

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra biologických a lékařských věd



# *Helicobacter pylori* a aktuální poznatky

## v léčbě

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Mgr. Marcela Vejsová, Ph.D.

Vypracovala:

Amálie Hemmerová

Hradec Králové 2021

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým autorským dílem a nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu. Veškerá data, literaturu a ostatní zdroje, z nichž jsem informace čerpala, jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.“

V Hradci Králové, 2021

Amálie Hemmerová

## Abstrakt

Tato práce je zaměřená na patogenní *Helicobacter pylori*, která hraje důležitou roli v řadě onemocnění v oblasti gastroduodena. Cílem této práce je shrnout dosud známé informace týkající se *Helicobacter pylori* a uvést některé aktuální poznatky týkající se její léčby.

*Helicobacter pylori* je gramnegativní mikroaerofilní spirální tyč, která žije pod vrstvou sliznice v oblasti příznivého neutrálního pH a vyvolává zánětlivé změny na epitelu žaludeční stěny. Infikována je až polovina světové populace. Aby byla léčba úspěšná, je důležité nalézt vhodnou terapii. Donedávna byla první volbou standardní trojkombinace klarithromycin/metronidazol, amoxicilin a PPI. Její účinnost však byla ve většině zemí snížena na úroveň nižší, než je doporučená míra eradikace (< 80 %). Příčinou selhání byla rezistence na klarithromycin/metronidazol. Čtyřkombinace s bizmutem jsou ve většině zemích účinné. Jsou využívány jak k léčbě první volby, tak jako záchranná terapie po selhání standardní trojkombinace. 14denní čtyřkombinace s bizmutem byla doporučena i podle pokynů Maastricht V Florence Consensus Report 2016, Toronto Consensus Report 2016 a Kyoto Global Consensus.

Vysoké míry eradikace dosahuje použití vonoprazanu jako součást dvojkombinace (> 93,8 %) nebo součást trojkombinace (> 90 %). Nové studie dále zkoumají vysokodávkové dvojkombinace (93,5 %) a pětinasobné kombinace. Předmětem spousty studií je také účinnost terapie se současným podáním probiotik. Probiotika mají příznivý vliv na obnovení mikrobiomu a na minimalizaci vedlejších účinků, které jsou pravidlem během náročných terapií. Studie se často setkávají s pacienty, kteří v důsledku vedlejších účinků léčbu nedodrží.

Největší problém v léčbě představuje rezistence na antibiotika. Rezistence je regionálně variabilní. Ve většině zemí ale platí, že rezistence na klarithromycin, metronidazol a levofloxatin je vysoká. Nové strategie hledají antibiotika, která by se mohla stát jejich vhodnou náhradou. Nové možnosti jsou spatřované v použití rifabutinu, furazolidonu, sitafloxatinu nebo cefuroximu jako náhrada za amoxicilin u pacientů rezistentních na penicilin. Zanedbatelná je naopak rezistence na amoxicilin a tetracyklin.

## Abstract

This work is based on the pathogenic *Helicobacter pylori* which plays an important role in many gastroduodenum diseases. The aim of this work is summarizing the information of the *Helicobacter pylori* and presenting some actual knowledge of its treatment.

*Helicobacter pylori* is a gram-negative microaerophilic spiral bacillus that lives under the layer of mucosae, area of neutral pH, and it causes an inflammatory changes on gastric epithelium. Half of the population worldwide is infected. It is important to find a suitable therapy for successful treatment. Until recently the first-line treatment was the standard triple combination clarithromycin/metronidazole, amoxicilline and PPI. However the effectiveness of this combination has been reduced in the most countries to a level lower than recommended eradication rate (< 80 %). The cause of the failure was resistance to clarithromycin/metronidazole. Bismuth quadruple therapies are effective in the most countries. They are used as the first-line treatment and also as rescue therapy after failure of the standard triple therapy. Bismuth quadruple therapies were also recommended according to the instructions of the Maastricht V Florence Consensus Report 2016, Toronto Consensus Report 2016 and Kyoto Global Consensus.

The use of vonoprazane-based dual therapy (> 93,8 %) or vonoprazane-based triple therapy (> 90 %) achieves a high rate of eradication. The new studies further research high-dose dual therapy (93,5 %) and quintuple therapy. The effectiveness of the therapy with probiotics is also the subject of many studies. Probiotics have a beneficial effect on microbiome recovery and on minimizing side effects which are the rule during demanding therapies. Studies often have encounterpatients who do not adhere to treatment due to side effects.

The most important problem of treatment is an antibiotics resistance. Resistance is regionally variable. Resistance to clarithromycin, metronidazole and levofloxacin is high in the most countries. The new strategies are looking for an antibiotics which could be a suitable compensation. The new possibilities are seen in the using of rifabutin, furazolidone, sitafloxacin or cefuroxime as a compensation of amoxicilin for penicillin-

resistant patients. Resistance to amoxicillin and tetracycline is insignificant on the other hand.

#### KLÍČOVÁ SLOVA

*Helicobacter pylori*, léčba, rezistence, epidemiologie, gastritida

#### KEY WORDS

*Helicobacter pylori*, treatment, resistance, epidemiology, gastritis

Chtěla bych poděkovat paní Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D., vedoucí bakalářské práce, za odborné vedení, pomoc, nesmírnou trpělivost a cenné rady, které mi byly nápomocny při zpracování této práce.

## Seznam použitých zkratek

| <b>Zkratka</b> | <b>Význam zkratky / český význam</b>  |
|----------------|---|
| CD             | cluster of differentiation / znak lymfocytů   |
| CLO            | Campylobacter-like organism test / rychlý ureázový test   |
| DNA            | deoxyribonucleic acid / deoxyribonukleová kyselina  |
| ELISA          | enzyme-linked immunosorbent assay   |
| HCl            | <i>acidum hydrochloricum</i> / kyselina chlorovodíková  |
| HLA            | human leukocyte antigens / molekuly tkáňové slučitelnosti   |
| HSP            | heat shock protein / protein teplotního šoku  |
| IEL            | intraepithelial lymphocytes / intraepiteliální lymfocyty  |
| Ig             | Imunoglobulin   |
| IL             | interleukin   |
| IRUT           | imunologický rychlý ureázový test   |
| KA             | krevní agar   |
| MCH            | major histocompatibility complex / hlavní histokompatibilní systém                                  |
| NSAIDs         | non-steroid antiinflammatory drugs / nesteroidní protizánětlivé léky                                |
| PAF            | platelet activating factors / faktor aktivující destičky  |
| PAS            | Periodic acid Schiff / průkaz polysacharidů pomocí Schiffova činidla                                |
| PCR            | polymerase chain reaction / polymerázová řetězová reakce  |
| PPI            | proton-pump inhibitor / inhibitor protonové pumpy   |
| RFLP           | restriction fragment length polymorphism / variabilita v separovaných fragmentech                   |
| SDS-PAGE       | sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis / polyakrylamidový gelu s dodecylsulfátem |
| TCR            | T-cell receptor / T buněčný receptor  |
| TNF            | tumor necrosis factor / tumor nekrotizující faktor  |
| TSI            | Triple sugar iron agar / Hajnův agar  |
| WHO            | World Health Organization / Světová zdravotnická organizace   |

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt.....   | 3  |
| Abstract.....   | 4  |
| Seznam použitých zkratk.....  | 7  |
| 1. Úvod.....  | 8  |
| 2. Zadání – cíl práce.....  | 9  |
| 3. Teoretická část.....   | 10 |
| 3.1. Úvodní charakteristika.....                                    | 10 |
| 3.2. Taxonomie.....   | 11 |
| 3.2.1. Poddruhová identifikace (typizace).....                      | 12 |
| 3.3. Morfologie.....  | 14 |
| 3.4. Fyziologie.....  | 15 |
| 3.5. Epidemiologie.....   | 15 |
| 3.5.1. Prevalence.....  | 15 |
| 3.5.2. Kolonizace.....  | 16 |
| 3.5.3. Způsob nákazy.....   | 17 |
| 3.6. Klinický obraz onemocnění.....                                 | 18 |
| 3.6.1. Chronická gastritis.....                                     | 18 |
| 3.6.2. Intestinální metaplazie.....                                 | 20 |
| 3.6.3. Dysplazie.....   | 21 |
| 3.6.4. Duodenitis.....  | 21 |
| 3.6.5. Peptický žaludeční a duodenální vřed.....                    | 22 |
| 3.6.6. Karcinom žaludku.....  | 22 |
| 3.6.7. MALT lymfom.....   | 23 |
| 3.7. Patologie.....   | 23 |
| 3.7.1. Patogenita.....  | 23 |
| 3.7.2. Patogeneze.....  | 26 |
| 3.8. Imunologický obraz.....  | 27 |
| 3.8.1. Specifické protilátky.....                                   | 27 |
| 3.8.2. Praktické využití metod imunologického stanovení.....        | 28 |
| 3.8.3. Imunitní odpověď na infekci <i>Helicobacter pylori</i> ..... | 30 |
| 3.9. Laboratorní průkaz.....  | 30 |
| 3.9.1. Biopsie žaludeční sliznice.....                              | 30 |
| 3.9.2. Kartáčový stěr.....  | 31 |
| 3.9.3. Mikroskopické zhodnocení.....                                | 31 |



|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.9.4.  | Ureázový test .....                                   | 32 |
| 3.9.5.  | Kultivace .....                                       | 33 |
| 3.9.6.  | Histologie a cytologie .....                          | 35 |
| 3.9.7.  | Dechový test.....                                     | 36 |
| 3.9.8.  | Imunologický průkaz .....                             | 37 |
| 3.9.9.  | PCR .....   | 38 |
| 3.10.   | Rezistence na antibiotika .....                       | 39 |
| 3.11.   | Léčba .....   | 40 |
| 3.11.1. | Trojkombinace .....                                   | 40 |
| 3.11.2. | Čtyřkombinace .....                                   | 41 |
| 3.11.3. | Sekvenční a hybridní terapie.....                     | 42 |
| 3.12.   | Nové přístupy v léčbě.....                            | 43 |
| 3.12.1. | Dvojkombinace.....                                    | 43 |
| 3.12.2. | Vonoprazan .....                                      | 44 |
| 3.12.3. | Pětinásobná terapie .....                             | 45 |
| 3.12.4. | Probiotika .....                                      | 45 |
| 3.12.5. | Alternativní antibiotika v boji proti rezistenci..... | 46 |
| 3.12.6. | Ostatní strategie.....                                | 48 |
| 4.      | Diskuze .....   | 49 |
| 5.      | Závěr.....  | 51 |
|         | Seznam použité literatury .....                       | 52 |

## 1. Úvod

Objev *Helicobacter pylori* je v posledních 50 letech jedním z velkých objevů v odvětví gastroenterologie. Ve svém důsledku převratně změnil chápání mnoha nemocí a s tím spojenou prognózu pacientů.

Z jeho zkoumání již mnohokrát vyplynula souvislost s tzv. chronickou gastritidou typu B a je důležité vnímat *Helicobacter pylori* jako možnou příčinu i v případě zvratu chronických onemocnění do maligní formy. I přesto, že je vztah *Helicobacter pylori* k žaludeční dyspepsii, chronické gastritidě, peptickým vředům a žaludeční malignitě již hodně probádaný, je stále i po tolika letech předmětem studia a předpokladem pro stále nové objevy.

Během desítek let se nejrůznější odborníci snažili najít nejlepší cestu nejprve k léčbě samotných onemocnění, nebo dokonce jen dyspeptických příznaků, až po léčbu, která spočívá v úplné eradikaci mikroorganismu, čímž je rekonvalescence pacienta značně usnadněna. Jako nejvýhodnější terapeutický režim se časem ukázaly nejrůznější kombinace léčiv s PPI a bizmutem.

*Helicobacter pylori* je častým předmětem studia zejména z toho důvodu, že je jím infikována téměř polovina světové populace. Jsou sice státy, kde došlo během posledních let k výraznějšímu poklesu, ale jsou i státy, kde je procento infikovaných stále poměrně vysoké. Důvodem jsou recidivy a stoupající rezistence.

Rezistence se postupem času ukázala jako největší problém. Stala globálním problémem týkající se obecně antibakteriálních terapií a počet pacientů rezistentních na některá antibiotika stoupá. I přesto, že současné režimy léčby *Helicobacter pylori* poskytují příznivou míru eradikace, je stále nutné tyto režimy optimalizovat, aby se zabránilo rezistenci. Je proto důležité léčbu *Helicobacter pylori* pravidelně monitorovat a snažit se nacházet nejvhodnější řešení léčby.

## 2. Zadání – cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo shrnout poznatky týkající se *Helicobacter pylori*, které jsem při studiu jeho taxonomického zařazení, morfologických a fyziologických znaků, jeho roli v patologii a vybraných typů diagnostických stanovení nasbírala. Největší důraz je v této práci kladen na poznatky týkající se aktuální léčby *Helicobacter pylori*.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Úvodní charakteristika

*Helicobacter pylori* patří do rodu *Helicobacter*. Jedná se o mikroaerofilní, nefermentující a nesporulující gramnegativní tyčku. Je to bakterie se spirálovitým tvarem a s polárně umístěnými bičíky (1)(3)(5) běžně se vyskytující hlavně v žaludeční sliznici (2). Dokáže se velice snadno přizpůsobit hostitelským podmínkám (3). Proti kyselému žaludečnímu pH se brání štěpením močoviny přítomné v žaludku. Stojí za vznikem chronické gastritidy a peptické vředové choroby, přičemž se hovoří i o souvislostech s výskytem karcinomu žaludku (2)(3).

Původně byl celý rod pojmenován jako *Campylobacter*. Prvním objeveným zástupcem ze skupiny helikobakterů byl *Campylobacter pylori* (opravený latinský název z úplně původního *Campylobacter pyloridis*), dnes *Helicobacter pylori* (1)(6).

Tehdejší *Campylobacter pylori* byl izolován ze žaludeční sliznice v roce 1983 (1). Za jeho první úspěšnou kultivaci stojí (3) patolog Robin Warren a gastroenterolog Barry J. Marshall (7). Vzorek sliznice byl odebrán pacientovi s chronickou gastritidou, souvislost tohoto onemocnění s mikrobem se prokázala (3). Ukázalo se totiž, že ureáza je původem působení tohoto bakteriálního druhu, ne produktem buněk žaludeční sliznice, jak se původně předpokládalo (4). Do této doby se tedy existence jisté bakterie kolonizující žaludeční epitel předpokládala a také existovaly určité pokusy o její kultivaci (1975; Steer a Collin Jones), ale skončily bohužel neúspěšně, protože nebyly známy mikroaerofilní podmínky jejího růstu. Výsledkem takových kultivací se potom stávali pouze zástupci kontaminace agarů, například *Pseudomonas aeruginosa*, za které byl *Helicobacter pylori* tehdy mylně označován (7).

Nový rod *Helicobacter* byl vytvořen podle pozdější analýzy nukleových kyselin (3). Na základě stanovení sekvence 16S rRNA a dalších vlastností byl tak *Campylobacter pylori* z rodu *Campylobacter* roku 1989 přemístěn do rodu *Helicobacter* jako *Helicobacter pylori*. Toto rodové jméno bylo odvozeno od spirálního (tzv. helikoidálního) tvaru jeho těla (6).

V roce 2005 byla za objev *Helicobacter pylori* a stanovení jejího vlivu u gastritidy a peptické vředové choroby udělena Barrymu J. Marshallovi a Robinu Warrenovi Nobelova cena (2).

### 3.2. Taxonomie

V roce 1989 Goodwin a spol. uvedli pojmenování *Helicobacter* pro nový druh, kam byl zařazen *Helicobacter pylori*. Zajímavé objevy týkající se žaludečních onemocnění, které přicházely s *Helicobacter pylori*, pobízely k hledání nových druhů spirálních mikroaerofilních bakterií v lidském i zvířecím těle. Objevené druhy se vyskytovaly kromě žaludku člověka také v žaludku koček, psů, fretek, opic a prasat. Všechny se vyskytovaly v hlenové vrstvě a všechny bylo obtížné vykultivovat, ale s vývojem novějších a v diagnostice bakterií přesnějších laboratorních metod docházelo k novým objevům dalších zástupců rodu *Helicobacter*. Již objevení zástupci i jejich zdroj výskytu jsou shrnuti v následující tabulce (viz. tabulka č. 3) (7):

**Tabulka č. 3 Zástupci rodu *Helicobacter* a jejich zdroj výskytu**

| <b>Rod <i>Helicobacter</i></b>           |   |
|--|---|
| <b>Druh</b>                              | <b>Přirozený hostitel</b>                         |
| <i>Helicobacter pylori</i>               | Člověk, vepř, primáti, kočka (žaludeční sliznice) |
| <i>Helicobacter mustelae</i>             | Fretka (žaludeční sliznice)                       |
| <i>Helicobacter felis</i>                | Kočka (žaludeční sliznice)                        |
| <i>Helicobacter nemestrinae</i>          | Makak (žaludeční sliznice)                        |
| <i>Helicobacter cinaedi</i>              | Člověk (střevo)                                   |
| <i>Helicobacter fennelliae</i>           | Člověk (střevo)                                   |
| <i>Helicobacter Heilmannii</i> typ 1 a 2 | Člověk (žaludeční sliznice)                       |
| <i>Gastrospirillum suis</i>              | Vepř (žaludeční sliznice)                         |
| <i>Helicobacter muridarum</i>            | Myš   |
| <i>Helicobacter bilis</i>                | Myš (střevo)                                      |
| <i>Helicobacter hepaticus</i>            | Myš (střevo)                                      |
| <i>Helicobacter acinomyx</i>             | Gepard asijský                                    |
| <i>Helicobacter Bizzozero</i>            | Pes   |

Zdroj: Sedláčková a kol. (7), 1996 (převzato; str. 40)

*Helicobacter pylori* byl zachycen v žaludeční sliznici opic a je zcela identický s druhem izolovaný ze sliznice člověka. Dále byl objeven i ve slinách a žaludeční šťávě koček (7).

U lidí došlo k nálezům *Helicobacter cinaedii* a *Helicobacter fennelliae* (8), opět druhy v minulosti součástí rodu *Campylobacter*. Izolace byla provedena z krve, stolice a z rektálních výtěrů, tj. především u homosexuálních jedinců (7).

Významným zástupcem hned po *Helicobacter pylori* je *Helicobacter heilmannii* (původně *Gastrospirillum hominis*). Byl poprvé popsán v roce 1989 v souvislosti s chronickou gastritidou. Izolace byla provedena u lidí i u zvířat (koček a psů). U lidí se ale vyskytuje méně často než *Helicobacter pylori* (3). Je snadno pozorovatelný mikroskopicky v žaludeční sliznici, protože má výraznou typickou morfologii těla (7), tj. 7 pravidelných spirál (vícenásobné závitky podobné vývrtce), která se nápadně odlišuje od jiných zástupců rodů *Helicobacter* i *Campylobacter* (7)(8). Je dlouhý 8-10  $\mu\text{m}$ , široký 0,65-0,9  $\mu\text{m}$  a jeho spirálovité tělo se vřetenovitě rozšiřuje směrem do středu. Má bipolární trsy s přibližně 12 bičíky kyjovitého tvaru, které jsou obaleny pochvou. Shoduje se v produkci ureázy a jeho nálezy na sliznici je charakteru ložisek. Nachází se v hlenové vrstvě a ve foveolech. Stejně jako *Helicobacter pylori* je původcem chronické gastritidy, avšak s odlišnou závažností (3)(4). *Helicobacter heilmannii* se barví slabě hematoxylinem-eosinem, v Gramově barvení je negativní. Výrazná je naopak v barvení dle Giemsy a dle Warthina a Starryho (7).

Ostatní zástupci osidlují například sliznici žaludku fretek. Tento zástupce má podobnou spirální strukturu těla jako *Helicobacter pylori*, ne však stejnou taxonomii. Jedná se o *Helicobacter mustelae*. *Helicobacter felis*, opět velice odlišná, byla izolována ze žaludeční sliznice koček. Mezi novější zástupce patří *Helicobacter hepaticus* a *Helicobacter bilis* izolované u myší. Oba u nich zapříčiňují vznik hepatitidy (7).

### 3.2.1. Poddruhová identifikace (typizace)

Poddruhová identifikace (typizace) je důležitá v případě, že byla zjištěna reinfekce pacienta jiným nebo stejným kmenem a je potřeba si domněnku ověřit. Typizace se využívá i ke srovnání kmenů izolovaných z odlišných míst (sliznice žaludku, sliny, stolice) a k epidemiologickým studiím. Jednotlivé druhy *Helicobacter* nejsou biochemicky příliš variabilní, proto se používá porovnání genomu. Molekulární diagnostika vychází z odlišností v genových produktech a sekvencích bakteriální DNA. K diagnostice se využívají *in vitro* namnožené buňky (7).

### **Srovnání proteinových profilů**

Proteiny se získají extrakcí roztokem sodium-dodecyl sulfátu, merkaptoetanolu a glycerolu a následně jsou odděleny v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem (SDS-PAGE) pomocí elektroforézy. Místa na gelu s přítomností proteinů jsou obarvena a na základě velikosti obarvené plochy, její polohy na gelu a porovnáním s tabulkovými hodnotami lze stanovit jejich molekulovou hmotnost.

Bylo rozeznáno kolem 30 různých proteinů (7 proteinů je společných pro celý bakteriální kmen, ostatní jsou charakteristické pro konkrétního zástupce).

Tato technika obvykle využívá i značení pomocí protilátek jako tzv. imunoblotová metoda (7).

### **Molekulární diagnostika na podkladě analýzy nukleových kyselin**

Základem metody jsou *in vitro* namnožené bakteriální buňky, ze kterých je získána DNA, která se dále porovnává. Pomocí ní se dají určit jednotlivé bakteriální druhy a kmeny (7).

### **Chromozomální restrikční analýza**

Principem je rozštěpení řetězce nukleových kyselin restrikčními nukleázami a následné porovnávání počtu a velikosti nově vzniklých fragmentů. Po enzymovém štěpení následuje separace jednotlivých fragmentů v agarovém gelu za pomoci elektroforézy. Fragmenty se obarví ethidium bromidem. Každý kmen se potom liší v počtu a velikosti separovaných fragmentů. Pojem RFLP (restriction fragment length polymorphism) se označuje variabilita v separovaných fragmentech (7).

### **Ribotypizace**

Tento typ metody je v bakteriologii značně využíván. Zasloužil se dokonce i o klasifikaci a identifikaci helikobakterů. Principem metody je srovnání fragmentů DNA kódující geny pro 16S a 23S rRNA. Lze ji kombinovat i s hybridizací (7).

### 3.3. Morfologie

*Helicobacter pylori* tvoří až 3 µm dlouhé tyčky ve tvaru spirály, uvádí se také, že mohou mít podobu písmen V a Y (1)(3)(4). Vzhled se dost vzdaluje od rodu *Campylobacter*, ke kterému byl helikobakter dříve řazen. Je mnohem robustnější a má svůj charakteristický vzhled. Někteřími zdroji je připodobňován k tvaru letícího ptáka (8). Na svém obvodu jsou tyčky široké 0,5-1,0 µm (4). Dle Gramova barvení jde o gramnegativní bakterii (7).

*Helicobacter pylori* je pohyblivá bakterie díky svazku 4-6 bičíků umístěných na jednom pólu buňky (2)(7), tzv. unipolárně umístěnými (7). V elektronovém mikroskopu je patrné, že bičíky mají na svém povrchu obal, který postupně přechází a tvoří vnější membránu buněčné stěny. Každý bičík je na svém konci paličkovitě rozšířen (3).

Kultury, které byly vystaveny vlivu kyslíku nebo nízkých teplot, přechází do kokoidních forem. Tento přechod je závislý tvarem bakterie do písmene U nebo V, kdy se nejprve odloučí membrána a oba konce se odhalenou cytoplasmatickou částí za současného působení denzních granul obou ramének spojí. Ohnutím bakterie a odloučením membrány za vzniku kokoidní formy se bakterie přizpůsobuje nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí. V tuto formu se mění například při vzniku adenokarcinomu a v okolí vředu. Je pravděpodobné, že stejným mechanismem může bakterie reagovat i na působení antibiotik a stávat se tak vůči nim rezistentní (5)(7).

Světelný mikroskop kokoidní formy umožňuje vidět spolu s aktivní formou bakterie. Jsou to kulaté nebo oválné elementy s průměrem větším, než byla šíře samotné bakterie a menším než spóry hub (7).

Mnohem lépe je lze odlišit kokoidní formy v elektronovém mikroskopu a pomocí imunohistochemických barvení (inkubace s protilátkami proti *Helicobacter pylori*). Jsou náročné na kultivaci, rostou pouze na speciálních půdách s přídavkem krve, heminu, aktivního uhlí, na čokoládovém agaru. Kultivace je pomalá a nárůst kolonií trvá několik dní (5)(7).



### 3.4. Fyziologie

Nejdůležitější vlastností *Helicobacter pylori* je výrazná produkce ureázy (1). Tato ureáza je stokrát více aktivní než ureáza např. *Proteus vulgaris* (4). Ureáza katalyzuje hydrolýzu močoviny (běžně se vyskytující v žaludeční sliznici) na kationt amonný a hydrogenuhličitanový aniont. Této vlastnosti se využívá v ureázovém testu k diagnostice této bakterie (1).

*Helicobacter pylori* neumí fermentovat ani oxidovat sacharidy. Všechny kmeny tvoří alkalickou fosfatázu, desoxyribonukleázu, leucin-aminopeptidázu, esterázy a malé množství sirovodíku (3)(8). Průkaz sirovodíku na TSI agaru nelze provést, *Helicobacter pylori* je pozitivní papírkovou metodou s octanem olovnatým (8). Dále pak produkuje oxidázu a katalázu (1), čehož lze také využít k jeho průkazu (1)(2). K jeho biochemickým vlastnostem patří pozitivní test na kyselou fosfatázu, leucin a negativní hydrolýzu hipurátu, redukci nitrátů, utilizaci karbohydrátů, produkci indolu, hydrolýzu inoxylacetátu (7)(8).

*Helicobacter pylori* neroste v běžné atmosféře, potřebuje ke svému přežití mikroaerofilní podmínky. Vhodná teplota se pohybuje v rozmezí 25-42 °C, pH od 6,9 do 8,5 (optimum 6,9-8,0) (7).

Lipopolysacharidy ve stěně bakterií mají určité antigenní vlastnosti, které využíváme k serologickým metodám průkazu (3). Součástí buněčné stěny jsou kyselina myristová, palmitová, stearová, olejová, linolová, beta-hydroxypalmitová, beta-hydroxystearová. Proteiny a nukleové kyseliny jsou výrazně variabilní a toho využívají některé metody k typizaci (7).

### 3.5. Epidemiologie

#### 3.5.1. Prevalence

Prevalence infekce *Helicobacter pylori* a věk nakažení jedinců nejsou ve všech částech světa stejné. Dokonce se v různých částech světa a různých typech populací liší značnou mírou. Ve vyšetřované skupině lidí záleží na jejich socio-ekonomickém stavu, který zvyšuje míru prevalence zejména jedinců nižší věkové kategorie (7). Nejvyšší míru

výskytu infekce mají populace méně rozvinutých zemí (6). Procento nakažení stoupá také s věkem člověka (4). Je nakaženo okolo poloviny světové populace, v rozvinutých zemích údaje dosahují až 80 % (12). Údaje z roku 2015 odhadují infikovanost celosvětové populace na 4,4 mld. obyvatel (13).

Ve vyvinutých zemích je prevalence zhruba 20 % kolonizovaných jedinců do 40 let a 50 % nad 60 let (7). U dětí je v této populaci výskyt infekce nízký (4).

Jinak tomu je v populaci třetího světa, kdy procento infikovaných stoupá již od raného dětství, velká část v pubertě (4). Na rozdíl od vyvinutých zemí objevujeme infekci již u dětí ve věku 2 let a se stoupajícím věkem křivka rychle roste a už kolem 20. roku dosahuje prevalence opravdu vysokých hodnot, okolo 80-90 % (7).

Porovnáme-li některé kontinenty, nejvyšší prevalence je v Africe (79,1 %), Jižní Americe (63,4 %) a Asii (54,7 %). V Severní Americe (37,1 %) a Oceánii (24,4 %) silně klesá. Analýza tohoto zdroje porovnává hodnoty v letech 1970-1999 s výsledky studií z let 2000-2016. Na přelomu století klesla prevalence ve vyspělých zemích, naproti tomu hodnoty z rozvojových států se téměř nezměnily. S tím souvisí i rozdíly, které nastaly v prevalenci výskytu peptických vředů a karcinomu žaludku. Prevalence kolonizovaných jedinců klesla na přelomu století v Evropě (z 48,8 % na 39,8 %), v Severní Americe (42,7 %/26,6 %) a v Oceánii (26,6 %/ 18,7 %). V Asii (53,6 %/ 54,3 %) a v Jižní Americe (62,8 %/ 60,2 %) rozdíl není patrný téměř žádný. Tento zdroj rovněž udává, že nejnižší výskyt zachytil ve Švýcarsku (18,9 %) a nejvyšší v Nigérii (87,7 %), podobně potom v Portugalsku (86,4 %) (13).

### 3.5.2. Kolonizace

*Helicobacter pylori* osidluje dutinu ústní, různé části žaludku (nejčastěji horní část) a duodena (6). V dutině ústní se může vyskytovat i pouze přechodně. Je tomu například při zvracení, regurgitaci, gastroezofageálním refluxu apod. (5)(7).

*Helicobacter pylori* je patogenní pouze pro člověka (3). Až 80 % populace kolonizované *H. pylori* nemá klinické příznaky poukazující na přítomnost bakterií, pouze se u nich může vyskytovat mírný zánět žaludku (6)(8). Zánět se ale může již snadno rozvinout do vzniku žaludečních a duodenálních vředů, popř. až do vzniku karcinomu žaludku (6). Vyskytuje se téměř u 100 % případů s vředovým onemocněním (3).

### 3.5.3. Způsob nákazy

Uvádí se tři možné zdroje infekce *Helicobacter pylori*, tedy přenos z člověka, ze zvířat a životního prostředí (7). Inkubační doba infekce je přibližně 1 týden (8).

Cestou infekce je oro-orální přenos. Zaznamenána byla v minulosti například perorální infekce pHmetrickými sondami, endoskopy, bioptickými kleštěmi, popř. jinými nástroji. Největším pokrokem v roce 1993 (Fergusson) se stala kultivace *Helicobacter pylori* ze slin. Až s rozvojem molekulární biologie, kdy byla umožněna detekce bakteriální DNA, jsou u pacientů potvrzené důkazy o přítomnosti mikroba v dutině ústní, hlavně v zubním povlaku a tkáních při periodontitidě (1993; Nguyen a spol. a Mapson). Dále v roce 1994 (Vincent a spol.) byl pomocí DNA typizace tento způsob přenosu infekce mezi lidmi prokázán také v ústavech pro mentálně postižené děti. Jednalo se o jednoznačný průkaz, že se riziko infekce zvyšuje v prostředí s horšími hygienickými návyky (7). V jiné studii (1990; Mégraud) byl přenos infekce prokázán v rodině, mezi matkou a dítětem (8).

*Helicobacter pylori* můžeme nalézt i ve stolici a může být přímou i nepřímou cestou infekce. Tento způsob přenosu je tzv. feko-orální cestou. Kultivace ze stolice je velice náročná, protože kolonie jsou přerůstány jinými druhy bakterií. Až s příchodem metod molekulární biologie byla detekce *Helicobacter pylori* jednoznačnější (7). Přenos infekce je v rámci feko-orálního přenosu zprostředkován pomocí kokoidních forem bakterie, které jsou rezistentnější k nepříznivým vnějším vlivům (1)(3).

Ať už jde o oro-orální cestu přenosu nebo feko-orální, nejčastěji se nákaza objevuje v rodinách, v kolektivech, ale i u lékařů a zdravotních pracovníků (8).

Dále bylo testováno, zda může být zdroj infekce i součástí životního prostředí. V rámci experimentálního průkazu se ho podařilo v laboratorních podmínkách vykultivovat z vodního prostředí. PCR metoda potom ukázala, že bakterie je schopna existovat jak v odpadní vodě, tak ve studních několik dní až měsíců, a to v podobě kokoidní formy. S tím souvisí nepřímý feko-orální přenos infekce v některých oblastech světa, kde jsou zdroje vody kontaminovány touto bakterií. Je to důkaz, že špatné hygienické podmínky v některých oblastech světa stojí za vysokou prevalencí této infekce (7).

### 3.6. Klinický obraz onemocnění

Zda bude či nebude přítomná i chronická gastritida současně s infekcí *Helicobacter pylori*, o tom rozhoduje kombinace několika faktorů. Týká se to jednak míry poškození žaludeční sliznice, a jednak kombinace poruch motility a sekrece gastrointestinálního traktu. V závislosti na závažnostech těchto faktorů poté dochází nebo nedochází k rozvoji chronické gastritidy. Zároveň se od tohoto stavu odvíjí i míra symptomatických příznaků žaludeční dyspepsie. Významnou roli hraje dále lokalizace zánětu, trvání zánětu v čase, genetická predispozice daného bakteriálního kmene a intenzita jeho agrese (8).

#### 3.6.1. Chronická gastritis

Chronická gastritis je různorodá skupina zánětlivých změn různého typu, různé etiologie a s odlišnou lokací. Primárně postihuje sliznici a postupuje směrem do hlubších vrstev stěny žaludku. Makroskopicky se tyto změny většinou vůbec neprojevují a nekorelují se současnými histologickými nálezy (7). V endoskopickém vyšetření může ale nálezu gastritidy značit zarudlá, edematózní a křehká žaludeční sliznice (8).

Jednotlivé morfologické formy chronické gastritidy lze mikroskopicky rozlišit na základě rozsahu a typu zánětlivých změn, které probíhají v žaludeční sliznici (7). Takto se rozlišují 2 základní formy:

**Chronická povrchová gastritis** (*gastritis chronica superficialis, foveolaris*) je charakteristická lymfoplazmocytární zánětlivou infiltrací sliznice v místě foveol a krčků žláz. Na povrchu a ve foveolárním epitelu dochází k regresivním změnám (úbytek až ztráta hlenu), poškození buněk vede až k jejich zániku. Regenerační zóna epitelu v krčku žláz se projevuje zvýšenou mitotickou aktivitou a foveoly se prodlužují. (7).

**Chronická hluboká gastritis** (*gastritis chronica profunda*) se vyznačuje zánětlivým infiltrátem na celém průřezu sliznice včetně zóny žláz (7).

Zánětlivých změn účastní i neutrofilní leukocyty prostupující epitelem, stěnou foveol i krčků žláz. Takovou změnu popisujeme jako chronickou aktivní gastritidu. Zánětlivý infiltrát bez polynukleárů naopak označujeme jako chronickou neaktivní gastritidu (7).

S prodlužujícím se trváním onemocnění a se stupňující se atrofií sliznice se chronická gastritis postupně stává chronickou atrofickou gastritis. Sliznice se ztenčuje a *muscularis mucosae* se zvětšuje na troj až čtyřnásobek své původní šířky, snižuje se i množství žlázek. K atrofii dochází spíše z nedostatečné obnovy tkáně než z nadměrného poškození zánětem. Další postup atrofie spěje k intestinální metaplazii (7).

Na základě rozdílné etiologie a lokalizace jednotlivých forem gastritid bylo vypracované (podle Applemana; 1994) toto klasifikační rozdělení (viz. tabulka č. 1) (7).

**Tabulka č. 1 Klasifikační rozdělení gastritid podle Applemana**

|    | Název typu gastritidy            | Dodatky k názvu  |
|----|----------------------------------|--|
| 1. | Bakteriální gastritis            | Typ B (difuzní antrální H. pylori-pozitivní gastritis) |
| 2. | Autoimunitní gastritis           | Typ A (difuzní atrofická autoimunitní gastritis)       |
| 3. | Chemická gastropatie             | Chronická gastritis C                                  |
| 4. | Multifokální atrofická gastritis | Podobná enteritidě při glutenové enteropatii           |
| 5. | Lymfocytární gastritis           |  |
| 6. | Ložisková gastritis              |  |
| 7. | Granulomatózní gastritis         |  |
| 8. | Crohnova choroba žaludku         |  |
| 9. | Eosinofilní gastritis            |  |

Zdroj: Sedláčková a kol. (7), 1996 (převzato; str. 22)

Nejčastější formou chronického zánětu žaludeční sliznice je chronická gastritis vyvolaná *Helicobacter pylori*, tedy **chronická difuzní antrální gastritis**. *Helicobacter pylori* je sice možné identifikovat běžnou barvicí metodu hematoxylin-eosin, mnohem jistější je však užití některé ze speciálních metod, barvení dle Giemsy nebo impregnace dle Warthin-Starry. Pomocí této metody lze odlišit velice snadno i druh *Helicobacter heilmannii*. Je přítomna samostatně nebo současně s výskytem *Helicobacter pylori*, přičemž je jejich současná přítomnost provázána horší formou zánětu (7).

*Helicobacter pylori* má afinitu ke sliznici v *antrum pylori* a v případě neléčení postupuje infekce i do těla a fundu (8). Často dochází i ke kolonizaci kardiie žaludku, výjimečně ji zachycujeme v Barretově sliznici jícnu. Pro nestejnou kolonizaci a pro dobrou typizaci zánětlivých změn na sliznici během histologického hodnocení je doporučeno odebírat z antra nejméně dva biopáty navíc s odlišnou lokalizací (7).

Morfologický obraz sliznice má nejčastěji povahu chronické aktivní gastritidy. Postihnout může povrch i celou šířku sliznice a často se v ní mohou vyskytovat i

lymfatické folikuly. Dlouhotrvající zánětlivé procesy jsou následované atrofií sliznice a intestinální metaplazií. (7).

Diagnóza této formy gastritidy se stanovuje nejen na základě typu zánětlivých změn, ale i podle jejich intenzity. Toto hodnocení bylo stanoveno mezinárodní komisí v Sydney (1991) a vyžaduje výsledky z 5 histologických nálezů, které jsou uvedeny v následující tabulce (viz. tabulka č. 2). Jde o tzv. Grading chronické gastritidy a jeho používání v praxi zabraňuje výraznějším rozdílům v individuální interpretaci nálezů (7)(8).

**Tabulka č. 2 Grading histologických změn u chronické gastritidy**

| Histologický nález             | Definice  | Grading   |
|--------------------------------|---|---|
| Chronická zánětlivá infiltrace | Infiltrace <i>lamina propria mucosae</i> lymfocyty a plasmatickými buňkami          | Mírná/střední/těžká   |
| Aktivita                       | Infiltrace <i>lamina propria mucosae</i> , jamek a povrchového epitelu polynukleáry | Mírná: < 1/3 jamek<br>Střední: 1/3-2/3 jamek<br>Těžká: > 2/3 jamek  |
| Atrofie                        | Redukce specializovaných žlázek antra/corpu   | Mírná/střední/těžká   |
| Intestinální metaplazie        | Intestinální metaplazie ve foveolech, žlázkách nebo v povrchovém epitelu            | Mírná: < 1/3 sliznice<br>Střední: 1/3-2/3 sliznice<br>Těžká: > 2/3 sliznice   |
| <i>Helicobacter pylori</i>     | hustota   | Mírná: nehojné, bakterie na < 1/3 povrchu<br>Střední: mezi mírným a těžkým stupněm<br>Těžká: souvislá vrstva, bakterie na > 2/3 povrchu |

Zdroj: Sedláčková a kol. (7), 1996 (převzato; str. 24)

### 3.6.2. Intestinální metaplazie

K intestinální metaplazii dochází vlivem nedokonalé nebo anormální regenerace, jejímž následkem je vznik epitelu intestinálního typu na místě původního epitelu žaludeční sliznice. Podle stupně diferenciace máme intestinální metaplazii kompletní a nekompletní (7):

**Kompletní intestinální metaplazie** vypadá naprosto stejně jako sliznice tenkého střeva. Pohárkové buňky jsou pozitivní v PAS průkazu díky produkci neutrálních mucinů a v alcianové modři díky kyselým mucinům (7).

**Nekompletní intestinální metaplazie** je formou, při které dochází k náhradě absorpčních buněk hlenovými, buňky ztrácí kartáčový lem a produkují kyselé muciny. Lehčí forma se dokazuje sialomuciny cylindrických buněk alciánovou modří při pH 2,5, těžší forma je průkazná na sulfomuciny také alciánovou modří, ale při pH 0,5 (7).

### 3.6.3. Dysplazie

Histologicky se dysplazie projevuje buněčnými a strukturálními změnami foveol a žlázek. Vzniká jak z normální, tak už z metaplastické podoby žaludeční sliznice. (7).

**Mírné dysplastické změny.** Změny v buňkách dosahují pouze nízkého stupně (jádra zůstávají uložena při bázi buněk, jsou zvětšená, protažená, s lehkou polymorfií a stratifikací). Změny se podobají změnám během zánětlivého procesu. U 60-70 % dochází k regeneraci (7).

**Střední dysplastické změny** jsou výraznější s jádry ve středu buňky a výraznou stratifikací. Regenerace u 30-60 % případů. (7).

**Těžkou dysplazii** charakterizují výrazné strukturální změny. Jádra epitelových buněk jsou velká, široká a hyperchromní a jsou posunuta k okraji buňky směrem k povrchu sliznice. Výrazně deformované a větvené jsou foveoly. Tato forma dysplazie je riziková v přechodu do karcinomu (20-80 %) (7).

### 3.6.4. Duodenitis

Duodenitis představuje zánětlivé stavy sliznice duodena, které nejvíce postihují ty oblasti, které jsou pod účinkem žaludečních šťáv. Často provází právě i chronickou *H. pylori*-pozitivní gastritidu. Nejčastěji zánět postihuje velké ohbí a zadní stěnu bulbu, méně častěji i distální část duodena. (7).

**Akutní duodenitis** charakterizují výskyty hyperemií a edému slizničního stromatu s mírným rozšířením do klků. Mohou se vyskytovat i drobné hemoragie nebo povrchové eroze. (7).

**Chronickou duodenitis** z mikroskopického hlediska dělíme podle míry zánětlivého procesu do 3 stupňů (7): Stupeň I. (12-28 % pacientů) je typický pro nápadně kulaté buňky a normálně dlouhé buňky se ztlustělými klky, neutrofily chybí. Je bez klinických

příznaků. Stupeň II. má výraznější kulatobuněčnou sliznici, krátké ztluštělé klky a obsahuje infiltrát s leukocyty (v epitelu a ve stěně krypt). Tato forma se typicky vyskytuje okolo peptického vředu. Stupeň III. je těžkou formou zánětu (deformace struktur duodenální sliznice, která může přejít až do úplného vymizení nebo přechodu v žaludeční metaplazii), s hutnějším smíšeným zánětlivým infiltrátem.

**Žaludeční** (gastrická, pylorická) **metaplazie** představuje vznik cylindrických buněk obsahující neutrální hlen jako náhrada za, ve střevní sliznici původní, pohárkové a absorpční buňky. Zachovávají krypty a žlásky (7).

### 3.6.5. Peptický žaludeční a duodenální vřed

Peptický vřed je označován za multifaktoriální onemocnění a kolonizace *Helicobacter pylori* způsobující na sliznici zánětlivé změny sama o sobě vznik vředu nezpůsobuje, ale má na jeho vzniku významný podíl (8). V žaludku je nejčastěji postiženo malé zakřivení, méně potom kardie. V duodenu je cílem bulbus. V patogenezi peptického vředu hrají významnou roli zejména tyto dva faktory: porušená rezistence sliznice a současné působení žaludeční šťávy (7).

**Akutní peptický vřed.** V počáteční fázi proniká pouze do submukózy, postupně ale dosahuje celé stěny. Spodinu tvoří nekrotická tkáň se zánětlivou infiltrací s příměsí leukocytů. Akutní peptický vřed může být regenerován (7).

**Chronický peptický vřed** se vyznačuje vyvýšenými okraji. Na spodině je fibrinoidní nekróza a na jejím povrchu leukocytární exudát. Směrem do hloubky pokračuje granuláční tkáň a jizevné vazivo. (7).

### 3.6.6. Karcinom žaludku

Během vývoje karcinomu se uplatňuje hned několik změn (přítomnost chronické atrofické gastritidy s nekompletní intestinální metaplazií III. typu / s dysplazií metaplastického typu), na jejichž podkladě se karcinom vyvíjí. U populace s častým výskytem *Helicobacter pylori* byla zachycena zároveň opakující se incidence karcinomu žaludku (7). Sám *Helicobacter pylori* není příčinou vzniku karcinomu, karcinom je pouze další fází rozvíjející se z *H. pylori*- pozitivní gastritis (8).



### 3.6.7. MALT lymfom

Přítomnost lymfatických folikulů během gastritidy způsobuje současná přítomnost společných epitopů *Helicobacter pylori* a sliznice žaludku a tvorba autoprotilátek. Malignita MALT je obvykle nízkého stupně, může ovšem přecházet i do těžkých forem (7).

## 3.7. Patologie

### 3.7.1. Patogenita

**Patogenita** je schopnost bakterie vyvolat onemocnění. Mírou patogenity se potom označuje **virulence** daného bakteriálního kmene (7). **Faktory patogenity** *Helicobacter pylori* jsou navázány přímo na tělo mikroba nebo jsou tvořeny jeho extracelulárními produkty (enzymy, toxiny, faktory ovlivňující produkci hostitelských buněk). Virulence se u každého kmene liší zastoupením faktorů a jejich kvantitou (3)(5)(8). Virulence kmene je také ovlivněna aktuálním prostředím jako je pH, koncentrace močoviny a účast imunitního systému pacienta (7).

Na povrch těla *Helicobacter pylori* jsou navázané adheziny, lipopolysacharidy a jiné substance. Jako faktory patogenity funguje i tvar těla, bičíky nebo přechod tyčky v kokoidní formu (1)(3). *Helicobacter pylori* produkuje již zmíněné enzymy (oxidázu, katalázu, ureázu, potom také fosfolipázy, glykofosfatázy, proteázy, aldehyd dehydrogenázy), toxiny (hemolyziny, cytotoxiny a protein inhibující tvorbu HCl). Bakterie díky exogenním produktům ovlivňuje indukci leukotrienů a destičkových faktorů (PAF), prokoagulační aktivitu interleukinů a TNF, ovlivňuje aktivaci cytochromu P450, indukci autoimunitních reakcí (1)(5). Stručné a přehledné shrnutí faktorů patogenity a jejich funkce v patogenezi onemocnění uvádí tabulka níže (viz. tabulka č. 4).

**Tabulka č. 4 Přehled faktorů patogenity a jejich funkce**

| Název faktoru                             | Funkce   |
|---|--|
| <b>Faktory kolonizace</b>                 |  |
| Spirální tvar těla                        | Pohyb v hlenu  |
| Bičíky                                    | Pohyb v hlenu  |
| Specifické adheziny                       | Selektivní kolonizace hlenových buněk žalud. sliznice            |
| Ureáza                                    | Přežívání v žaludku  |
| Mucináza                                  | Štěpení hlenové vrstvy   |
| <b>Faktory perzistence</b>                |  |
| Adheziny                                  |  |
| Ureáza                                    |  |
| Kataláza                                  | Chrání před usmrcením fagocytem                                  |
| Proteáza                                  | Štěpí spec. IgA; štěpení hlenu                                   |
| LPS                                       |  |
| <b>Faktory působící poškození</b>         |  |
| Cytotoxin                                 | Poškození epiteliálních buněk                                    |
| Nízkomolekulární chemoatraktivní proteiny | Atrahuje fagocyty-z nich se uvolní cytokiny a kyslíkové radikály |
| Ureáza                                    | Toxicita amoniaku  |
| Alkohol. dehydrogenáza                    | Toxický acetaldehyd  |
| Fosfolipáza                               | Poškození buněčných membrán                                      |

*Zdroj: Sedláčková a kol. (7), 1996 (převzato; str. 22)*

Do žaludeční sliznice proniká *Helicobacter pylori* specifickým způsobem. Po kontaktu se sliznicí se obklopí vrstvou amoniaku (1). Ten vzniká štěpením močoviny, přítomné v žaludku, díky enzymu **ureáza**, který *Helicobacter pylori* hojně produkuje. Amoniak neutralizuje HCl, a zvyšuje tak pH jinak kyselého žaludečního obsahu (7) a chrání tím bakterii žaludeční kyselinou (2). Ureáza je uvolňována z povrchu bakteriálního těla (7) a je důležitým faktorem její patogenity (2). Je aktivní pouze v prostředí nízkého pH, ve vysokém pH je její produkce snížena. Na druhou stranu přežití *Helicobacter pylori* závisí také na přítomnosti močoviny v žaludku, kterou ureáza na amoniak rozkládá, bez ní by totiž v tak kyselém prostředí také zahynula (7). K jejímu přežití je dále důležitá produkce **katalázy**, kterou se chrání proti působení fagocytózy (1)(3)(8).

Snazší proniknutí bakterie do žaludeční sliznice hlenovou vrstvou umožňuje její tvar (3) (má velice typickou **morfologii těla**, spirálovitě stočené tělo do 4-6 závitů), pohyb pomocí polárně uložených bičíků a enzym mucináza, který štěpí hlenové buňky. Bičíky jsou tvořeny polypeptidovými podjednotkami, tzv. flageliny FlaA a FlaB. Vlákna flagelinů jsou opatřena fosfolipidovým obalem, který je chrání před depolymerizací nepříznivým žaludečním pH (8). Hlenová vrstva, do které se snaží proniknout, má pro ni příznivé pH.

Po průniku hlenovou vrstvou je *Helicobacter pylori* schopný vazby k lipidům a polysacharidům žaludeční stěny (6)(7). Na ni se váže pomocí několika typů **adhezinů** (3) různé chemické povahy. Jde o specifickou vazbu adhezinů k receptorům na povrchu epiteliálních buněk. Vazba umožňuje bakterii dlouhodobě pobývat v jí vyhovujícím mikroaerofilním prostředí. Mezi adheziny patří bakteriální tělo pokryté fibrilárním glykoproteinem (váže se na mikrovilli) nebo adheziny, které se váží na kolagen a fibronectin (7). Adhezin BabA váže na povrchu buněk epitelu antigen Lewis b (6).

*Helicobacter pylori* má specifickou tkáňovou adhezi, a to pouze k hlenovým buňkám. Váže se také jen na buňky lidí a primátů, v čemž spočívá jeho druhová specifita. Infekce *Helicobacter pylori* je neinvazivní, protože neproniká do hloubi tkáně. Proniká jen do mezibuněčných spojů a může se vázat na povrch buňky a na jejich bazální membránu (7).

K významným faktorům patogenity patří dále cytotoxin. Produkuje ho gen VacA a nazýváme jej **vakuolizační toxin** (působí na iontové mechanismy uvnitř buňky, a to ústí ve vznik vakuol). Je navázaný na povrchu buňky bakterie a je uvolňován málo, protože působí na krátkou vzdálenost. Tím se liší od ostatních toxinů. S výskytem cytotoxinu pozorujeme ještě přítomnost proteinu (gen CagA), který nestojí přímo za toxicitou, ale je znakem virulence daného bakteriálního kmene. (7).

*Helicobacter pylori* produkuje také **fosfolipázy**, které mají přímé účinky k membránovým fosfolipidům (1)(3). Fosfolipáza C štěpí fosfatidyl (lecitin) za vzniku fosforylcholinu a diacylglycerolu. Fosfolipáza A působí hydrolyticky za vzniku lysolecitinu (7).

Produkce tzv. **heat shock proteinů** (HSP; teplotních proteinů) ovlivňuje odpověď imunitního systému, protože aktivují T lymfocyty (7).

Gramnegativní bakterie, stejně jako *Helicobacter pylori*, mají součástí membrány lipopolysacharidový komplex (**endotoxin**), který se po jejím rozpadu uvolňuje a má významnou imunologickou funkci. Aktivuje komplement (alternativní cesta) a usnadňuje fagocytózu bakteriální buňky, stimuluje makrofágy, indukuje B lymfocyty k urychlení protilátkové odpovědi a navozuje pyrogenní reakci. *Helicobacter pylori* významně ulehčuje průnik mezi epitelovými buňkami a vazbu na lamin. **Lipopolysacharidy** zároveň

indukují produkci pepsinogenu. Postranní **polysacharidy** jsou podkladem pro vznik antigenních determinant (7).

Pomocí metabolických produktů enzymů, zánětlivých mediátorů, přímým účinkem fosfolipáz na membránové fosfolipidy, proteáz, odbouráváním lecitinu na toxický lysolecitin, produkcí amoniaku, ethanolu, acetaldehydu a vlastními cytotoxiny způsobuje *Helicobacter pylori* poškození epitelu (1)(3). Acetaldehydy jsou produktem alkoholové dehydrogenázy (7). Amoniak je schopen degradace lecitinu a mění ho na lysolecitin, který je toxický (1). Působení amoniaku oslabuje buněčné a mitochondriální dýchání, a tím zkracuje schopnost buněk sliznice přežít (8). Pro osídlení sliznice je důležitá produkce enzymu glykosylfosfatázy, který reaguje s hlenovými glykoproteiny (1)(3).

### 3.7.2. Patogeneze

Inkubační doba infekce trvá několik dní (až týden) a následně pacienta postihne mírná akutní gastritida doprovázena bolestí břicha, nevolnostmi, flatulencí a zápachem z úst. Pokud helicobakter neustoupí, gastritida se prohloubí do chronické podoby. (4)(8). Infekce není ale ve většině případů doprovázená žádnými příznaky a vzhled sliznice je při endoskopickém vyšetření normální (4). Mnoho pacientů může být až několik let zcela bez příznaků (1).

Na základě dlouho trvající gastritidy se může rozvinout vředová choroba, lymfom nebo karcinomu žaludku (1)(2)(3)(4). *Helicobacter pylori* je nalézán až u 95 % pacientů s vředovým onemocněním duodena a u 85 % pacientů vředové choroby žaludku (2). V patogenezi jeho vzniku se hned uplatňuje několik faktorů, jedním z nich je produkce ureázy. Ureázou uvolňovaný amoniak působí na změnu poměru iontů hlenu pokrývající sliznici. Tato změna má za následek zpětnou difuzi vodíkových iontů do sliznice a vznik peptického vředu. Proto úspěšnou eradikací dosáhneme i vyhojení peptického vředu (4).

Mikrob osidluje jakoukoliv oblast žaludku, ale nejkritičtější místo infekce *Helicobacter pylori* je lokalizováno především v *antrum pylori* a na metaplastické sliznici duodena (3)(4). V žaludku se pohybuje ve směru příznivého pH (5). Hlen (pH 7) ho chrání před kyselým prostředím žaludku (4)(5). Jakmile dosáhne epiteliálních buněk, začnou se proti tomuto postupu hlenové buňky bránit a vylučují další a další hlen, kterým se snaží

posouvat bakterii zpět do lumen žaludku. Ta na to však reaguje úplně opačně, tento gradient pH vnímá a aktivně se proti jeho směru pohybuje zpět do pro ni příznivějšího prostředí (6). Zánět může ale také porušit jinak nepřístupnou vrstvu mukózy, která se stává nechráněnou k působení žaludeční kyselinou a pepsinu. Následkem toho dochází k rozvoji zánětu v žaludeční či duodenální vřed. Typ vředu je předurčen jednak místem, které bakterie kolonizuje, a jednak kyselostí žaludečního obsahu. Jeho vznik je následující (6):

**Duodenální vřed** vzniká u pacientů s vysokou produkcí žaludeční kyseliny. *Helicobacter pylori* osidluje antrum. V antru uložené G-buňky odpovídají na kolonizaci bakterie produkcí gastrinu. Gastrin je hormon, který putuje k buňkám ve stěně korpu a stimuluje je k ještě větší produkci kyseliny. Hladina gastrinu se tak chronicky zvýšila a má za následek vyšší tvorbu stěnových buněk a s tím spojenou další produkci kyseliny. Vysoká kyselost žaludečního obsahu poškozuje stěnu duodena a podněcuje vznik duodenálního vředu (6).

**Žaludeční vřed** vzniká spíše v souvislosti se sníženou a normální hladinou žaludeční kyseliny, což napovídá o poškození ochrany mukózy. V takovém případě *Helicobacter pylori* kolonizuje korpus žaludku a stimuluje v tomto místě vznik zánětu. V souvislosti s tím dochází k dalšímu snížení produkce žaludeční kyseliny, následně k atrofii žaludeční stěny a celý proces spěje ke vzniku žaludečního vředu. Následné riziko tohoto onemocnění je možný vznik nádoru (6).

### 3.8. Imunologický obraz

#### 3.8.1. Specifické protilátky

Tělo pacienta na dlouhotrvající a chronickou infekci *Helicobacter pylori* odpovídá tvorbou specifických protilátek. Tvoří si zejména imunoglobuliny třídy IgG a IgA. IgG se tvoří v průběhu infekce a závisí na genetických vlastnostech pacienta, na typu a době setrvání antigenu v těle nemocného. Specifické slizniční IgA ale všichni infikovaní tvořit nemusí. IgA zároveň koreluje s intenzitou gastritidy a hustotou kolonizace, resp. závažností infekce. Vyskytují se i protilátky typu IgM, které je možné zachytit nejvíce v akutní fázi onemocnění (7).

Odpověď imunitního systému nemocného na infekci je rozdílná, a to díky přítomnosti různé hustoty jednotlivých podtříd imunoglobulinu IgG. Tyto antigenně odlišné formy tvoří 4 varianty: IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4; pro každého pacienta charakteristické. Jejich rozdílnost tkví ve schopnosti vázat komplement a fixovat se na povrchové receptory makrofágů. Během infekce jsou nápadně zvýšeny podtřídy IgG1 a IgG4. Ne u každého pacienta budou zvýšeny i hladiny IgG2. IgG3 jsou typické hlavně pro akutní fázi. (7).

*H. pylori*-pozitivní gastritida je přirozenou odpovědí organismu na výskyt antigenu. Antigeny pronikají do *lamina propria mucosae* (endocytóza nebo pasivní transport skrz mezibuněčné spoje). Zvýšenou permeabilitu epitelu ovlivňuje lokální tvorba IgG.

V počáteční fázi infekce se tvoří především imunoglobuliny IgA, následně IgG1 a IgM. IgA a IgM je možné detekovat ze vzorků slin a žaludečního sekretu. Pacient si po dobu infekce tvoří spektrum specifických protilátek proti faktorům virulence *Helicobacter pylori*. Toto spektrum lze využít v základu metod molekulární analýzy (7).

### 3.8.2. Praktické využití metod imunologického stanovení

#### **ELISA**

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je nejpoužívanějším klinickým vyšetřením. Výhodou metody je snadné a rychlé provedení a nenáročná reprodukovatelnost výsledků. Citlivost a specifitu ovlivňuje antigen obsažený v pevné fázi. Nejprve se antigen na mikrotitrační destičce s protilátkou inkubuje, následně promyje (odstraní se tím nenavázané zbytky antigenu) a přidá se vyšetřované sérum. Specifická vazba antigen-protilátka se zjišťuje po přidání enzymem značené sekundární protilátky a hodnotí podle hustoty zbarvení (7).

#### **Hemaglutinační test a latexová aglutinace**

Jsou to metody, které slouží k rychlé a technicky nenáročné detekci přítomnosti *Helicobacter pylori*. Principem je v obou případech schopnost antigenů navázat se na erytrocyty / latexové částice jako podklad pro detekování specifických protilátek (7).

### **Western-blotting**

Využívá molekulární analýzy k detekci specifických protilátek. Využívá bakteriální antigeny rozseparované pomocí SDS-PAGE. Dále se provádí jejich elektroforetický přenos na nitrocelulózovou membránu. Následná detekce specifických protilátek navázaných na přenesené antigeny se zajišťuje pomocí ELISA metody. Je to velice citlivé stanovení, ale také náročné na čas a materiál, proto je pro rutinní detekci nevhodné (7).

### **Radio-imunoprecipitační stanovení protilátek**

Toto stanovení protilátek proti *Helicobacter pylori* (RIPA; radio-immunoprecipitation assay) spočívá v separaci a identifikaci antigenů za pomoci sodium dodecyl sulfát polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE). Protilátky a antigeny reagují na agaru na základě imunoprecipitace. Bakteriální antigen je značen  $^{125}\text{I}$  (7).

### **Nepřímá imunofluorescence**

Touto technikou lze detekovat téměř všechny antigeny ve vzorcích tkání a v bakteriálních suspenzích. Zároveň je možná detekce i protilátek proti *Helicobacter pylori* (7).

### **Bakteriální aglutinace**

Principem stanovení je shlukování korpuskulárních antigenů vlivem specifických protilátek. Jedná se o polysacharidové somatické antigeny a proteinové bičíkové antigeny vyskytující se na povrchu bakterií. Protilátky se zde uplatňují typu IgG a IgM (7).

### **Komplement fixační test**

V první fázi testu je k dispozici známé množství komplementu, který se váže na vzniklý imunokomplex (z předchozí reakce antigenu s protilátkou). V druhé fázi se přidá hemolytický systém a dokazuje se volný komplement. Negativní reakce je pozorována potom, co krvinky v přítomnosti komplementu hemolyzují (komplement nebyl komplexem vyvázan, protože v reakci nebyly přítomny protilátky). Uplatňují se IgG a IgM. Mnohem jednodušší z technického pohledu je spíše např. latexová aglutinace (7).

### 3.8.3. Imunitní odpověď na infekci *Helicobacter pylori*

Odpověď imunitního systému na infekci *Helicobacter pylori* spočívá v lokální produkci cytokinů. Jsou to faktory, které ovlivňují průběh imunitní odpovědi aktivací neutrofilů a ostatních imunokompetentních složek zánětlivého procesu. Odpovědi na infekci se účastní zejména interleukiny IL 8 a IL 6, tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa) a interferon gama (7). Buňky odpovídají na infekci také produkcí IL 1, IL 2, IL 3 a IL 4. Interleukiny jsou po stimulaci infekcí produkovány přímo buňkami epitelu (8).

IL 8 je vylučován buňkami žaludečního epitelu do několika hodin po infekci a stojí za aktivací neutrofilů. Aktivované neutrofilie uvolňují proteolytické enzymy (destruují sliznici) a radikály kyslíku (způsobují peroxidaci lipidů) (7)(8), díky čemuž dochází k zánětu žaludeční sliznice. (7).

Během infekce produkují buňky epitelu MHC glykoproteiny II. třídy (8). Zvýšená exprese heat-shock proteinů i změny u T lymfocytů typu gama/delta dávají najevo, že nastupuje startuje T buněčnou odpověď. Také se v *lamina propria* žaludeční sliznice zvyšuje koncentrace lymfocytů se znaky CD8 a CD22 (7).

## 3.9. Laboratorní průkaz

Nález chronického zánětu žaludeční sliznice i průkaz její kolonizace *Helicobacter pylori* nelze provádět pouze jejím makroskopickým zhodnocením, je potřeba využít metod, které zajistí přesnou diagnózu. Využíváme vzorky sliznice odebrané během endoskopického vyšetření pomocí rutinní biopsie. (7).

### 3.9.1. Biopsie žaludeční sliznice

K diagnostice se odebírá tkáň ze sliznice antra, popř. fundu žaludku, a z duodena (3). Protože je sliznice bakterií kolonizovaná nerovnoměrně, je potřeba vzorky odebírat z několika různých míst. Vícečetná biopsie tedy zaručuje vyšší pravděpodobnost záchytu zánětu i bakterií. (7).

Odebírá se vzorek sliznice o velikosti 1-2 mm. Odběr žaludečního biopátu se provádí pro účely mikroskopického vyšetření a ke kultivaci, popř. i k ureázovému testu (7)(8).



Velkou část úspěchu kultivace *Helicobacter pylori* zahrnuje správný (za chladu) a rychlý transport odebraného vzorku do laboratoře ke zpracování (3). K tomuto účelu je nutné vybrat správné transportní půdy. Nejvhodnější a nejvíce používané je Stuartovo transportní médium (2) (thioglykolátová půda) a fyziologický roztok o objemu 0,5 ml. Ne příliš vhodné jsou půdy s příměsí glukózy a močoviny. Transportní médium chrání vzorek před vyschnutím a atmosférickým kyslíkem. Kultivace by měla být provedena do 2 hodin od odběru, se zvětšující se časovou prodlevou klesá úspěšnost kultivace (7). Vzorek může být uložen v chladu maximálně po dobu 24 hodin (8).

Bioptický vzorek se pro další diagnostické účely nejprve zhomogenizuje. Homogenizace se provádí speciálními roztoky nebo mechanickým rozdrčením tkáně (7).

### 3.9.2. Kartáčový stěr

Během endoskopického vyšetření můžeme kromě samotného bioptátu odebrat i vzorek vrstvy hlenu pokrývající povrch žaludeční sliznice. Technika odběru se nazývá „kartáčový stěr“. Pomocí kartáčku se setře hlenová vrstva a rozetře se na podložní sklíčko. Množství odebraného hlenu je tímto postupem větší než množství hlenu získaného během biopsie, proto metoda získává na vysoké citlivosti. Podložní sklíčko se nechá volně uschnout a barví dle potřeby. Využívá se barvení dle Grama nebo Giemsy. Odběr lze provádět přímo gastroenterologem v běžné ordinaci, je jednoduchý a k pacientovi šetrný (oproti odběru bioptického vzorku) (7).

### 3.9.3. Mikroskopické zhodnocení

Mikroskopické vyšetření bioptátu vyžaduje prohlédnutí celého preparátu. *Helicobacter pylori* je přítomný v hlenové vrstvě vzorku, avšak nestejně rozmístěn. Proto během prohlížení lze spatřit v některých zorných polích stovky bakterií a v jiných žádnou. Výskyt *Helicobacter pylori* může být obohacen i o další zástupce, například grampozitivní koky, gramnegativní tyče, u starších pacientů i kvasinky a plísně. Přesně tato flóra bývá příčinou falešně pozitivních výsledků ureázového testu. Pro mikroskopické hodnocení se využívá homogenizovaná tkáň, po zaschnutí a fixaci obarvená dle Grama (7).

### 3.9.4. Ureázový test

Ureázový test je nejlevnější, nejrychlejší a velice jednoduchou a snadno dostupnou variantou průkazu *Helicobacter pylori*. Principem testu je důkaz enzymu ureázy, který *Helicobacter* produkuje. Provádí se z bioptického materiálu, který je vložen do zkumavky s polotuhou půdou obohacenou o močovinu a indikátor pH (fenolová červeň) (1)(2)(7).

Močovina je štěpena ureázou na amoniak a amid kyseliny uhličitě. Dále dochází k samovolné hydrolyze amidu na amoniak a kyselinu uhličitou. Vodné prostředí mění amoniak na hydroxid amonný. Hydroxid amonný zvyšuje pH původního roztoku. Fenolová červeň, která byla v neutrálním prostředí žlutá, zčervená. Rychlost barevné přeměny je přímo úměrná koncentraci enzymu. Kontaminaci jinými mikroby (streptokoky a stafylokoky) ověříme aerobní kultivací na KA a Endově půdě (1)(2)(7).

Nevýhodou ureázového testu může být vznik falešně pozitivního výsledku, pokud by byla sliznice osídlena jinou bakterií také produkující ureázu. V zásadě ale platí, že *Helicobacter pylori* produkuje vysoké koncentrace ureázy, kdežto koncentrace ureázy tvořená jinými druhy je nízká (7).

Koncentrace použité močoviny je zvolena v takovém rozmezí, aby tím nebyla ovlivněna samotná reakce. Běžně užívaná koncentrace je od 2 % do 10 %. Inkubace probíhá při 37 °C. Citlivost metody je nepřímo úměrná množství tekutiny, do kterého vzorek noříme (7).

Výhodou testu je jeho vysoká specifita a citlivost. Specifita testu však klesá s časovou prodlevou od odběru. Je současně nutné dodržet dobu pozorování. Většinou se reakce hodnotí po uplynutí 120 minut. Hodnocení změny po uplynutí stanovené doby přispívá k zachycení falešně pozitivního výsledku (7).

Variantou ureázového testu je tzv. IRUT, imunologický rychlý ureázový test. Principem této metody je vyloučit ureázovou aktivitu jiného původu za použití specifických protilátek proti ureáze *Helicobacter pylori* (1)(2)(7).

Komerční verze testů mají různou úpravu. Základem CLO testu je agar s příměsí substrátu s indikátorem, přičemž se vzorek do agaru zatlačí. Jiné testy byly vyráběny v lyofilizované podobě a vzorek se do nich ponořil až po předchozím rozpuštění substrátu v destilované vodě (7).

### 3.9.5. Kultivace

Kultivace je vysoce náročnou metodou ke zpracování. Je ale nezbytná pro zjištění citlivosti *Helicobacter pylori* na antibiotika a důležitá ke sledování antimikrobiální léčby, popř. zjištění, proč došlo k jejímu opakovanému selhání (8).

Ke kultivaci jsou vzorky udržovány ve vlhkém prostředí maximálně 2 hodiny (4)(7). Kultivace může být vysoce citlivou metodou, ale je ovlivněna kvalitou bioptického vzorku, místem bioptického odběru, zpracováním v čase a způsobem transportu vzorku do laboratoře (2)(10). Měly by být dopraveny ve sterilním roztoku do 2 hodin při pokojové teplotě, popř. chladničkové teplotě. Někteří autoři, srovnávající použití různých transportních médií za různých teplot a s různou časovou prodlevou, uvádí, že experimentální podmínky samotnou kultivaci příliš neovlivnily. Uvedli, že hlavním problémem je s delší časovou prodlevou narůstající pravděpodobnost namnožení jiných nežádoucích druhů, které mohou v nátěru *Helicobacter pylori* až přerůst (7). Z toho důvodu se citlivost uvádí 70-95 % a specifita 100 % (8).

Skladování kmenů za laboratorních podmínek není příliš výhodné. Kmeny během pasážování buď hynou, anebo se ztratí kvůli velice snadné kontaminaci jinými kmeny. Mohou se měnit nebo ztrácet například některé jeho antigenní vlastnosti. Typickým znakem *Helicobacter pylori* je jeho schopnost přecházet do kokoidní formy. Tomuto přechodu je možné v některých případech zabránit pravidelným pasážováním každé 3 dny. Možným způsobem uchování je také zmrazení mikroba v bílkovinném médiu za vhodných podmínek pod -70 °C, a to až po dobu 2 let. Naopak nevhodnou formou pro skladování je lyofilizace, kterou nepřežívá (7).

Homogenizovanou tkáň, případně hlen nebo jiný biologický materiál očkujeme na nutričně bohaté selektivní i neselektivní půdy (8). Jejich základ tvoří Columbia agar, Brucella agar, Oxoid agar, Muller-Hintonův agar, k nimž se přidává čerstvá nebo zahřátá koňská či beraní (méně) krev. K agaru se navíc přidává 5-10 % koňského nebo telecího séra a směs růstových faktorů speciálních ke kultivaci helikobakterů a kampylobakterů (7). Mezi selektivní půdy patří čerstvě připravený KA s přídavkem 10% koňské či beraní krve, čokoládový agar (2) s přídavkem koňských erytrocytů, popř. i Thayerův-Martinův agar, nebo Skirrowova selektivní půda (3). Selektivní půdy obsahují vankomycin,

cefsulodin a amfotericin B. Je vhodné je používat, protože hlen odebraný ze žaludeční sliznice může obsahovat kontaminanty (2). Pro zábranu přerůstání kolonií kvasinkami se do půd přidává amfotericin B (8).

Plotna s půdou nesmí být předem sušena (4). Půda je inkubována při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí po dobu 3-5 dnů (1), jako negativní se však hodnotí vzorek až po týdnu (4). V případě, že pacient již užívá antibiotika, jedná se o dobu až 1 týdne (1). Podmínky, za kterých se *Helicobacter pylori* kultivuje, jsou striktně mikroaerofilní, vyžaduje proto atmosféru s obsahem 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> a 85 % N<sub>2</sub>, s dostatečnou vlhkostí a teplotou ideálně okolo 37 °C (1)(2). V aerobním ani anaerobním prostředí mikroba neroste (3). Půdu, která je takto naočkována, je třeba ihned inkubovat, protože *Helicobacter pylori* není termotolerantní a rychle se mění v kokoidní formy. Pokud tato podmínka není splněna do 30 minut, bakterie podléhají destrukci (2).

Již po 4 dnech se na povrchu půdy tvoří drobné šedé lesklé 1-2 mm kolonie (7). *Helicobacter pylori* vyrůstá v malých navalitych koloniích. Vzhled kolonií se může lišit v závislosti na tom, od kterého pacienta byl izolát helikobaktera získán. Izoláty od pacientů, kterým byla podána antibiotika, se vyznačují drobnými koloniemi (2-3 mm), průhlednými s našedlým povrchem. Naopak u izolátů od pacientů bez předchozí antibiotické terapie na půdě narostou mnohem větší kolonie, a to již za 3-4 dny (1). Někdy se v primokulturách vyskytují kolonie obou případů najednou (1)(7). Některé z kmenů mohou vytvářet úzkou zónu hemolýzy (3)(7).

Jako součást kultivačního vyšetření jsou v případě positivity prováděny i testy na oxidázu a katalázu a identifikaci *Helicobacter pylori* lze jimi doplnit. Test na oxidázu se provádí následujícím způsobem: na kolonii otiskneme detekční proužek nasycený fenylendiaminem a  $\alpha$ -naftolem. V případě pozitivní reakce se detekční proužek zbarví tmavě fialově až modře. K průkazu katalázy se kápne na podložní sklíčko 3% peroxid vodíku a do něj se rozmíchá vyšetřovaná kolonie. Pozitivní reakce se projeví uvolňováním bublinek kyslíku. Pro přesnější důkaz lze využít i testy na fosfatázu nebo na rezistenci ke kyselině nalidixové a cefalosporinu (8).

### 3.9.6. Histologie a cytologie

Mikroskopické vyšetření je mnohem starší metodou než průkaz *Helicobacter pylori* kultivačně (4). K jejím přednostem patří rychlost vyšetření, malé náklady a spolehlivost (7).

Mikroskopický preparát lze získat několika způsoby. Jedním z nich je vzorek žaludeční sliznice, který je získán pomocí biopsie. Odebraná tkáň se rozdrtí mezi dvěma podložními sklíčky, nechá zaschnout a barví dle potřeby (dle Grama, Giemsky-Romanowského atd.). Takto upravenou (resp. rozdrčenou) tkáň lze použít i pro přípravu inokula a k jeho kultivaci. Mikroskopický preparát lze získat i odebráním hlenové vrstvy ze žaludeční sliznice během endoskopického vyšetření (2). Jde o tzv. kartáčový stěr a je brán jako stejně citlivý a specifický jako hodnocené vzorky odebrané biopticky a jako výhodnější metodou než je ureázový test, protože je to technika snadná, levná a rychlá (7). Hlen se rozetře na podložní sklíčko, opět se nechá uschnout a barvit dle potřeby (2). Stěr lze však vyhodnotit pouze mikroskopicky, pro kultivaci jeho odebrané množství nestačí (7).

Barvení se volí dle cíle vyšetření. K diagnostice zánětu se provádí barvení hematoxylinem-eosinem (7). K průkazu *Helicobacter pylori* využíváme stříbření (barvení dle Warthin-Starry) a barvení dle Giemsky, které jsou obě citlivější a specifitější než rutinní hematoxylin-eosin (3)(7). *Helicobacter pylori* je dobře prokazatelná také v čerstvém nátěru nativně v zástinu, ve fázovém kontrastu nebo ve fixovaném preparátu obarveném dle Grama (4).

Vzhledem k ne úplně rovnoměrnému rozložení bakterií ve vzorku je nutné preparát prohlédnout na větším počtu zorných polí. V mikroskopu se jeví jako gramnegativní zahnuté nebo typicky spirálovité tyče. Budou soustředěny především ve světlejších místech nátěru (v místě, kde je hlen) (2). *Helicobacter pylori* je v žaludeční sliznici tedy přítomný hlavně v hlenu pokrývající sliznici, dále v lumen foveol a na povrchu buněk epitelu a v místech mezibuněčných spojů (8).

Kromě *Helicobacter pylori* by bylo možné v mikroskopickém preparátu zahlédnout i další druhy mikroorganismů v podobě grampozitivních i gramnegativních tyčí například

z rodu *Bacillus* nebo kvasinek. Tyto nálezy s nejvyšší pravděpodobností souvisí s potravou a nehrají v patologii nálezu nijak zvlášť významnou roli (8).

Histologická vyšetření poskytují kromě identifikace přítomné *Helicobacter pylori* i důležité informace o závažnosti zánětu a pokročilosti atrofie žaludeční sliznice. Je důležité poskytnout pro citlivé vyšetření kvalitní bioptický vzorek. Citlivost a specifita se v závislosti na kvalitě odebraného bioptátu pohybuje od 50 do 100 % (10).

Další technikou morfologického průkazu za pomoci mikroskopie je tzv. „Touch cytologie“ (neboli cytologický otisk, popř. otisk bioptátu a jiné (7). Cytologický otisk je stejně jako kartáčový stěr jednou z rychlých, efektivních a levných metod v gastroenterologii. Má výhodu v rychlém rozhodnutí lékaře o další mikrobiální terapii. Její provedení nevyžaduje příliš náročnou manipulaci a doba zpracování se pohybuje do 10 minut. Cytologie otisku barvená metodou Diff-Quick je vysoce citlivá (82 %) a specifická (100 %). Pro svoji citlivost a specifitu je téměř srovnatelná s výsledky z histologických vyšetření (9)(10).

### 3.9.7. Dechový test

Pro svoji neinvazivnost je dechový test velice výhodný (*urea breathe test*) a není ho zapotřebí provádět v mikrobiologické laboratoři (1)(2). Je vhodný pro detekci nepravidelné a střední kolonizace sliznice, typickou situaci po antimikrobiální léčbě (10). Principem tohoto testu je přítomnost značeného izotopu uhlíku  $^{14}\text{C}$  nebo  $^{13}\text{C}$  v malém množství roztoku urey, která je podaná pacientovi v podobě tekutiny nebo kapsle (1)(2)(4)(7). Močovina je díky ureázové aktivitě *Helicobacter pylori* hydrolyzována na amoniak a  $\text{CO}_2$  (nejprve ve formě hydrogen uhličitanu vstřebán do krve, přechází do plic je vydechován ve formě  $\text{CO}_2$ ) (8). Pokud je *Helicobacter pylori* v žaludku přítomen, je uvolněno velké množství značeného oxidu uhličitého ve vydechovaném vzduchu (1)(2)(7). Analýza vydechovaného vzduchu se provádí pomocí plynové chromatografie, hmotnostní spektrofotometrie (2)(7) nebo v případě použitého  $^{14}\text{C}$  kapalinovou scintilační kamerou (7)(8).

Nevýhodou je radioaktivita  $^{14}\text{C}$  (4). Proto izotop  $^{14}\text{C}$  pro radioaktivitu a dlouhý poločas rozpadu nevyužíváme k testování dětí (7). Naopak izotop  $^{13}\text{C}$ , který radioaktivní není, je však možné měřit pouze hmotnostním spektrometrem, přičemž náklady na jeho

pořízení činí tuto metodu velmi nákladnou (4). Nevýhodou je také nízká dostupnost metody dechového testu na pracovištích, a to pro značnou finanční nákladnost na její pořízení a provoz (1)(7)(8).

Citlivost dechových testů se pohybuje okolo 90-100 % a specifita dosahuje 99 %. Tento test se využívá jako screening před samotnou indikací endoskopických zásahů a jsou velmi užitečné k diagnostice akutní infekce zejména u dětí. Výhodou testu je jeho rychlost (7). Falešně negativní výsledky mohou být zapříčiněny užíváním antibiotik v posledních 14 dnech nebo přítomností ureázy v ústní dutině (8).

### 3.9.8. Imunologický průkaz

Základní metoda a zároveň velice praktická je neinvazivní serologické stanovení. Většinou sleduje specifické IgG, ale i IgM a IgA protilátky proti *Helicobacter pylori* (7).

Průkaz protilátek je důležitý nejen pro identifikaci mikroba, ale i k jeho sledování v průběhu léčby, dlouhodobému pozorování účinků terapie a případné reinfekce. Umožňují analýzu kinetiky protilátek, což je zvláště významné ke sledování výsledků terapie. Úspěšná eradikace je doprovázena současným poklesem protilátek (2)(3)(7). Serologické stanovení je nejvíce používané při epidemiologických studiích (7), ale jsou vhodné i k diagnostice pacientů, u kterých nelze provést z nějakého důvodu invazivní vyšetření (8). Klinická vyšetření jsou ale omezena na fakt, že nelze rozlišit, zda jde o aktuální stav nebo infekci, která proběhla v minulosti. Protilátky typu IgG jsou schopny v těle určitou dobu přetrvávat a vymizí až po delším časovém úseku (8).

Velice zásadní je příprava antigenů pro průkaz. Dříve se používaly komplexní antigenní směsi připravené ze živých či usmrcených kultur. Tyto antigeny však podléhaly spontánní aglutinaci. Antigeny se začaly získávat z vnější membrány, bičíků a ureázy purifikací vysokomolekulární antigenní frakce. Získané purifikované proteiny jsou specifické a vhodné pro serologická stanovení. Problémem je ale klesající senzitivita se zvyšující se čistotou proteinů (8).

Protilátky lze prokázat ve vzorcích slin, séra nebo moči (2)(3). V séru se sledují protilátky typu IgG, IgM a IgA, v žaludeční šťávě IgG a IgA (3). Specifické protilátky je dále možné prokázat v moči. Jejich hladiny v dobře korelují s hladinami v séru. Citlivost i specifita protilátek typu IgG v moči dosahují 90-90,5 % (7). Protilátky se stejně tak dají

prokazovat ze slin. Nacházejí se u 85 % infikovaných jedinců, z toho 90 % má protilátky typu IgG, protilátky typu IgA se vyskytují nepravidelně. Důvod je ten, že IgG do slin pronikají z krve do gingivální tekutiny, zatímco IgA vylučují převážně slinné žlázy (7).

Nejčastější metodou pro serologické vyšetření je ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (1)(2)(3). Oproti tomu nenáročný časově i na laboratorní vybavení je imunochromatografický test. Výsledky jsou k dispozici během několika minut, lze jej provést přímo u pacienta v ordinaci, avšak jeho přesnost může být nižší (2)(3).

### 3.9.9. PCR

Pro úspěšnou izolaci a průkaz, že se jedná o *Helicobacter pylori*, jsou metody jako je kultivace vysoce náročné a jsou ohrožené kontaminací jiným bakteriálním kmenem (7). Naopak vysoce průkazný je PCR test, který je značně specifickou a citlivou metodou. Umožňuje detekovat mikroba i ve vysoce kontaminovaném prostředí stolice, dutiny ústní, ale i zevního prostředí (voda), což je jeho velikou výhodou (2)(3). Nevýhodou metody je, že slouží pouze k identifikaci konkrétního zástupce na základě jeho genetické výbavy, ale už nepodávají žádné informace o jeho vlastnostech, například vlastnostech virulence a citlivosti na antibiotika (7).

Princip PCR metody spočívá v přidání specifického primeru, který zahájí namnožení definovaného úseku DNA. Namnožení (amplifikace) cílové DNA struktury je důležitá k dosažení potřebné koncentrace, ve které je již možné námi diagnostikovaný fragment detekovat. Pro úspěšnou detekci je třeba zvolit vhodný primer. Pro důkaz *Helicobacter pylori* existují primery, které se váží v oblastech genů pro ureázu, některé proteiny, bičíky, vakuolizační toxin a jiné (7).

Obecně metody molekulární biologie jsou mnohem mladšími diagnostickými metodami a slouží k detekci DNA a RNA *Helicobacter pylori* v různých materiálech. Dokáží identifikovat nejen aktivní formy mikroba, ale i jeho přítomnost v neaktivní kokoidní formě. Je to ale typ metody, jehož význam ani tak nespočívá v klinické diagnostice, ale je technikou více využívanou specializovanými pracovišti (technická a finanční náročnost) (7).



### 3.10. Rezistence na antibiotika

V posledních několika letech významně stoupá rezistence na klarithromycin. V důsledku toho se celosvětově snižuje účinnost standardní trojkombinace (klarithromycin, amoxicilin/metronidazol, PPI). V roce 2017 Světová zdravotnická organizace zveřejnila seznam 12 bakterií, jejichž rezistence vůči některým dosud užívaným antibiotikům se stala velice závažným problémem. Zástupci tohoto seznamu byli řazeni dle závažnosti do různých kategorií, přičemž klarithromycin-rezistentní *Helicobacter pylori* byla zařazena jako vysoce prioritní, co se týče výzkumu a vývoje antibiotik (15). Mezinárodní pokyny současně doporučují nepodávat léčbu obsahující klarithromycin pacientům bez předchozího otestování citlivosti v těch oblastech, kde je přítomna rezistence na toto antibiotikum vyšší než 15 % (20). Studie ukázaly, že rezistence na klarithromycin je typická pro pacienty, které již toto antibiotikum nebo jiné ze skupiny makrolidů (např. erythromycin) užívali.

Současně se uvádí i vážná rezistence na metronidazol a levofloxatin (15). Pro rezistenci na metronidazol také platí, že je typická pro pacienty, kterým byl již metronidazol v minulosti dávkován (14). Rezistence na amoxicilin a tetracyklin je nízká (16) (3-5 %) (38).

Rezistence na antibiotika je regionálně variabilní. Ve většině zemí platí zejména vysoká rezistence na klarithromycin (Japonsko a Itálie 30 %, Chile 26 %, Turecko 40 %, Čína 50 %, Izrael a Korea) (14)(26), metronidazol (Korea 30 %) (27) i levofloxatin (Francie 17,2 %, Belgie 16,8 %, Japonsko 15 %, Honkong 11,5 % a Korea 10,4 %) (38), jsou ale i výjimky. Nízká rezistence na klarithromycin platí například pro Švédsko, Tchaj-wan (15 %) a USA (14)(26). Metronidazol dosahuje nízké rezistence v Japonsku, a tudíž zde trojkombinace založená na metronidazolu (metronidazol, amoxicilin a PPI) dosahuje dobrých výsledků (16). Nízká rezistence na levofloxatin byla ohlášena na Tchaj-wanu (5,8 %) (38) a v Evropě (11 %) (31). Naopak v Číně je vysoká rezistence na všechny tři zmíněná antibiotika a míra eradikace po podání trojkombinace dosahuje méně než 80 %. V Číně je proto vhodnější čtyřkombinace s bizmutem (16).

V některých případech lze hovořit i o tzv. duální rezistenci některých antibiotik, která tak může narušit jindy úspěšnou terapii. Příkladem je duální rezistence

klarithromycin-metronidazol (Korea 9,6 %) (27). Pokud rezistence přesahuje hodnotu 14,9 %, účinnost čtyřkombinace (klarithromycin, metronidazol, amoxicilin a PPI) klesá pod 90 % (16). Byla zjištěna také duální rezistence klarithromycin-levofloxatin, která byla zaznamenaná u 73,2 % testovaných (38).

### 3.11. Léčba

K eradikaci se používají dvě nebo tři antibiotika v kombinaci s přípravky PPI nebo bizmutu (14). Klíčovou vlastností přípravků PPI je schopnost zvyšovat pH žaludku, které se stane pro bakterii příznivější. Tímto mechanismem se stávají bakterie náchylnější k působení antibiotik (16). Z toho důvodu vysoké dávky PPI účinnost trojkombinace zvyšují (14).

#### 3.11.1. Trojkombinace

Dlouhou dobu byla zejména doporučována standardní trojkombinace s PPI (klarithromycin, amoxicilin, PPI) podávaná po dobu 1 týdne a déle. Postupem času ale účinnost tohoto režimu začala výrazně klesat z důvodu zvyšující se rezistence na klarithromycin. Protože je ale rezistence na antibiotika regionálně variabilní, neúčinnost tohoto režimu neplatí pro všechny oblasti světa stejně a v některých regionech se používá stále (15).

Podávání standardní trojkombinace se ve spoustě studiích sice nedoporučuje (15)(16), i přesto se ale stále jako terapie první volby používá. První verzí je trojkombinace založená na klarithromycinu (klarithromycin, amoxicilin a PPI), druhou trojkombinace s metronidazolem (metronidazol, amoxicilin a PPI). V obou případech je ideální podání 10-14 dní (30). Metronidazol nahrazuje klarithromycin, pokud je pacient na klarithromycin rezistentní (14). Některé práce uvádí, že rezistenci na metronidazol lze překonat vysokými dávkami (1500-1600 mg/ den) (16).

V důsledku zvyšující se rezistence na klarithromycin a metronidazol se využívá dále trojkombinace založená na levofloxatinu (levofloxatin, amoxicilin a PPI). Levofloxatin je širokospektrální chinolon. Tato terapie ale není většinou klíčbě první volby doporučována, protože i rezistence na levofloxatin významně roste ve všech regionech

světa. Tato kombinace je vhodná pro regiony s vysokou rezistencí na klarithromycin a metronidazol a nízkou rezistencí na levofloxatin (30).

### 3.11.2. Čtyřkombinace

Pokud je nějaké podezření rezistence na klarithromycin nebo metronidazol, je možné místo trojkombinace jako léčbu první volby aplikovat čtyřkombinaci s bizmutovým preparátem (14), popř. i non-bizmutové čtyřkombinace, podávané 14 dní. Obě kombinace obsahují PPI a dvě nebo tři antibiotika (15). Byly testované různé kombinace dvojic antibiotik: klarithromycin a amoxicilin, furazolidon a amoxicilin, metronidazol a amoxicilin, tetracyklin a amoxicilin, metronidazol a furazolidon (16).

Bizmut má na *Helicobacter pylori* přímý baktericidní efekt. V bakteriální stěně a periplazmatickém prostoru tvoří komplexy, dále inhibuje enzymatickou aktivitu a syntézu ATP a zabraňuje adhezi bakterie k žaludeční stěně. Přidáním bizmutu k terapii lze překonat rezistenci na klarithromycin a metronidazol. Bizmut navíc napomáhá hojení peptického vředu (24).

Některé mezinárodní pokyny (Maastricht V Florence Consensus Report 2016, Toronto Consensus Report 2016, Kyoto Global Consensus, dokonce už i dřívější směrnice Second Asia-Pacific Consensus Guidelines 2009) (31)(32)(33) doporučily jako alternativní léčbu (hned po standardní trojkombinaci) 14denní čtyřkombinaci s bizmutem (metronidazol, tetracyklin, PPI a bizmut) jako léčbu první linie (24)(30). Také doporučily trojkombinaci nebo čtyřkombinaci s fluorochinolony (amoxicilin) jako léčbu druhé volby (amoxicilin, levofloxatin, PPI a bizmut).

Konkrétně Toronto Consensus Report (33) doporučuje tyto následující kombinace. Jako léčbu první volby uvádí čtyřkombinaci s bizmutem (metronidazol, tetracyklin, PPI a bizmut) nebo bez bizmutu (klarithromycin, metronidazol, amoxicilin a PPI) jako 14denní terapii. Mezi vhodnou terapii zahrnuje i trojkombinaci s klarithromycinem (klarithromycin, metronidazol a PPI), popř. její varianci (klarithromycin, amoxicilin a PPI). Zároveň upozorňuje, že jsou tyto dvě kombinace vhodné jen pro oblasti s nízkou rezistencí na klarithromycin. Za vhodnou záchrannou terapii považuje trojkombinaci (levofloxatin, amoxicilin a PPI) a čtyřkombinaci (metronidazol, tetracyklin, PPI a bizmut).

Pokud by pacient nezareagoval dostatečně ani na jednu uvedenou terapii, je podle této zprávy možné přistoupit k zavedení rifabutinu do terapie.

Jako léčba druhé volby byla zmíněná čtyřkombinace s bizmutem (metronidazol, tetracyklin, PPI a bizmut), která se doporučuje po selhání standardní trojkombinace. Existují ale i další čtyřkombinace s bizmutem jako léčba druhé volby (levofloxatin, tetracyklin, esomeprazol a bizmut) / (levofloxatin, amoxicilin, PPI a bizmut) (30).

Čtyřkombinace obsahující levofloxatin (levofloxatin, amoxicilin, esomeprazol a bizmut) byla testována jako léčba druhé volby po selhání čtyřkombinace bez bizmutu (25). Pacientům byla podávána po dobu 14 dní následující kombinace: levofloxatin 500 mg jednou denně, amoxicilin 1000 mg a esomeprazol 20 mg a bizmut 220 mg dvakrát denně. Tato terapie dosáhla míry eradikace u záměrně léčených pouze 73,5 % a u pacientů s vysokou rezistencí na antibiotika (8,3 % amoxicilin, 55,6 % klarithromycin, 73,6 % metronidazol a 36,1 % levofloxatin) pouhých 78,5 %. V obou případech dosáhla terapie neuspokojivých výsledků. Studie ukázala, že v oblastech s vysokou rezistencí na levofloxatin tato kombinace není vhodná pro terapii v druhé linii.

Režimy čtyřkombinací poskytují běžně dostatečnou eradikaci (> 90 %) (15)(24), nicméně by mohly dlouhodobě přispívat ke vzrůstající rezistenci v důsledku užívání vícero antibiotik, jsou vysoce nákladné, vyznačují se nepříznivými vedlejšími účinky a horší kombinovatelností u pacientů užívajících větší množství léků (15).

Srovnatelné pokyny z různých států (Evropa, Kanada, Spojené státy) doporučují čtyřkombinaci s bizmutem jako léčbu první volby jako náhradu za trojkombinaci s klarithromycinem (23). Čtyřkombinace obsahující bizmut byla doporučena například v mnoha evropských zemích, její omezená účinnost naopak platí pro ASEAN, zejména pro Thajsko (11)(22).

### 3.11.3. Sekvenční a hybridní terapie

Kromě již zmíněných je jako léčba první volby někdy uváděna tzv. sekvenční terapie. Jedná se o 10denní terapii, která se skládá ze dvou po sobě jdoucích režimů. V první části to je amoxicilin/levofloxatin a PPI podávané dvakrát denně po dobu 5 dní, zbylých 5 dní je podávána opět dvakrát denně kombinace klarithromycin, metronidazol

a PPI (30). Jako léčba druhé volby dosahuje sekvenční terapie rovněž příznivých výsledků (92,5 %) (37).

Sekvenční terapie byla testována i ve třetí linii (40). Pacientům bylo podávána prvních 7 dní kombinace amoxicilin a esomeprazol, poté dalších 7 dní metronidazol, esomeprazol a jedno vybrané antibiotikum (klarithromycin, levofloxatin, tetracyklin). Míra eradikace po kombinaci s klarithromycinem, levofloxatinem a tetracyklinem byla 78,9 %, 92,2 %, 71,4 %. Celková míra eradikace ve třetí linii dosahuje dobrých výsledků (80,7 %).

Kromě sekvenční terapie je často uváděná také jako vhodná tzv. hybridní léčba (43). Sekvenční a hybridní terapie jsou vlastně obdobou čtyřnásobné terapie bez bizmutu. Je vhodné je používat ale pouze za předpokladu, že duální rezistence klarithromycin-metronidazol je nízká.

Hybridní terapie podle studií (44) dosahuje vysoké míry eradikace (96 %), dobrou bezpečnost a shodu s pacientem. Účinná byla i u kmenů rezistentních na klarithromycin (89 %), metronidazol (91 %), méně potom u kmenů s duální rezistencí klarithromycin-metronidazol (86 %).

V randomizované klinické studii v Chorvatsku (45) byla rovněž testovaná míra eradikace po podání hybridní léčby. Pacienti užívali amoxicilin 1 g a esomeprazol 40 mg dvakrát denně po dobu 14 dnů, posledních 7 dní docházelo k přidání metronidazolu 500 mg a klarithromycinu 500 mg opět dvakrát denně. Míra eradikace dosahovala 83,1 % a 95,2 % záměrného léčení. Studie porovnávala míru eradikace u hybridní léčby a u čtyřkombinace bez bizmutu a hodnotí, že obě terapie dosahují téměř stejných výsledků.

### 3.12. Nové přístupy v léčbě

#### 3.12.1. Dvojkombinace

Jednou z možností je zavedení dvojkombinace (amoxicilin a PPI), protože rezistence na amoxicilin zůstává v současnosti stále nízká. Tato terapie byla sice už zavedena v 90. letech jako léčba první volby, nicméně nebyla příliš účinná a byla používána pouze jako záchranná terapie. V posledních letech se ale tato terapie

(amoxicilin a rabeprazol) ukázala jako velice účinná jak v první linii (95,3 %), tak ve druhé (89,3 %). Aby ale bylo dosaženo potřebné míry eradikace (> 90 %), vyžaduje vysoké dávky podávané s vysokou frekvencí (rabeprazol 20 mg a amoxicilin 750 mg; čtyřikrát denně po dobu 14 dní). Z toho však vyplývá, že tento režim je vysoce nákladný a vede k nepříznivým vedlejším účinkům (15).

Zároveň se tato dvojkombinace spolu s trojkombinací založenou na rifabutinu doporučuje jako léčba třetí a čtvrté volby (35).

Na Tchaj-wanu (rabeprazol 20 mg a amoxicilin 750 mg; 14 dnů) dosahovaly tyto terapie v první linii úspěšnosti 95,3 % a druhé linii 89,3 %. V Itálii (esomeprazol 40 mg 3krát denně a amoxicilin 1 g 3krát denně; 10 dní) se ukázala jako účinná léčba první linie. V USA a současně i v Koreji byly pozorovány nízké míry eradikace (16).

### 3.12.2. Vonoprazan

Vonoprazan je nový typ blokátoru žaludeční kyseliny kompetitivní s draslíkem, který je vysoce a dlouhodobě účinný v inhibici sekrece kyseliny. Vyvolává silnější a trvalejší inhibiční účinky než lansoprazol (16).

Jednou z možností je použít vonoprazan ve dvojkombinaci místo PPI (amoxicilin 500 mg třikrát denně a vonoprazan 20 mg dvakrát denně po dobu 7 dní). Tento režim má potenciál vysoké míry eradikace (93,8 %) (15)(30) a zároveň minimální dopad na rezistenci. Léčba obsahující vonoprazan má několik výhod: dobrý soulad s jinou léčbou, nižší náklady, kratší doba léčby. Minimální množství podávaných dávek současně minimalizuje změny ve složení mikrobiomu na sliznici. Zavedení této terapie po celém světě není ale příliš snadné. Vonoprazan byl vyvinut až teprve nedávno a k dostání není zcela ještě ve všech zemích. Druhou nevýhodou jsou pacienti s alergií na penicilin, kterým nelze dávkovat (15).

Druhou možností je použití vonoprazanu jako součást trojkombinace v léčbě první i druhé volby (16).

V Japonsku zůstává stále léčbou první volby trojkombinace s klarithromycinem (klarithromycin, amoxicilin a PPI). Ukázalo se, že PPI může být nahrazeno vonoprazanem. V Japonsku po použití trojkombinace s vonoprazanem (klarithromycin

200 mg, amoxicilin 750 mg a vonoprazan 20 mg; dvakrát denně, 7 dní) se po 3 měsících původně zaznamenaná dysbióza vrátila do původního stavu (před eradikací). Zároveň byla tato kombinace pro minimum nežádoucích účinků prohlášena jako velice bezpečná. Jednalo se však o studii s malým množstvím pacientů a je doporučeno tento příznivý efekt na sliznici pozorovat z dlouhodobého hlediska (19).

### 3.12.3. Pětinásobná terapie

První randomizovaná studie byla provedena v Itálii (2007). Ke standardní trojkombinaci (klarithromycin, amoxicilin a esomeprazol) byl přidán laktoferin (bLf) a probiotika (Pbs) podávané 7 dní. Výsledky ukazovaly vyšší míru eradikace u skupiny s touto pětinásobnou kombinací než u skupiny se samotnou trojkombinací. Rozdíly byly pozorovány i ve vedlejších účincích (pouze trojkombinace 40 % vs. pětikombinace 9,5 %). Tato studie ukazuje na vyšší míru eradikace a nižší procento nežádoucích účinků po přidání laktoferinu a probiotik ke standardní trojkombinaci. Není však z tohoto pokusu jasné, jestli jsou dané pozitivní výsledky zásluhou laktoferinu nebo probiotik (16).

### 3.12.4. Probiotika

Problém představují antibiotika i PPI, které narušují mikroflóru sliznice během eradikační terapie. Navíc širokospektrá antibiotika snižují rozmanitost mikrobioty (18)(19).

Probiotika mají příznivé účinky na mikroflóru a funkci imunitního systému. Zmírňují vedlejší účinky (průjem, nevolnost, zvracení, nadýmání, bolest břicha), které nastupují po použití antibiotik. Mechanismus účinku probiotik spočívá v produkci antioxidantů a antimikrobních látek, mění pH, ovlivňují kolonizaci *Helicobacter pylori* a její přilnavost ke stěnám (16)(17).

Význam konkrétních kmenů, velikost dávky, doba podávání a trvání účinků nejsou zatím přesně známé. Jako přídatek k antibiotické léčbě lze použít některé z následujících probiotických směsí: *L. acidophilus* / *B. animalis*, *L. helveticus* / *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* / *B. longum* / *E. faecalis*. Tyto směsi se ukázaly v doplňkové léčbě jako významně účinné (> 90 %) (16).

### 3.12.5. Alternativní antibiotika v boji proti rezistenci

V době zvyšující se rezistence je snaha nalézt vhodná antibiotika, která by mohla ta stávající v léčbě nahradit (41)(42)(43). Jako náhrada jsou často testována tato antibiotika: rifaximin, rifabutin, furazolidon, garenoxacin, sitafloxatin.

V Indonésii je vysoká míra rezistence k metronidazolu a levofloxatinu. Existuje studie, která se snaží za ně najít vhodnou alternativu (41). Žádný z testovaných kmenů nebyl rezistentní na furazolidon, citlivé byly kmeny dále na rifabutin a sitafloxatin. Rezistence na rifaximin a garenoxacin byla vysoká. V závěru bylo zhodnoceno, že léčba obsahující rifabutin, furazolidon a sitafloxatin může být použita jako vhodná alternativa v oblastech s vysokou rezistencí na klarithromycin a metronidazol. Sitafloxatin má potenciál doplnit léčbu v oblastech s vysokou rezistencí na levofloxatin. Garenoxacin a rifaximin nejsou doporučovány. Zajímavostí je, že kmeny citlivé na garenoxacin byly pozorovány v oblastech s vysokou rezistencí na klarithromycin (Bali, Papua).

Dalším příkladem je studie z Dominikánské republiky (42), která dominuje také vysokou rezistencí na metronidazol a levofloxatin. Bylo zjištěno, že kmeny jsou citlivé na furazolidon, rifabutin a sitafloxatin. Naproti tomu rezistence k rifaximinu a garenoxacinu byla vysoká, přičemž míra rezistence rostla s přibývajícím věkem pacienta. Na závěr je konstatováno, že furazolidon, rifabutin a sitafloxatin mohou být alternativní náhradou v eradikaci *Helicobacter pylori* v oblastech s vysokou rezistencí na metronidazol a levofloxatin.

Jiná studie (43) hodnotí rifabutin, furazolidon a sitafloxatin jako užitečnou náhradu, zejména jako součást záchranné terapie.

#### **RIFABUTIN**

Rezistence na rifabutin (průměr z celkem 39 studií) byla vyhodnocena na 0,13 %. Jedná se o souhrnnou rezistenci na toto antibiotikum u pacientů, kteří nebyli/byli již v minulosti léčeni rifabutinem. Pokud by studie zahrnovala pouze primární rezistenci, byla by hodnota rezistence na rifabutin ještě nižší (0,07 %) (36).

Míra eradikace s obsahem rifabutinu dosahuje hodnot 73 % (první linie), 79 % (druhá linie), 69 % (třetí linie), 69 % (čtvrtá linie), 72 % (pátá linie). Naproti tomu byla ale



vyhodnocena častá míra nežádoucích účinků (15 %), méně často potom vážných nežádoucích účinků (reverzibilní myelotoxicita) (36).

Jiná studie dosahuje podobných výsledků. Pacientům byla podávána trojkombinace založená na rifabutin (amoxicilin 1 g, rifabutin 150 mg, esomeprazol 40mg; vše dvakrát, rifabutin jednou denně). Bylo dosaženo celkové eradikace 61,9 %, v druhé linii 68,3 % a ve čtvrté linii 63,1 % (39). Obecně ale trojkombinace s rifabutinem dosahuje velice rozdílných hodnot eradikace 40-80 % (30).

Trojkomboinace s rifabutinem se podle některých studií doporučuje jako vhodná léčba třetí a čtvrté volby, v závislosti na předchozí léčbě pacienta (35). Podle jiné je obecně doporučena jako léčba v případě selhání předchozí eradikace (36)(37). Přidání bizmutu ke standardní trojkombinaci s rifabutinem (amoxicilin, rifabutin a PPI) také vedlo ke zvýšení účinnosti léčby (30).

Rifabutin je však velice drahý a jeho použití je provázáno závažnými nežádoucími účinky. Je také léčivem, které se používá proti mykobakteriím, proto by jeho použití ještě v eradikaci *Helicobacter pylori* mohlo vést ke zvýšení rezistence (30).

### **CEFUROXIM**

V roce 2017 byla provedena randomizovaná klinická studie (28) testující, zda by amoxicilin v terapii první linie mohl být časem nahrazen novým léčivem. Jako potenciální náhrada amoxicilinu byl navržen cefuroxim.

Studie porovnávaly tyto dvě antibiotika ve čtyřkombinaci s bizmutem: amoxicilin, levofloxatin, esomeprazol a bizmut; cefuroxim, levofloxatin, esomeprazol a bizmut. Výsledky obou terapií byly srovnatelné a významně se nelišily. Zaznamenaná byla i podobná míra nežádoucích účinků. Obě terapie se ukázaly jako dostatečně účinné a bezpečné pro léčbu první volby. Závěr studie je tedy takový, že cefuroxim může v terapii vhodně nahradit současný amoxicilin (28).

Jiná studie (29) rovněž studovala zmíněnou kombinaci s cefuroximem (cefuroxim, levofloxatin, esomeprazol a bizmut). Výsledky se v tomto případě ukázaly opět příznivé. Tato studie rovněž navrhuje možné použití cefuroximu jako náhrada na amoxicilin. Navíc zdůrazňuje, že cefuroxim je vhodné použít hlavně u pacientů s alergií na penicilin.

### 3.12.6. Ostatní strategie

Mezi další nové strategie v eradikaci *Helicobacter pylori* spočívají například v použití antimikrobiálních peptidů. Antimikrobiální peptidy působí jako mediátory imunitní odpovědi a v léčbě nahrazují antibiotika. Jejich nevýhodou však je jejich možná degradace hostitelskými či bakteriálními proteázami. Výhodu představují jejich synergické účinky s antibiotiky (30).

Další potenciál mají látky zacílené na tvorbu biofilmu. Bylo totiž prokázáno, že rezistence na klarithromycin, metronidazol a levofloxacin byla zvýšena také v souvislosti s tvorbou biofilmu. Narušení vývoje biofilmu bylo již prokázáno v pokusech s N-acetylcysteinem, mukolytickými a thiol obsahujícími antioxidačními činidly (30).

## 4. Diskuze

Primárním cílem všech terapií je eradikace *Helicobacter pylori*. Jeho úplné vymizení brání recidivám hlavně u peptického vředu a přispívá k vyléčení MALT lymfomu. Správně indikovaná terapie zároveň zabraňuje zvýšení rezistence k použitým antibiotikům.

Nicméně léčba chronické gastritidy by měla být komplexní. To znamená, že by cílem takové léčby mělo být zmírnění až vymizení dyspeptických příznaků, eradikace *Helicobacter pylori* a zhojení žaludeční sliznice. Proto je zároveň snahou najít kromě účinné léčby i způsob, jakým ochránit a obnovit přirozený mikrobiom lidského těla.

Donedávna byla volbou první linie trojkombinace: klarithromycin, amoxicilin a PPI; metronidazol, amoxicilin a PPI; klarithromycin, metronidazol a PPI; levofloxatin, amoxicilin a PPI. Jejich použití musí být předem uváženo v souvislosti s vysokou rezistencí klarithromycinu, metronidazolu a levofloxatinu po celém světě. Účinnou léčbu první volby představuje čtyřkombinace s bizmutem/ bez bizmutu: klarithromycin, amoxicilin, metronidazol a PPI; metronidazol, tetracyklin, PPI a bizmut a jiné varianty nahrazují metronidazol nebo tetracyklin amoxicilinem. Léčbu druhé terapie představuje: levofloxatin, amoxicilin a PPI; metronidazol, tetracyklin, PPI a bizmut; tetracyklin, levofloxatin, esomeprazol a bizmut; levofloxatin, amoxicilin, PPI a bizmut.

Současně byly uvedeny i následující kombinace, které představují nové strategie v léčbě *Helicobacter pylori*: dvojkombinace amoxicilinu a PPI ve vysokých dávkách, vonoprazan jako součást dvojkombinace nahrazující PPI (amoxicilin a vonoprazan) nebo vonoprazan jako součást trojkombinace. Trojkombinaci lze obohatit i o probiotika, která snižují vedlejší účinky a působí příznivě k lidskému mikrobiomu.

V současnosti se uvádí, že rezistence na klarithromycin je ve většině zemí závažná. Klarithromycin-rezistentní *Helicobacter pylori* označila dokonce i WHO jako vysoce prioritní pro další výzkum. Problém vysoké rezistence je spatřován i u metronidazolu a levofloxatinu. Tato 3 problematická antibiotika by měla být v některých kombinacích v zemích s vysokou prevalencí (> 15 %) nahrazena novými. U amoxicilinu a tetracyklinu dosahuje rezistence dosud nízkých a zanedbatelných hodnot. Náhradou za antibiotika

s vysokou rezistencí mohou být furazolidon, rifabutin a sitafloxatin. Náhradou za amoxicilin by mohl být v budoucnu cefuroxim.

Rezistence je obrovský problém týkající se obecně terapií všech bakteriálních onemocnění. Z toho důvodu by se nemělo antibiotikum k eradikaci *Helicobacter pylori* podávat samostatně. Monoterapie antibiotiky jen zvyšuje pravděpodobnost rezistence. Pravděpodobnost rezistence bakteriálního kmene je současně výrazné zkrácování léčby. To má za následek přetrvávání zánětu (8). Na druhou stranu je rizikem pro zvýšenou rezistenci i užívání kombinací s velkým počtem antibiotik. Jednak je to vyšší pravděpodobnost vzniku rezistence pro hned několik antibiotik najednou při selhání terapie, zároveň riziko vyvolávají sami pacienti, kteří pro množství léků a časté vedlejší účinky v důsledku náročné terapie správné dávkování nedodrží.

Globálně zvyšující se rezistence k používaným antibiotikům je neustálou otázkou týkající se vhodných terapií v boji s *Helicobacter pylori*. Tento problém by měl vést k neustálému testování jedinců a k vytvoření regionálních a národních monitorovacích programů, které zajistí kontrolu nad aktuální rezistencí v návaznosti na vhodně volené terapie léčby.

## 5. Závěr

Tato práce nahlíží na globální otázku antimikrobiální rezistence *Helicobacter pylori* a problém, který je spatřován v její úspěšné eradikaci. Léčba je stále náročnější kvůli rezistenci na klarithromycin, metronidazol a fluorochinolony. Z toho důvodu v posledních letech stále klesá míra eradikace po podání standardní trojkombinace v zemích s vysokou rezistencí na tato antibiotika. Velice účinnou možností je stále čtyřkombinace s bizmutem. Jednou ze zajímavých možností je vysokodávková dvojkombinace nebo použití vonoprazanu jako součást dvojkombinace či trojkombinace. Příznivé účinky na léčbu má také přidání probiotik ke standardní trojkombinaci. Spousta studií podotýká, že není zatím zcela známo, jaké množství a jaké kombinace probiotik jsou nejvhodnější. Je ale jasné, že podání probiotik jako součást léčby hraje roli v zachování rovnováhy lidského mikrobiomu.

## Seznam použité literatury

- (1) VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, s. 50-52. ISBN 80-902896-6-5.
- (2) VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, c2010, s. 273-274. ISBN 978-80-86850-04-8.
- (3) BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, s. 285-287. ISBN 80-238-0297-6.
- (4) PEUTHERER, John Forrest, Richard C. B. SLACK a David GREENWOOD. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada, 1999, s. 306-309. ISBN 80-716-9365-0.
- (5) JULÁK, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 2. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2015, s. 268-271. ISBN 978-80-246-3210-0.
- (6) *Klinicky významné bakterie*. Praha: Triton, 2012, s. 57-60. ISBN 978-80-7387-588-6.
- (7) SEDLÁČKOVÁ, Miloše. *Infekce Helicobacter pylori: vředová choroba, karcinom žaludku, dyspepsie*. Praha: Maxdorf, 1996. ISBN 80-858-0032-2.
- (8) KYZEKOVÁ, Jozefína. *Žaludeční dyspepsie a Helicobacter pylori*. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-716-9621-8.
- (9) AL-ALI, J, F AL-ASFAR, R DHAR, PM DHAR a K KAPILA. Diagnostic Performance of Gastric Imprint Smear for Determination of *Helicobacter pylori* Infection. *Canadian Journal of Gastroenterology* [online]. 2010, **24**(10), 603-606 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0835-7900. Dostupné z: doi:10.1155/2010/156310
- (10) SIAVOSHI, Farideh, Parastoo SANIEE, Farideh HOSSEINI a Saman KHALILI-SAMANI, et. al. Evaluation of methods for *H. pylori* detection in PPI consumption using culture, rapid urease test and smear examination. *Annal of translational medicine* [online]. 2015, **3**(1),11 [cit. 2021-04-14]. Dostupné z: doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.11.16
- (11) ALBA, Claudio, Ana BLANCO a Teresa ALARCÓN. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Infectious Diseases* [online]. 2017, **30**(5), 489-497 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0951-7375. Dostupné z: doi:10.1097/QCO.0000000000000396
- (12) GODERSKA, Kamila, Sonia AGUDO PENA a Teresa ALARCON. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2018, **102**(1), 1-7 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-017-8535-7
- (13) HOOI, James K.Y., Wan Ying LAI, Wee Khoon NG, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* [online]. 2017, **153**(2), 420-429 [cit. 2021-04-13]. ISSN 00165085. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022
- (14) Diaconu S, Predescu A, Moldoveanu A, Pop CS, Fierbinteanu-Braticevici C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. *J Med Life*. 2017 Apr-Jun; 10(2):112-117. Review.
- (15) SUZUKI, Sho, Mitsuru ESAKI, Chika KUSANO, Hisatomo IKEHARA a Takuji GOTODA. Development of *Helicobacter pylori* treatment: How do we manage antimicrobial resistance? *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2019, **25**(16), 1907-1912 [cit. 2021-5-15]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v25.i16.1907
- (16) HU, Yi, Yin ZHU a Nong-Hua LU. Novel and Effective Therapeutic Regimens for *Helicobacter pylori* in an Era of Increasing Antibiotic Resistance. *Frontiers in Cellular*

- and Infection Microbiology* [online]. 2017, **7** [cit. 2021-5-15]. ISSN 2235-2988.  
Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2017.00168
- (17) OH, Bumjo, Bong-Soo KIM, Ji Won KIM, Jong Seung KIM, et al. The Effect of Probiotics on Gut Microbiota during the *Helicobacter pylori* Eradication: Randomized Controlled Trial. *Helicobacter* [online]. 2016, **21**(3), 165-174 [cit. 2021-5-15]. ISSN 10834389.  
Dostupné z: doi:10.1111/hel.12270
- (18) TANG, Bo, Li TANG, Cheng HUANG, et al. The Effect of Probiotics Supplementation on Gut Microbiota After *Helicobacter pylori* Eradication: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2021, **10**(1), 317-333 [cit. 2021-5-15]. ISSN 2193-8229. Dostupné z: doi:10.1007/s40121-020-00372-9
- (19) KAKIUCHI, Toshihiko, Kentaroh YAMAMOTO, Ichiro IMAMURA, Kazutoshi HASHIGUCHI, et al. Gut microbiota changes related to *Helicobacter pylori* eradication with vonoprazan containing triple therapy among adolescents: a prospective multicenter study. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1) [cit. 2021-5-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-80802-3
- (20) KOCSMÁR, Éva, György Miklós BUZÁS, Ildikó SZIRTES, et al. Primary and secondary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and mathematical modeling of the role of macrolides. *Nature Communications* [online]. 2021, **12**(1) [cit. 2021-5-15]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-22557-7
- (21) ARENAS, A., C. SERRANO, L. QUIÑONES, et al. High prevalence of clarithromycin resistance and effect on *Helicobacter pylori* eradication in a population from Santiago, Chile: cohort study and meta-analysis. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2021-5-15]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-56399-7
- (22) POONYAM, Piyakorn, Peranart CHOTIVITAYATARAKORN a Ratha-Korn VILAICHONE. High Effective of 14-Day High-Dose PPI- Bismuth-Containing Quadruple Therapy with Probiotics Supplement for *Helicobacter Pylori* Eradication: A Double Blinded-Randomized Placebo-Controlled Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* [online]. 2019, **20**(9), 2859-2864 [cit. 2021-5-15]. ISSN 2476-762X.  
Dostupné z: doi:10.31557/APJCP.2019.20.9.2859
- (23) FALLONE, Carlo A., Steven F. MOSS a Peter MALFERTHEINER. Reconciliation of Recent *Helicobacter pylori* Treatment Guidelines in a Time of Increasing Resistance to Antibiotics. *Gastroenterology* [online]. 2019, **157**(1), 44-53 [cit. 2021-5-15]. ISSN 00165085. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2019.04.011
- (24) ALKIM, Huseyin, Ali Riza KOKSAL, Salih BOGA, Ilker SEN a Canan ALKIM. Role of Bismuth in the Eradication of *Helicobacter pylori*. *American Journal of Therapeutics* [online]. 2017, **24**(6), e751-e757 [cit. 2021-5-15]. ISSN 1075-2765.  
Dostupné z: doi:10.1097/MJT.0000000000000389
- (25) SONG, Zhiqiang, Liya ZHOU, Jianzhong ZHANG, Lihua HE, et al. Levofloxacin, bismuth, amoxicillin and esomeprazole as second-line *Helicobacter pylori* therapy after failure of non-bismuth quadruple therapy. *Digestive and Liver Disease* [online]. 2016, **48**(5), 506-511 [cit. 2021-5-15]. ISSN 15908658. Dostupné z: doi:10.1016/j.dld.2016.01.002
- (26) Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Feb;**43**(4):514-33. Dostupné z: doi: 10.1111/apt.13497. Epub 2015 Dec 23.
- (27) CHOI, Youn I, Jun Won CHUNG, Dong Kyun PARK, Kyoung Oh KIM, et al. Tailored eradication vs empirical bismuth-containing quadruple therapy for first-line *Helicobacter pylori* eradication: A comparative, open trial. *World Journal of*

- Gastroenterology* [online]. 2019, **25**(46), 6743-6751 [cit. 2021-5-15]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v25.i46.6743
- (28) FU, Wei, Zhiqiang SONG, Liya ZHOU, Yan XUE, et al. Randomized Clinical Trial: Esomeprazole, Bismuth, Levofloxacin, and Amoxicillin or Cefuroxime as First-Line Eradication Regimens for *Helicobacter pylori* Infection. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 2017, **62**(6), 1580-1589 [cit. 2021-5-15]. ISSN 0163-2116. Dostupné z: doi:10.1007/s10620-017-4564-4
- (29) SONG, Zhiqiang, Wei FU a Liya ZHOU. Cefuroxime, levofloxacin, esomeprazole, and bismuth as first-line therapy for eradicating *Helicobacter pylori* in patients allergic to penicillin. *BMC Gastroenterology* [online]. 2019, **19**(1) [cit. 2021-5-15]. ISSN 1471-230X. Dostupné z: doi:10.1186/s12876-019-1056-3
- (30) ROSZCZENKO-JASIŃSKA, Paula, Marta Ilona WOJTYŚ a Elżbieta K. JAGUSZTYN-KRYNICKA. *Helicobacter pylori* treatment in the post-antibiotics era—searching for new drug targets. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2020, **104**(23), 9891-9905 [cit. 2021-5-15]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-020-10945-w
- (31) SAVOLDI, Alessia, Elena CARRARA, David Y. GRAHAM, Michela CONTI a Evelina TACCONELLI. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology* [online]. 2018, **155**(5), 1372-1382.e17 [cit. 2021-5-15]. ISSN 00165085. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2018.07.007
- (32) SUGANO, Kentaro, Jan TACK, Ernst J KUIPERS, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis. *Gut* [online]. 2015, **64**(9), 1353-1367 [cit. 2021-5-15]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2015-309252
- (33) FALLONE, Carlo A., Naoki CHIBA, Sander Veldhuyzen VAN ZANTEN, et al. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology* [online]. 2016, **151**(1), 51-69.e14 [cit. 2021-5-15]. ISSN 00165085. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2016.04.006
- (34) MALFERTHEINER, P, F MEGRAUD, C A O'MORAIN, et al. *Gut* [online]. 2016, **66**(1) [cit. 2021-5-15]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2016-312288
- (35) LIYEN CARTELLE, Anabel, Pearl Princess UY, Tara E KOEHLER a John Erikson L YAP. Persistent *Helicobacter pylori* Infection: An Insight to the Limitations of Current Clinical Practice. *Cureus* [online]. [cit. 2021-5-16]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.12309
- (36) GISBERT, Javier P. Rifabutin for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: A Review. *Pathogens* [online]. 2021, **10**(1) [cit. 2021-5-16]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens10010015
- (37) DE FRANCESCO, Vincenzo, Angelo ZULLO, Raffaele MANTA, Luigi GATTA, et al. *Helicobacter pylori* eradication following first-line treatment failure in Europe [online]. 2021, Publish Ahead of Print [cit. 2021-5-16]. ISSN 0954-691X. Dostupné z: doi:10.1097/MEG.0000000000002100
- (38) KUO, Chia-Jung, Cheng-Han LEE, Ming-Ling CHANG, et al. Multidrug resistance: The clinical dilemma of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* [online]. 2021 [cit. 2021-5-16]. ISSN 16841182. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmii.2021.03.006
- (39) SARACINO, Ilaria M., Matteo PAVONI, Angelo ZULLO, et al. Rifabutin-Based Triple Therapy Or Bismuth-Based Quadruple Regimen As Rescue Therapies For *Helicobacter*



- pylori* Infection. *European Journal of Internal Medicine* [online]. 2020, **81**, 50-53 [cit. 2021-5-16]. ISSN 09536205. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejim.2020.06.029
- (40) LIOU, Jyh-Ming, Ming-Jong BAIR, Chieh-Chang CHEN, et al. *Helicobacter pylori* eradication following first-line treatment failure in Europe. *American Journal of Gastroenterology* [online]. 2016, **111**(3) [cit. 2021-5-16]. ISSN 0002-9270. Dostupné z: doi:10.1038/ajg.2015.439
- (41) MIFTAHUSSURUR, Muhammad, Langgeng Agung WASKITO, Ari Fahrial SYAM, et al. Alternative eradication regimens for *Helicobacter pylori* infection in Indonesian regions with high metronidazole and levofloxacin resistance. *Infection and Drug Resistance* [online]. 2019, **12**, 345-358 [cit. 2021-5-16]. ISSN 1178-6973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S187063
- (42) MIFTAHUSSURUR, Muhammad, Modesto CRUZ, Dalla DOOHAN, et al. Five alternative *Helicobacter pylori* antibiotics to counter high levofloxacin and metronidazole resistance in the Dominican Republic. *PLOS ONE* [online]. 2019, **14**(3) [cit. 2021-5-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0213868
- (43) GEORGOPOULOS, Sotirios a Vasilios PAPASTERGIOU. An update on current and advancing pharmacotherapy options for the treatment of *H. pylori* infection. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [online]. 2021, **22**(6), 729-741 [cit. 2021-5-16]. ISSN 1465-6566. Dostupné z: doi:10.1080/14656566.2020.1845649
- (44) HU, Yi, Yaobin OUYANG, Yin ZHU a Nong-Hua LU. Reverse hybrid therapy for *Helicobacter pylori* eradication: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter* [online]. 2021, **26**(2) [cit. 2021-5-16]. ISSN 1083-4389. Dostupné z: doi:10.1111/hel.12784
- (45) MESTROVIC, Antonio, Nikola PERKOVIC, Josko BOZIC, et al. Randomised clinical trial comparing concomitant and hybrid therapy for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(12) [cit. 2021-5-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0244500