

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

Stanovení antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici
(bakalářská práce)

Autor práce: **Simona Štrofová**

Vedoucí práce: **PharmDr. Barbora Voxová**

Hradec Králové, 2009

Prohlašuji, že předložená práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové

(podpis)

Děkuji PharmDr. Barboře Voxové z Fakultní nemocnice Hradec Králové za pomoc, radu a odborné vedení mé bakalářské práce. Dále děkuji PharmDr. Janě Havlasové PhD. a Ladislavu Štorkovi DiS z INTERIMUN s.r.o. v Pardubicích za vstřícnost a poskytnutí studijních materiálů.

Obsah

1.	Abstrakt	- 2 -
2.	Úvod	- 4 -
3.	Teoretická část:	- 5 -
1.1.	Helicobacter pylori	- 5 -
1.1.1.	Charakteristika HP	- 5 -
1.1.2.	Epidemiologie HP	- 6 -
1.1.3.	Přenos HP	- 6 -
1.1.4.	Helicobacter heilmannii (HH).....	- 6 -
1.2.	Infekce Helicobacter pylori	- 7 -
1.2.1.	Chronická gastritida	- 7 -
1.2.2.	Akutní gastritida	- 9 -
1.2.3.	Duodenitis	- 10 -
1.2.4.	Peptický vřed, vředová choroba	- 11 -
1.2.5.	Karcinom žaludku	- 13 -
1.2.6.	MALT lymfon žaludku	- 14 -
1.3.	Léčba	- 14 -
1.4.	Metody průkazu.....	- 15 -
1.4.1.	Invazivní metody.....	- 16 -
1.4.2.	Neinvazivní metody	- 18 -
4.	Experimentální část	- 20 -
1.5.	Průkaz antigenu Helicobacter pylori ve stolici	- 20 -
1.5.1.	Helicobacter Antigen Quick.....	- 20 -
1.5.2.	Průkaz antigenu Helicobacter pylori ve stolici kvalitativní enzymovou imunoanalýzou (ELISA)	- 22 -
5.	Výsledky.....	- 24 -
1.5.3.	Přehled počtu vyšetřených pacientů a jejich výsledků z oddělení mikrobiologie FNHK	- 24 -
1.5.4.	Přehled počtu vyšetřených pacientů a jejich výsledků z oddělení klinické imunologie INTERIMUN s.r.o. poliklinika (HELP) Pardubice	- 30 -
1.5.5.	Přehled zpracovaných dat.....	- 35 -
1.5.6.	Porovnání metod	- 36 -
6.	Diskuze.....	- 37 -
7.	Závěr.....	- 39 -
8.	Seznam literatury.....	- 40 -
	Seznam zkratk.....	- 42 -

1. Abstrakt

Problematika infekce *Helicobacter pylori* (HP) je vrcholně aktuální gastroenterologické téma, které doznává rychlých změn díky velkému množství nových poznatků. HP je spirálovitá bakterie kolonizující lidský žaludek a duodenum. Bakterie je adaptovaná na kyselé prostředí žaludku. HP je uváděn jako agens působící gastritidu, peptické vředy a rakovinu žaludku od svého prvního popisu v roce 1984 Marhallem a Warrenem. K průkazu infekce HP lze použít několik metod. Podle potřeby provedení endoskopického vyšetření se dělí na metody invazivní a neinvazivní. Mezi invazivní metody se řadí histologické vyšetření, rychlý ureázový test, kultivace a některé molekulární techniky. K neinvazivním metodám průkazu infekce patří sérologické vyšetření, dechový test a detekce antigenu HP ve stolici. Posledně jmenovaná metoda je jednoduchá, levnější a téměř stejně přesná jako dechový test.

Z ústavu klinické mikrobiologie (ÚKM) Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK) a laboratoře klinické imunologie a alergologie INTERIMUN na poliklinice HELP v Pardubicích jsem získala data o pacientech vyšetřovaných metodou stanovení - Průkaz antigenu HP ze stolice. Vytvořila jsem přehled výskytu HP vzhledem k počtu vyšetřovaných pacientů, jejich věku a pohlaví ve sledovaném období.

Abstrakt

The issue of *Helicobacter pylori* infection is a very hot topic in gastroenterology and it evolves rapidly due to a great amount of new information. HP is a spiral bacterium colonizing human gaster and duodenum. The bacterium is adapted to acid enviroment of gaster. Since its first characterization by Marshall and Warren in 1984 HP has been known as an agens causeing gastritis, peptic ulcers and gastric cancer. The HP infection can be diagnosed by several methods. These are classified as either invasive or non-invasive according to the use of endoscopy. The invasive ones are histological examination, rapid urease test, cultivation and some molecular techniques. The non-invasive ones are serological examination , breath test and a detection of HP antigen in stools. The last method mentioned is simple, cheaper and almost as precise as the breath test.

I have gained a date from department of microbiology in FNHK and department of clinical immunology and alergology of poliklinika Pardubice about patients examined with the method of detection HP antigen in stools. I have created an overview of HP presence based on the number of examined patients, their age and sex in defined period.

2. Úvod

Objev HP představuje největší zlom v oblasti gastroenterologie v posledních 50 letech. Je pravděpodobné, že jde o jeden z nejdůležitějších objevů medicíny vůbec. Stává se jen málokdy, aby nějaký objev v lékařství změnil tak převratně a rychle nejen chápání nemoci, ale i prognózu nemocných (2). Převratnost tohoto objevu byla potvrzena v roce 2005, kdy byla J. Barrymu, B.J. Marshallovi a J. R. Warrenovi udělena Nobelova cena „za objev bakterie *Helicobacter pylori* a její úlohy u gastritídy a peptické vředové choroby“(11).

Dodnes byla získána a potvrzena řada poznatků o významné úloze tohoto mikroba v patogenezi chronické gastritídy a peptického vředu. Přítomnost této mikroaerofilní gram.negativní bakterie může být příčinou široké škály projevů – od asymptomatické kolonizace žaludeční sliznice, přes gastritídu a vředovou chorobu až k malignímu zvratu buněk - adenokarcinomu žaludku a lymfomu lymfoidní tkáně mukózy (MALT-lymfom) (10).

Významnosti HP se v dnešní době zabývá mnoho odborných publikací i článků. Proto bych se v této práci chtěla více seznámit s problematikou HP a infekcemi, které způsobuje. Také bych se zaměřila na prevalenci HP v České republice a vytvořila přehled pacientů vyšetřovaných metodou – Průkaz antigenu (Ag) HP ve stolici. Předmětná data o pacientech jsem získala z ÚKM ve FNHK a laboratoře INTERIMUN na poliklinice HELP v Pardubicích.

3. Teoretická část:

1.1. *Helicobacter pylori*

V roce 1983 J.R.Warren a B.J. Marshall popsali přítomnost bakterií v lidském žaludku a jejich spojení s nálezem gastritidy. Nalezené bakterie nazvali *CLO-Campylobacter-like organisms* a později *Campylobacter pyloridis* pro jejich podobnost s již dříve známými střevními kampylobaktery a podle místa jejich nejčastějšího nálezu. Později pak byl opraven lingvistický omyl a bakterie byla přejmenována na *Campylobacter pylori*. Brzy však byly rozpoznány morfologické, biochemické, imunologické, mikrobiologické a klinické odlišnosti této bakterie od rodu *Campylobacter*. Proto byla zařazena do nového bakteriálního rodu a v r.1989 dostala již definitivní název *Helicobacter pylori* (2).

1.1.1. Charakteristika HP

HP je spirální nebo zahnutá gramnegativní tyčka, 2,5 - 5 μ m dlouhá a 0,5 – 1,0 μ m široká, se 4-6 bičíky unipolárně umístěnými (2). Při histologickém vyšetření žaludečních biopsií má ostře ohraničené konce, při kultivaci na pevném mediu má tyčinkový vzhled a při prodloužené či opakované kultivaci převažují typické kokoidní formy (5). Spirální tvar a přítomnost bičků umožňují pohyb bakterie v hlenu. Roste v mikroaerobní atmosféře, neroste ani na vzduchu, ani v anaerobním prostředí, růstová teplota se pohybuje mezi 25-42 °C, optimální pH pro kultivaci je 6,9-8,0.

Morfologicky je možno HP rozpoznat již v rutinním barvení hematoxylinem-eosinem, ale spolehlivější je užití speciálních histologických metod: modifikované Giemsovo barvení nebo impregnace podle Warthina a Starryho. Impregnací se HP znázorňuje jako silnější tyčka, čímž se stávají zřetelnější i kolmo zachycené bakterie.

Základním předpokladem pro rozvinutí patogenních schopností HP je jeho schopnost přežít v lumen žaludku a proniknout na povrch žaludeční sliznice. Znamená to, že bakterie je schopná čelit nízkému pH v žaludku (2). Tato rezistence proti kyselému pH je dána schopností HP produkovat významné množství enzymu ureázy a štěpit močovinu za vzniku amoniaku a oxidu uhličitého a tím zvyšovat pH. Nízké pH je velmi účinnou bariérou, která chrání nejen žaludeční sliznici, ale de facto celý gastrointestinální trakt před mikroorganismy v potravě a ve vodě (1).

1.1.2. Epidemiologie HP

Infekce HP patří celosvětově mezi nejčastější vůbec. Odhaduje se, že je infikováno více než polovina lidstva. Ve vyspělých zemích je prevalence infekce HP 15 – 40%, v rozvojových zemích 70 – 99%. V nižších socio-ekonomických vrstvách je prevalence vyšší. V České republice je dle sérologických studií prevalence infekce HP 42%. Infekcí se člověk většinou nakazí v dětství (5). Zlepšování životních podmínek je pravděpodobně hlavním důvodem, proč se prevalence HP stále snižuje (3).

1.1.3. Přenos HP

Mechanismy přenosu infekce nejsou beze zbytku objasněny. Hlavními rizikovými faktory jsou špatné socioekonomické a hygienické podmínky. Jiné vlivy, např. genetické, či nutriční, mohou při přenosu bakterie také hrát roli (3). K rozvoji infekce HP dochází pravděpodobně po orálním příjmu bakterií. Přenos je pravděpodobně jako oro-orální (ve vyspělých zemích), tak i oro-fekální (v rozvojových zemích a v kolektivních zařízeních pro malé děti) (5). Většinou se jedná o přenos z osoby na osobu. K přenosu prostřednictvím pitné vody a kontaktem s domácími zvířaty je možný, ale dochází k němu spíše vzácně (3).

1.1.4. *Helicobacter heilmannii* (HH)

Objev HP vedl mikrobiology k usilovnému studiu dalších spirálních mikroaerofilních bakterií prokazovaných v žaludku. Dalším druhem izolovaným z lidí, ale též ze zvířat je *Helicobacter heilmannii* patřící do velké skupiny non-*H.pylori* žaludečních bakterií. Oficiální název je „*Candidatus Helicobacter heilmannii*“. HH se v bioptických vzorcích žaludeční sliznice člověka i zvířat se prokazuje mikroskopicky, jeho morfologie je nápadná (vícečetné tuhé závitky v podobě vývrtky) a zcela odlišná od ostatních helicobacterů (4). Stejně jako HP produkuje ureázu, ale kultivace se zatím nepodařila. HH dosahuje délky 7-10 μm a její šířka kolísá mezi 0,65-0,9 μm. Narozdíl od HP má 4-6 spirál a na jednom konci až 12 bičků kyjovitého tvaru. Od spirochet se liší tím, že nemá axilární filamenta a periplasmatická vlákna. Slabě se barví hematoxylinem-eosinem, je gamnegativní, ale dobře se znázorňuje v Giemsově barvení a v impregnaci podle Warthina a Starryho.

V žaludeční sliznici se nachází buď ve vrstvě hlenu nebo ve foveolách. Nejčastěji vyvolává chronickou aktivní gastritidu, která však mívá menší intenzitu zánětlivých změn než při infekci HP. Obě bakterie se mohou vyskytovat současně a pak se pravidelně pozorují těžší formy zánětu (2).

1.2. Infekce *Helicobacter pylori*

Při infekci HP dochází obvykle k rozvoji akutní gastritidy, která je často spojena s dyspeptickými příznaky jako jsou nauzea, zvracení a bolest v epigastriu. Infekce u většiny osob perzistuje a působí superficiální, většinou antrální gastritidu. Chronická gastritida většinou probíhá asymptomaticky. U většiny osob infekce HP nevede k rozvoji jiných patologických změn (3).

1.2.1. Chronická gastritida

Gastritida je zánět sliznice žaludku, diagnózu můžeme stanovit pouze na základě histologického vyšetření. Není žádná korelace mezi histologickým obrazem a klinickými příznaky. Velké množství pacientů s gastritidou nemá žádné symptomy a naopak, mnozí nemocní s dyspeptickými příznaky nemají gastritidu. Podle histologického obrazu rozlišujeme gastritidu akutní - s neutrofilní infiltrací, nebo chronickou - s převažující infiltrací lymfocyty a plasmatickými buňkami (3).

1.2.1.1. Morfologické formy chronické gastritidy

Chronická gastritis představuje heterogenní skupinu zánětlivých procesů různé etiologie, které se liší lokalizací a typem zánětlivých změn. Postihuje sliznici, ale může přecházet i do hlubších vrstev žaludeční stěny. Podle rozsahu a typu zánětlivých změn žaludeční sliznici se mikroskopicky rozlišují dvě základní formy chronické gastritidy:

1. Chronická povrchová gastritis (gastritis chronica superficialis). Vyznačuje se lymfoplasmocytární zánětlivou infiltrací žaludeční sliznice v oblasti foveol a žlazových krčků. V povrchovém a foveolárním epitelu dochází k regresivním změnám, jež se projevují

úbytkem až úplnou ztrátou hlenu. Takto poškozené buňky většinou zanikají. Některé projevy naznačují, že tento typ zánětu představuje spíše iniciální fázi jiných typů gastritid. Může rovněž znamenat nespecifické, spontánně se hojící onemocnění, podobné akutní gastritidě, ale s delším trváním.

2. Chronická hluboká gastritis (gastritis chronica profunda). Je charakterizována zánětlivým lymfoplasmatickým infiltrátem v celé tloušťce sliznice, tedy i v zóně žlázek.

Déletrvající chronická gastritis vede k atrofii sliznice a označuje se jako chronická atrofická gastritis. Počet žlázek postupně klesá a zánětlivě infiltrované stroma, v normální sliznici velmi úzké, se výrazně rozšiřuje. Řídká síť retikulárních vláken stromatu je v okolí žlázek zahuštěná a sliznice se nápadně snižuje.

1.2.1.2. Klasifikace chronické gastritidy

Rozdělení chronických gastritid vychází z etiologie a lokalizace zánětlivých změn v žaludeční sliznici. Na základě těchto kritérií byla vypracována celá řada klasifikačních systémů. Jedna z posledních klasifikací chronických gastritid, navržená Applemanem v roce 1994, vymezuje 3 základní typy a další méně obvyklé jednotky:

1. Bakteriální gastritis – typ B (difuzní antrální *H.pylori* pozitivní gastritis)
2. Autoimunní gastritis – typ A (difuzní atrofická autoimunní korporální gastritis)
3. Chemická gastropatie (chronická gastritis C)
4. Multifokální atrofická gastritis
5. Lymfocytární gastritis podobná enteritidě při glutenové enteropatii
6. Ložisková gastritis
7. Granulomatozní gastritis
8. Crohnova choroba žaludku
9. Eosinofilní gastritis

1.2.1.3. Chronická difuzní antrální gastritis – *H.pylori* pozitivní (gastritida B)

Je nejčastějším typem chronického zánětu žaludeční sliznice. HP vykazuje afinitu k antrální sliznici, kterou při infekci žaludku postupně osídluje. Později přechází i na korporální sliznici, jež je na přítomnost bakterií méně citlivá a obvykle reaguje mírnějším zánětem. Pravidelně je také infikována sliznice kardie a vzácně se může HP prokázat i

v Barretově sliznici jícnu. Kolonizace antrální sliznice někdy zůstává trvale ložisková a proto se ke spolehlivému histologickému průkazu HP, ale také k určení typu zánětlivých změn, které bývají v kolonizovaných úsecích výraznější, doporučuje odběr alespoň dvou biopeptických vzorků z různých částí antra.

Morfologický nález ve sliznici antra u HP-pozitivní gastritidy většinou odpovídá chronické aktivní gastritidě, ale může mít i povahu neaktivního zánětu. Postihuje povrchovou část nebo celou tloušťku sliznice, v níž se často nacházejí lymfatické folikuly. Déletrvajícím zánětem vede k atrofii sliznice a k intestinální metaplazii.

Diagnóza chronické gastritidy B vyžaduje nejen určení typu zánětlivých změn, ale i jejich intenzity. Grading chronické gastritidy B, navržený mezinárodní komisí v Sydney (1991), vychází z hodnocení pěti histologických nálezů (chronická zánětlivá infiltrace, přítomnost polynukleárů, atrofie žlázek, intestinální metaplazie, množství helicobakterů) (2).

1.2.2. Akutní gastritida

Akutní gastritida je akutní zánětlivý proces žaludeční sliznice. Akutní gastritidu mohou způsobit různé faktory, mezi něž patří:

- *H.pylori*, *H.heilmannii* (akutní infekce)
- Bakterie (streptokoky, *E.coli*, *Proteus sp.*, *Salmonella so.*, *T.pallidum*, aj.)
- Viry (CMV)
- Mykózy (generalizované), parazité
- Nesteroidní antirevmatika, zvláště aspirin
- Excesivní požití alkoholu
- Alimentární vlivy
- Těžký stres

Akutní gastritida může být asymptomatická, ale obvykle jí provází bolest v epigastriu, nauzea, zvracení, průjem, nechutenství a vzácně krvácení do gastrointestinálního traktu (GIT). Příznaky obvykle trvají pouze několik dnů. Virová či bakteriální gastritida je častou komplikací u imunosuprimovaných osob. Akutní gastritida způsobená infekcí HP přechází u většiny osob v gastritidu chronickou.

Diagnózu určíme zpravidla na základě anamnézy, endoskopické vyšetření s biopsiemi (které jako jediné může diagnózu potvrdit) se indikuje v případě diagnostických rozpaků. Při endoskopii může být makroskopicky sliznice žaludku normální, nebo jsou patrné

eroze, které mohou být i zdrojem krvácení. Histologicky nacházíme nejčastěji infiltraci neutrofilů nad bazální membránou, ale histologický obraz je závislý na etiologii. Diferenciálně diagnosticky musíme myslet na akutní hepatitidu, pankreatitidu, střevní infekce a styfylokokovou enterotoxikózu. Náhlé příhody břišní se taky mohou manifestovat pod nespecifickým obrazem akutní gastritidy

Léčba je symptomatická, nutné je zabezpečit dostatečnou hydrataci. Realimentace by měla probíhat pozvolna s vyloučením dráždivých a ostrých jídel. Z léků podáváme spasmolytika, antiemetika nebo prokinetika, při průjmu antidiaretika (3).

1.2.3. Duodenitis

Chronická *H.pylori*-pozitivní gastritis je často provázena zánětlivými změnami ve sliznici duodena, jejichž maximum se nachází v úsecích nejvíce vystavených účinku žaludeční šťávy. Nejčastěji je postiženo velké ohbí a zadní stěna bulbu, vzácně distální část duodena. Změny bývají ložiskové a vyžadují odběr většího počtu bioptických vzorků. Rozlišujeme duodenitis akutní, chronickou a žaludeční metaplazii.

Akutní duodenitis je mikroskopicky charakterizována hyperémií a edémem slizničního stromatu s mírným rozšířením klků. U těžších forem se ve sliznici nacházejí drobné hemoragie a povrchové eroze, jež mohou být zdrojem závažného krvácení.

Chronická duodenitis je dle rozsahu zánětlivých změn rozlišena na 3 stupně: I, II, III. Lehká forma zánětu (I) většinou probíhá asymptomaticky a proto nemá větší klinický význam. Pozoruje se u 12 – 26% zdravých jedinců. Chronická duodenitis II. se pravidelně nachází v okolí peptického vředu duodena. U některých nemocných jsou těžší formy zánětu provázeny gastrickou metaplazií povrchového epitelu, jež se pravidelně uplatňuje při vzniku duodenálního peptického vředu.

Žaludeční (pylorická) metaplazie odpovídá náhradě povrchového epitelu tenkého střeva (pohárkových a absorpčních buněk) cylindrickými buňkami, které obsahují neutrální hlen. Krypty a žlázy duodenální sliznice si při metaplazii zachovávají normální vzhled. Ložiska gastrické metaplazie mohou být osídlena HP. Mimo metaplazii se HP v duodenu nevyskytuje (2).

1.2.4. Peptický vřed, vředová choroba

Vředem trávicího traktu označujeme slizniční defekt pronikající skrze muscularis mucosae. Méně hluboké léze se nazývají eroze. Vředy mohou být projevem různých chorob (např. nádor, Crohnova choroba aj.), pojmem peptický vřed zdůrazňujeme patogenetický vliv kyseliny chlorovodíkové a pepsinu. Peptické vředy proto nalézáme pouze v místech, které jsou vystaveny agresivnímu působení žaludeční šťávy, nejčastěji v žaludku a bulbu duodena. Vzhledem k tomu, že peptické vředy často recidivují, hovoříme o vředové chorobě. Přístup k této problematice významně ovlivnil objev HP.

1.2.4.1. Etiopatogeneza

Podmínky pro vznik peptických vředů vznikají, pokud je narušena rovnováha mezi tzv. agresivními a ochrannými faktory. Některé agresivní faktory jsou tzv. vnitřní (tělu vlastní) a jiné vnější (léky).

Mezi agresivní faktory patří :

- Pepsin a kyselina chlorovodíková (oba nezbytné pro vznik peptického vředu)
- *H.pylori*
- Žlučové kyseliny
- Ischémie (porucha mikrocirkulace)
- Léky (nesteroidní antirevmatika)
- Kouření

Mezi ochranné faktory patří:

- Žaludeční hlen
- Prostaglandiny (zvláště třídy E)
- Sekrece bikarbonátů do žaludeční šťávy
- Intaktní mikrocirkulace
- Regenerační schopnost žaludečního epitelu
- Normální membránový transport na apikální části epitelových buněk

Patogeneze vzniku jednotlivých vředů není jednotná a liší se podle vyvolávajících příčin. V patogenezi vředů „*H.pylori*-pozitivních“ se uplatňuje vzájemný vztah mezi virulencí HP, odpovědí hostitele a zevními faktory. Virulence HP není u všech druhů stejná. Ulcerogenní jsou kmeny, které produkují různé toxické substance (cytotoxiny). Nejznámější indikátor cytotoxických kmenů je protein kódovaný *cag A* genem.

Mezi faktory závislými na hostiteli řadíme faktory genetické (větší riziko vředové choroby u krevní skupiny 0, „rodinný“ výskyt vředové choroby, HLA-B5 antigen). Důležitým faktorem vzniku vředů je typ a tíže zánětlivé reakce vyvolané infekcí HP. V důsledku zánětu dochází k produkci různých substancí (interleukin 8, TNF α , kyslíkové radikály), které přispívají k narušení integrity žaludeční sliznice. Tyto substance ovlivňují i žaludeční sekreci, která bývá u pacientů s duodenálními vředy zvýšená. Vlivem větší expozice kyseliny solné dochází k rozvoji žaludeční metaplazie v bulbu. HP může dále kolonizovat tyto okrsky metaplazie s následným rozvojem zánětu přímo v bulbu duodena. Tato žaludeční metaplazie je po léčbě HP reverzibilní. Při infekci HP také dochází k narušení inhibičních neuronálních a endokrinních mechanismů (např. somatostatin), které za normálních podmínek blokují sekreci gastrinu a kyseliny solné.

U pacientů s žaludečními vředy nenacházíme rozdíl od nemocných s vředy duodenálními hypersekreci kyseliny solné, i když i zde je její přítomnost pro jejich vznik nezbytná. Asi 10% pacientů se žaludečním vředem má také duodenální vřed. Proč někteří jedinci mají vřed v žaludku a jiní v duodenu není známo.

Tyto složité vztahy mohou komplikovat zevní vlivy jako např. nevhodná strava, kouření a přidružená onemocnění. Častěji nacházíme peptické vředy u pacientů s alkoholickou cirhózou jater, chronickou obstruktivní chorobou plicní, chronickým renálním selháním a hyperparathyroidismem. Vliv psychických faktorů na vznik peptických vředů nebyl prokázán.

HP je hlavním etiopatogenetickým činitelem při vzniku peptického vředu (po eradikaci bakterie se sníží pravděpodobnost recidivy vředu na minimum). Většina dvanáctníkových (90-95%) i žaludečních (70%) vředů je spojena s infekcí HP, i když pouze u malé části infikovaných se objeví peptický vřed.

1.2.4.2. Patologický obraz

Většina duodenálních vředů je lokalizována v bulbu duodena, nejčastěji na přední straně. Žaludeční vředy jsou nápadně často lokalizovány podél malé křivky nebo v oblasti tzv. junkční zóny mezi sliznicí těla a antra. Většina pacientů má jeden vřed, někteří však mohou mít vředů více. Vředy jsou nejčastěji oválné s více či méně navality okraji. Výrazně navalté nepravidelné okraje svědčí spíše pro vředy maligní. Baze vředu je většinou čistá a bělavá. Histologický obraz zahrnuje nekrózu a fibrinoid v první vrstvě, v dalších vrstvách je přítomen zánět a granulační tkáň (3).

1.2.5. Karcinom žaludku

Žaludeční karcinom je ve světě druhou nejčastější příčinou úmrtí na zhoubné nádory a to i přesto, že dochází k poklesu výskytu určitých jeho typů (3). V populaci s vysokou incidencí HP byl opakovaně prokázán zvýšený výskyt karcinomu žaludku především intestinálního typu, ale jejich vzájemný vztah nebyl zatím zcela objasněn. Při vzniku karcinomu se zřejmě uplatňuje celá řada faktorů (2).

Etiologie je multifaktoriální, roli hrají faktory vnější (dieta, prostředí), vnitřní (genetické faktory) a získané vnitřní (např. atrofie a intestinální metaplazie žaludeční sliznice např. při perniciózní anémii). Vyšší riziko mají i nemocní po operaci žaludku a s adenomovými polypy. HP je spojován s rizikem vzniku karcinomu žaludku nepřímo díky jeho vlivu na vznik atrofické gastritidy a intestinální metaplazie u některých nemocných. Znovu je třeba zdůraznit, že většina infikovaných nikdy karcinomem žaludku onemocní.

Karcinom žaludku se klasifikuje na základě několika kritérií. Podle hloubky invaze se rozlišuje časný a pokročilý karcinom žaludku, podle histologického typu intestinální a difúzní typ, existuje také makroskopická klasifikace.

Časný karcinom žaludku je termín zavedený v roce 1962 Japonskou společností pro gastrointestinální endoskopii. Tento termín zahrnuje všechny tumory infiltrující mukózu i submukózu, bez ohledu na to, zda jsou nebo nejsou postiženy přilehlé uzliny. Pokud karcinom proniká hlouběji, hovoříme o pokročilém karcinomu žaludku. Význam tohoto dělení spočívá v tom, že u časného karcinomu při správné léčbě přežívá pět let až 90% nemocných, zatímco u pokročilých karcinomů je pětileté přežívání méně než 30%.

Podle histologického obrazu rozlišujeme intestinální typ (se žlázovými strukturami) a difúzní typ (bez žlázových struktur). Intestinální typ bývá dobře diferencovaný, produkuje málo hlenu, často vzniká v terénu atrofické gastritidy s intestinální metaplazií. HP je zde jedním z rizikových faktorů. Hlavní lokalizací je oblast antra a pyloru. Difúzní typ se vyskytuje u mladších pacientů, častěji proximálně a významně produkuje hlen. Difúzní typ je ve srovnání s intestinálním více agresivní. Obě histologické formy karcinomu metastazují do regionálních i vzdálených lymfatických uzlin, hematogenní metastázy jsou typické v játrech a plicích (3).

1.2.6. MALT lymfom žaludku

Vztah maligního lymfomu (ML) k autoimunitním chorobám je znám již mnoho let. Zvýšené riziko non-hodgkinových ML a Hodgkinovy choroby se pozoruje u orgánově nespecifických autoimunitních onemocnění, jakými jsou např. systémový lupus erythematosus, zejména Hashimotovy thyroiditidy a Sjögrenova syndromu. Oba orgánové typy autoimunitního zánětu se vyznačují tvorbou lymfatické tkáně, která má úzký vztah ke sliznici podobně jako peyerovy pláty střeva. Přítomnost lymfatických folikulů u chronické *H.pylori*-pozitivní gastritis se v poslední době uvádí v souvislosti s vývojem MALT-lymfomu žaludku. Společné epitopy žaludeční sliznice a HP, tvorba příslušných autoprotilátek a v neposlední řadě průkaz helikobakterií u všech nemocných s ML žaludku tento předpokládaný vztah podporují. MALT lymfomy obecně vykazují nízký stupeň malignity. Mohou však přecházet do vysoce maligních lymfomů nebo jsou vysoce maligní od počátku (2).

1.3. Léčba

V současné době není k dispozici ideální léčba, která by byla stoprocentně efektivní. Ačkoliv je HP in vitro citlivý na velké množství různých antibiotik (ATB), léčba jedním ATB vede k eradikaci bakterie jen zřídka. Je proto nutné užívat kombinace léků. V klinických studiích byly nalezeny kombinace dosahující úspěchu v 90% případů. V běžné klinické praxi se však s těmito kombinacemi dosahuje horších výsledků s procentem eradikace okolo 80%. Nedávná metaanalýza prokázala, že úspěch eradikace nezávisí ani tak na použité kombinaci léků, ale že se mění v závislosti na centru a regionu. Úspěch eradikace ovlivňují faktory jako věk, pohlaví, rezistence na antibiotika v příslušné oblasti, virulence bakterie, onemocnění pacienta a v neposlední řadě spolupráce pacienta.

Primární rezistence na ATB vzrůstá nejenom v důsledku masové eradikace HP, ale též v důsledku užívání ATB k léčbě jiných infekcí. Léčíme-li totiž těmito ATB osobu infikovanou HP (např. pro respirační infekci), rezistence HP na toto ATB se vyvíjí neobyčejně rychle (6). Zvláště zřetelná je rezistence na metronidazol (2).

V současné době považujeme za nejvhodnější dělit indikace k léčbě infekce na 1.absolutní, kdy o léčbě HP není pochyb a na 2.relativní, kdy nebyl nikdy prokázán přímý

užitek u pacientů, kteří tuto léčbu podstoupili, ale tento užitek lze předpokládat. A konečně 3. kontroverzní, kdy léčbu v současné době nelze doporučit, neboť přímý pozitivní efekt léčby nebyl nikdy prokázán a nelze jej ani automaticky předpokládat. Dále léčbu dělíme na léčbu první volby, druhé volby a léčbu v případě selhání dvou eradikačních kúr (6).

Studie prokázaly, že HP je in vitro citlivý na řadu protimikrobiálních léků, zvláště na amoxicilin, tetracyklin, erytromycin, azithromycin, roxithromycin a další antibiotika. Není tomu však vždy in vivo. Do léčby infekce HP byly také zařazeny nitroimidazolové preparáty pro svůj antimikrobiální účinek také na mikroaerofilní bakterie. Používá se především metronidazol, tinidazol a ornidazol. Do řady antibiotik v terapii infekce HP se v posledních letech zařadilo zatím nejúspěšnější ATB – klaritromycin. Je to ATB nové generace makrolidů se širokým spektrem účinku proti grampozitivním i gramnegativním aerobům i anaerobům. Prokázalo se, že je vysoce účinný i proti HP a to i v monoterapii (2).

1.4. Metody průkazu

K poznání zásadní role bakterie *Helicobacter pylori* v patogenezi vředové choroby bylo vyvinuto několik diagnostických metod k průkazu infekce. Z praktického hlediska se tyto testy dělí na **invazivní** (k diagnostice je nutné odebrat bioptické vzorky žaludeční sliznice při endoskopickém vyšetření) a **neinvazivní** (endoskopické vyšetření není nutné). K invazivním testům řadíme histologické vyšetření, rychlý ureázový test, kultivaci a molekulárně biologické metody (PCR). K neinvazivním testům se řadí vyšetření sérologické, detekce metabolitů hydrolýzy urey ve vydechovaném vzduchu, moči či krvi a nově detekce antigenu HP ve stolici. Žádný z testů však není stoprocentně senzitivní ani specifický, a proto se doporučuje infekci HP diagnostikovat alespoň dvěma metodami. Výtěžnost všech testů je negativně ovlivněna léčbou antibiotiky nebo léky blokujícími sekreci žaludeční kyseliny a konkrétní výběr závisí na dané klinické situaci a zkušenostech pracoviště.

1.4.1. Invazivní metody

K většině invazivních metod průkazu infekce HP je nutné provedení endoskopického vyšetření s odběrem vzorků sliznice žaludku, popsány jsou však i jiné invazivní metody jako např. nasogastrická intubace sondou k aspiraci žaludeční šťávy a jejímu vyšetření. Mezi invazivní testy řadíme histologické vyšetření, rychlý ureázový test, kultivaci, a v poslední době stále více užívané (i když stále pouze v rámci výzkumu) metody PCR diagnostiky.

1.4.1.1. Histologické vyšetření

Histologické vyšetření patří mezi nejčastěji užívané diagnostické metody. Doporučuje se odebrat alespoň dva vzorky z antra a dva z těla žaludku, někteří autoři doporučují odběr vzorků i z kardia. Výhodou histologického vyšetření je současné zhodnocení aktivity zánětu a posouzení přítomnosti případných změn sliznice žaludku jako jsou atrofie a nebo intestinální metaplasie. HP je dobře patrný na povrchu epitelových buněk jako spirální mikroorganismus. Při barvení vzorků se dříve užívalo stříbření (metoda Warthin – Starry), nyní se dává přednost modifikované metodě barvení dle Giemsey se senzitivitou kolem 90%. Nověji se užívá barvení dle Genty, jehož výhodou je i kvalitní zobrazení okolní tkáně. Dále se užívá barvení alciánovou žlutí s toluidinovou modří, které dosahují podobné výsledky jako s metodou modifikovaného barvení dle Giemsey. Specifita a senzitivita histologického vyšetření se může zvýšit užitím imunohistochemie s monoklonálními protilátkami.

1.4.1.2. Rychlý ureázový test

Rychlé ureázové testy jsou velmi rozšířené. Jsou velmi levné, relativně spolehlivé a výsledek můžeme obdržet během několika minut až hodin bez toho, abychom odesílali jakékoliv vzorky do laboratoře. V současnosti je na trhu celá řada těchto testů (např. CLO test). Jeho princip spočívá ve změně zbarvení pH citlivého indikátoru při rozkladu močoviny na amoniak a oxid uhličitý (tato reakce probíhá pouze za přítomnosti ureázy u infikovaných osob). Amoniak totiž způsobí zvýšení pH s následným fialovým či červeným zbarvením indikátoru., kterým je zpravidla fenolová červeň.

K tomuto vyšetření se odebírají jedna nebo raději dvě biopsie, které se umístí do předem připravených destiček s jamkami nebo malých zkumavek s tekutým či polotekutým médiem. U některých pacientů je test pozitivní během několika málo minut. Vyšetření lze prohlásit definitivně za negativní pokud nedojde ke změně barvy do 24 hodin. Senzitivita a

specifita rychlého ureázového testu je 90%, senzitivita se však výrazně snižuje při krvácení do GIT .

1.4.1.3. Kultivační vyšetření

Kultivační vyšetření je náročnou a drahou metodou a proto se k základní diagnostice HP rutinně neuzívá. V klinické praxi se kultivační vyšetření indikuje u pacientů, u nichž selhala antibiotická léčba HP, neboť toto vyšetření umožňuje stanovit citlivost a rezistenci konkrétního kmene HP k jednotlivým ATB. Rezistence na ATB totiž v posledních letech celosvětově stoupá a negativně ovlivňuje výsledky léčby. Dále se kultivační vyšetření hojně užívá v rámci výzkumu. Senzitivita je ve srovnání s ostatními metodami menší (80 – 90%), specifita je z definice mikrobiologického vyšetření stoprocentní.

K zajištění co největší pravděpodobnosti úspěšné kultivace je třeba dodržet standartní postupy dopravy a zpracování biotických vzorků. Vzorky se musí zpracovat co nejdříve, protože k usmrcení dochází krátce po jeho expozici nevhodnému cizímu prostředí. Biopsie se doporučuje odebírat do Stuartova transportního media. HP zde při teplotě 4°C přežívá 24 hodin, ale při teplotě nad 15°C pouze 6 hodin. K samostatné kultivaci se používá kombinace neselektivních a selektivních pūd, nejčastěji Columbia agar s různými přísadkami jako např. škrob či bovinní albumin a ATB. Kultivace se provádí za mikroaerofilních podmínek. Je popsána i úspěšná kultivace ze stolice a zubního povlaku, klinický význam to však nemá.

1.4.1.4. Metody molekulární biologie

Metody molekulární biologie jsou sice přesné, ale ve srovnání s ostatními metodami drahé a náročné, proto se v běžné klinické praxi neuzívají. Používají se především v klinickém i základním výzkumu. Nejrozšířenější molekulární metodou detekce je polymerázová řetězová reakce (PCR), s jejíž pomocí se HP prokazuje v biopsiích z žaludku, v žaludeční šťávě, zubním povlaku či stolici. Metoda má senzitivitu až 100%, která ale velmi závisí na výběru primární sekvence nukleových kyselin (primer).

HP lze potvrdit in situ hybridizací, tato technika se ale pro její náročnost v rutinní praxi nepoužívá.

1.4.2. Neinvazivní metody

Neinvazivní testy se nejčastěji indikují při průkazu HP u pacientů s dyspepsií horního typu mladších než 45 let. A dále k ověření úspěšné eradikační léčby, není-li indikováno kontrolní endoskopické vyšetření. Neinvazivní metody diagnostiky se používají také v epidemiologických studiích nebo u pacientů, kde je endoskopické vyšetření rizikové (těhotenství). Konečně je indikujeme k primární diagnostice infekce u extradigestivních chorob, kde by infekce HP mohla hrát patogenetickou úlohu (např. rezistentní kopřivka).

1.4.2.1. Vyšetření sérologické

Vyšetření protilátek neurčuje aktuální stav infekce, protože případná pozitivita přetrvává i několik let po úspěšné léčbě. Sérologické vyšetření je vhodné zejména pro epidemiologické studie nebo při vyhledávání HP v rodinách pacientů s komplikovaným průběhem chorob vázaných na HP (perforace peptického vředu, karcinom žaludku). Nelze je použít ke kontrole úspěchu eradikační léčby, neboť pokles hladiny protilátek je pozvolný (k významnému poklesu hladin protilátek dochází během 6-12 měsíců, k úplné negativizaci nemusí dojít ani po dvou letech). Sérologické vyšetření lze doporučit i u pacientů s krvácejícím vředem žaludku nebo duodena při negativním histologickém vyšetření anebo rychlém ureázovém testu (při krvácení je jejich výtěžnost snížena).

K detekci protilátek lze užít řadu technik. Nejužívanější je stanovení protilátek třídy IgG enzymovou imunoabsorpční esejí (ELISA), které je velmi spolehlivé. Stanovené protilátek třídy IgA je málo senzitivní. Protilátky třídy IgM se vyskytují pouze u 10% infikovaných (zvláště dětí), a proto se k diagnostice infekce HP neužívají. Mezi další metody stanovení protilátek patří aglutinace, imunoblot („Western blot“) a imunochromatografie. Aglutinace a imunochromatografie jsou metody, na nichž jsou založeny tzv. rychlé sérologické testy.

1.4.2.2. Dechový test

Dechový test je globálním (tj. posuzujícím přítomnost HP v celé sliznici žaludku na rozdíl od testů „neglobálních“ při odebírání biopsických vzorků) neinvazivním testem s nejvyšší specifitou a senzitivitou. Spolu s vyšetřením antigenu ve stolici je metodou první volby k primární diagnostice HP, není-li indikováno endoskopické vyšetření.

Princip dechového testu je založen na rozložení orálně podané močoviny ureázou na amoniak a oxid uhličitý. Pokud infikovanému pacientovi podáme močovinu se značeným izotopem uhlíku (např. neradioaktivní ^{13}C nebo radioaktivní ^{14}C), dojde k jejímu rozložení na oxid uhličitý a amoniak. Ve vydechovaném vzduchu lze pak detekovat oxid uhličitý s užitým izotopem uhlíku. Při analýze vydechovaného vzduchu se měří poměr mezi značenými a přírodními izotopy uhlíku.

Existují 3 hlavní metody analýzy vzorků vydechovaného vzduchu. Všechny tři jsou stejně přesné, liší se pouze pořizovací cenou a technickými detaily. Nejvíce se užívá hmotová spektrometrie, jejíž nevýhodou je vysoká cena. Další možností je infračervený analyzátor, který je levnější, vyžaduje však, aby pacient dodal daleko větší objem vzduchu. Třetí možností je analýza laserová (př. je laserový systém LARA) (6).

1.4.2.3. Průkaz antigenu HP ve stolici

Viz. Experimentální část

4. Experimentální část

1.5. Průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici

1.5.1. *Helicobacter* Antigen Quick

Tento test je určen pro kvalitativní stanovení Ag HP ve fekálních vzorcích. Jde o rychlé jednokrokové imunochromatografické stanovení. Vyšetření HP tímto testem se stalo uznávanou metodou pro svoji vysokou citlivost a specifitu. Stejně dobrých výsledků se dosáhlo i při kontrole úspěchu eradikace u dospělých a metoda se osvědčila i u dětí. Vyšetření antigenu ve stolici se stalo rovnocennou alternativou k dechovým testům, se kterými velmi dobře koreluje. Jeho provedení je lehké, rychlé a pacienty téměř vůbec nezatěžuje. Oproti dechovému testu je levnější a nevyžaduje speciální laboratorní vybavení, tzn.můžeme je provádět kdekoliv.

1.5.1.1. *Odběr a uchování vzorku*

Vzorky stolice by měly být odebrány do čistých kontejnerů a stanovení by mělo proběhnout hned po odběru. Vzorky mohou být uchovávány při 2-8 °C po 1-2 dny před testováním. Pro delší uchování, maximálně po 1 rok, musí být vzorek zmrazen na -20°C.

1.5.1.2. *Složky testu (pro 25 stanovení)*

- testovací stripy - 25 testovacích stripů potažených monoklonálními protilátkami proti HP a konjugátem, 1 kontejner vakuově balený s vysoušedlem
- ředidlo na vzorek – k použití přímo, s kapátkem
- materiály nutné, nedodané – odběrové tyčinky, kontejner na odběr vzorku, mikropipety, zkumavky nebo lahvičky, jednorázové rukavice

1.5.1.3. Princip testu

Membrána je předem potažena monoklonálními protilátkami proti HP v oblasti testovacího proužku. Během testování reaguje antigen ve vzorku s barevným konjugátem (monoklonální protilátky proti HP – červené). Vytvořený komplex antigenu HP s konjugátem migruje po membráně kapilárním vzlínáním. V případě pozitivního výsledku budou specifické protilátky přítomné na membráně vázat barevný konjugát a tvořit červený proužek. Přebytek konjugátu pokračuje v migraci po membráně k imobilizovaným protilátkám lokovaným v kontrolním proužku a vytvářet zeleně zbarvený proužek. Přítomnost tohoto zeleného proužku znamená ověření, že byl použit dostatečný objem, že proběhlo vzlínání a jako inertní kontrola pro reagentie.

1.5.1.4. Postup testu

1. Necháme testovací stripy a vzorky vytemperovat za pokojové teploty (15-30°C) než začneme testovat. Balení otevřeme až těsně před provedením testu.
2. Dáme 1ml (asi 20 kapek) ředidla na vzorek do testovací zkumavky.
3. Přidáme asi 5 mm vzorku tyčinkou dobře zatřepeme, aby se vzorek dobře rozptýlil.
4. Dobře zatřepeme testovací zkumavkou pro rozptýlení vzorku. Necháme nejméně 5 minut zkumavku stát pro usazení.
5. Za použití pipety odebereme tekutinu z vrchu a dáme ji do malé zkumavky nebo do lahvičky tak, aby hloubka byla 1 cm a více.
6. Ponoříme testovací strip do připravené tekutiny z bodu 5. Nesmíme přesáhnout linii vyznačenou na stripu.
7. Odečteme výsledek po 5 minutách ponoření stripu. (7).

1.5.2. Průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici kvalitativní enzymovou imunoanalýzou (ELISA)

Vyšetření HP ve stolici testem ELISA se stalo uznávanou metodou pro svoji vysokou citlivost a specifitu, jenž dosahuje průměrně 95%, což jsou hodnoty srovnatelné s výsledky dechových testů. Metoda je vhodná pro diagnostiku infekce HP u dospělých i u dětí, a to i u velmi malých. Dále se velmi dobře hodí pro časné monitorování eradikace infekce a k diagnostice případné reinfekce.

1.5.2.1. Odběr a uchování vzorku

Vzorek stolice je třeba do cílové laboratoře dopravit do 2-3 dnů od odběru. Po dobu dvou dnů může být uchován při běžné pokojové teplotě. Rovněž je možno jej uskladnit při teplotě 2-8 °C, kde vydrží bez ovlivnění výsledků analýzy až 3 dny.

1.5.2.2. Složky testu

- mikrotitrační destička s jamkami potaženými monoklonálními protilátkami specifickými pro Ag HP
- pozitivní a negativní kontrola, konjugát, substrát, ředící roztok, ukončovací (stop) roztok, promývací roztok
- nastavitelná mikropipeta, osmikanálová pipeta, zkumavky na ředění vzorků, promývací zařízení, fotometr, stolní odstředivka, třepačka mikrotitračních destiček.

1.5.2.3. Princip testu

Sendvičová enzymatická imunoanalýza využívající technologie amplifikace signálu pro vysoce citlivé stanovení antigenů HP ve stolici. Mikrotitrační jamky jsou potaženy monoklonálními protilátkami specifickými pro antigeny HP. Do jamek je přidán supernatant suspenze stolice a monoklonální protilátky značené křenovou peroxidázou (HRP) (konjugát protilátky). Během inkubace se antigeny HP přítomné ve vzorku navážou na protilátky mikrotitrační destičky a na protilátky značené HRP, čímž je vytvořen „sendvičový komplex“. Mikrojamky jsou promyty, aby byl odstraněn nenavázaný konjugát protilátky. Přidán je bezbarvý substrátový roztok obsahující tetrametylbenzidin (TMB) a peroxid vodíku. Vázaná

HRP oxiduje substrát za vzniku modře zbarveného produktu. Přidáním zastavovacího roztoku Stop solution se barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení je stanovena spektrofotometricky.

1.5.2.4. Postup

1. Příprava reagensů – promývací roztok (ředíme 10x v destilované vodě).
2. Soupravu necháme vytemperovat na laboratorní teplotu.
3. Připravíme si příslušný počet jamek.
4. Všechny reagenty lehce promícháme.
5. Pipetujeme po 50 μ l supernatantu stolice, 50 μ l pozitivní kontroly a 50 μ l negativní kontroly.
6. Přidáme 50 μ l konjugátu připraveného k použití přímo do každé mikrojamky .
7. Zakryjeme destičku dodanou krycí fólií a za třepání inkubujeme při teplotě 18 – 27°C po dobu 55 – 65 minut.
8. Před promýváním opatrně sejmeme z destičky krycí fólii a začneme promývat. Odsajeme nebo vytřepeme obsah mikrojamek a úplně naplníme vyprázdňené mikrojamky čerstvě připraveným promývacím pufrem. Je nezbytné provést nejméně pět promývacích cyklů.
9. Do každé mikrojamky přidáme 100 μ l substrátu.
10. Inkubujeme při teplotě 20 – 30 °C po dobu 10 minut.
11. Zastavíme reakci přidáním 100 μ l zastavovacího činidla – Stop Solution.
12. Mikrojamky by měly být fotometricky odečteny do 15 minut po přidání zastavovacího roztoku na fotometru s nastavenou primární vlnovou délkou 450 nm a sekundární 405 nm (referenční 630 nm).
13. Interpretace výsledků:
 - při dvojí vlnové délce (450/620 až 650nm):
 - 1.vzorky s hodnotou absorbance $\geq 0,150$ jsou pozitivní
 - 2.vzorky s hodnotou absorbance $< 0,150$ jsou negativní
 - při jediné vlnové délce (450nm):
 - 1.vzorky s hodnotou absorbance $\geq 0,190$ jsou pozitivní
 - 2.vzorky s hodnotou absorbance $< 0,190$ jsou negativní

(8).

5. Výsledky

Podkladový materiál- tzn. počty a výsledky vyšetření pacientů na HP, provedené metodou – Průkaz antigenu HP ve stolici, jsem získala z ÚKM FNHK a laboratoře klinické imunologie a alergologie INTERIMUN s.r.o. na poliklinice HELP v Pardubicích. Ve FNHK je HP zjišťován pomocí Helicobacter Antigen Quick test a výsledky testů jsou zpracovány za období od 14.7. 2003 do 12.12. 2008. V laboratoři INTERIMUN v Pardubicích je HP stanovován kvalitativní enzymovou imunoanalýzou (ELISA) a data zpracovávána za období od 16.1. 2006 do 4.11. 2008.

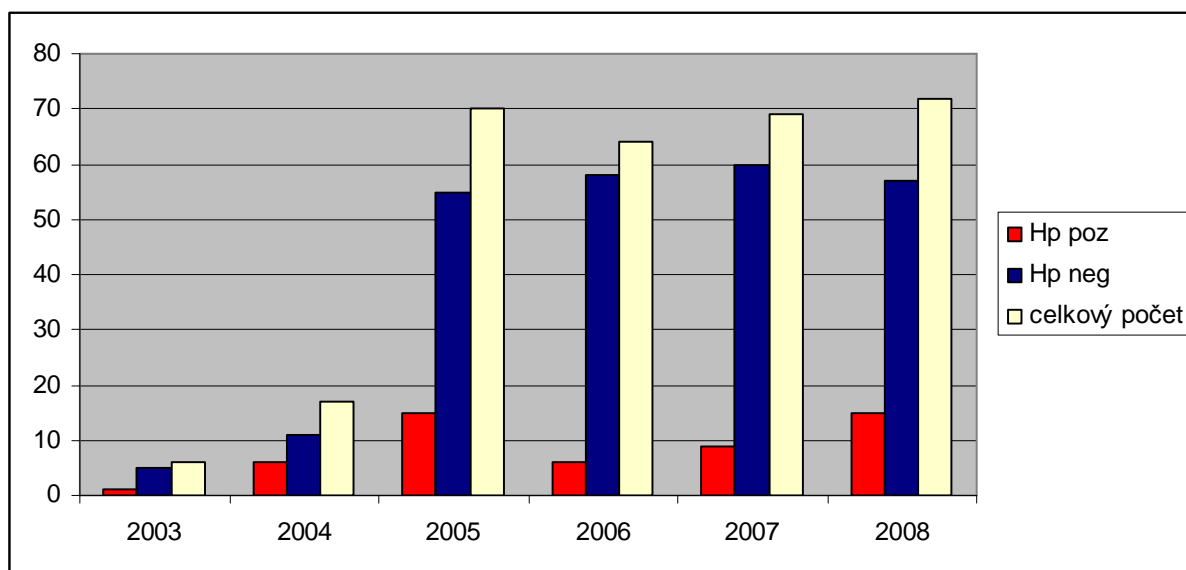
1.5.3. Přehled počtu vyšetřených pacientů a jejich výsledků z oddělení mikrobiologie FNHK

Od 14.7. 2003 do 12.12. 2008 bylo vyšetřeno metodou – stanovení Ag HP ze stolice (Helicobacter Anigen Quick) celkem 298 pacientů

Tab.č.1. Počty a výsledky vyšetřovaných pacientů na Ag HP ze stolice za dané období r. 2003-08

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
HP poz	1	6	15	6	9	15
HP neg	5	11	55	58	60	57
celkový počet	6	17	70	64	69	72

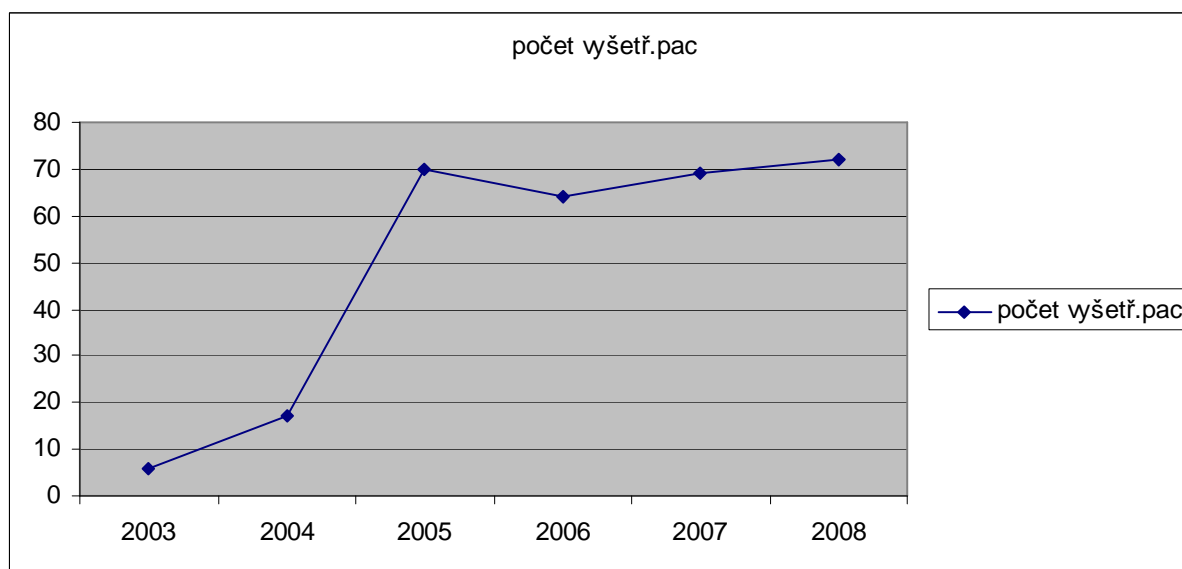
Graf č. 1 znázorňuje celkový počet vyšetřených pacientů za rok 2003 až 2008, celkem bylo vyšetřeno 298 pacientů, z toho bylo 52 pozitivních a 246 negativních pacientů.



Tab.č.2. Počet vyšetřovaných pacientů (ženy i muži) na Ag HP ze stolice za dané období roku 2003-2008

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
počet vyšetřovaných pacientů	6	17	70	64	69	72

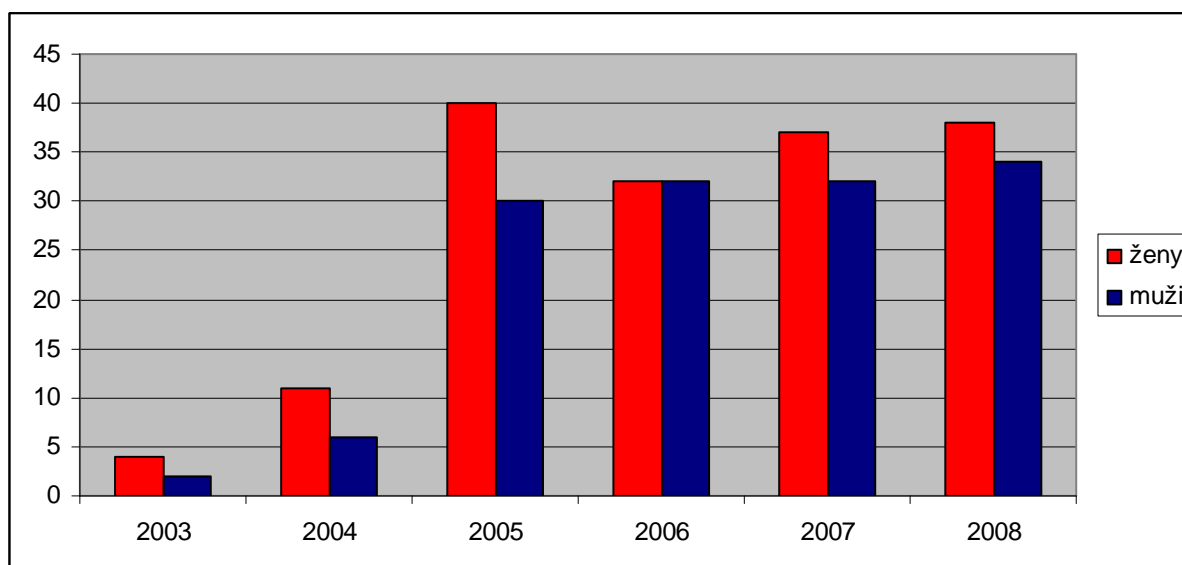
Graf č.2 znázorňuje nárůst a pokles počtu vyšetřených pacientů na HP v daném období roku 2003-2008



Tab.č. 3 Počet žen a mužů vyšetřovaných na Ag HP ze stolice za dané období roku 2003-2008

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ženy	4	11	40	32	37	38
muži	2	6	30	32	32	34

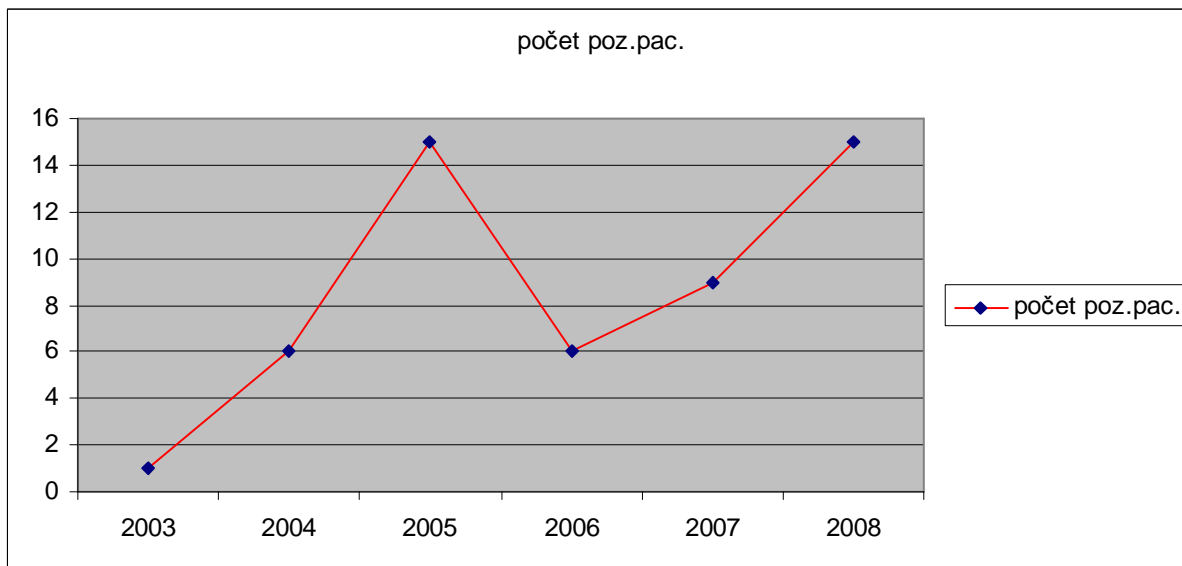
Graf č. 3 rozlišuje počet žen a mužů vyšetřených na Ag HP ze stolice za dané období r. 2003-08



Tab.č.4. Počet pozitivních pacientů (mužů i žen) na HP v daném období roku 2003-2008

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
počet pozitivních pacientů	1	6	15	6	9	15

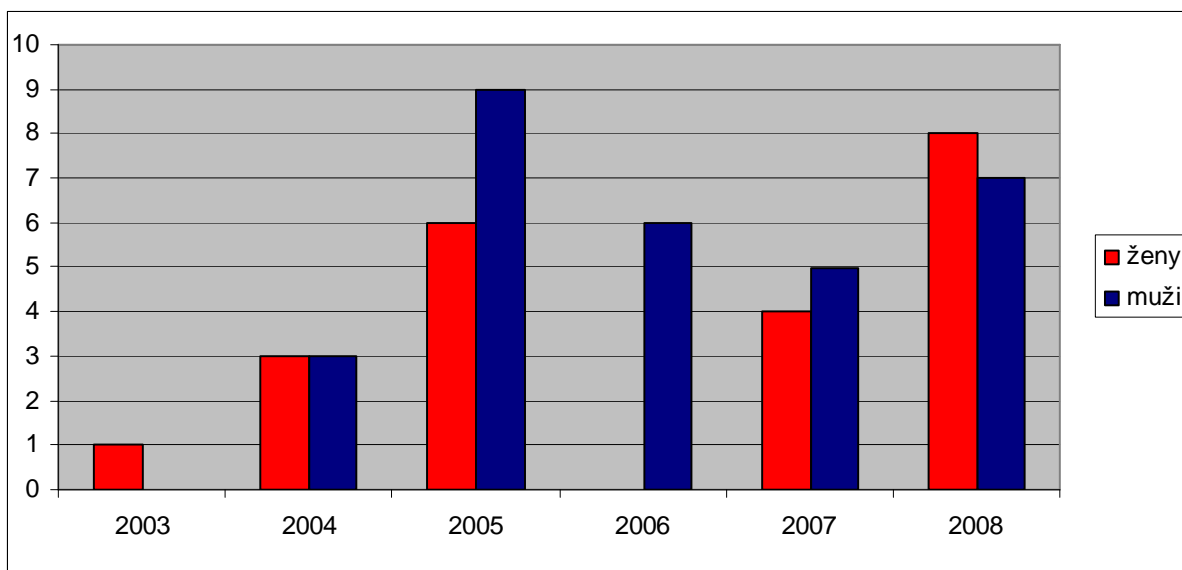
Graf č.4. znázorňuje nárůst a pokles počtu pozitivních pacientů (mužů i žen) za dané období roku 2003-2008



Tab.č.5. Počet pozitivních pacientů na HP v daném období roku 2003-2008

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ženy	1	3	6	0	4	8
muži	0	3	9	6	5	7

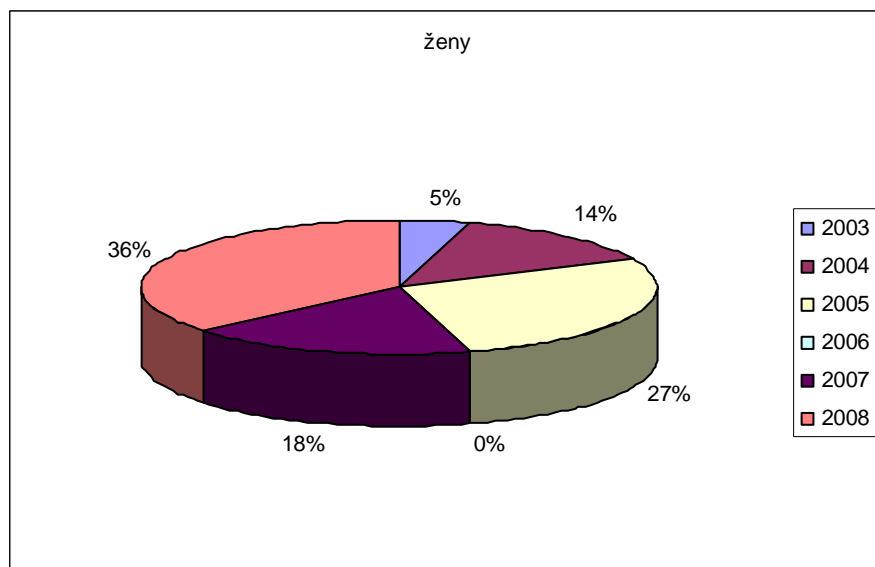
Graf č.5 rozlišuje z celkového počtu pozitivních pacientů (52) počet žen a mužů za daná období roku 2003-2008.



Tab.č.6 Počet žen pozitivních na HP v daném období roku 2003-2008 v procentech (%)

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ženy	1	3	6	0	4	8

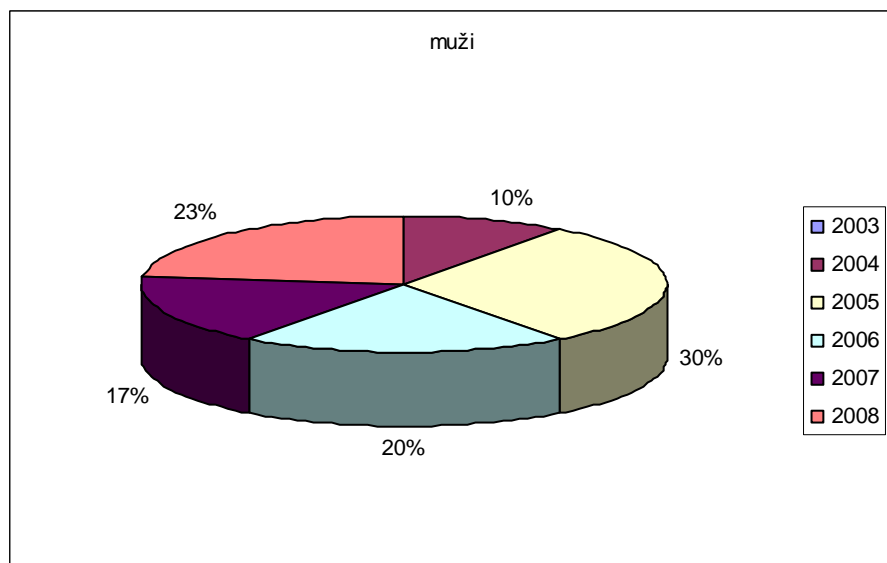
Graf č.6 znázorňuje procentuální zastoupení pozitivních žen na HP za dané období roku 2003 – 2008.



Tab.č.7. Počet mužů pozitivních na HP v daném období roku 2003-2008 v procentech (%)

	2003	2004	2005	2006	2007	2008
muži	0	3	9	6	5	7

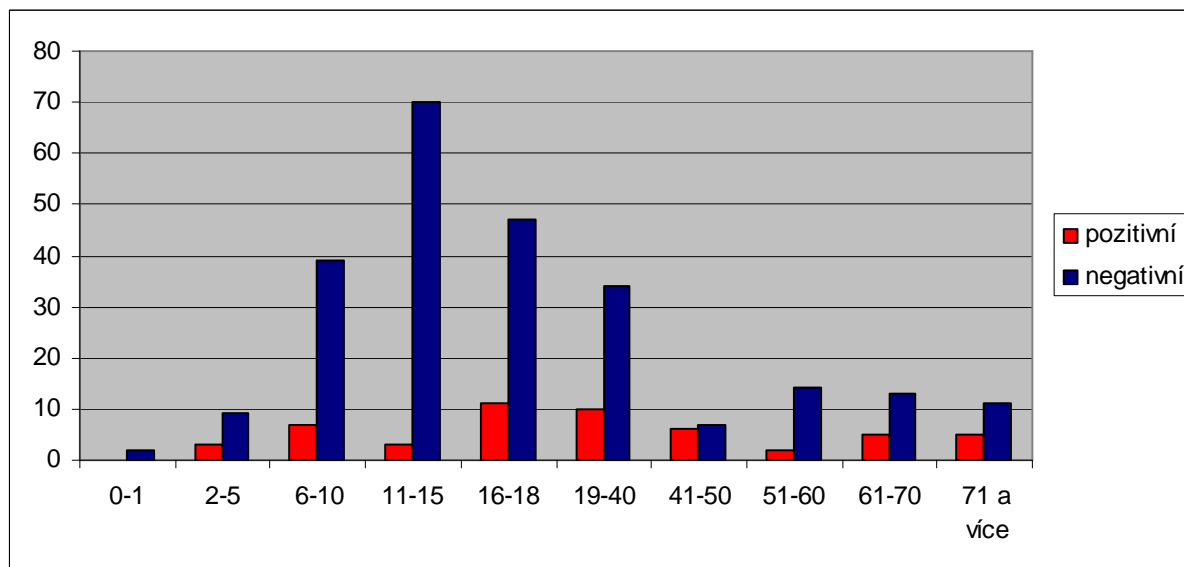
Graf č.7 znázorňuje procentuální zastoupení pozitivních mužů na HP za dané období roku 2003 – 2008.



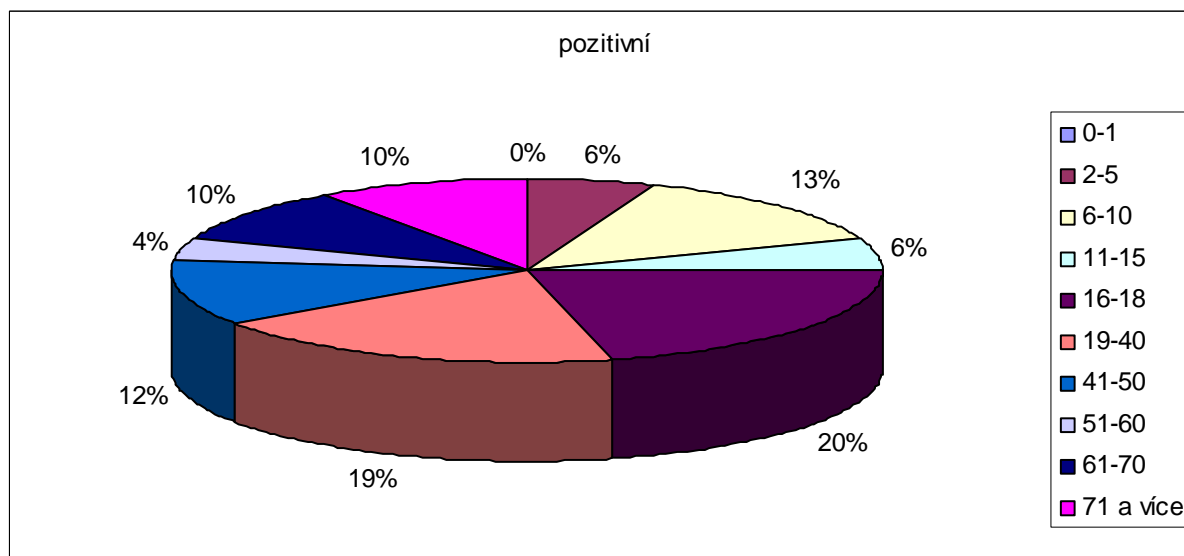
Tab.č.8. Počet pozitivních a negativních pacientů (žen i mužů) na HP z hlediska věkové distribuce v daném období roku 2003 – 2008

věk	0-1	2-5	6-10	11-15	16-18	19-40	41-50	51-60	61-70	71 a více
pozitivní	0	3	7	3	11	10	6	2	5	5
negativní	2	9	39	70	47	34	7	14	13	11

Graf č. 8 znázorňuje počet pozitivních a negativních pacientů (mužů i žen) na HP rozdělených dle věkové distribuce v daném období roku 2003- 2008.



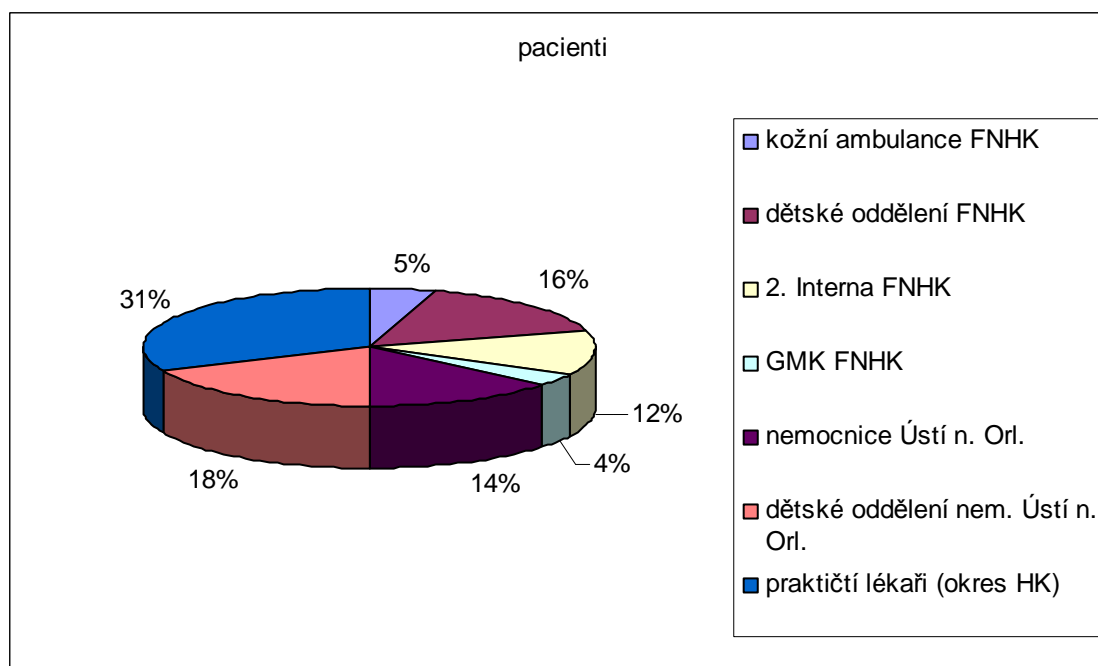
Graf č.9 (vychází z tab.č.8) znázorňuje procentuální zastoupení pozitivních pacientů na HP (mužů i žen) dle věkové distribuce v daném období roku 2003-2008.



Tab.č.10. Přehled zdravotnických zařízení nejčastěji doporučující pacienty k vyšetření na HP za dané období roku 2003- 2008

Zdravotnická zařízení	Počet pacientů	v %
kožní ambulance FNHK	14	5
dětské oddělení FNHK	47	16
2. Interna FNHK	36	12
GMK FNHK	11	4
nemocnice Ústí n. Orl.	41	14
dětské odd. nem. Ústí n. Orl.	55	18
praktičtí lékaři (okres HK)	94	31

Graf č.10 znázorňuje procentuální zastoupení zdravotnických zařízení nejčastěji doporučující pacienty k vyšetření HP za dané období roku 2003-2008.



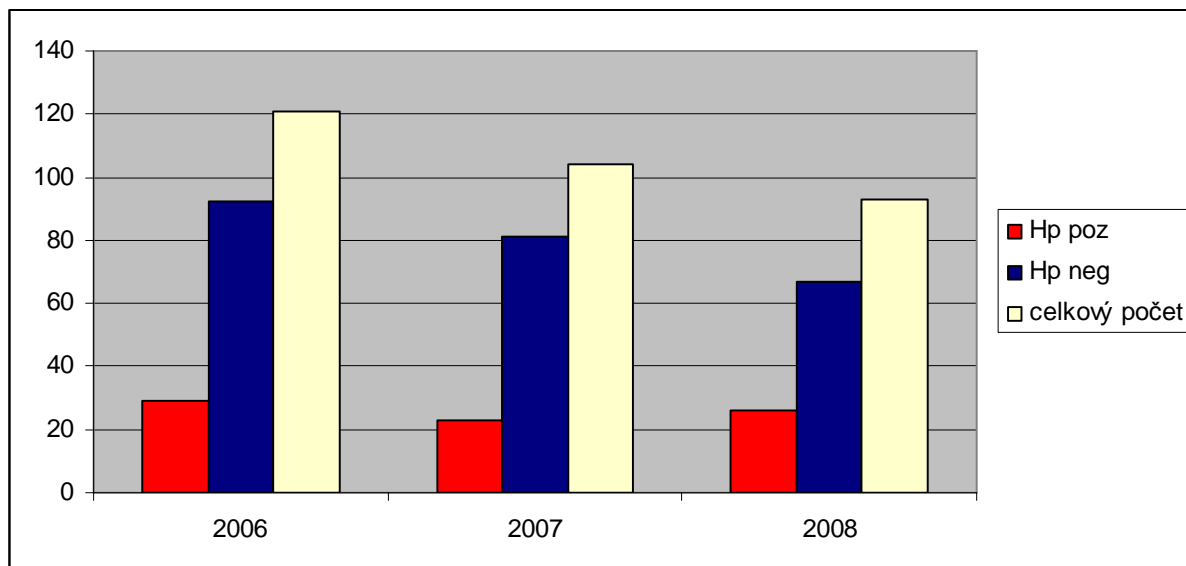
1.5.4. Přehled počtu vyšetřených pacientů na Ag HP a jejich výsledků z laboratoře klinické imunologie INTERIMUN s.r.o. poliklinika HELP Pardubice

Od 16.1. 2006 do 4.11. 2008 bylo vyšetřeno metodou – stanovení Ag HP ve stolici kvalitativní enzymovou imunoanalýzou (ELISA) celkem 318 pacientů.

Tab.č.1. Počty a výsledky vyšetřovaných pacientů na Ag HP ze stolice za dané období roku 2006-2008

	2006	2007	2008
HP poz	29	23	26
HP neg	92	81	67
celkový počet	121	104	93

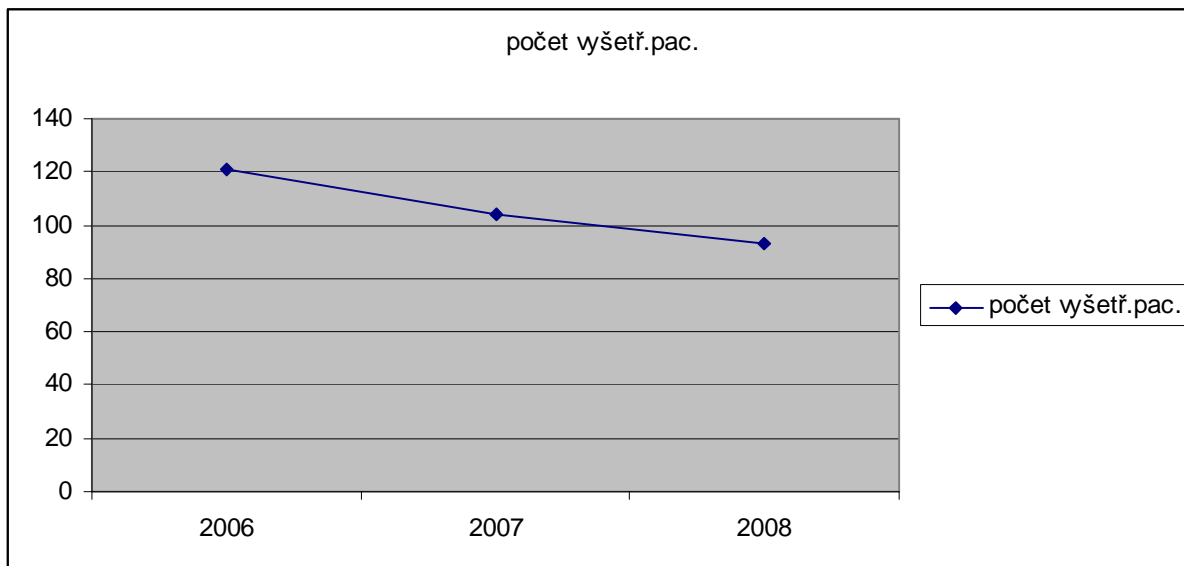
Graf č.1. znázorňuje celkový počet vyšetřovaných pacientů na Ag HP za rok 2006-2008, celkem bylo vyšetřeno 318 pacientů, z toho bylo 78 pozitivních a 240 negativních.



Tab.č 2. Počet vyšetřovaných pacientů (ženy i muži) na Ag HP za dané období r. 2006-08

	2006	2007	2008
počet vyšetř.pac.	121	104	93

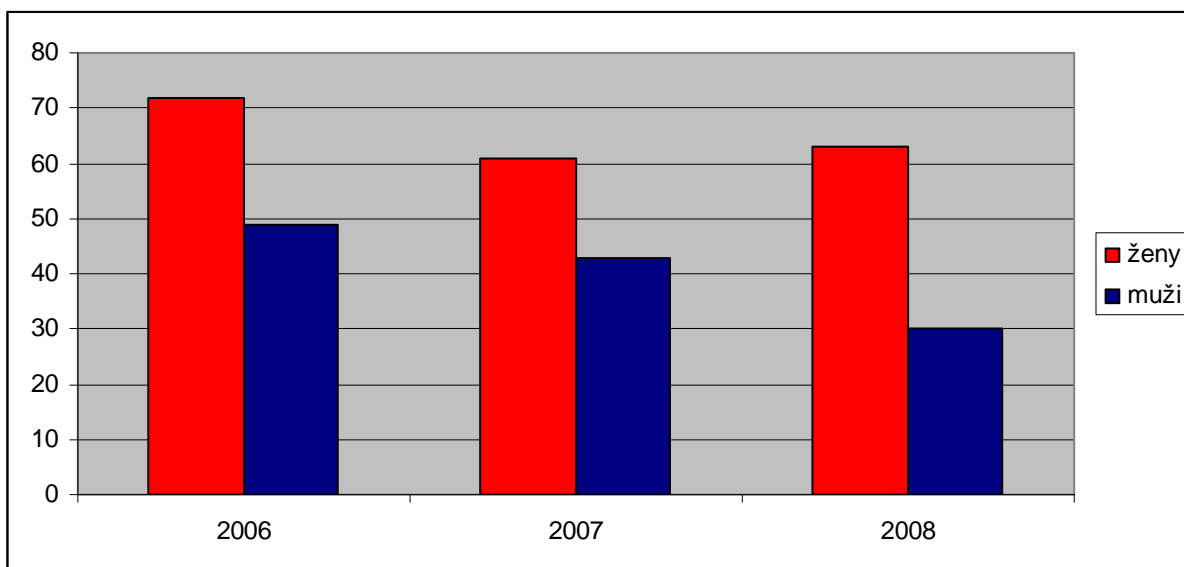
Graf č.2 znázorňuje pokles počtu vyšetřovaných pacientů v daném období roku 2006-2008



Tab.č. 3. Počet vyšetřovaných žen a mužů na Ag HP ze stolice v daném období roku 2006-2008

	2006	2007	2008
ženy	72	61	63
muži	49	43	30

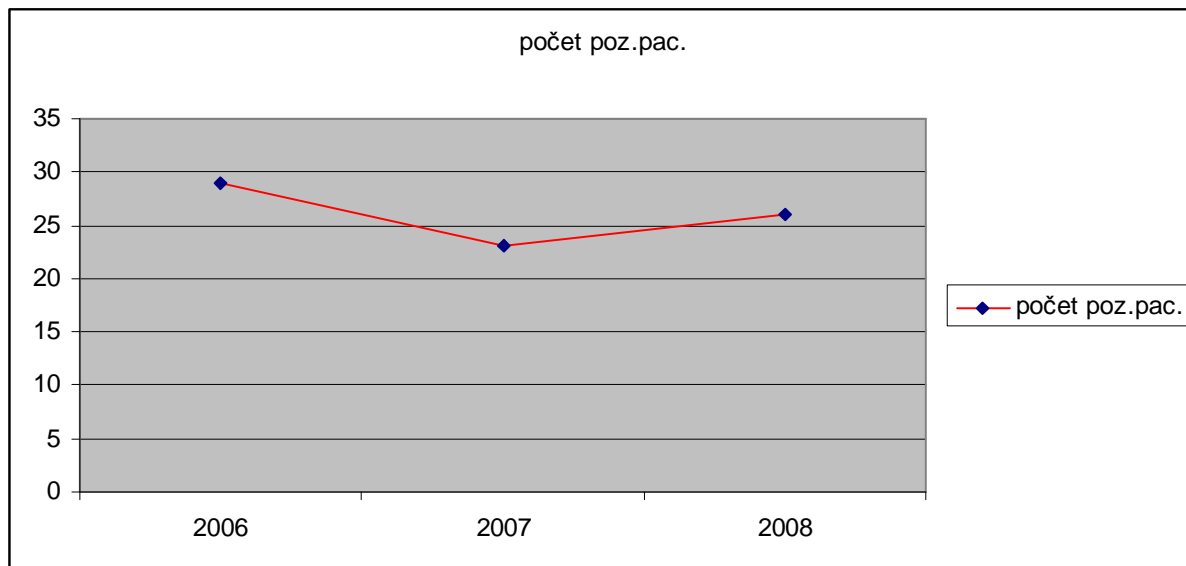
Graf č. 3 rozlišuje počet žen a mužů vyšetřených na Ag HP v daném období 2006-2008



Tab. č.4 Počet pozitivních pacientů (mužů i žen) na Ag HP v daném období 2006-2008

	2006	2007	2008
počet poz.pac.	29	23	26

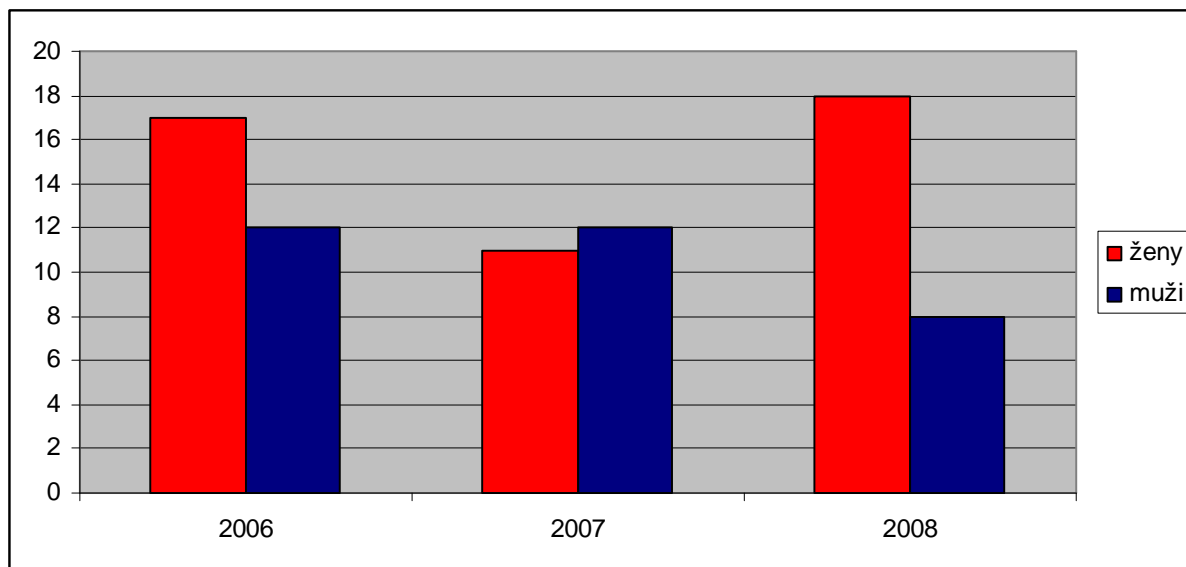
Graf č.4 znázorňuje pokles a nárůst počtu pozitivních pacientů v daném období r.2006-08



Tab.č 5. Počet pozitivních pacientů na Ag HP v daném období 2006-2008

	2006	2007	2008
ženy	17	11	18
muži	12	12	8

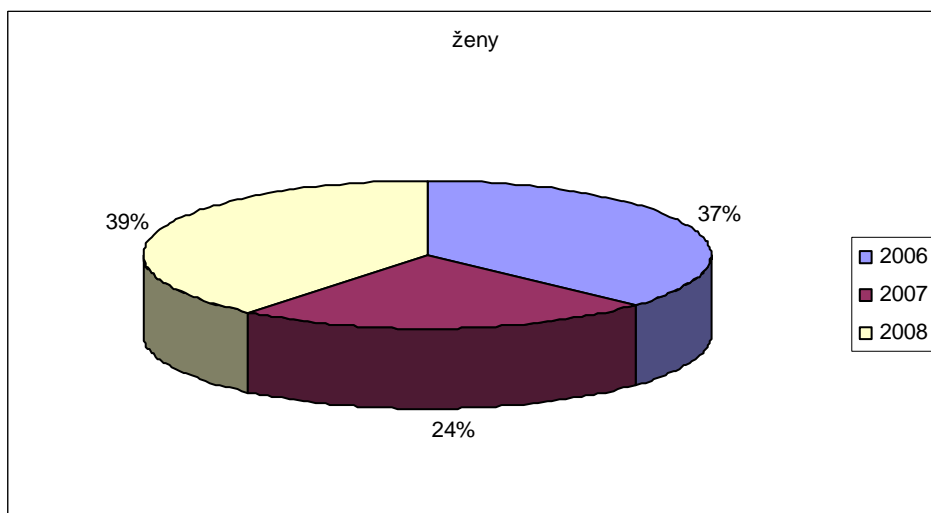
Graf č.5 rozlišuje z celkového počtu pozitivních pacientů (78) počet žen a mužů za daná období roku 2006-2008



Tab.č. 6. Počet žen pozitivních na Ag HP v procentech (%)

	2006	2007	2008
ženy	17	11	18

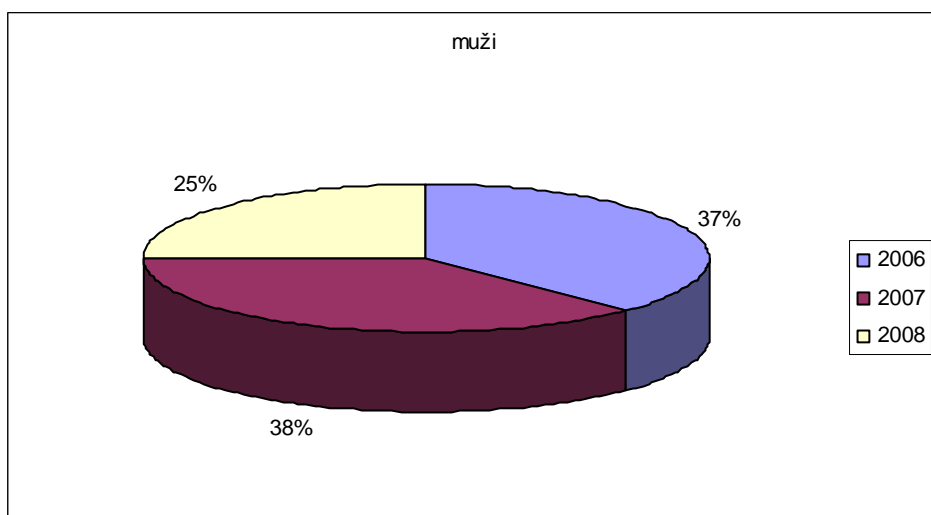
Graf č.6 znázorňuje procentuální zastoupení pozitivních žen za dané období roku 2006-2008.



Tab.č. 7. Počet mužů pozitivních na Ag HP v procentech (%)

	2006	2007	2008
muži	12	12	8

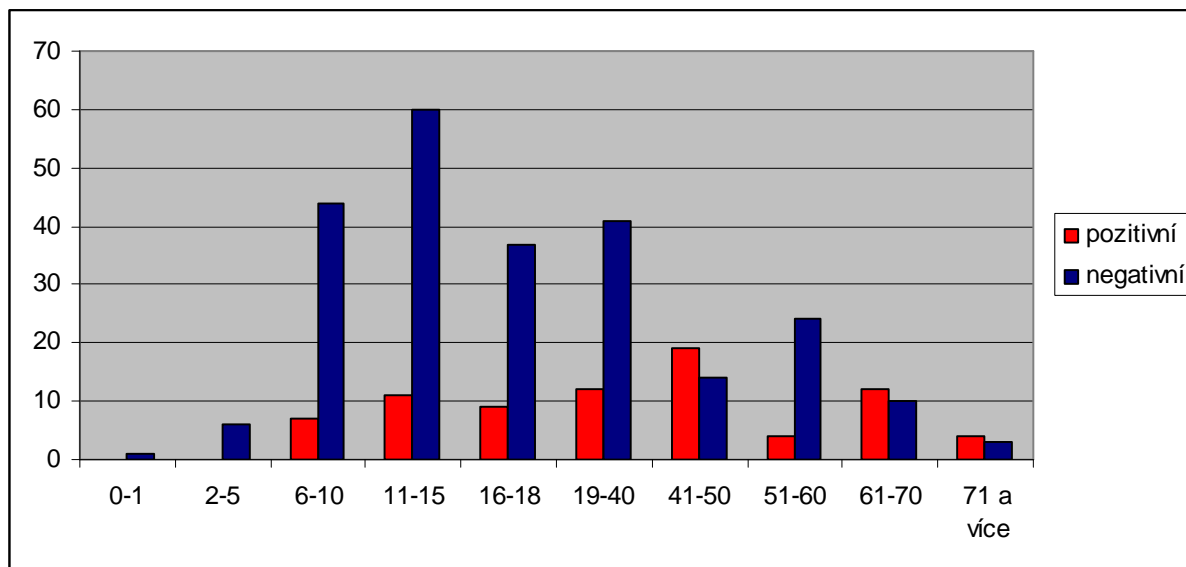
Graf č.7 znázorňuje procentuální zastoupení pozitivních mužů za dané období roku 2006-2008.



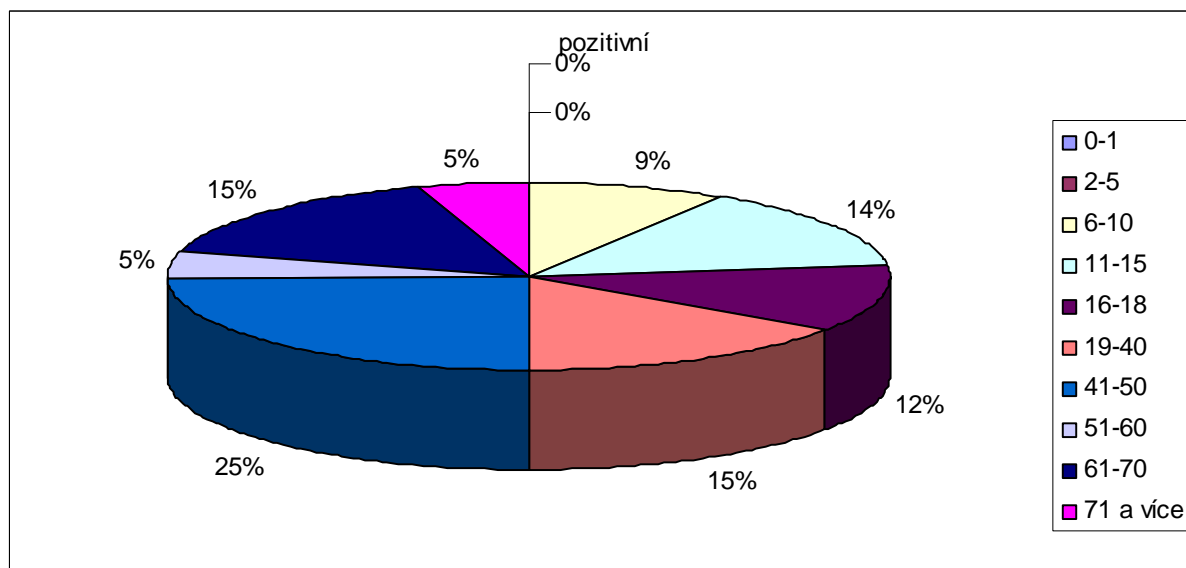
Tab.č. 8. Počet pozitivních a negativních pacientů (mužů i žen) na Ag HP z hlediska věkové distribuce v daném období roku 2006-2008.

	0-1	2-10	6-10	10-15	16-18	19-40	41-50	51-60	61-70	71 a více
pozitivní	0	0	7	11	9	12	19	4	12	4
negativní	1	6	44	60	37	41	14	24	10	3

Graf č.8 znázorňuje počet pozitivních a negativních pacientů rozdělených dle věkové distribuce za dané období roku 2006-2008.



Graf č.9 . (vychází z tab.č.8) znázorňuje procentuální zastoupení pozitivních pacientů (mužů a žen) dle věkové distribuce v daném období roku 2006-2008.



1.5.5. Přehled zpracovaných dat

Získaná data z obou laboratoří jsem zpracovávala stejným způsobem. Informace z laboratoře ÚKIA v Pardubicích mi byly poskytnuty za kratší časové období a bez údajů o zdravotnických zařízeních doporučujících pacienty k vyšetření.

Údaje poskytnuté z ÚKM FNHK (za období od 14.7. 2003 do 12.12. 2008) :

Je patrné, že počet vyšetřených pacientů na HP od roku 2003 stoupal až do roku 2005, od té doby se drží na přibližně stejné úrovni. Lineární vzestup počtu pacientů vyšetřených na HP je dán zavedením této nové metody ve FNHK v průběhu roku 2003 (graf č. 1 a č.2). K vyšetření na HP byly ve sledovaném období doporučeny ve větším počtu ženy (graf č.3). Je vidět výrazný záchyt pozitivních výsledků v roce 2005 a 2008 (graf č.4), současně je patrné, že počet pozitivních žen od r.2003 stoupal. Je zajímavé, že v r.2006 z počtu vyšetřených žen (32) nebyl ani jeden výsledek pozitivní (graf č.5). Nejčastější pozitivní nález u žen (36%) je roce 2008 (graf č.6) a nejčastější pozitivní nález u mužů (30%) je v r. 2005 (graf č.7). Důležitým zjištěním je, že nejvyšetřovanější skupinou na HP je mládež ve věkovém rozmezí 11-15 let, ale je zajímavé, že v této skupině je nejmenší záchyt pozitivních výsledků (graf č.8). Největší záchyt positivity na HP (20%) je ve věkovém rozmezí 16-18 let (graf č.9). Dále se ukazuje, že největší procentuální zastoupení v počtu doporučení na vyšetření Ag HP ze stolice mají praktičtí lékaři z okresu HK(31%), ale výrazné je i množství pacientů odeslaných k vyšetření z dětského oddělení FNHK(16%) a nemocnice Ústí n.Orl.(18%).

Údaje poskytnuté z laboratoře INTERIMUN s.r.o.na poliklinice HELP v Pardubicích (za období od 16.1. 2006 do 4.11. 2008) :

Je zřejmé, že celkový počet pacientů doporučených k vyšetření na HP od r.2006 klesá (graf č.1 a č.2). V počtu vyšetřovaných pacientů na Ag HP je výrazná převaha žen (graf č. 3). Největší počet pozitivních záchyťů na HP byl v r.2006 a od r.2007 počet opět stoupá (graf č. 4). Dále je patrná výrazná převaha pozitivních žen na HP v r.2006 a 2008, v r.2007 lehká převaha pozitivních mužů. Tento fakt dokazuje i graf.č 6, kde u žen je nejčastější pozitivní nález (39%) v r.2008 a na grafu č. 7, kde je nejčastější pozitivní nález u mužů (38%) v r.2007. Opět se ukazuje, že nejvíce pacientů doporučených k vyšetření na HP je ve věkovém rozmezí 11-15 let (graf č.8). Největší záchyt positivity na HP je ale ve věkovém rozmezí 41-50 let (25%) (graf č. 9).

1.5.6. Porovnání metod

Podkladový materiál tzn. data o pacientech vyšetřených metodou – Průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici byl získán z ÚKM FNHK a laboratoř INTERIMUN s.r.o. poliklinika HELP v Pardubicích. Obě tato pracoviště používají ke stanovení Ag HP ze stolice jinou metodiku. Oba způsoby jsem měla možnost si nejen teoreticky prostudovat, ale i prakticky vyzkoušet a porovnat.

Oddělení mikrobiologie ve FNHK využívá metody *Helicobacter* Antigen Quick test, což je jednokrokové imunochromatografické stanovení. Je to metoda neinvazivní, pro pacienta nezatěžující a není náročná na laboratorní vybavení. Je snadná, rychlá a každý jednotlivý vzorek může být ihned po odběru stanovován, neboť na každý vzorek připadá jeden testovací strip. Senzitivita soupravy je dle údajů výrobce 95%.

V laboratoři na poliklinice v Pardubicích využívají metody sendvičové enzymatická imunoanalýzy (ELISA). Jedná se také o metodu neinvazivní a pacienta nezatěžující. Je ale časově náročnější a závislá na přístrojovém vybavení laboratoře. Na tomto pracovišti postupují dle směrnic s časovou dostupností tohoto testu 1x za 14 dní. To však závisí na počtu vzorků doporučených k vyšetření, neboť z ekonomického hlediska je výhodnější zpracovat více vzorků v jedné mikrodestičce najednou. Nevýhodou je pak uchovávání vzorků, které musí být při delší časové proluce zmrazeny na -20°C . Tato metoda se stala uznávanou pro svoji vysokou specifitu a senzitivitu, pro obě hodnoty je udáváno 95%. V tomto ohledu jsou obě metody srovnatelné.

6. Diskuze

HP infekce je běžná po celém světě a prevalence vykazuje výrazné geografické, ale i populační rozdíly. Zjištění, že infekce HP téměř vždy vzniká v dětství a jednou vzniklá infekce je obvykle doživotní, potvrdila zpráva Goodmanové a Correyové. Autorky sledovaly výskyt infekce HP mezi dětmi žijícími v oblasti s jedním z nejvyšších výskytů rakoviny žaludku na světě – ve venkovských lokalitách kolumbijských And. Zjistily, že mezi dětmi mladšími deseti let se infekce nejčastěji přenáší mezi sourozenci početných rodin (10).

Většina autorů se shoduje, že k získání infekce dochází v dětském věku. K infekci dochází s největší pravděpodobností již před 5. rokem života. Jedním z hlavních rizikových faktorů přenosu infekce je nízká životní úroveň v dětství. U dětí v rozvojových zemích mezi 2. a 8. rokem života je roční nárůst infekce asi 10%, zatímco údaje ze Severní Ameriky ukazují pouze nárůst 1% za rok. Prevalence v rozvinutých zemích se liší vzájemně v závislosti na etnickém původu a věku. Ve studiích z Německa a Švýcarska byli domácí žáci infikováni méně často než žáci cizího původu (15).

Vědci z Texasu a Louisiany studovali vzorky krve u skupiny 224 jedinců ve více než 21-letém období od roku 1976 (kdy byly děti) do roku 1996 (když byli mladí). Výsledky ukázaly, že děti ve věku 4-6 mají největší riziko infekce (2,1% všech dětí je nakažených každý rok), následují děti ve věku 7-9 let (1,5% infikovaných za rok). I když jsou tato čísla poměrně nízká, celková infekce se zvýší v průběhu dětství a v době, kdy se děti stávají mladými - 18-23 let (24,5% z nich bylo infikováno) (16).

Výsledky naší studie ukazují, že počet mladých lidí (ve věku od 11-18 let) doporučených k vyšetření HP je nejméně o polovinu vyšší než dětí (0-11 let). Z dat z ÚKM FNHK je ale zřejmé, že počet pozitivních pacientů na HP z řad dětí a mládeže se mnoho neliší. Hodnoty z laboratoře v Pardubicích počty vyšetřených dětí a mládeže potvrzují. Počet pozitivních mladých lidí je o něco vyšší.

Prof. MUDr. J. Bureš CSc. a kolektiv (UK, Lékařská fakulta HK) studovali epidemiologii infekce HP v České republice. Cílem studie bylo zhodnotit prevalenci u reprezentativního vzorku české populace a popsat rozdíly prevalence HP mezi skupinou dětí a dospělých. Do studie bylo zařazeno 2509 osob ve věku 5-100 let a ti byli vyšetřováni dechovými testy (pacientovi podána močovina se značeným izotopem uhlíku C^{13}). Autoři stanovili věk prevalence HP u mužů ve věku 5 a více let na 41,9% a u žen starších 5 let na 41,4%. Dále došli k výsledku, že děti matek s nižším vzděláním, s nižší životní úrovní, žijící

v menších městech jsou nejvíce rizikovou skupinou. Stejně tak mládež a dospělí, kteří jsou méně vzdělaní a silní kuřáci jsou více pozitivní na infekce HP. Také prokázali, že prevalence HP se zvyšuje s věkem a nezáleží na pohlaví (12).

V naší studii jsme rovněž zjistili, že sice více vyšetřovanou skupinou na HP jsou ženy, ale u získání nákazy, tedy v počtu pozitivních pacientů nemá pohlaví žádný zásadní význam.

Metod stanovení HP je velké množství. V naší studii jsme se zaměřili na metodu stanovení Ag HP ze stolice. Použili jsme metodu Helicobacter Antigen Quick test a sendvičovou enzymatickou imunoanalýzu (ELISA). U obou těchto metodik je srovnatelná specifita a senzitivita stanovení (95%).

K podobným výsledkům senzitivity a specifity došli vědci z pediatrické kliniky v Itálii, kde hodnotili a porovnávali metodu stanovení Ag HP ze stolice, PCR (identifikace bakteriálního DNA ústní dutiny) a sérologické vyšetření HP (IgG). Do studie bylo zahrnuto 190 dětí s gastrointestinálními potížemi. Statistická analýza ukázala, že metoda stanovení Ag HP ze stolice má větší senzitivitu (91,5%), zatímco serologické vyšetření je více specifické a PCR metoda je velmi specifická (98,2%), ale málo citlivá.(25,7%) (13).

Porovnáváním invazivních a neinvazivních metod stanovení HP a monitorování eradikace léčby se zabývali vědci v Izraeli. Studovali 92 pacientů, kteří byli vyšetřeni endoskopickým vyšetřením. Byl u nich proveden rychlý ureázový test, žaludeční biopsie (invazivní) a stanovení Ag HP ze stolice (FemtoLab) a dechové testy (neinvazivní). Po léčbě trojkombinací ATB se u 26 dětí z 36 nepodařila eradikace HP. Použitím metody stanovení Ag HP ze stolice bylo pozitivních 10 dětí z 26 a použitím dechových testů 11 z 26. Autoři zjistili, že tyto dvě neinvazivní metody jsou vyrovnaně efektivní v diagnostice i potvrzení eradikace HP infekce u dětí (14).

7. Závěr

Cílem této práce bylo seznámit se s problematikou bakterie *Helicobacter pylori* a s úlohou tohoto mikroba v patogenezi gastroenterologických onemocnění. Dále zpracovat získaná data, porovnat je mezi sebou a odbornou literaturou. Data byla získána z ÚKM FNHK a laboratoře klinické imunologie a alergologie INTERIMUN s.r.o. na poliklinice v Pardubicích. V rámci naší studie byl vytvořen přehled o pacientech vyšetřovaných neinvasivní metodou stanovení - Průkazu Ag HP ve stolici a to rychlým jedнокrokovým imunochromatografickým testem (Helicobacter Antigen test) a sendvičovou enzymatickou imunoanalýzou (ELISA). Cílem bylo evidovat výskyt této bakterie a vytvořit přehled z hlediska počtu pacientů, věku a pohlaví.

Problematika HP je velmi široká a v této práci jsem se převážně zabývala charakteristikou HP, infekcemi, které způsobuje a prevalencí HP v České republice. Významná úloha tohoto mikroba v rámci onemocnění gastrointestinálního traktu mě zaujala natolik, že bych v budoucnu (eventuálně v diplomové práci) tyto aspekty ráda rozšířila např. o klinické projevy těchto onemocnění, eradikaci HP a účinnosti léčby.

8. Seznam literatury

- (1). LEE, Adrian, MÉGRAUD, Francis. *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis and basic research*, London: W.B.Saunders Company Ltd. 1996. 299 s. ISBN 0-7020-1999-2.
- (2). SEDLÁČKOVÁ, Miloše. *Infekce Helicobacter pylori*, Praha: Maxdorf , 1996. 158 s. ISBN 80-85800-32-2.
- (3). MARTÍNEK, Jan, ŠPIČÁK, Julius. *Onemocnění žaludku a dvanáctníku*, Praha: TRITON, 2000. 124 s. ISBN 80-7254-106-4.
- (4). FARTHING, Michael J.G., *GUT-European Helicobacter pylori Study Group, Abstracts of Scientific Presentations (XIVth International Workshop on Gastroduodenal Pathology and Helicobacter pylori)*, Strasbourg: 2001, 112 s.
- (5). BUREŠ, Jan et al., *Infekce Helicobacter pylori : Doporučený postup České gastroenterologické společnosti ČSL JEP pro dospělé. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*. 2004, Vol. 58, is. 4, s. 151–155.
- (6). MARTÍNEK, T. HUCL a kol. *Diagnostika a léčba infekce na přelomu milénia* , Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2001, vol. 7, is. 1, s. 58-65.
- (7). Laboratorní návod – Helicobacter Antigen Quick test, Generic Assays, Kat.č.6110
- (8). Laboratorní návod – Průkaz antigenu HP ve stolici, (ELISA), Oxoid GmbH, Kat.č.6630 (Velká Británie)
- (10). Spechler, S.J. et al., *Clinical Aspects of Genetic Variability in Helicobacter pylori* , JAMA, 2000, Vol.283, is. 10, s. 1254-6
- (11). Nobelprize.org : The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2005 [online]. Nobel Web AB, c2007 [cit. 2007-05-20]. Dostupný z WWW: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html

- (12). BUREŠ, J., et al., *Epidemiology of Helicobacter pylori Infection in the Czech Republic*, *Helicobacter*, 2006, Vol. 11, is. 1, s. 56–65.
- (13). BONAMICO, M et al., *Evaluation of stool antigen test, PCR on ORAL samples and serology for noninvasive detection of Helicobacter pylori infection in children*, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004, Vol.9, is. 1, s. 69-76.
- (14). HINO, B. et al., *Comparison of invasive and non-invasive tests diagnosis and monitoring of Helicobacter pylori infection in children*, *Helicobacter*, 2004, Vol. 39, is. 5, s. 482-4.
- (15). SÝKORA, J., *Helicobacter pylori a gastrointestinální projevy u dětí*, *Pediatric pro praxi*, 2006, Vol. 2, s. 74-79.
- (16). JENSEN, Aaron W., *Children's H.pylori infection*, [online]. [cit. 2002/1/6]. Dostupné z WWW:
http://www.life-enhancement.com/article_template.asp?ID=673

Seznam zkratek:

HP – *Helicobacter pylori*

HH – *Helicobacter heilmannii*

Ag - antigen

ML – maligní lymfom

MALT-lymfom – lymfom lymfoidní tkáně mukózy

CMV – cytomegalovirus

E.coli – *Escherichia coli*

T.pallidum – *Treponema pallidum*

GIT – gastrointestinální trakt

TNF α – Tumor necrosis factor α

HLA – Human leukocyte antigen

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

IgA – imunoglobulin A

ATB – antibiotikum

PCR - polymerázová řetězová reakce

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

HRP – monoklonální protilátka značená křenovou peroxidázou

TMB – tetrametylbenzidin

ÚKM- Ústav klinické mikrobiologie

FNHK – Fakultní nemocnice Hradec Králové

INTERIMUN s.r.o. – soukromá laboratoř klinické imunologie a alergologie

HELP – soukromá poliklinika v Pardubicích