

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autorečrát disertační práce



Detekce a genotypizace kmenů *Helicobacter pylori* ve Waldeyerově lymfatickém okruhu a jeho vztah ke vzniku patologie v této oblasti

MUDr. Eva Nártová

Praha 2016

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku I.LF UK a FN v Motole, V Úvalu 84, Praha 5, 15006

Školitel: Prof. MUDr. Jaromír Astl, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu I. lékařské fakulty.

Obsah:

Abstrakt (CZ).....4

Abstrakt (EN)..... 5

Kapitoly:

1. Úvod..... 6
2. Hypotézy a cíle práce..... 9
3. Materiál a metodika..... 10
4. Výsledky.....11
5. Diskuse..... 15
6. Závěry..... 17
7. Použitá literatura..... 18
8. Seznam publikací.....20

Abstract

The aim of this study was to reveal the presence of *Helicobacter pylori* (HP) in the Waldeyer's lymphatic tissue in the group of children and adults, along with its possible role in the etiology of tonsillar carcinoma and benign diseases (chronic tonsillitis, OSAS, adenoids).

In our study we have confirmed the hypothesis that HP is presented in the Waldeyer's lymphatic tissue, as well as in the stomach and that the oropharynx and epipharynx are the an extragastric reservoir of HP. Mucosa associated lymphatic tissue in the stomach is similar to lymphatic tissue of Waldeyer ring. These conditions can be very favourable for the survival of HP and thus can promote inflammation changes and immune changes as well as in the stomach.

In our study, using the real-time PCR method we have detected high incidence of HP DNA in adenoids and tonsillar tissue. In the group of benign diseases, the most frequent genotypes were CagA-VacAs1bm1 and CagA-VacAs1bm2. In the group of patients with tonsillar carcinoma, the most frequent genotype was CagA-VacAs1bm1. Genotyping identified strains of HP showed differences in comparison with the predominant strains which are most frequently found in the stomach. Genotypic analysis of HP strains showed that the less prevalent virulent strains of HP, known as cagA negative and vacA positive. It is supposed, that the long colonization of less virulent strains in the oropharyngeal and epipharyngeal area leads to an influence of immune mechanisms and can start the process of cancerogenesis. The correlation between the particular types of HP genotypes and chronic tonsillitis/tonsillar carcinoma was not proven.

The question of the eradication in the group of patients with PCR positivity and serology positivity was not confirmed in our study and will be the subject of the future studies. The serology does not have a high sensitivity for the detection of acute infection, and it is therefore not possible to detect in which location the infection was/is taking place. The HP antibodies can persist in the organism for a long time.

Our results contribute to the HP knowledge in children and adults.

Key words: *Helicobacter pylori*, tonsils, adenoids, PCR, genotyp

Abstrakt

Práce se zabývá studiem přítomnosti *Helicobacter pylori* (HP) v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu u skupiny dospělých a dětských pacientů a možnou souvislostí se vznikem benigních onemocnění v této oblasti (chronická tonzilitida, adenoidní vegetace a OSAS) a se vznikem karcinomu tonzily.

V naší práci jsme potvrdili hypotézu, že HP se nachází v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu stejně tak jako v žaludku a lymfatické tkáni orofaryngu a epipharyngu tak plní roli extragastrického zdroje HP. Předpokládá se, že v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu působí infekce HP podobnými imunitními a zánětlivými procesy jako v žaludku, neboť se jedná o lymfatickou tkáně vázanou na sliznici.

V dizertační práci jsme pomocí metody real-time PCR zjistili vysoký výskyt DNA HP v adenoidní a tonzilární tkáni. Ve skupině benigních onemocnění byly nejčastěji detekovány genotypy CagA-VacAs1bm1 a CagA-VacAs1bm2. Ve skupině pacientů s karcinomem tonzily byl nejčastěji detekován genotyp CagA-VacAs1bm1. Genotypizací zjištěné kmeny HP vykazovaly rozdíly v porovnání s převládajícími kmeny, které lze nejčastěji nalézt v žaludku. Prokázáno se, že především menší exprese CagA genu. Byly tak detekovány méně virulentní kmeny. Předpokládá se, že dlouhodobá kolonizace lymfatické tkáně orofaryngu a epipharyngu méně virulentními kmeny může vést k ovlivnění imunitních mechanismů a teoreticky k nástupu zánětlivého procesu a ke cancerogenezi. Korelace mezi výskytem určitých typů genotypů HP a chronickým zánětem či maligním onemocněním prokázána nebyla.

Otázka eradikace HP u pacientů s PCR pozitivitou a současnou sérologickou pozitivitou infekce v naší práci potvrzena nebyla a je předmětem dalších studií. Sérologická metoda nemá dobrou výpovědní hodnotu k určení recemence či již proběhlé infekce HP a nelze rovněž zjistit, v jaké lokalizaci infekce proběhla/probíhá. HP protilátky se nevytváří v organismu hned po vzniku infekce a zároveň přetrvávají v organismu poměrně dlouho.

Výsledky dosažené v této práci přispívají k poznání významu HP infekce u dospělých a dětských pacientů a pokládají rovněž otázky pro další výzkum.

Klíčová slova: *Helicobacter pylori*, tonzily, adenoidní vegetace, PCR, genotyp

1. Úvod

Helicobacter pylori (HP) je spirální, polyblivá, mikroaerofilní bakterie. Infekce HP je považována za hlavní příčinu chronické gastritidy a hraje velmi důležitou roli v patogenezi vředové choroby, žaludečního lymfomu a karcinomu žaludku (Israel a Peek, 2001). Příčinná souvislost mezi působením HP a chronickou gastritidou se ukázala v roce 1983, kdy Marshall a Warren vykultivovali tuto bakterii z materiálu žaludeční sliznice. Výskyt infekce HP je odhadován mezi 40 – 80% a je spjat se zeměpisnou oblastí, věkem, rasou a socioekonomickým stavem dané země (Bures et al., 2006). Klinické projevy onemocnění se objevují pouze u 10 – 15% nakažených jedinců, což je pravděpodobně dáno rozdílnou imunitní odpovědí hostitele a odlišným stupněm virulence kmenů (Stromberg et al., 2003). Cesty přenosu uvedeného patogenu nejsou doposud zcela objasněny, předpokládá se cesta oro – orální či oro – fekální (Brown, 2000).

HP se vyznačuje produkcí celé řady faktorů virulence. Nejdůležitější jsou dva sekreční proteiny: vakuolizační cytotoxin A (VacA) a cytotoxin – asociovaný gen A (CagA). CagA je produkován asi 60% kmenů HP a je kódován genem *cagA*, který se nachází v tzv. ostrůvku patogenicity – PAI (Olivares a Gisbert, 2006). Kmeny s přítomností *cagA* jsou označovány jako CagA+. U pacientů s těmito kmeny byl zaznamenán vyšší výskyt peptických vředů, atrofických gastritid a karcinomu žaludku. Dalším důležitým faktorem virulence je VacA protein. Nositeli vacA genu jsou všechny kmeny HP. VacA protein je však produkován jen zhruba u 50% kmenů. Jsou známy alely s1 a s2 signální sekvence vacA a m1 a m2 střední sekvence vacA. Za vysoce toxické jsou považovány kmeny genotypu s1m1, které jsou spojovány s vysokým výskytem intestinálních metaplasí a gastritid (Höcker a Hohenberger, 2003).

K diagnostice průkazu infekce HP se užívají metody invazivní a neinvazivní. Při detekci infekce v oblasti orofaryngu se zpravidla užívají testy invazivní, kam je zařazen **průkaz kultivační**, což je metoda se 100% specificitou, její úspěšnost však závisí na mnoha faktorech a zkušnostech laboratoře. Uvedená metoda je velmi časově náročná a při detekci v orofaryngu může přinášet falešně negativní výsledky, neboť v orofaryngu se vyskytují i jiné bakteriální kmeny, které mohou růst HP inhibovat (Ishihara et al., 1997). **Detekce urážky** patří mezi rychlé, levné a jednoduché testovací metody. Tyto testy jsou založeny na průkazu ureázové aktivity HP (Qureshi et al., 1992), která spočívá v hydrolyze urey na oxid uhličitý a amonný iont. Mezi nejvíce užívané ureázové testy patří CLO test (Campylobacter - like- organism) a RUT test (Rapid Urease Test). **Molekulární diagnostické postupy v detekci HP** v oblasti orofaryngu a epifaryngu zahrnují v současné době především metodu PCR (polymerázová řetězová reakce). Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři kroky: denaturace, hybridizace a polymerace. Nejčastěji využívanými systémy jsou klasická end-point PCR a PCR v reálném čase (real – time – PCR). Real-time PCR je založena na měření množství

produktu v průběhu amplifikace a v multiplexní aplikaci umožňuje provádět genotypizaci jednotlivých kmenů HP pomocí různých značených hybridizačních sond. End point PCR je klasickou PCR metodou a užívá se zejména k detekci *cagA* a *vacA* genů. Senzitivita PCR metody je především závislá na typu transportního média a rovněž na způsobu uchovávání vzorku do doby izolace nukleové kyseliny. Mezi testy neinvazivní je řazen **urážový dechový test**, který je v současné době považován za zlatý standard metod k detekci infekce HP v žaludku (Kocna, 2006). Dle Maastrichtského konsenzu z roku 2000 se jedná o vyšetření vhodné k průkazu infekce HP a rovněž je pokládáno za vyšetření určené ke kontrole eradikace. Největším problémem dechových testů je kvantitativní interpretace. Objem vzduchu při dýchání se liší v závislosti na fyzické aktivitě, psychologickém stavu a dalších faktorech. Výsledkem je pak jejich vysoká biologická aktivita. **Detekce HP antigenů ve stolici (Stool Antigen Test)** se provádí pomocí komerčně vyráběných testů založených na imunochromatografických či imunoenzymových metodách (Dzierzanowska-Fangrat et al., 2006). U dětí je pak považován za ekvivalent dechového testu (Doom, 2001). Principem testu je vazba antigenů HP na polyklonální králičí anti-HP protilátku a stanovení probíhá in vitro metodou ELISA. **Sérologická detekce protilátek proti HP** stojí na hranici mezi invazivními a neinvazivními metodami. Běžně jsou stanovovány protilátky IgG, IgA, IgM. Rovněž lze ze séra detekovat přítomnost protilátek proti CagA. K detekci protilátek se rutinně využívá metoda ELISA, která má senzitivitu 92% a specificitu 96% (Mégraud, 1995).

Následující tabulka ukazuje přehledně práce, ve kterých se autoři zabývali detekcí HP ve tkáních Waldeyerova lymfatického okruhu za použití různých detekčních metod.

| Autor | Rok | Počet případů | Typ odebrané tkáně | Diagnostická metoda | Počet pozitivních případů na H. pylori |
|------------------|------|---------------|------------------------------|---------------------------------------|--|
| Di Bonaventura | 2000 | 36 | tonsilární séra | kultivace, imunohistochemický průkaz | 0 (0 %) |
| Di Bonaventura | 2001 | 75 | tonsilární séra a biopsie | PCR | 0 (0 %) |
| Unver et al. | 2001 | 19 | adenoidní tkáň | CLO test | 11 (58 %) |
| Skinner et al. | 2001 | 50 | tonsilární tkáň | CLO test, imunohistochemický průkaz | 0 (0 %) CLO test a imunocytochemie |
| Uygun-Bayramcili | 2002 | 27 | tonsilární tkáň | histologie, imunohistochemický průkaz | 0 (0 %) histologie, imunohistochemický průkaz |
| Cirak | 2003 | 23 | tonsilární a adenoidní tkáň | PCR (16S ribosomální RNA, CagA) | 7 (30 %) pozitivních na H. pylori, 5 z nich (71 %) pozitivních na CagA gen |
| Yilmaz et al. | 2004 | 50 | tonsilární a adenoidní tkáň | CLO test | 0 (0 %) |
| Yilmaz et al. | 2005 | 38 | adenoidní tkáň, střední tkáň | PCR (23S ribosomální RNA) | 12 (67 %) ve střední tkáň, 1 (5 %) v adenoidní tkáň |
| Pitkaranta | 2005 | 20 | adenoidní tkáň, střední tkáň | Kultivace | 0 (0 %) |

2. Hypotézy a cíle práce

Dizertační práce je zaměřena na studium kolonizace tkáně Waldeyerova lymfatického okruhu *Helicobacter pylori*. Zabývá se detekcí této bakterie v dané oblasti a následnou genotypizací. Zabývá se otázkou, zda HP může být etiologickým faktorem při vzniku benigních a maligních onemocnění v této oblasti.

Cíle dizertační práce

1. Průkaz přítomnosti *Helicobacter pylori* ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu pomocí metody real-time PCR a zhodnocení výskytu její DNA v této oblasti.
2. Popis genotypových rozdílů *Helicobacter pylori* a porovnání jednotlivých genotypů v tkáňových vzorcích patrových tonsil a adenoidních vegetací v rámci benigních a maligních onemocnění této oblasti.
3. Porovnání zastoupení *cagA* genů a *vacA* genů v dané oblasti.
4. Zhodnocení argumentu indikace eradikace *Helicobacter pylori* v rámci výskytu *cagA* genu ve Waldeyerově lymfatickém okruhu.

Hypotézy dizertační práce

Hypotéza 1: Ve Waldeyerově lymfatickém okruhu se vyskytuje infekce *Helicobacter pylori* stejně tak jako v žaludku.

Hypotéza 2: Nález kmenů *Helicobacter pylori* v oblasti Waldeyerova lymfatického okruhu a současný sérologický průkaz infekce je argumentem k provedení eradikace u daných pacientů.

Hypotéza 3: Existuje korelace mezi výskytem konkrétních genotypů a chronickým zánětem nebo maligním onemocněním ve Waldeyerově lymfatickém okruhu.

3. Materiál a metodika

Ve skupině dospělých pacientů bylo 145 vzorků tonsilární tkáně, resp. 80 vzorků tonsil s diagnózou chronické tonzilitidy (55,71%), 42 vzorků tonsil s diagnózou OSAS (28,97%) a 23 vzorků tonsil s diagnózou tonzilárního karcinomu (15,86%). Celkem bylo odebráno 79 dětských tkáňových vzorků, 62 z adenoidních vegetací (78,48%), 17 pak z tonsilární tkáně při OSAS (21,52%). U 12 dětských pacientů byla odebrána tkáň adenoidní i tonsilární. V úvodu chirurgického výkonu po zavedení endotracheální intubace byly odebrány tkáňové vzorky tonsil za sterilních podmínek. Vzorky byly následně vloženy do transportního media (Microtest® MART, Remel Inc., USA) pro PCR zpracování a transportovány do laboratoře.

DNA HP z tkáňových vzorků byla izolována s využitím MagnA Pure Compact Systemu (Tegimenta AG, Rotkreuz, Switzerland) a soupravou MagnA Pure Compact Nucleic Acid Isolation

| Author | Year | Sample Type | Method | Results |
|-------------------|------|---|---|---|
| Khademi et al. | 2005 | tonsilární a adenoidní tkáň | CLO test | 27 (48%) |
| Blitar | 2005 | adenoidní tkáň | RUT, histologie a nested PCR (UreA) | 21 (84 %) pozitivních v RUT, 4 (16 %) pozitivních v histologii, 0 (0 %) pozitivních v nested PCR |
| Bulut | 2006 | tonsilární a adenoidní tkáň | PCR (CagA - glmM gen) | 29 (24,6 %) pozitivních na H. pylori, 17 z nich (58,6 %) CagA pozitivních |
| Blitar | 2006 | adenoidní tkáň, středoušní tebutina | kultivace, RUT, PCR (ureC-gen) | 0 (0 %) ve středoušní tebutině, 10 (77 %) v adenoidní tkáni podle RUT, 0 (0 %) podle PCR |
| Yilmaz et al. | 2006 | adenoidní a tonsilární tkáň, středoušní tebutina, sliznice promotoria | kultivace, PCR (16S RNA) | středoušní tebutina: 2 pozitivní v kultivaci, 7 v PCR; sliznice promotoria: 1 v kultivaci, 7 v PCR; adenoidní tkáň: 11 (50 %) v kultivaci, 14 (64 %) v PCR; tonsilární tkáň: 12 (55 %) v kultivaci, 14 (64 %) v PCR |
| Jelarte et al. | 2007 | tonsilární a adenoidní tkáň | kultivace, RUT | 17 (12 %) pozitivních v RUT, 0 (0 %) pozitivních v kultivaci |
| Kusano et al. | 2007 | patrové tonsily | imunohistochemický průkaz, elektronová mikroskopie, hybridizace in-situ (16S RNA gen) | 126 (72,9 %) pozitivních |
| Vayisoglu et al. | 2008 | tonsilární a adenoidní tkáň | RUT, imunohistochemický průkaz | 2 (2,2 %) v adenoidní tkáni, 0 (0 %) v tonsilární tkáni s RUT, 0 (0 %) v imunohistochemickém průkazu |
| Eyigor et al. | 2009 | 35 adenoidních tkáň, 20 tonsil | RUT, PCR (glmM gen) | RUT 5,5 % pozitivních, 0 % PCR pozitivních |
| Ozcan | 2009 | adenoidní tkáň, středoušní tebutina | CLO, imunohistochemický průkaz | 0 (0 %) CLO pozitivních, 0 (0 %) imunohistochemicky pozitivních |
| Iabbari Moghaddam | 2009 | tonsilární tkáň | RUT, histopatologie | 113 (39,6 %) pozitivních s histopatologií, 40 (14 %) pozitivních s RUT |
| Vilarinho et al. | 2010 | adenoidní a tonsilární tkáň | RUT, imunohistochemický průkaz, FISH, PCR-DNA (vacA gen) | 3 pozitivní s RUT, 2 pozitivní s imunohistochemickým průkazem, 0 pozitivních s FISH, 0 pozitivních s PCR |
| Toros et al. | 2011 | tonsilární a adenoidní tkáň | RUT, histopatologie | 0 (0 %) pozitivních s RUT, 0 (0 %) pozitivních s histopatologií |
| Abdel-Monem | 2011 | adenoidní a tonsilární tkáň | RUT, PCR (ureC-gen) | 16 (53,3 %) pozitivních s RUT, 5 (16,6 %) pozitivních s PCR |
| Hussey et al. | 2011 | adenoidní tkáň | Nested RT-PCR (RNA) | 1 positive (Wolinella africanus) |
| Farivar et al. | 2012 | tonsilární tkáň | Scorpion RT - PCR | 21,35% positive |
| Kraus et al. | 2014 | adenoidní a tonsilární tkáň | RT-PCR | 98% positive, 2% negat. |
| Bayindir et al. | 2015 | adenoidní a tonsilární tkáň | HP protilátky, PCR (cagA, fosfoglukosaminuasa) | protilátky 89%, PCR 10,9% |
| Kaymakı | 2014 | adenoidní tkáň | PCR | 8,7% pozitivních |
| Nárová | 2014 | tonsilární tkáň | PCR | 80% PCR pozitivní u chronických tonsilitid, z toho cagA gen u 25%. Ve skupině SAS 82,76% pozitivním cagA u 20,83% |
| Lukeš | 2014 | tonsilární tkáň | PCR | 73,91% pozitivní ve skupině tonsilárních tumorů, 70,0% u chronických tonsilitid, 69,23% OSAS vzorků |
| Katra | 2014 | adenoidní tkáň | PCR | 90% pozitivní, cagA gen 33,33% |

Kit I (Roche Diagnostics), s užitím protokolu Total_NA_400_100 a s předošetením v MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche Diagnostics).

Pro genotypizaci byly vyvinuty 3 PCR TaqMan eseje ve spolupráci s TIB – Molbiol GmbH v Berlíně. TaqMan[®] real-time PCR eseje byly prováděny na zařízení LightCycler[®], verze 2.0 s šestikanálovou detekcí: 530,570,610,640,670 a 705nm. Byl použit komerčně vyráběný LightCycler[®] TaqMan[®] MasterMix (Roche Applied Science, Basel), Switzerland) – 15 µl MasterMixu včetně primerů a sond a 5 µl vzorku izolátu DNA na 20 µl kapiláru. Pro real-time PCR esej k detekci signální sekvence vacA genu byly použity hybridizační sondy S1aLC(LC610), S1bLC(LC640) a S2 LC (LC705) společně s komerčním LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) – 15 µl MasterMixu včetně primerů a sond a 5 µl vzorku izolátu DNA na 20 µl kapiláru.

K potvrzení infekce *Helicobacter pylori* u pacientů byla použita sérologická detekce. Sérové vzorky byly testovány kvantitativním komerčním ELISA testem (EIA H. pylori, Test-Line, Czech Republic) na IgG, IgA a IgM protilátky. Testy byly provedeny na Ústavu imunologie a mikrobiologie I.LF UK a VFN.

4. Výsledky

Průkaz přítomnosti *Helicobacter pylori* ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu pomocí metody PCR a zhodnocení výskytu její DNA v této oblasti.

Do skupiny dospělých pacientů bylo celkem zařazeno 193 pacientů. Diagnózami v této skupině byly chronická tonzilitida, OSAS (syndrom obstrukční spánkové apnoe) a tonzilární spinocelulární karcinom. Celkem bylo užito k detekci *Helicobacter pylori* metodou real-time PCR 145 vzorků tonzilární tkáně, resp. 80 vzorků tonzil s diagnózou chronické tonzilitidy (55,71%), 42 vzorků tonzil s diagnózou OSAS (28,97%) a 23 vzorků tonzil s diagnózou karcinomu (15,86%).

Přítomnost *Helicobacter pylori* byla z celkového počtu vzorků (n=145) prokázána pomocí metody real-time PCR u 112 pacientů (77,24% vzorků), u 33 pacientů (22,76% vzorků) přítomnost *Helicobacter pylori* v tonzilární tkáni prokázána nebyla.

Následující tabulka 1 ukazuje počet HP pozitivitu/negativity v rámci jednotlivých diagnóz.

| Typ diagnózy | HP + | HP - |
|-----------------------|------|------|
| Chronická tonzilitida | 62 | 18 |
| OSAS | 33 | 9 |
| Karcinom tonzily | 17 | 6 |

Tabulka 1: Srovnání HP pozitivitu/negativity v rámci jednotlivých diagnóz

Bylo prokázáno, že DNA *Helicobacter pylori* byla v tonzilární tkáni u dospělých pacientů detekována, *Helicobacter* zde tedy přítomný je, stejně tak, jako v lidském žaludku, pro který je hlavním patogenem.

Do skupiny dětských pacientů (Kraus et al., 2014; Katra et al., 2014) bylo celkem zařazeno 67 dětí. Diagnózami v této skupině byly hypetrofická adenoidní vegetace a OSAS. Celkem bylo odebráno 79 tkáňových vzorků, 62 z adenoidních vegetací (78,48%), 17 pak z tonzilární tkáně při OSAS (21,52%). U 12 dětských pacientů byla odebrána tkáň adenoidní i tonzilární. Z celkového počtu 79 odebraných vzorků u dětských pacientů byla prokázána přítomnost HP pomocí metody real-time PCR u 75 z nich (94,94%) a u 4 vzorků přítomnost bakterie prokázána nebyla (5,06%). Ve skupině vzorků adenoidních vegetací byla pozitivní PCR detekce HP v 59 vzorcích tkáně (n=62), což představuje 95,16%. Ve vzorcích tonzilární tkáně při OSAS byla PCR HP detekce pozitivní v 16 případech, což představuje 94,12%.

Přehled ukazuje tabulka 2.

| Typ diagnózy | HP + | HP - |
|--------------------|------|------|
| Adenoidní vegetace | 59 | 3 |
| OSAS | 16 | 1 |

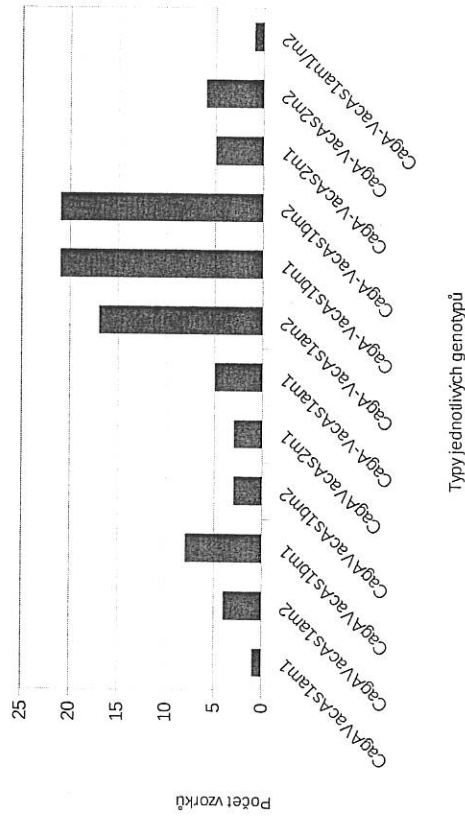
Tabulka 2: HP pozitivita/HP negativita u vzorků dětských pacientů

Tyto výsledky prokazují, že stejně tak jako u skupiny dospělých, tak i u skupiny dětských pacientů se ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu DNA *Helicobacter pylori* nachází.

Popis genotypových rozdílů *Helicobacter pylori* a porovnání jednotlivých genotypů v tkáňových vzorcích patrových tonzil a adenoidních vegetací v rámci benigních a maligních onemocnění této oblasti.

Benigní diagnózy

Ve skupině dospělých pacientů byly zkoumány typy benigních diagnóz: chronická tonzilitida a OSAS. Ve skupině dětských pacientů byly pak benigními diagnózami adenoidní vegetace a OSAS. Pomocí metody real-time PCR byla provedena detailní genotypizace kmenů *Helicobacter pylori* ve tkáňových vzorcích benigních diagnóz u dospělých pacientů, což ukazuje graf 1.

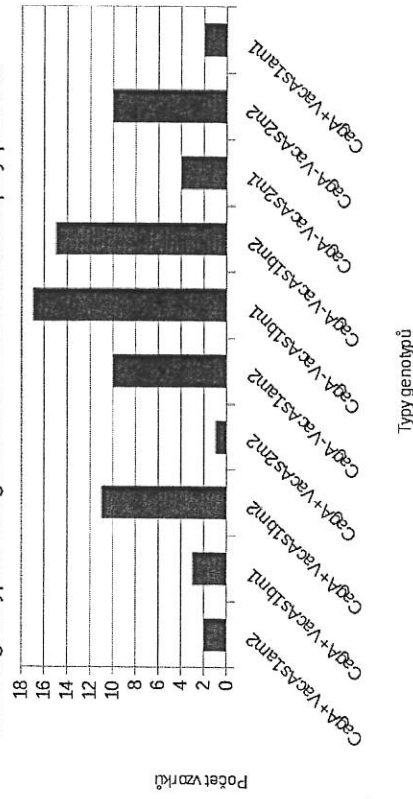


Graf 1: Přehled genotypů u benigních onemocnění dospělých skupiny pacientů

Z daného grafu vyplývá, že nejčastějším genotypem u benigního typu onemocnění (chronická tonzilitida a OSAS) u dospělých pacientů je genotyp CagA-VacAs1bm1 a genotyp CagA-VacAs1bm2, dalším nejčastějším genotypem u skupiny benigních onemocnění je genotyp CagA-

VacAs1am2. Tato analýza zjistila, že u benigních onemocnění dospělé skupiny pacientů převažuje VacA pozitivita nad CagA pozitivitou.

Přehled genotypů u benigních onemocnění dětské skupiny pacientů



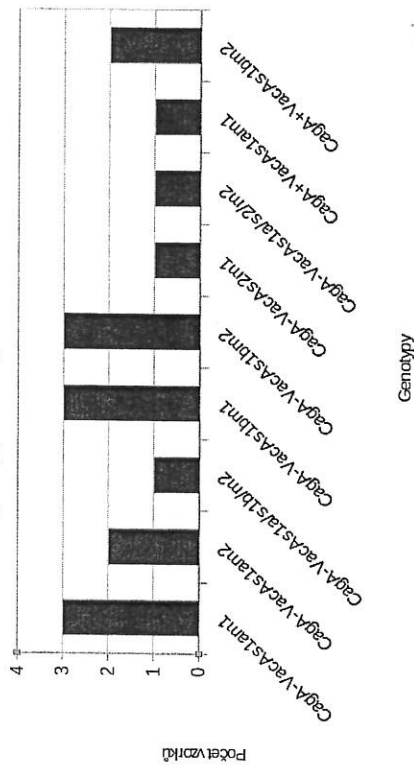
Graf 2: Přehled genotypů u benigních onemocnění dětské skupiny pacientů

Nejčastějším typem genotypu u dětské skupiny benigních onemocnění (adenoidní vegetace, OSAS) je genotyp CagA-VacAs1bm1, druhým nejčastějším pak genotyp CagA-VacAs1bm2. Lze tak říci, že u benigních onemocnění dětské skupiny opět převažuje pozitivita VacA genu nad CagA genem.

Maligní diagnózy

Do skupiny maligních onemocnění byly zařazeny tonzilární karcinomy (Lůkeš et al., 2014a). Nejčastějším typem genotypu u tonzilárního karcinomu byl genotyp CagA-VacAs1bm1, druhým nejčastějším pak genotyp CagA-VacAs1bm2, což znázorňuje graf Chyba: zdroj odkazu nenalezen. Stejně tak jako u skupiny benigních onemocnění, převažuje i zde pozitivita VacA genu.

Přehled genotypů u maligních onemocnění



Graf 3: Přehled genotypů *Helicobacter pylori* u tonzilárního karcinomu

Porovnání zastoupení *cagA* genů a *vacA* genů ve tkáni Waldeyerova lymfatického okruhu

Celkově převyšuje zastoupení *VacA* genotypů v PCR pozitivních vzorcích. Nejvíce pak u skupiny benigních onemocnění dospělých (90%), nejméně u skupiny karcinomu tonzily (15%).

Zhodnocení argumentu eradikace *Helicobacter pylori* v rámci výskytu *cagA* genu ve Waldeyerově lymfatickém okruhu

Hlavní otázkou kladenou v této části výsledků je, zda současný PCR průkaz a sérologický průkaz *Helicobacter pylori* u pacienta je argumentem k provedení eradikace.

K sérologické detekci (Lukeš et al., 2014a; Nártova et al., 2013) bylo použito z celkového počtu skupiny dospělých pacientů celkem 161 vzorků krve (83,42%). Protilátky *Helicobacter pylori* byly prokázány celkem u 104 pacientů (64,60%), u zbylého počtu pacientů (57), tedy 35,40%, sérologická pozitivita prokázána nebyla.

Při porovnání PCR diagnostiky a sérologické diagnostiky práce Lukeše et al. a Nártové et al. (Lukeš et al., 2014a; Nártova et al., 2013) popsaly, že celkem 63 PCR pozitivních vzorků bylo zároveň sérologicky pozitivních, 21 PCR pozitivních vzorků bylo sérologicky negativních, 41 PCR negativních vzorků bylo pozitivních sérologicky a 36 PCR negativních vzorků bylo rovněž sérologicky negativních.

K porovnání metod PCR a sérologie byl užit Chi-kvadrát test:

| | Ser + | Ser - | Suma |
|-------|-------|-------|------|
| PCR + | 63 | 21 | 84 |
| PCR - | 41 | 36 | 77 |
| Suma | 104 | 57 | 161 |

Tabulka 3: Porovnání PCR a serologie

Na základě χ^2 testu lze konstatovat, že PCR pozitivita HP ve vyšetřovaných vzorcích je statisticky významně rozdílná od sérologické pozitivitivity HP (statistický odhad $\chi^2=8,31$ je větší než kvantil). Hladina významnosti byla zvolena $p < 0,05$.

Vzhledem ke skutečnosti, že *CagA* gen se nachází ve tkáních Waldeyerova lymfatického okruhu v menší míře, neexistuje důkaz a z něj prokazatelně podložené doporučení k eradikaci daných pacientů. Otázkou eradikace je interpretace incidence *VacA* genu.

Pro jednotlivé typy genotypů byl spočítán počet vzorků tkáně chronické tonzilitidy a karcinomu tonzily. Na základě těchto hodnot byl vypočten Pearsonův korelační koeficient, který má hodnotu 0,59. Na základě této hodnoty lze říci, že nebyla zjištěna významná korelace mezi konkrétním typem genotypu a chronickým zánětem/karcinomem tonzily. ($R = 0,59$, úplná korelace = 1).

Kultivace byla odebrána u 45 dospělých pacientů (11 pacientů s karcinomem tonzily, 22 s chronickou tonzilitidou a 12 pacientů se SAS), z čehož byl HP prokázán pouze u 3 (6,67%).

5. Diskuse

Jedním z cílů disertační práce bylo prokázat možnou kolonizaci lymfatické tkáně Waldeyerova okruhu HP. Práce, zabývající se detekcí HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu vykazují rozdílné výsledky, jak ukazuje přehledná tabulka v úvodu. Detekce HP v orofaryngální lymfatické tkáni byla úspěšná v rozsahu 0-90% (Dowsett a Kowolik, 2003). Často užívanou invazivní metodou je RUT (rychlý ureázový test) a CLO test (campylobacter – like test). Tyto testy byly užity např. v práci Skinnera z roku 2001 (Skinner et al., 2001), který pomocí CLO testu detekoval z 50 vzorků tonzilární tkáně HP v 0% případech. Naopak Bitar prokázal v roce 2005 pozitivitu v adenodní tkáni v 84% případech (Bitar et al., 2005). Z metod neinvazivních jsme v našich pracích užili sérologický průkaz specifických protilátek HP (Lukeš et al., 2014b; Nártova et al., 2013). Obecně lze říci, že sérologická pozitivita nevyovídá o současně probíhající infekci HP a není určujícím faktorem pro zahájení antibiotické terapie HP (Testerman a Morris, 2014).

V našich pracích jsme jako hlavní detekční metodu užili metodu invazivní molekulární – PCR, resp. real-time PCR. Jedná se o metodu s nejvyšší senzitivitou a specificitou 100% (Testerman a Morris, 2014). V experimentech bylo užito mnoho variací PCR s detekcí 0-90% (Dowsett a Kowolik,

2003). Různorodost spočívala v užití odlišných typů primerů a sond k detekci různých segmentů DNA HP. Genotypizace umožňuje rozlišit přítomné geny HP, kódující virulentní faktory a rozlišit tak vysoce virulentní a méně virulentní kmeny (Pavlík et al., 2007). Diskrepance mezi publikovanými PCR výsledky pak ukazuje na důležitost výběru vhodné PCR assaye.

V souboru příložených prací jsme prokázali přítomnost DNA v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, resp. tonzilární a adenoidní tkáni. Prokázali jsme rovněž přítomnost vysoce virulentního cagA genu a méně virulentního vacA genu. Jednoznačně lze říci, že lymfatická tkáň Waldeyerova okruhu je extragastrickým rezervoárem HP. Toto tvrzení podporuje i práce Pavlíka z roku 2015 (Pavlík et al., 2015). Metodu PCR k detekci HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu užila ve svých pracích řada autorů, jejichž výsledky jsou v souladu či v rozporu s našimi daty. Přehled dosažených výsledků jednotlivých prací, založených na detekci HP ve Waldeyerově okruhu pomocí metody PCR ukazuje přehledně tabulka v úvodu.

Dizertační práce ukazuje na zvýšený výskyt méně virulentních genotypů HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, tedy genotypů cagA negativních, vacA pozitivních. Analýza genotypů HP v tonzilární tkáni u dospělých jedinců v dizertační práci ukazuje na zvýšený výskyt s1/m2 alel vacA genu a s1/m1 alel cagA genu. CagA gen byl nalezen pouze v malém počtu případech, v práci Lukeše v 5 tkáňových vzorcích, v práci Nártové v 17 tkáňových vzorcích. Tento nález vypovídá o tom, že méně virulentní kmeny HP mají v lymfatické tonzilární tkáni u dospělých jedinců v našich studiích dominanci. Naše data podporují vysokou senzitivitu a specifitu zvolené modifikace PCR metody. Rovněž podporují hypotézu, že HP je potenciálním etiologickým faktorem při patogenezi chronické tonzilitidy, neboť ve vzorcích detekovaných pacientů s touto diagnózou se ukázala vysoká přítomnost genotypů vacA s1/m1. Zajímavým faktem je přebytek cagA negativních genotypů v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, což vede k úvaze, že CagA protein, jakožto hlavní virulentní faktor v žaludku, nehraje v oblasti lymfatické tkáně orofaryngu a epifaryngu důležitou infekční roli. Naopak dlouhodobá kolonizace cagA negativními kmeny HP v této oblasti a tedy potenciální pomalá alterace imunitního systému může vést ke vzniku chronického zánětu a v pozdější fázi k iniciaci karcinogeneze. Tuto teorii popírá práce Aliakbari (Aliakbari et al., 2011), rovněž tak metaanalýza Hwanga z roku 2015 (Hwang et al., 2015).

Dle našich výsledků lze i adenotonzilární tkáň u dětí považovat za extragastrický rezervoár HP. V rámci tonzilárního karcinomu byl nejčastějším genotypem také s1/m1/ s1/m2, stejně jako u skupiny chronických tonzilitid. Tento fakt přispívá k úvaze vzájemného vztahu chronické tonzilitidy jako prekancerózy k malignímu onemocnění.

Naše práce si rovněž pokládá otázku významu eradikace u pacientů s nálezem HP v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu, zvláště pak u pacientů s chronickou tonzilitidou. I přes významně vyšší výskyt cagA negativních kmenů by eradikace mohla bránit rozvoji dalších patologií. Otázka prospěšnosti eradikace však plně doposud zodpovězená není a je třeba, aby byla předmětem dalších studií. Z ekonomického hlediska by antibiotická terapie byla mnohonásobně výhodnější, než

následná ORL - chirurgická a onkologická léčba pacientů. Je však nutno získat silnější data a podpořit je statisticky.

6. Závěry

Uložené cíle dizertační práce byly splněny.

Hypotéza č. 1 byla na základě výsledků potvrzena. DNA HP se nachází v lymfatické tkáni Waldeyerova okruhu u dospělých skupiny pacientů v 77,24% vzorků a u skupiny dětí v 94,94% vzorků. Výskyt tak lze považovat za vysoký.

Hypotéza č. 2, eradikace u pacientů s PCR pozitivitou a zároveň sérologickou pozitivitou je indikována, nebyla v našich pracích potvrzena, je předmětem dalších studií a nelze ji tedy přijmout.

Hypotéza č. 3, tedy otázka existence korelace mezi konkrétními typy genotypů a chronickým zánětem či maligním onemocněním lymfatické tkáně Waldeyerova okruhu, potvrzena nebyla.

7. Použitá literatura

- Aliakbari, I, Noohi, S, Safavi, SA, Tabrizi, AG, Bolfion, M, Razzaghi, M, Goudarzi, H, Dabiri, H. 2011. The role of adenotonsillar tissues as a reservoir for *Helicobacter pylori* and *Helicobacter hepaticus*. *Gastroenterol. Hepatol. from bed to bench* 4: 153–8.
- Bitar, MA, Soweid, A, Mahfouz, R, Zaatari, G, Fuleihan, N. 2005. Is *Helicobacter pylori* really present in the adenoids of children? *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 262: 987–92.
- Brown, LM. 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol. Rev.* 22: 283–297.
- Doom, L-J van. 2001. Detection of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1: 290–298.
- Dowsett, SA, Kowolik, MJ. 2003. Oral *Helicobacter pylori*: can we stomach it? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14: 226–33.
- Dzierżanowska-Fangrat, K, Lehours, P, Mégraud, F, Dzierżanowska, D. 2006. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11: 6–13.
- Höcker, M, Hohenberger, P. 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors—one part of a big picture. *Lancet* 362: 1231–3.
- Hwang, MS, Forman, SN, Kanter, JA, Friedman, M. 2015. Tonsillar *Helicobacter pylori* Colonization in Chronic Tonsillitis. *JAMA Otolaryngol. Neck Surg.* 141: 245.
- Ishihara, K, Miura, T, Kimizuka, R, Ebihara, Y, Mizuno, Y, Okuda, K. 1997. Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 355–61.
- Israel, DA, Peek, RM. 2001. Review article: Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15: 1271–1290.
- Katra, R, Kabelka, Z, Jurovcik, M, Hradsky, O, Kraus, J, Pavlik, E, Nartova, E, Lukes, P, Astl, J. 2014. Pilot study: Association between *Helicobacter pylori* in adenoid hyperplasia and reflux episodes detected by multiple intraluminal impedance in children. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 78: 1243–1249.
- Kocna, P. 2006. Dechové testy-moderní, neinvazivní diagnostika. *Interní Med.* 336–341.
- Kraus, J, Nartova, E, Pavlik, E, Katra, R, Sterzl, I, Astl, J. 2014. Prevalence of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar hypertrophy in children. *Acta Otolaryngol.* 134: 88–92.
- Lukeš, P, Pavlík, E, Potuzníková, B, Nartova, E, Foltynova, E, Plzak, J, Katra, R, Sterzl, I, Burtunkova, J, Betka, J, Astl, J. 2014a. Detection of *Helicobacter pylori* in oropharyngeal lymphatic tissue with real-time PCR and assessment of its carcinogenic potential. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 271: 399–405.
- Mégraud, F. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Baillieres. Clin. Gastroenterol.* 9: 507–18.
- Nártová, E, Kraus, J, Pavlík, E, Lukeš, P, Katra, R, Plzák, J, Kolářová, L, Sterzl, I, Betka, J, Astl, J. 2014. Presence of different genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*
- Olivares, D, Gisbert, JP. 2006. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 98: 374–86.
- Pavlík, E, Lukes, P, Potuzníková, B, Astl, J, Hrdá, P, Soucek, A, Matucha, P, Doseděl, J, Sterzl, I. 2007. *Helicobacter pylori* isolated from patients with tonsillar cancer or tonsillitis chronica could be of different genotype compared to isolates from gastrointestinal tract. *Folia Microbiol. (Praha).* 52: 91–4.
- Pavlik, E, Nartova, E, Astl, J, Dmkova, B, Lukes, P, Potuznikova, B, Katra, R, Kraus, J, Sterzl, I. 2015. Detection of *Helicobacter pylori* and Human Papillomavirus in Peroperative Tissue Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area. <http://www.sciencepublishinggroup.com> 3: 364.
- Qureshi, H, Ahmed, W, Zuberi, SJ, Kazi, J. 1992. Use of CLO test in the detection of *Helicobacter pylori* infection and its correlation with histologic gastritis. *J. Pak. Med. Assoc.* 42: 292–3.
- Skinner, LJ, Winter, DC, Curran, AJ, Barnes, C, Kennedy, S, Maguire, AJ, Charles, DA, Timon, CI, Burns, HP. 2001. *Helicobacter pylori* and tonsillectomy. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 26: 505–9
- Stromberg, E, Edebo, A, Svennerholm, AM, Lindholm, C. 2003. Decreased Epithelial Cytokine Responses in the Duodenal Mucosa of *Helicobacter pylori*-Infected Duodenal Ulcer Patients. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 10: 116–124.
- Testerman, TL, Morris, J. 2014. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J. Gastroenterol.* 20: 12781–808.

8. Seznam publikací

Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace s IF

1. Nártová, E., Kraus J., Pavlík E., Lukeš P., Katra, R., Plzák, J., Kolářová L., Šterzl I., Betka J., Astil J.: presence of different genotypes of Helicobacter pylori in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome, Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014, 271:607–613 (IF 1,458)
2. Lukeš P., Pavlík E., Potužníková B., Nártová E. et al.: Detection of Helicobacter pylori in oropharyngeal lymphatic tissue with real – time PCR and assessment of its carcinogenic potential, Eur Arch Otorhinolaryngol, 2014, 271:399–405 (IF 1,458)
3. Kraus, J., Nártová E., Pavlík E., Katra, R. et al.: Prevalence of Helicobacter pylori in adenotonsillar hypertrophy in children, Acta Otolaryngol, 2014, 134: 88-92 (IF 0,99)
4. Katra, R., Kabelka, Z., Jurovčík M., Hradský, O., Kraus, J., Pavlík, E., Nártová, E. et al.: Helicobacter pylori in adenoid hyperplasia and reflux episodes detected by multiple intraluminal impedance in children, Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2014, 78: 1243–1249 (IF 1,447)

Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace bez IF

1. Nártová E., Lukeš P., Pavlík E., Šterzl I., Astil J., Betka J., The presence of Helicobacter pylori in oropharynx and its influence to the gastric infection, Otorinolaryng. a Foniatr. (Prague), 58, 2009, č. 2, s. 97-101.
2. Lukeš P., Pavlík E., Potužníková B., Plzák J., Nártová E., Doseděl J., Katra R., Šterzl I., Betka J., Astil J.: Comparison of Helicobacter pylori genotypes obtained from the oropharynx and stomach of the same individuals - a pilot study, Prague Med Rep. 2012; 113(3):231-9.
3. Nártová, E., Astil, J., Lukeš, P., Katra, P., Pavlík, E., Betka, J.: Helicobacter pylori a jeho úloha v patogenezi a patologii orofaryngu a epifaryngu ve vztahu k ORL onemocněním, Otorinolaryng a Foniatr. (Prague), 61, 2012, č. 2, s. 120-129.
4. Pavlík, E., Nártová, E., Astil, J. et al.: Detection of Helicobacter pylori and Human Papillomavirus in Peroperative Tissue Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area, AJCEM (American Journal of Clinical and Experimental Medicine), 2015; 3(6): 364 – 367.