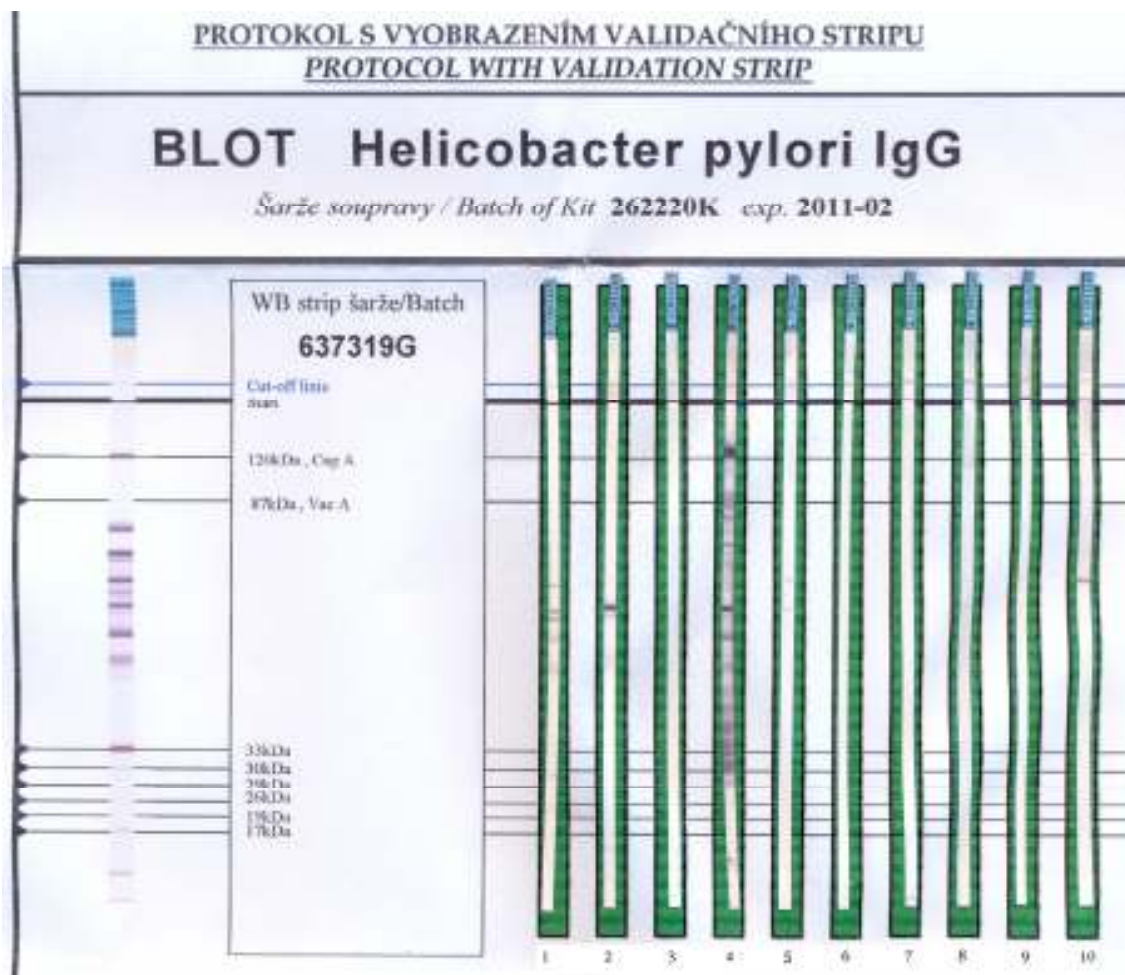
Vyhodnocujeme pouze proužky korespondující s pozicemi na validačním stripu vyobrazeném na protokolu.

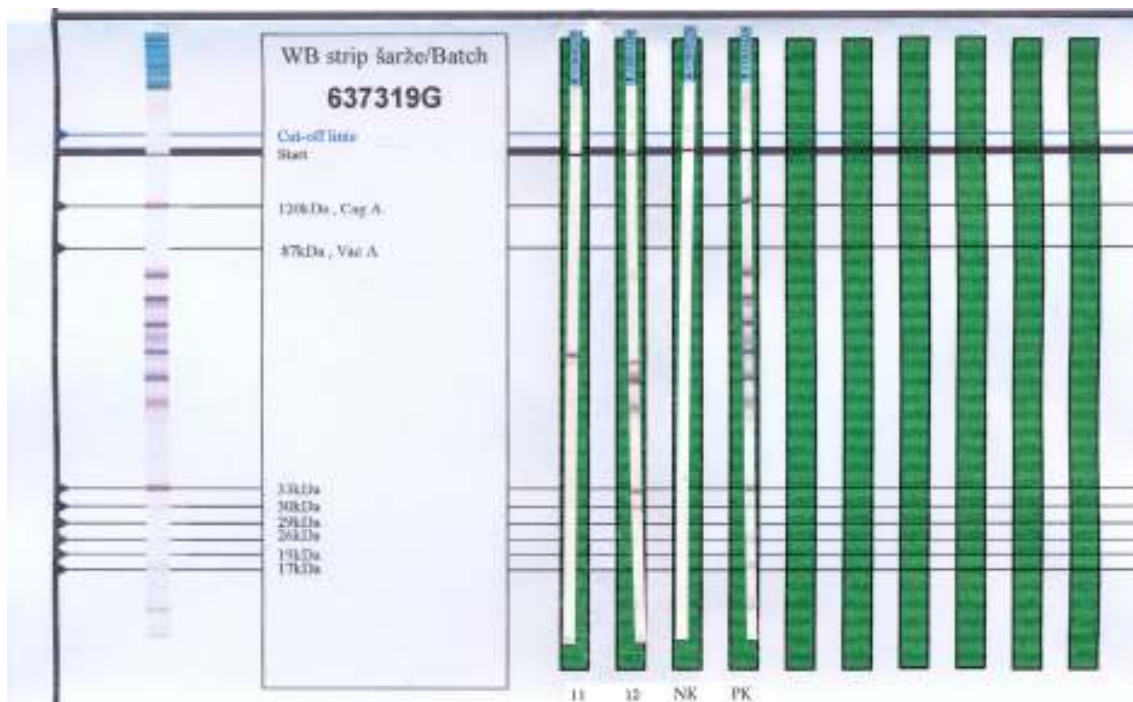
5. Výsledky

Bylo vyšetřeno 12 pacientů s přetrvávajícími zažívacími potížemi, bez specifických příznaků infekce *H.pylori*. U 5 pacientů byla zvýšena hladina protilátek třídy IgG (graf č.1), což velmi dobře koresponduje s nálezem pozitivních zón získaných metodou Westernblot (obrázek 4) a u jednoho pacienta byli pozitivní protilátky třídy IgG proti CagA *H.pylori* (graf č.2).



Na obrázku č.4, kde je zobrazen pracovní protokol Westernblot. byla u vzorku 4 zvýšena také hladina protilátek proti CagA antigenu, což bylo potvrzeno nálezem odpovídající pozitivní zóny Westernblotu .





Obrázek č. 4. – pracovní protokol Westernblot

6.Diskuse

Při laboratorním průkazu jsem se snažila ukázat jakými metodami lze stanovit infekci *H.pylori* a poukázat na to, který z diagnostických postupů dokáže přinést ošetřujícímu lékaři nejvíce využitelných informací pro případnou eradikaci *H.pylori*.

Metoda stanovení protilátek třídy IgG metodou EIA patří k laboratorně nejdéle používanému sérologickému průkazu *H.pylori*. K diagnostice je zapotřebí velmi malé množství vzorku od pacienta, samotné provedení je snadné a rychlé. Výsledky získané touto metodou ukazují schopnost organismu vytvářet protilátky proti *H.pylori* a nevypovídají o aktivitě samotného mikroorganismu. Proto je tato metoda vhodná spíše pro dlouhodobější sledování léčených pacientů a monitorování úspěšnosti zvolené terapie. Souprava EIA *Helicobacter* MONO IgG obsahuje kalibrátor, který pomocí indexu positivity kvalitativně rozdělí pacienty na negativní a pozitivní. Právě při sledování trendů ve tvorbě protilátek by bylo výhodnější použít soupravu rozšířenou o sadu kalibrátorů, které umožní kvantitativní stanovení hladiny protilátek v séru.

Metody Westernblot bývají často používány jako konfirmační pro potvrzení pozitivních nálezů stanovením metodou ELISA. V případě *H.pylori* však kromě

potvrzení správnosti ELISA metody podávají i velmi zajímavé informace o antigenní struktuře protilátek. Můžeme tak nalézt zónu pro průkaz patogenních kmenů s tvorbou antigenů CagA popřípadě vacA. Hlavní nevýhodou pro použití Westernblotu v rutinním provozu laboratoře je dlouhá doba stanovení, která by i při částečné automatizaci trvala nejméně 4 hodiny, zatímco ELISA metoda trvá přibližně 1,5 hodiny. Dalším významným faktorem je také cena, kdy Westernblot metoda je přibližně 10x dražší než ELISA metoda.

Metoda na stanovení *H.pylori* ve stolici je postavena na přímém průkazu antigenu *H.pylori*, ne na stanovení protilátek. Jedná se o kvalitativní metodu sloužící k velmi přesnému průkazu přítomnosti mikroorganismu v zažívacím traktu. Nehodí se pro dlouhodobé sledování léčby.

Stanovení celkových protilátek proti *H.pylori* má význam především pro prvotní záchyt infekce *H.pylori* u praktických lékařů, identifikace bakterií pomocí Westernblot nebo alespoň průkaz CagA antigenu využívají spíše specialisté – gastroenterologové. Pro sledování úspěšnosti léčby je přínosné hodnotit vývoj protilátek v čase nebo alespoň hodnotu indexu positivity.

7. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout poznatky o *H.pylori*, poukázat na možnosti diagnostiky této infekce, jakými metodami lze *H.pylori* laboratorně stanovit a zjistit výhody a nevýhody určitých stanovení jako je cena a doba provedení testu.

V naší laboratoři jsme provedli vyšetření u 12 pacientů třemi různými metodami: metodou stanovení protilátek třídy IgG Helicobacter Mono IgG, stanovení protilátek IgG proti Cag A ELISA metodou a metodou Westernblot IgG.

Provedli jsme vyšetření u 12 pacientů, kteří měli delší dobu zažívací obtíže. 5 pacientů mělo zvýšenou hladinu protilátek IgG, u jednoho pacienta byli zjištěny protilátky IgG proti CagA a u jednoho pacienta byli pozitivní protilátky CagA.

8. Literatura

1. Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J.: Lékařská mikrobiologie. Praha, Marvil, 1996, s. 558
2. Bureš J., Kopáčová M., Rejchrt S.: Časopis Lékařů českých, 2008, č.147,
3. Cleveland clinic [online], 2008, last modified 17.11.2008 dostupné z:http://my.clevelandclinic.org/services/breath_test/hic_breath_test_for_h_pylori.aspx
4. DakoCytomation: firemní materiál: Amplified IDEA™ Hp StAR, 2002 22.www.science.org.au/nobel/2005/images/invasion.jpg
5. Dialab s.r.o.,2009 dostupné z: <http://www.dialab.cz/laboratorni-medicina-a-vyzkum/katalog/klinicka-laboratorni-diagnostika/gastroenterologie.html>
6. EUROIMMUN: firemní materiál, Anti – Helicobacter pylori CagA ELISA(IgA), 2004
7. Greenwood D., Slack R., Peutherer J.: Lékařská mikrobiologie, Grada, 1999, ISBN 80-7169-365-0, s. 686
8. Israel D.A., Peek R.M.: Review article: pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. Časopis Aliment. Pharmacol.Ther., 2001, č.15, s.1271-1290
9. Johannes G., Arnoud H., Kuipers J.: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* [online]. Časopis Clinical Microbiology Reviews, 2006, 3, 449-490. dostupné z: <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/19/3/449?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=helicobacter+pylori&searchid=1&FIRSTINDEX=0&resource-type=HWCIT#Vaccination>
10. Krejsek J., Kopecký O.: Klinická imunologie. Hradec Králové, Nukleus, 2004, ISBN 80-86225-50, s. 941
11. Mégraud F., Lehours P.: *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing, Časopis Clinical Microbiology Reviews, 2007, č. 2, s. 280-322
12. Mutaz I.S.: *Helicobacter Pylori* Infection [online], publikováno 2010, [2010-4-7], dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/929452-overview>
13. Přímé metody diagnostiky infekce *H.pylori*. Dostupné z: <http://www.mona.php5.cz/metody1.html>

14. Rejchrt S., Bureš J., Živný P., Široký M., Palička V., Kopáčová M.: Časopis Klinická biochemie a metabolismus. 2004, č.12, s.14-18
15. Rosenstock S., Kay L., Andersen L., Bonnevie O., Jorgensen T. Rosenstock C.: Relation between *H.pylori* infection and gastrointestinal symptoms and syndroms [online].: Gut, 1997, č. 41, s.169-176.
16. Dostupné z:<http://gut.bmj.com/content/41/2/169.abstract?sid=a1a9eb3c-148e-4a78-854c-2e54af9edd71>
17. Sedláčková a kol.: Infekce *Helicobacter pylori*, Maxdorf, 1996, s.163
18. Seifert B.: Doporučené postupy pro praktické lékaře: Infekce *Helicobacter pylori*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP/2001
19. Social software. Wikipedia [online]. Last modified 27. 3. 2010. Dostupné z:http://cs.wikipedia.org/wiki/Karcinom_%C5%BEaludku#Faktory_virulence
20. Sýkora J.: Časopis Pediatriká praxe, 2006, č. 2, s. 68-74
21. TEST - LINE s.r.o. Clinical Diagnostics: firemní materiál, EIA *Helicobacter* MONO IgG, 2008
22. TEST – LINE s.r.o.Clinical Diagnostics: firemní materiál, Blot *Helicobacter pylori* IgG, 2010

9. Přílohy

9.1. Seznam grafů

Graf č.1 – celkové protilátky IgG proti *H.pylori*

Graf č.2 – protilátky IgG proti CagA H pylori

9.2. Seznam tabulek

Tabulka č.1 – pracovní schéma EIA MONO IgG

Tabulka č.2 – interpretační kritéria EIA MONO IgG

Tabulka č.3 - pracovní schéma Amplified™ HP StAR

Tabulka č.4 – pracovní schéma CagA ELISA IgG

Tabulka č.5 – interpretační kritéria CagA ELISA IgG

9.3. Seznam obrázků

Obrázek č.1 – *Helicobacter pylori*

Obrázek č.2 – ureázové testy

Obrázek č.3 – mikrotitrační destička

Obrázek č.4 – pracovní protokol Westernblot