

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky  
VFN a 1. LF UK**

**STANOVENÍ ANTIGENU  
HELICOBACTER PYLORI VE STOLICI  
RAPID TESTEM**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Řešitel: Jan Jeřábek  
Vedoucí: as. MUDr. Petr Kocna, CSc.  
Oponent: MUDr. Otakar Nyč**

**Praha 2007**

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat především as. MUDr. Petru Kocnovi, CSc., za neocenitelnou pomoc, kterou mi prokázal při vzniku této práce. Dále děkuji RNDr. Janu Klaschkovi, Ph.D., za velkou ochotu při konzultaci statistiky.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a že veškeré citované prameny uvádím v seznamu literatury.

4. června 2007



Jan Jeřábek

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>7</b>
1.1 Helicobacter pylori a jeho vlastnosti.....	8
1.2 Léčba infekce Helicobacter pylori .....	10
1.3 Diagnostika infekce Helicobacter pylori.....	11
1.3.1 Invazivní testy .....	11
1.3.2 Neinvazivní testy .....	13
<b>2 Materiál a metody</b> .....	<b>17</b>
2.1 Ověření použitelnosti výsledků metody ELISA a starších zmražených vzorků stolic .....	17
2.2 Zjištění vlivu množství odebrané stolice na výsledek rapid testu.....	18
2.3 Srovnání metod .....	23
<b>3 Výsledky a diskuze</b> .....	<b>26</b>
3.1 Ověření použitelnosti starších zmražených vzorků stolic .....	26
3.2 Zjištění vlivu množství odebrané stolice na výsledek rapid testu.....	27
3.3 Porovnání rapid testu s testem ELISA .....	28
3.4 Zhodnocení výsledků dvou různých rapid testů a jejich porovnání s testem ELISA.....	29
3.5 Zhodnocení vlastního provádění rapid testů.....	32
<b>4 Závěry</b> .....	<b>34</b>
<b>5 Literatura</b> .....	<b>36</b>
<b>6 Seznam zkratk</b> .....	<b>40</b>
<b>7 Přílohy</b> .....	<b>41</b>

## Abstrakt

*Helicobacter pylori* (Hp) je spirální, gramnegativní bakterie kolonizující žaludeční sliznici, je klasifikována WHO jako kancerogen 1. třídy. Infekce Hp je spojována se vznikem atrofické gastritidy, s rozvojem vředové choroby a souvisí se vznikem karcinomu žaludku a MALT-lymfomu. V naší populaci je prevalence infekce asi 42 %.

K diagnostice infekce se používají invazivní (rychlý ureázový test, histologické vyšetření, kultivace) a neinvazivní (sérologické vyšetření, dechový ureázový test, průkaz antigenu ve stolici) testy. V neinvazivní diagnostice je zlatým standardem dechový test s <sup>13</sup>C značenou ureou, jehož alternativou je pak vyšetření antigenu Hp ve stolici. To je dostupné ve 2 uspořádáních – ELISA test a imunochromatografický (rapid) test.

Test ELISA (*Amplified IDEIA™ Hp StAR™*) s monoklonálními protilátkami jsem porovnával se dvěma rapid testy – *helicoCARE direct* a *RAPID Hp StAR™*. Porovnání bylo provedeno na 50 vzorcích stolice uchovávaných při teplotě -70 °C. Stabilita antigenu ve zmražené stolici byla ověřena na 10 náhodně vybraných ELISA pozitivních vzorcích, u nichž bylo provedeno opakování testu ELISA.

U testu *helicoCARE direct* provádí v běžné praxi sám pacient odběr vzorku (cca 10 mg) do pufru pomocí plastového kartáčku. Vzorek pro test *RAPID Hp StAR™* připravuje až vyšetřující, který za pomoci dřevěné špejle odebírá asi 100 mg stolice do pufru. Preanalytická fáze je proto spolehlivější u testu *RAPID Hp StAR™*.

S rutinní metodou ELISA se test *helicoCARE direct* shodoval ve 42 případech (Cohenův koeficient  $\kappa = 0,672$ ; 95% interval spolehlivosti 0,465–0,878), relativní senzitivita, specifická a přesnost tohoto testu vzhledem k referenční metodě ELISA byly 79 %, 94 % a 84 %.

*RAPID Hp StAR™* se s ELISA shodoval u 30 vzorků ( $\kappa = 0,543$ ; 95% interval spolehlivosti 0,312 až 0,775), relativní senzitivita, specifická a přesnost tohoto testu vzhledem k referenční metodě ELISA byly 64 %, 100 % a 76 %.

Vyšší spolehlivost a shodu s testem ELISA jsem prokázal pro test *helicoCARE direct*.

## Abstract

*Helicobacter pylori* (Hp) is a spiral gram-negative bacterium, which colonises gastric mucosa and is classified as a class 1 carcinogen by WHO. The Hp infection is connected with a genesis of atrophic gastritis, with a development of ulcerous disease and is related to a genesis of gastric cancer and MALT-lymphoma. In the Czech Republic the prevalence of the infection is about 42 %.

For the diagnosis of the infection, invasive (rapid urease test, histology, culture) and non-invasive (serological survey, urease brath test, detection of the antigen in stool) tests are used. The gold standard among non-invasive diagnostics is <sup>13</sup>C-urea breath test. Instead, Hp antigen detection in stool can be alternatively used. This test is available in two forms – ELISA test and immunochromatographic (rapid) test.

In my study I compared ELISA test (*Amplified IDEIA™ Hp StAR™*) with monoclonal antibodies with two rapid tests – *helicoCARE direct* and *RAPID Hp StAR™*. The comparison was performed on 50 stool specimens, which had been stored in -70 °C. The antigen stability was verified on 10 randomly chosen specimens, where repeated ELISA test was proceeded.

In *helicoCARE direct* test in standard practice the patient himself takes up the stool sample (cca 10 mg) into the buffer with a plastic applicator stick. The sample for *RAPID Hp StAR™* is prepared entirely by the examiner, who extracts about 100 mg of stool with a wooden stick into the buffer. Consequently, the preanalytical phase is more confident in *RAPID Hp StAR™* test.

The matching of *helicoCARE direct* with ELISA occurred in 42 cases (Cohen's  $\kappa = 0.672$ , 95% confidence interval 0.465–0.878), relative sensitivity, specificity and accuracy of this test in reference to ELISA were 79 %, 94 % and 84 %.

*RAPID Hp StAR™* matched with ELISA in 30 specimens ( $\kappa = 0.543$ , 95% confidence interval 0.312–0.775), relative sensitivity, specificity and accuracy of this test in reference to ELISA were 64 %, 100 % and 76 %.

I proved better performance and agreement with ELISA test in *helicoCARE direct* test.

# 1 Úvod

Infekce bakterií *Helicobacter pylori* patří mezi onemocnění s vysokou prevalencí jak u nás, tak ve světě. Přítomnost tohoto mikroorganismu v těle hostitele může být příčinou široké škály projevů – od asymptomatické kolonizace žaludeční sliznice přes gastritidu a vředovou chorobu až k malignímu zvratu buněk.

Ve své práci se zabývám problematikou diagnostiky helicobacterové infekce a monitorování úspěšnosti eradikační léčby, a to zejména testy detekujícími antigeny *Helicobacter pylori* ve stolici. Ty existují ve dvou uspořádáních: jsou to (1) testy ELISA na principu destičkové enzymové imunoanalýzy a (2) rychlé imunochromatografické testy, tzv. rapid testy.

Cílem mého výzkumu pak bylo:

- 1) Ověřit spolehlivost starších zmražených vzorků stolice.
- 2) Zjistit vliv hmotnosti použitého vzorku stolice na výsledek rapid testu.
- 3) Porovnat rapid test s metodou ELISA.
- 4) Zhodnotit výsledky dvou různých rapid testů a porovnat je s výsledky ELISA.
- 5) Zhodnotit vlastní provádění rapid testů.

## 1.1 *Helicobacter pylori* a jeho vlastnosti

V roce 1983 byla poprvé popsána bakterie, jejíž objev nebyl významný pouze pro mikrobiologii, ale především představoval mezník v pohledu gastroenterologie na etiologii, patogenezi a léčbu řady onemocnění. Bakterie dostala později název *Helicobacter pylori* a stala se předmětem zájmu mnoha výzkumů. Dostalo se jí takové pozornosti, že je od roku 1996 vydáván nakladatelstvím Blackwell Publishing Ltd monotematický časopis *Helicobacter*. Převratnost tohoto objevu pak byla potvrzena v roce 2005, kdy byla Barrymu J. Marshallovi a J. Robinu Warrenovi udělena Nobelova cena „za objev bakterie *Helicobacter pylori* a její úlohy u gastritidy a peptické vředové choroby“ [1].

Infekce *Helicobacter pylori* (Hp) patří celosvětově mezi nejčastější vůbec. Odhaduje se, že je infikována více než polovina lidstva. Ve vyspělých zemích je prevalence infekce Hp 15–40 %, v rozvojových zemích 70–99 %. V nižších socioekonomických vrstvách je prevalence vyšší [2].

V České republice je prevalence Hp asi 42 %. Není vázána na pohlaví, ale roste s věkem: zatímco u dětí do 15 let věku se pohybuje kolem 30 %, v populaci nad 45 let je nadpoloviční. Vyšší riziko Hp positivity mají děti, jejichž matky mají nižší vzdělání, sdílejí pokoj s rodiči, nemají přístup k teplé vodě a bydlí v menších městech. Ve skupině dospělých jsou pak nejvíce ohroženy nižší socioekonomické vrstvy s nižším vzděláním [3].

Způsob přenosu infekce není dosud beze zbytku objasněn. Předpokládá se oro-orální (ve vyspělých zemích) nebo fekálně-orální (v rozvojových zemích a v kolektivních zařízeních pro děti) cesta. K akvizici infekce dochází nejčastěji již v dětském věku [2].

Dnes je Hp znám jako původce chronického zánětu žaludeční sliznice a vředové choroby\*. Navíc je infekce Hp jedním z rizikových faktorů pro vznik nádorů žaludku – lymfomů a karcinomů†, které vznikají na podkladě atrofické gastritidy. Od roku 1994 klasifikuje Světová zdravotnická organizace Hp jako kancerogen 1. třídy [5].

---

\* Vředové onemocnění se rozvine asi u 20 % infikovaných osob, přičemž za vznik gastrických vředů je Hp zodpovědný v 60–80 %, u duodenálních vředů až v 90 % případů, zbývající část onemocnění je přičítána zejména užívání nesteroidních antirevmatik [4].

† Rakovina žaludku vzniká asi u 1 % infikovaných osob [4].



Hp je obvykle spojován s onemocněními žaludku a dvanáctníku. Ukazuje se však, že se může podílet i na vzniku řady dalších chorob mimo trávicí trakt. Jde zejména o ovlivnění imunitního systému. Průkaz přímého příčinného vztahu je ovšem problematický, neboť jde vesměs o nemoci s multifaktoriální etiologií a mnoho studií dochází k protichůdným závěrům. *Helicobacterová* infekce se dává do souvislosti např. s manifestací aterosklerózy či chronické idiopatické trombocytopenické purpury [6].

Virulence Hp je dána mnoha faktory. Bakterie je pohyblivá, produkuje řadu enzymů (např. ureázu) a toxinů, např. vakuolizační cytotoxin, kódovaný genem *vacA*, a imunogenní protein CagA, kódovaný genem *cagA*, které jsou lokalizovány v tzv. ostrůvku patogenity (PAI – pathogenicity island).

U různých kmenů Hp je produkce faktorů virulence různě výrazná, což spolu s různou vnímavostí hostitelů vysvětluje rozdílné průběhy onemocnění, jakož i časté bezpříznakové nosičství [4].

**Ureáza** je nejdůležitější enzym produkovaný Hp. Tento enzym katalyzuje rozklad močoviny na oxid uhličitý a amoniak, který neutralizuje kyselé žaludeční šťávy. To umožňuje bakterii přežít v prostředí o extrémně nízkém pH a kolonizovat žaludeční sliznici. Urea byla prvním faktorem virulence použitým k diagnostice *helicobacterové* infekce.

**Adheziny** umožňují navázání bakterie na buňky žaludeční sliznice. Některé z nich se váží na antigeny Lewisova krevního systému, a proto mohou být odpovědné za autoimunizaci hostitele.

**VacA** (vakuolizační cytotoxin) je protein, který způsobuje vznik vakuol v buňkách. Tento účinek byl nejprve připisován ureáze. Všechny druhy Hp mají gen *vacA*, ale ne všechny produkují cytotoxin. Hp se v 1–10 % vyskytuje i intracelulárně, což mu patrně umožňuje právě VacA. Uvnitř buňky je bakterie chráněna před působením antibiotik a makrofágů. VacA je společně s dalšími faktory zodpovědný za indukci apoptózy slizničních buněk. Zvýšená apoptóza vede k atrofii žaludeční sliznice a metaplazii či hyperproliferaci, což je považováno za významný rizikový faktor kancerogeneze. Dále se mu připisuje také imunomodulační úloha.

**CagA** (s cytotoxinem asociovaný antigen A) je další důležitý faktor virulence. Přesná úloha tohoto vysoce imunogenního proteinu není dosud objasněna, nicméně

je považován za významný marker virulence Hp, neboť CagA-pozitivní kmeny jsou spojovány s rozvojem závažnějších onemocnění – chronické gastritidy a karcinomu duodena [5].

V současnosti je považován za velice významný faktor virulence také **NapA** (HP-NAP, neutrofile aktivující protein). Tento faktor má opět imunomodulační účinky a vyvolává v neutrofilech tvorbu kyslíkových radikálů [11]. Jeho role v patogenezi onemocnění trávicího traktu je předmětem výzkumů.

## 1.2 Léčba infekce *Helicobacter pylori*

Infekce hostitele Hp není automaticky indikací k eradikační terapii, jelikož ne u všech pacientů vede k rozvoji s ní asociovaných onemocnění. U těchto pacientů by mohl mikrob být „normálním“ článkem fyziologických funkcí žaludku [2]. Eradikační léčba zatěžuje pacienta antibiotiky a zvyšuje riziko vzniku rezistentních kmenů. Dále pak existují názory, že eradikace Hp může indukovat vznik jiných onemocnění, např. refluxní esofagitidy. Byla publikována řada prací s opačnými výsledky. Dle české randomizované dvojité slepé studie [7], provedené na 38 pacientech s funkční dyspepsií infikovaných Hp, kteří byli sledováni po dobu 12 měsíců, nebylo pozorováno zvýšené riziko vzniku refluxní choroby jícnu u pacientů po eradikaci oproti pacientům s placebem.

Indikace k eradikační léčbě je podle České gastroenterologické společnosti ČLS JEP [2] doporučena u dospělých v těchto případech:

- u **vředové choroby žaludku a dvanáctníku**, kde eradikace snižuje riziko recidiv onemocnění i jeho komplikací,
- u **MALT-lymfomu žaludku**, kde eradikace přispívá k navození dlouhodobé remise onemocnění,
- u **rakoviny žaludku**, jelikož Hp je jedním z etiologických agens; k eradikaci jsou v těchto případech indikováni i příbuzní 1. řádu,
- u **refluxní choroby jícnu**, kde má eradikace zabránit atrofii sliznice po používání inhibitorů protonové pumpy (tato indikace je však vzhledem k výše uvedenému sporná),
- **při léčbě nesteroidními antirevmatiky** s vředovou chorobou v anamnéze,

- u **chronické atrofické gastritidy**, kde je zvýšené riziko vzniku rakoviny žaludku,
- u **jaterní cirhózy**, kdy mají Hp pozitivní nemocní 40krát vyšší riziko vzniku peptického vředu,
- u **funkční dyspepsie** je eradikace vhodná, neboť z ní 10 % pacientů profituje.

Eradikační terapie se provádí nejčastěji trojkombinací léků – inhibitoru protonové pumpy (např. omeprazol) a dvou antibiotik (amoxicilin nebo metronidazol a klaritromycin) po 7 dní a dosahuje více než 80% úspěšnosti.

Mimo léčby infekce Hp se medicína zaměřuje i na prevenci, a to v podobě vakcíny, která je ve fázi vývoje [12]. S ohledem na výdaje spojené s farmakoterapií, rezistencí na antibiotika a eventuální nespolupráci pacientů by tato vakcína mohla přinést méně nákladný a efektivní způsob převzetí kontroly nad helicobacterovou infekcí.

### 1.3 Diagnostika infekce *Helicobacter pylori*

Zásadním požadavkem před zahájením léčby je přesná diagnostika infekce Hp. Žádné jiné infekční onemocnění nemá tak širokou paletu dostupných vyšetření jako právě infekce Hp. Platí zásada „nevyšetřovat osoby, které v případě positivity Hp nehodláme eradikovat“.

Dostupné testy můžeme rozdělit do dvou velkých kategorií: invazivní testy a neinvazivní testy. Pro diagnostiku infekce Hp je vhodné použít dva testy, nejlépe jeden globální (některý z neinvazivních testů) a jeden fokální (z bioptického vzorku sliznice) [2].

#### 1.3.1 Invazivní testy

Invazivním testům vždy předchází endoskopické vyšetření s odebráním bioptických vzorků žaludeční nebo duodenální sliznice. Jedná se o fokální testy, takže výsledek závisí na místě odběru vzorku, jelikož rozložení infekčního agens není homogenní. Obvykle se proto odebírá více vzorků – z těla žaludku, z antra a z dvanáctníku [8]. Vyšetření lze provést rychlým ureázovým testem, histologicky či kultivací. V experimentální oblasti lze pak využít analýzu DNA.

## RUT

Rychlý ureázový test (CLO test) detekuje přítomnost bakterií produkované ureázy (viz 1.1). *Helicobacterová* ureáza, přítomná ve vzorku, katalyzuje hydrolýzu urey za vzniku amoniaku. Změna barvy pH indikátoru signalizuje pozitivitu testu [13].

Variantou tohoto testu je IRUT (imunologický rychlý ureázový test), který používá specifické protilátky proti Hp ureáze, což vylučuje reakci ureázy jiného původu. Výsledek je dán změnou pH. Tato metoda má být velice přesná a rychlá [9].

## Histologie a mikroskopické vyšetření

Hp je gramnegativní spirálovitá bakterie a je ji možné prokázat také v histologickém preparátu. K obarvení vzorků se většinou používá stříbření.

V mikrobiologii se pro mikroskopické vyšetření používá rozdrčení preparátu mezi dvěma podložními sklíčky a barvení podle Grama či Giemsky.

Při mikroskopické diagnostice je nezbytné prohlédnout větší počet zorných polí z důvodu nerovnoměrné distribuce bakterií [13].

## Kultivace

Kultivace Hp má 100% specifitu, senzitivita je však nízká. Bakterie často nepřežijí transport vzorku do mikrobiologické laboratoře. Vzorek by měl být transportován ve vhodném médiu při pokojové teplotě a v ideálním případě zpracován v laboratoři do 2 hodin od odběru.

Hp vyžaduje speciální kultivační půdy, které jsou většinou založené na čokoládovém agaru z koňských erytrocytů. Kolonie vyrůstají za 3–5 dní v přísně mikroaerofilním prostředí.

Spíše než k průkazu infekce je tento postup vhodný tehdy, když byla eradikační terapie neúspěšná a je potřeba zjistit citlivost na antibiotika. Její zjištění je ovšem často obtížné, protože mikrob těžko snáší přeočkování [8, 13].

## Analýza DNA

Moderní molekulárně-biologické metody umožňují přímý průkaz DNA daného organismu. Pomocí analýzy DNA lze nejen prokázat přítomnost Hp s teoreticky

100% specificitou, ale díky specifickým úsekům DNA je možné jednotlivé kmeny klasifikovat, zhodnotit virulenci daného kmene (geny *vacA*, *cagA*) nebo určit rezistenci na antibiotika.

Dobrých výsledků dosáhla rakouská studie [10], která používala real-time PCR<sup>‡</sup> analýzu k detekci Hp v bioptickém vzorku a současně ke stanovení citlivosti bakterie na klaritromycin. Nejmenší množství čisté DNA, které dávalo pozitivní výsledek, byly 4 fg, což odpovídá 2,2 bakterií. Diagnostická senzitivita Hp infekce byla 100 %, specificita 98 %. Pro určení citlivosti Hp na klaritromycin dosahovala metoda senzitivity 82 % a specificity 100 %. Do studie bylo zařazeno 92 pacientů.

Italská studie [14] používala k detekci klaritromycinové rezistence analýzu založenou na PCR a DHPLC<sup>§</sup>. Vyšetřeno bylo 101 bioptických vzorků, senzitivita i specificita byly 100 %.

Metody analýzy DNA jsou však časově i finančně náročné, takže se dosud nestaly součástí rutinních vyšetřovacích postupů.

Pro ověření úspěšnosti eradikační terapie je správné provést vyšetření bioptických vzorků jak pomocí RUT, tak histologicky, pokud je pacient po 4 týdnech nebo později endoskopován. Je třeba odebrat nejméně tři vzorky (z žaludečního antra v blízkosti angulární řasy, ze střední části žaludečního těla a z fundu) [2].

### 1.3.2 Neinvazivní testy

Neinvazivní testy jsou vyšetření, která pacienta minimálně zatěžují, a proto se v poslední době stále více upřednostňují, a to především u pacientů, u nichž není indikace k endoskopickému vyšetření. Další výhodou je, že jde o testy globální, takže jejich výsledek není závislý na homogenitě rozložení infekčního agens v hostiteli. K dispozici je vyšetření protilátek proti Hp, dechový ureázový test, průkaz antigenu Hp ve stolici a experimentálně metody analýzy DNA.

---

<sup>‡</sup> Real-time PCR umožňuje kvantifikovat množství produktu amplifikace přímo v termocykleru pomocí fluorescenčních značek.

<sup>§</sup> DHPLC je chromatografická metoda, pomocí níž se oddělují fragmenty DNA s mutací a bez mutace na základě rozdílné teploty, při níž dochází k denaturaci. K analýze je potřebná referenční DNA.

## Vyšetření protilátek proti Hp

Jedná se o serologické vyšetření prováděné nejčastěji metodou ELISA, i když existují i POCT testy na principu imunochromatografie, které nevyžadují laboratorní vybavení. Vyšetřit lze krev, ale i sliny a moč.

Je možné udělat i vyšetření protilátek proti specifickým faktorům virulence Hp – např. proti proteinu CagA.

V současné době není tento způsob zjištění Hp statutu považován za vhodný pro screening ani pro ověření úspěšnosti eradikační terapie, jelikož má nízkou diagnostickou senzitivitu a specifitu (chybné výsledky dosahují až 20 %). K vymizení protilátek proti Hp dochází až po řadě měsíců (navíc ne u všech úspěšně eradikovaných), na druhou stranu část nositelů floridní infekce Hp může mít protilátky falešně negativní.

Sledování titru protilátek proti Hp má smysl při dlouhodobém sledování pacientů [2, 8, 15].

## UBT

Dechový test s ureou značenou přirozeným izotopem uhlíku  $^{13}\text{C}^{**}$  byl v roce 1996 označen Maastrichtskou konferencí jako zlatý standard diagnostiky Hp, což platí dodnes. Od roku 1997 je toto vyšetření dostupné i v České republice. Mezi výhody tohoto přesného vyšetření patří i fakt, že lze provést prakticky kdekoli a k analýze odeslat poštou do specializovaného centra.

Test pracuje opět na principu průkazu helicobacterové ureázy. Vyšetřovanému je per os podána urea značená stabilním neradioaktivním izotopem uhlíku  $^{13}\text{C}$ , který se stejně jako  $^{12}\text{C}$  běžně vyskytuje v přírodě (včetně člověka). Pokud je vyšetřovaný infikován, je v jeho žaludku podaná urea účinkem ureázy hydrolyzována. Vzniká amoniak a oxid uhličitý ( $^{13}\text{CO}_2$ ), který se v duodenu vstřebává a ve stejné formě je vydechován plicemi. Ve vydechovaném vzduchu se stanovuje  $^{13}\text{CO}_2$  v poměru k  $^{12}\text{CO}_2$  a tento poměr je vztažen k plynu referenčnímu. Výsledkem je  $\delta^{13}\text{CO}_2$  v ‰. Při vyhodnocování testu se porovnávají  $\delta^{13}\text{CO}_2$  před a po požití značené urey.

---

\*\*  $^{13}\text{C}$  nahradil dříve používaný  $^{14}\text{C}$ , který je radioaktivní. Vyšetření tak mohlo být prováděno pouze na specializovaných pracovištích (se zřetelem na ionizující záření). Testům nebyly podrobovány těhotné ženy a děti. Nahrazení radioaktivního izotopu neradioaktivním předznamenalo velký rozvoj dechových testů i pro jiné diagnostické účely v gastroenterologii [16].

UBT se provádí nalačno a před vyšetřením je potřeba vysadit případnou léčbu H<sub>2</sub>-antagonisty, preparáty bizmutu, inhibitory protonové pumpy. Terapie antibiotiky musí být ukončena alespoň 3 týdny před testem.

Analýza vydechnutého vzduchu se provádí hmotnostní spektrometrií (IRMS), která je považována za základní a referenční metodu pro všechny dechové testy s izotopem uhlíku <sup>13</sup>C. Alternativními možnostmi stanovení jsou metody infračervené spektrometrie (NDIRS) a laserové spektroskopie (LARA<sup>®</sup>). Podle použité analytické metody se liší i objem odebíraného vzduchu.

Senzitivita a specifická testu přesahuje 95 %, k provedení vyšetření je však nutná spolupráce pacienta [15–19].

### Detekce antigenu Hp ve stolici

Test pro průkaz antigenu Hp je doporučován jako alternativa k UBT. Toto vyšetření je oblíbené zejména u pediatrů, jelikož je zcela neinvazivní a není vyžadována žádná spolupráce pacienta. Nevýhodou je nutnost manipulovat se stolicí. Princip spočívá ve vazbě antigenu se specifickými protilátkami a je dostupný ve dvou uspořádáních: jako ELISA či jako POCT imunochromatografický (rapid) test.

Test ELISA byl poprvé představen na sjezdu Americké mikrobiologické společnosti v roce 1997 a brzy se stal součástí doporučených vyšetřovacích postupů jako levnější alternativa UBT. V České republice byl test zařazen mezi standardní vyšetření do Seznamu zdravotních výkonů v roce 2002 [20]. První testy pracovaly s polyklonálními protilátkami, nověji začali výrobci používat protilátky monoklonální. Jejich spolehlivost je srovnatelná (viz Tabulka 1).

	<b>Senzitivita</b>	<b>Specifická</b>
<b>ELISA polyklonální</b>	85–100 %	85–100 %
<b>ELISA monoklonální</b>	92–96 %	90–100 %
<b>Rapid testy</b>	85–92 %	85–93 %

**Tabulka 1** Diagnostická senzitivita a specifická metody ELISA a rapid testů v literatuře [20–34]

Na rozdíl od metody ELISA imunochromatografické testy nevyžadují laboratorní vybavení. Výsledky jsou k dispozici během několika minut a vyšetření lze provést

přímo v ordinaci lékaře. Oproti testům ELISA však bývají o 10–15 % méně přesné. V současnosti existují i rapid testy, které stanovují pouze kmeny produkující CagA a VacA. Princip rapid testu je popsán v experimentální části této práce.

### **Analýza DNA v stolici**

Stejně jako v bioptických materiálech i ve stolici lze provádět vyšetření DNA. Extrakce a amplifikace DNA ze vzorků stolice je však obtížná. Protože není Hp intestinální patogen, vyskytuje se ve stolici jen v malém množství. Stolica obsahuje směs různorodého materiálu – polysacharidy, produkty degradace potravy, metabolické produkty, velké množství nesouvisící DNA a mnoho typů bakterií – který způsobuje problémy při PCR. Dále jsou ve stolici přítomny inhibitory DNA polymerázy, jejichž nepříznivý vliv je potřeba při analýze odstranit.

V turecké práci [35] byla použita u 54 vzorků klasická PCR technika, produkty amplifikace byly vizualizovány na agarózovém gelu. Diagnostická senzitivita i specifita testu však byly mnohem nižší než u konvenčních metod – 65,22 % a 75 %.

V již zmiňované rakouské studii [10] byly vyšetřovány real-time PCR technikou mimo bioptických vzorků i vzorky stolice. Detekční hranice DNA zde byla 10 až 15 pg/g stolice, což odpovídá  $5,5\text{--}8,5 \cdot 10^3$  bakterií. Senzitivita a specifita testu pro detekci Hp byly 98 %, pro stanovení citlivosti na klaritromycin 82 a 73 %.

I zde platí, že je vyšetření DNA vyhrazeno prozatím výzkumným účelům. Vzhledem ke snadné dostupnosti vzorku by však tyto metody mohly zaujímat významné místo v diagnostice Hp.



## 2 Materiál a metody

Cílem práce bylo provedení dvou různých imunochromatografických metod (rapid testů) používaných pro detekci helicobacterového antigenu ve stolici, posouzení způsobu práce s nimi a srovnání jejich výsledků s rutinní metodou ELISA. Jelikož výrobci nekladou vysoké nároky na přesnost odměření použitého množství vzorku pro testování, bylo dalším cílem zjištění vlivu různých hmotností vzorku na výsledek testu. A protože jsem měl k dispozici starší zmražené vzorky a výsledky získané metodou ELISA, bylo nezbytné ověřit, zda jsou výsledky této metody stále platné a vzorky i výsledky lze pro daný účel použít.

Výzkum jsem prováděl v gastroenterologické laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze (ÚKBLD) v březnu 2007. Laboratorní teplota se pohybovala mezi 20 a 25 °C, podmínky byly během jednotlivých měření srovnatelné.

### 2.1 Ověření použitelnosti výsledků metody ELISA a starších zmražených vzorků stolic

Pro svůj výzkum jsem měl k dispozici starší zmražené stolice (stolice byly uchovávány při teplotě -70 °C, nejstarší vzorek byl pořízen v září 2002) a jejich výsledky získané metodou ELISA. Tyto vzorky většinou pocházely z předchozí studie [7]. Abych tyto vzorky mohl použít pro své experimenty, bylo nezbytné ověřit jejich spolehlivost: Nechal jsem zopakovat test ELISA u deseti náhodně vybraných ELISA pozitivních vzorků. Stanovem bylo provedeno enzymovou imunoanalýzou *Amplified IDEIA™ Hp StAR™*, metodou, která se rutinně provádí na ÚKBLD a která byla použita i v době pořízení vzorků. Po provedení testu jsem porovnal původní výsledky ELISA a výsledky nové.

*Amplified IDEIA™ Hp StAR™* je kvalitativní test, který slouží ke stanovení přítomnosti antigenu Hp v lidské stolici. Výsledky napomáhají k diagnostice infekce bakterií Hp a sledování výsledků eradikační terapie u dospělých a dětí po 4–6 týdnech od jejího ukončení, dále pak i k diagnostice reinfekce. Výrobce udává diagnostickou senzitivitu 95,3–100 % a specificitu 96,9–99,4 %, což dokládá třemi

studiemi, provedenými u dospělých (n = 356), dětí (n = 239) a dětí po eradikační terapii (n = 40). Dále výrobce prohlašuje, že nebyla pozorována zkřížená reakce testu na antigeny jiných bakterií, které by se mohly ve stolici vyskytovat. Testovány byly rody *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*.

Principiálně se jedná o sendvičovou ELISA, využívající technologii znásobené imunoanalýzy. V 96 (12 × 8) jamkách mikrotitrační destičky jsou naadsorbovány monoklonální protilátky specifické pro antigen Hp.

Vzorek stolice se rozpustí v diluentu (pufrovaného roztoku o pH 7,4 s antimikrobiálními prostředky) a zcentrifuguje se.

V jednom kroku se do jamek napipetuje supernatant ze suspenze stolice zároveň s monoklonálními protilátkami značenými křenovou peroxidázou (konjugát). Během inkubace se antigen Hp, přítomný ve vzorku, naváže na protilátky na destičce i na protilátky značené. Tím vznikne „sendvičový komplex“.

Jamky se promyjí pufrovaným roztokem o pH 7,4 s detergentem a antimikrobiálními prostředky, aby se odstranil nenavázaný konjugát. Pak se přidá bezbarvý jednosložkový substrát – tetramethylbenzidin. Navázaná peroxidáza oxiduje substrát na modrý barevný produkt. Přidáním zastavovacího roztoku (kyseliny sírové) se reakce přeruší a modrá barva se změní na žlutou. Intenzita zabarvení se stanoví duálně vertikálním fotometrem při vlnových délkách 450 a 650 nm.

Test *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* provedla gastroenterologická laboratoř ÚKB LD. Pro novou analýzu bylo vybráno deset vzorků, které byly testem v době odběru vyhodnoceny pozitivně. Podle pokynů výrobce se jako pozitivní označily vzorky s hodnotou absorbance vyšší nebo rovnou 0,150; negativně se hodnotily vzorky s absorbancí nižší než 0,150.

## **2.2 Zjištění vlivu množství odebrané stolice na výsledek rapid testu**

Za účelem zjištění závislosti výsledku rapid testů na množství odebrané stolice jsem provedl jsem následující experiment: Zvolil jsem 3 vzorky – dle ELISA jeden výrazně pozitivní, jeden slabě pozitivní a jeden negativní. U všech vzorků jsem

provedl testy *helicoCARE direct* a *RAPID Hp StAR™*, a to pro 3 různá množství stolice. Testem *helicoCARE direct* jsem pak otestoval ještě další 2 vzorky, které byly metodou ELISA hodnocené pozitivně.

### Test *helicoCARE direct*

Test *helicoCARE direct* je imunochromatografická analýza pro kvalitativní stanovení antigenu Hp ve stolici, sloužící k diagnostice a sledování úspěšnosti terapie při infekci Hp. Výrobce udává citlivost testu 4–8 ng antigenu/ml. Diagnostickou senzitivitu a specifitu dokládá studií na 102 pacientech – senzitivita je 89 %, specifita 96 %.

Po aplikaci vzorku do otvoru „S“ – Sample (vzorek) se konjugát anti-Hp monoklonální myší protilátky a koloidního zlata v případě positivity váže s antigenem Hp, přítomným ve vzorku.

Vzniklý komplex se na nosiči kapilaritou pohybuje k linii „T“ – Test, kde je imobilizována další myší monoklonální protilátka proti antigenu Hp. Zde dojde k navázání komplexu a díky koloidnímu zlatu vznikne červenofialový pruh.

Vnitřní pozitivní kontrolu tvoří konjugát IgA polyklonální králičí protilátky s koloidním zlatem, který je nezávislý na přítomnosti antigenu Hp. Ten se pohybuje k imobilizované polyklonální ovčí protikráličí protilátce, na niž se naváže, a vytvoří tak kontrolní barevný pruh označený „C“ – Control (kontrola), který signalizuje správné provedení testu.

Výsledek se hodnotí vizuálně: Pokud se zbarví linie „T“ i „C“, je test pozitivní, zbarví-li se pouze „C“, výsledek je negativní. Test je neplatný, pokud nedojde ke zbarvení linie „C“. Způsob hodnocení přehledně popisuje Tabulka 2.

Linie		Hodnocení
T	C	
■	■	Pozitivní
	■	Negativní
		Neplatný
■		Neplatný

**Tabulka 2** Hodnocení imunochromatografického testu

Souprava obsahuje 25 testových kazet s pohlcovačem vlhkosti (zabalených ve fólii), návod k použití (v anglickém jazyce), 25 odběrových systémů se štítky, 25 informací pro pacienty (v anglickém jazyce) a 25 plastických uzavíratelných sáčků.

Pacient odebírá vzorek stolice pomocí plastového odběrového systému, jenž se skládá z uzavíratelné nádoby s pufrem a víčka s odběrovou tyčinkou. Na nádobce je nalepený štítek pro označení vzorku. Odběrová tyčinka je připevněná k vnitřní straně víčka a na konci je opatřena závitem. Ten slouží k odměření potřebného množství stolice – výrobce požaduje jen takové množství stolice, které se zachytí do závitu, zbytek je třeba otřít. Po zašroubování víčka je část závitu ponořena do pufru. Během provádění testu pak systém slouží jako kapátko, kterým se roztok aplikuje do testové kazety, poté co se odlomí vrchol uzávěru.

Testové kazety jsou vyrobeny z bílého plastu a mají oblý tvar. Uprostřed kazety je okénko, skrz které je vidět na nosič s imobilizovanými protilátkami, kde se během provádění testu formují barevné pruhy. Vedle okénka se nachází otvor pro nakapání suspenze, nad okénkem pak pole pro označení kazety. Pod okénkem a otvorem najdeme vystupující písmena „C“, „T“ a „S“. Jejich význam je vysvětlen výše.

K provedení testu není potřeba s výjimkou buničiny a hodinek žádné další laboratorní vybavení. Já jsem použil namísto ručního protřepávání třepačku, z metodických důvodů jsem navíc používal analytické váhy.

Vybrané vzorky stolic pěti pacientů jsem rozmrazil. U každého pacienta jsem odebíral 3 různá množství stolice. Analytické váhy jsem vytáročoval na prázdnou odběrovou tyčinku. Odebral jsem první vzorek stolice podle pokynů výrobce: odběrovou tyčinku jsem ponořil do stolice, přebytečnou stolici jsem otřel do buničiny tak, aby zůstala pouze v závitu, a zvážil ji. Potom jsem ji vložil zpět do označené nádoby s pufrem a dobře zašrouboval uzávěr. U druhého vzorku jsem po vytárování odebíral přibližně dvojnásobné množství, třetí vzorek byl přibližně poloviční oproti prvnímu. Tímto způsobem jsem připravil celkem 15 vzorků.

Nádobky jsem 15 sekund třepal na třepačce a uložil do chladničky.

Po 24 hodinách jsem vzorky vyndal a vzorky i testové kazety, které jsem označil, jsem nechal vytemperovat na laboratorní teplotu. Odlomil jsem hroty na uzávěrech

odběrových systémů a do jamky „S“ v kazetách nakapal dle návodu vždy po dvou kapkách roztoku příslušného vzorku. V průběhu 10 minut jsem testy vyhodnotil. Vyhodnocení probíhalo za denního světla.

### Test RAPID Hp StAR™

Test *RAPID Hp StAR™* je rychlá kvalitativní imunochromatografická analýza pro přímou neinvazivní detekci antigenu Hp v lidské stolici, používaný pro diagnostiku infekce Hp, monitorování úspěšnosti eradikace Hp po 4–6 týdnech od ukončení terapie a dále k diagnostice reinfekce. Test pracuje se stejnými monoklonálními protilátkami, které používá *Amplified IDEIA™ Hp StAR™*. Spolehlivost testu výrobce dokládá 4 studiemi: u dospělých pacientů (n = 227) je shoda s *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* 93 %; při monitoraci eradikační terapie vzhledem k dechovému ureázovému testu (n = 95) relativní specifická 94,2 %, negativní prediktivní hodnota 94,5 %, shoda 92,6 %; u primární diagnózy helicobacterové infekce (n = 80) je vzhledem k *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* relativní senzitivita 97,6 %, relativní specifická 97,4 %; u primární diagnózy u dětí vzhledem ke zlatému standardu dosahuje relativní senzitivita 74,5 %, relativní specifická 89,7 %, pozitivní prediktivní hodnota 86,4 %, negativní prediktivní hodnota 80 % a shoda 82,6 %. Zkříženou reaktivitu testu výrobce vylučuje pro rody *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacterioides*, beta-hemolytický *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Candida*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* a *Staphylococcus*.

Na startu testového stripu (pruhu) jsou dvě různé monoklonální protilátky, specifické pro antigen Hp. Jedna z těchto protilátek je konjugovaná s koloidním zlatem, druhá s biotinem.

Po ponoření stripu do suspenze vzorku se tekutina pohybuje vzhůru po nitrocelulózové membráně, kde rozpouští protilátkové konjugáty. Antigen přítomný ve vzorku se naváže na tyto dva konjugáty za vzniku komplexu. Každý komplex se tedy skládá z antigenu a obou konjugátů: protilátky konjugované s koloidním zlatem a protilátky konjugované s biotinem. Komplexy migrují vzhůru, dokud nedosáhnou imobilizovaného streptavidinu, na který se naváže biotinová část komplexu, čímž se

utvoří červenofialový pruh (linie „T“ – Test). Zbývající nenavázaný konjugát s koloïdním zlatem stoupá dále a je zachycen protimyšší polyklonální protilátkou, která je imobilizovaná v kontrolní zóně, za vzniku druhé barevné linie (linie „C“ – Control), která informuje o tom, že test byl proveden správně.

Výsledek testu se hodnotí vizuálně. Pokud se zbarví linie „T“ i „C“, je test pozitivní. Zbarví-li se pouze „C“, výsledek je negativní. Test je neplatný, pokud nedojde ke zbarvení linie „C“ (viz Tabulka 2, strana 19).

Souprava obsahuje návod (v anglickém, francouzském a německém jazyce), 25 špejlí, 20 plastických pipet (cejchovaných po 0,1 ml), 20 testových stripů v průhledných zkumavkách, 20 diluentů (1,35 ml pufru obsahujícího antimikrobiální prostředky, zvířecí sérum a detergent).

Výrobce nedodává vlastní odběrový systém. Ten musí pacientovi poskytnout vyšetřující, vzorek k testování se pak odebírá pomocí špejle a přenesení do skleněné nádoby s diluentem, šroubovacím víčkem a nalepeným štítkem pro označení vzorku. Testové zkumavky s plochým dnem jsou z plastu, také vybavené štítkem. Plastové víčko se vytahuje bez šroubování, na jeho spodní části je hranol a klín, které mezi sebou drží testový strip. Na stripu je start označen dvěma silnými šipkami. Ve střední části je bílé pole s imobilizovanými protilátkami. Do pole směřují z obou stran šipky označující pruh „T“, respektive „C“. Celý strip je až na startovou část potažen plastovou membránou.

K provedení testu není mimo hodinek potřeba další laboratorní vybavení, já jsem použil volitelnou třepačku a opět z metodických důvodů analytické váhy. Jelikož byly některé vzorky příliš řídké, používal jsem také automatickou pipetu a modré špičky s odstřiženým koncem.

Vybrané vzorky stolice tří pacientů jsem rozmrazil. U každého pacienta jsem odebíral 3 různá množství stolice. Analytické váhy jsem vytárouval na prázdnou špejli. Odebral jsem první vzorek stolice podle pokynů výrobce – špejli jsem nabral vzorek o velikosti hrášku (přibližně 0,1 g). Špejli se vzorkem jsem zvažil, potom přenesl do diluentu a nádobku dobře zašrouboval. U druhého vzorku jsem po vytárování odebíral přibližně dvojnásobné množství, třetí vzorek byl přibližně poloviční oproti prvnímu. Na řídké vzorky jsem místo špejle používal na odvážení

automatickou pipetu, pipetoval jsem přímo do nádoby s diluentem, na kterou jsem předem vytáročoval analytické váhy. Pomalu jsem stlačoval píst pipety, dokud jsem nezískal požadovanou hmotnost. Tímto způsobem jsem připravil celkem 9 vzorků.

Nádoby jsem 15 sekund třepal na třepačce a uložil do chladničky.

Po 24 hodinách jsem vzorky vyndal a vzorky i zkumavky s testovými pruhy jsem nechal vytemperovat na laboratorní teplotu. Otevřel jsem zkumavky a vyndal testové pruhy. Pomocí jednorázových kalibrovaných plastových pipet jsem do zkumavek napipetoval po 350 µl suspenze. Dbal jsem na to, aby se do pipety nenasály kousky stolice. Testové pruhy jsem vrátil do zkumavek tak, aby byly báze stripů ponořené v suspenzi. Zkumavky jsem nechal stát ve svislé poloze po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Během pěti minut od konce inkubace jsem odečetl výsledky, a to za denního světla.

## 2.3 Srovnání metod

V této části jsem experimentálně porovnával oba rapid testy – *helicoCARE direct* a *RAPID Hp StAR™* – vzájemně a s metodou *Amplified IDEIA™ Hp StAR™*. Zmíněnými metodami jsem vyšetřil 50 vzorků, které pocházely od osob ve věku 24 až 81 let – 37 žen a 13 mužů.

### Test Amplified IDEIA™ Hp StAR™

Jelikož jsem měl k dispozici výsledky této metody z doby příjmu vzorků, neprováděl jsem ji znovu. Metodika ověření jejich použitelnosti, princip a vlastnosti metody jsou popsány v části 2.1.

### Test helicoCARE direct

Testy jsem prováděl celkem ve čtyřech dnech s tím, že vlastní test a jeho vyhodnocení probíhalo vždy následující den po přípravě vzorků. Popis testu a jeho princip je uveden v části 2.2.

Vybrané vzorky stolic jsem rozmrazil a označil si odběrové systémy. Analytické váhy jsem vytáročoval na prázdnou tyčinku odběrového systému. Vzorky stolice jsem odebíral podle pokynů výrobce – odběrovou tyčinku jsem ponořil do stolice,

přebytečnou stolicí jsem otřel do buničiny tak, aby zůstala pouze v závitě, a zvážil ji. Potom jsem ji vložil zpět do označené nádoby s pufrem a dobře zašrouboval uzávěr. Tímto způsobem jsem zpracoval všechny vzorky. Nádoby jsem 15 sekund třepal na třepačce a uložil do chladničky.

Provedení testu pak už probíhalo standardně, jak je popsáno v části 2.2.

### Test RAPID Hp StAR™

Test *RAPID Hp StAR™* jsem prováděl paralelně s testem *helicoCARE direct*, taktéž ve čtyřech dnech. Stejně jako u *helicoCARE direct* jsem jeden den vzorky připravil a druhý den prováděl vlastní test včetně vyhodnocení. Popis metody a její princip je uveden v části 2.2.

Používal jsem rozmražené vzorky stolic z předchozího testování. Označil jsem si nádoby s diluentem. Analytické váhy jsem vytáročoval na prázdnou špejli. Odebíral jsem vzorky stolice podle pokynů výrobce – špejlí jsem nabral vzorek o velikosti hrášku (přibližně 0,1 g). Špejli se vzorkem jsem zvážil, poté přenesl do diluentu a nádobku dobře zašrouboval. Tímto způsobem jsem připravil všechny vzorky. Suspenze jsem 15 sekund třepal na třepačce a uložil do chladničky.

Provedení vlastního testu pak již probíhalo také standardně, je popsáno v části 2.2.

### Statistické vyhodnocení

Ke statistickému vyhodnocení míry shody mezi metodami jsem použil Cohenův koeficient  $\kappa$ . Tento nástroj (na rozdíl od prostého procenta dosažené shody) bere v úvahu i shody vzniklé náhodou, tedy takové, které by vznikly na základě zcela náhodných výsledků (očekávaná shoda). Koeficient  $\kappa$  tedy popisuje míru shody mezi dvěma soubory po odstranění vlivu očekávané shody a říká, jaký podíl z maximální shody nad rámec shody očekávané byl dosažen. V případě, že je shoda mezi oběma soubory naprostá, pak  $\kappa = 1$  (koeficient nabývá maximální hodnoty), odpovídá-li shoda pouze shodě vzniklé v důsledku náhody,  $\kappa = 0$ . K jeho výpočtu jsem použil webový kalkulačtor <http://faculty.vassar.edu/lowry/kappa.html>.

U obou rapid testů jsem spočítal relativní senzitivitu, specificitu a přesnost, kde referenční metodou byla metoda ELISA. Výpočty jsem prováděl podle níže uvedených vzorců:



$$\text{senzitivita} = \frac{SP}{SP + FN},$$

$$\text{specifická} = \frac{SN}{SN + FP},$$

$$\text{přesnost} = \frac{SP + SN}{SP + SN + FP + FN},$$

kde SP jsou výsledky správně pozitivní, SN správně negativní, FP falešně pozitivní a FN falešně negativní.

### Obrazové přílohy

Fotografie pořídil as. MUDr. Petr Kocna, CSc., za použití digitálního fotoaparátu OLYMPUS Camedia C750-UZ.

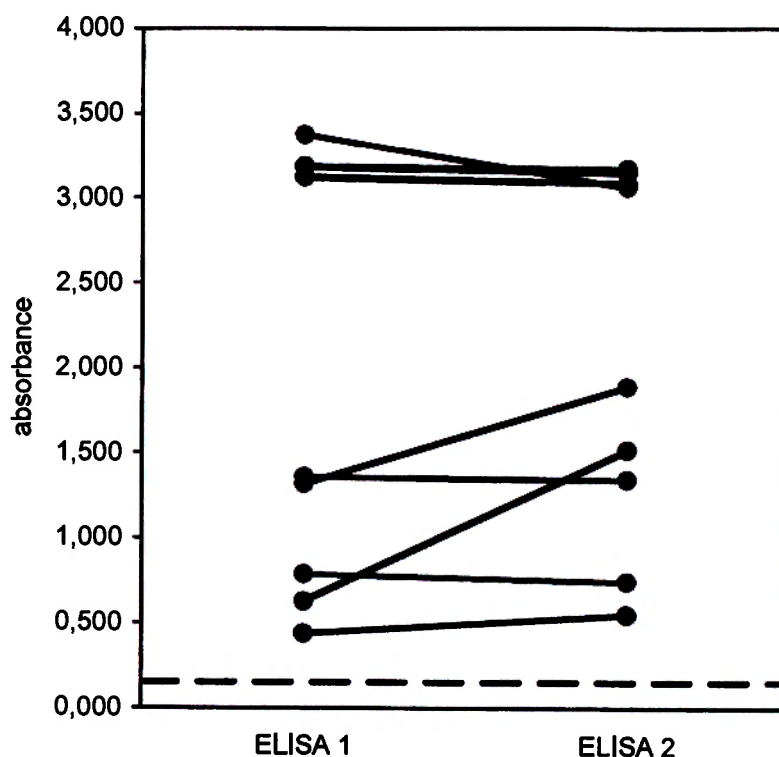
### 3 Výsledky a diskuze

#### 3.1 Ověření použitelnosti starších zmražených vzorků stolic

Výsledky testu *Amplified IDELA™ Hp StAR™* byly ve všech případech pozitivní. Pozitivita tak byla v porovnání s výsledky získanými stejnou metodou v době odběru vzorků zachována.

Jak vyplývá z Grafu 1, nebyl zaznamenán ani výrazný úbytek absorbance v rozmražených vzorcích oproti měření v době příjmu vzorků. Odlišné hodnoty lze vysvětlit nehomogenitou stolice.

Výsledky metody ELISA provedené v době odběru vzorků lze proto použít pro hodnocení v dalších experimentech. Jak laboratoř ověřila, uchovávání stolic při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  patrně zajišťuje dostatečnou stabilitu antigenu, takže se vzorky je možné pracovat při dalším výzkumu.



**Graf 1** Stabilita antigenu ve zmražené stolici

Výsledky ELISA 1 jsou z doby odběru vzorku, ELISA 2 představuje opakování testu v roce 2007. Přerušovaná čára značí hranici positivity (cut-off = 0,150).

### 3.2 Zjištění vlivu množství odebrané stolice na výsledek rapid testu

Všechny výsledky rapid testů byly platné. U vzorku 5 však nebyl test *helicoCARE direct* proveden, neboť v odběrovém systému chyběl diluent. Výsledky popisuje Tabulka 3.

Vzorek číslo 1, který byl metodou ELISA stanoven slabě pozitivně, vyšel testem *RAPID Hp STAR™* ve všech koncentracích suspenze pozitivně, test *helicoCARE direct* byl naopak bez výjimky negativní. Druhý vzorek, dle ELISA negativní, nedal ani v žádném z rapid testů pozitivní reakci. Vzorek tři, ELISA výrazně pozitivní, nereagoval v testu *helicoCARE direct* pozitivně pouze při nejnižší koncentraci vzorku. *RAPID Hp STAR™* byl u tohoto vzorku pro všechny koncentrace překvapivě negativní. Tento vzorek a vzorek 2 musel však být pro svou vysokou tekutost pipetován.

Čtvrtý vzorek byl testován pouze metodou *helicoCARE direct*. Byl opět ELISA vysoce pozitivní a rapid test vyšel negativně pouze u nejnižší koncentrace. U posledního vzorku s opět pozitivní ELISA a opět testovaného pouze testem *helicoCARE direct* jsem získal výsledek pouze u koncentrace standardní a dvojnásobné, které vyšly výrazně pozitivně. Nejnižší koncentrace nemohla být otestována, jelikož v odběrovém systému chyběl diluent.

Výsledky této části výzkumu nebyly jednoznačné z důvodu nízkého počtu provedených testů, k čemuž přispělo i nedokončené stanovení u vzorku 5. U jednoho vzorku, který byl ELISA slabě pozitivní, nedal test *helicoCARE direct* pozitivní reakci ani v nejvyšší koncentraci suspenze. Ve dvou případech nedošlo u téhož testu u nejnižší koncentrace k pozitivní reakci, přestože vyšší koncentrace pozitivní byly. U testu *RAPID Hp STAR™* existují podklady pro zhodnocení případné falešné negativity pouze z jednoho vzorku, neboť druhý ELISA pozitivní vyšel neočekávaně pro všechny koncentrace negativně. Ze získaných dat lze usuzovat na to, že dvojnásobné množství nabrané stolice nezpůsobí vysycení protilátek v testu a nevede k falešně negativnímu výsledku. Ani falešná pozitivita se u suspenzí s vysokou koncentrací neprojevila. Poloviční množství testovaného vzorku však může, minimálně u testu *helicoCARE direct*, zapříčinit falešně negativní výsledek. Pro validní závěry by však bylo nezbytné zopakovat tento experiment s větším počtem vzorků.

Vzorek	Iniciály	Datum odběru	ELISA 1		ELISA 2		helicoCARE direct		RAPID Hp StAR™		Poznámka
			Absorbance	Hodnocení	Absorbance	Hodnocení	Hmotnost [mg]	Hodnocení	Hmotnost [mg]	Hodnocení	
1	HR	15.5.2003	0,786	POZ	0,740	POZ	4,5	NEG	42	POZ	
							5,9	NEG	105	POZ	
							23,1	NEG	252	POZ	
2	KN	2.6.2003	0,043	NEG	-	-	4,5	NEG	56	NEG	pipetováno
							6,7	NEG	96	NEG	
							25,5	NEG	246	NEG	
3	KN	8.4.2003	3,373	POZ	3,000	POZ	3,6	NEG	61	NEG	pipetováno
							15,0	POZ	96	NEG	
							24,0	POZ	237	NEG	
4	MP	20.3.2003	3,125	POZ	3,100	POZ	3,9	NEG	-	-	
							8,9	POZ	-	-	
							24,0	POZ	-	-	
5	SV	21.1.2003	1,317	POZ	1,900	POZ	3,7	NS	-	-	
							8,7	POZ	-	-	
							21,5	POZ	-	-	

**Tabulka 3** Vliv množství odebrané stolice na výsledek rapid testů

Výsledky ELISA 1 jsou z doby odběru vzorku, ELISA 2 představuje opakování testu v roce 2007. POZ – pozitivní test, NEG – negativní test, NS – nestanoveno.

### 3.3 Porovnání rapid testu s testem ELISA

Test ELISA je metoda laboratorní, tudíž její provedení vyžaduje laboratorní vybavení, např. automatické pipety, centrifugu či vertikální fotometr. Teoreticky je možné na jedné destičce s 96 jamkami provést 94 vyšetření (2 jamky se spotřebují na pozitivní a negativní kontrolu). Pracuje-li laboratoř v dubletech, klesá počet stanovení na 47. Musí ale nashromáždit 47 vzorků, aby mohla vyšetření provést, což pochopitelně znamená zpoždění výsledků. Metoda proto umožňuje pracovat s jednotlivými „sloupci“ destičky, které sestávají z 8 jamek. V jednom „sloupci“ lze vyšetřit 6 pacientů nebo 3 v dubletech. V tomto uspořádání však padne čtvrtina jamek na kontroly, takže náklady na jedno stanovení vzrostou oproti předchozí variantě (stanovení na celé destičce) o třetinu.

Imunochromatografické testy nevyžadují žádné speciální vybavení. Lze je provést přímo v ordinaci lékaře u každého pacienta zvláště a výsledek je známý do 20 minut. Jsou však považovány za méně spolehlivé. Problémem je i interpretace testů, neboť jejich hodnocení je vizuální, a tudíž je zatíženo subjektivitou.

### 3.4 Zhodnocení výsledků dvou různých rapid testů a jejich porovnání s testem ELISA

Výsledky všech rapid testů byly platné. U testu *RAPID Hp StAR™* bylo 5 vzorků hodnoceno pozitivně až po 20 minutách od ponoření stripu do suspenze, jeden vzorek až po třiceti.

Metodou *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* bylo z 50 vzorků 33 stanoveno pozitivně, rapid test *helicoCARE direct* dal pozitivní reakci ve 27 případech, *RAPID Hp StAR™* u 21 vzorků.

Výsledky obou rapid testů se shodovaly u 40 vzorků,  $\kappa = 0,605$  (95% interval spolehlivosti 0,386 až 0,824), *helicoCARE direct* s ELISA ve 42 případech,  $\kappa = 0,672$  (95% interval spolehlivosti 0,465 až 0,878) a *RAPID Hp StAR™* s ELISA u 38 vzorků,  $\kappa = 0,543$  (95% interval spolehlivosti 0,312 až 0,775). Lepší shodu s ELISA měl tedy test *helicoCARE direct*.

Testem *RAPID Hp StAR™* nebyl žádný vzorek, který by byl metodou ELISA vyhodnocen negativně, označen opačně. U *helicoCARE direct* nastala tato situace v jednom případě.

Relativní sezitivita, specificita a přesnost vzhledem k referenční metodě ELISA u testu *helicoCARE direct* byly 79 %, 94 % a 84 %, u testu *helicoCARE direct* 64 %, 100 % a 76 %.

		helicoCARE direct		Součet
		NEG	POZ	
RAPID Hp StAR™	NEG	21	8	29
	POZ	2	19	21
Součet		23	27	50

**Tabulka 4** Kontingenční tabulka rapid testů

		Amplified IDEIA™ Hp StAR™		
		NEG	POZ	Součet
helicoCARE direct	NEG	16	7	23
	POZ	1	26	27
	Součet	17	33	50

**Tabulka 5** Kontingenční tabulka *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* a *helicoCARE direct*

		Amplified IDEIA™ Hp StAR™		
		NEG	POZ	Součet
RAPID Hp StAR™	NEG	17	12	29
	POZ	0	21	21
	Součet	17	33	50

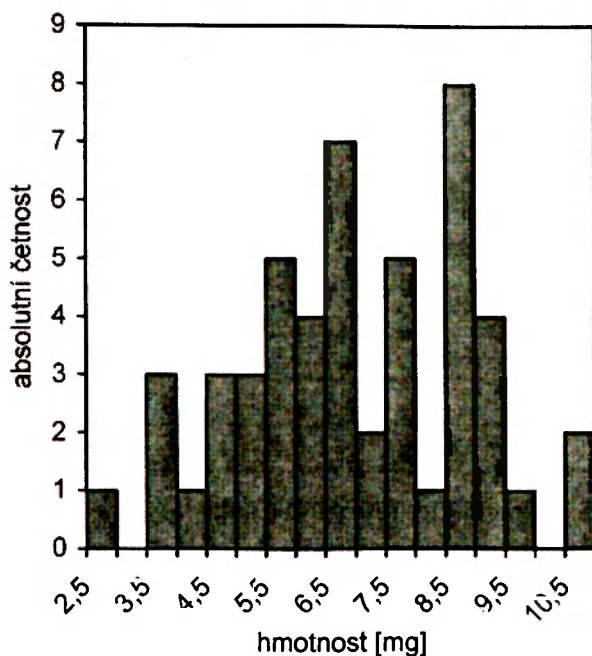
**Tabulka 6** Kontingenční tabulka *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* a *RAPID Hp StAR™*

Statistické parametry hmotností použitých vzorků stolic popisuje Tabulka 7. Přehled o rozložení jejich četností podávají Graf 2 a Graf 3. Průměrná hmotnost vzorku pro test *helicoCARE direct* byla přibližně 14× menší než pro *RAPID Hp StAR™*, směrodatná odchylka byla menší asi 12×. Jelikož pracuje test *helicoCARE direct* s mnohem menšími hmotnostmi, musí být i přesnost odběru vyšší. Nicméně porovnání průměrných hmotností vzorků a směrodatných odchylek u obou testů ukazuje, že variabilita hmotností je proporcionálně u obou testů srovnatelná.

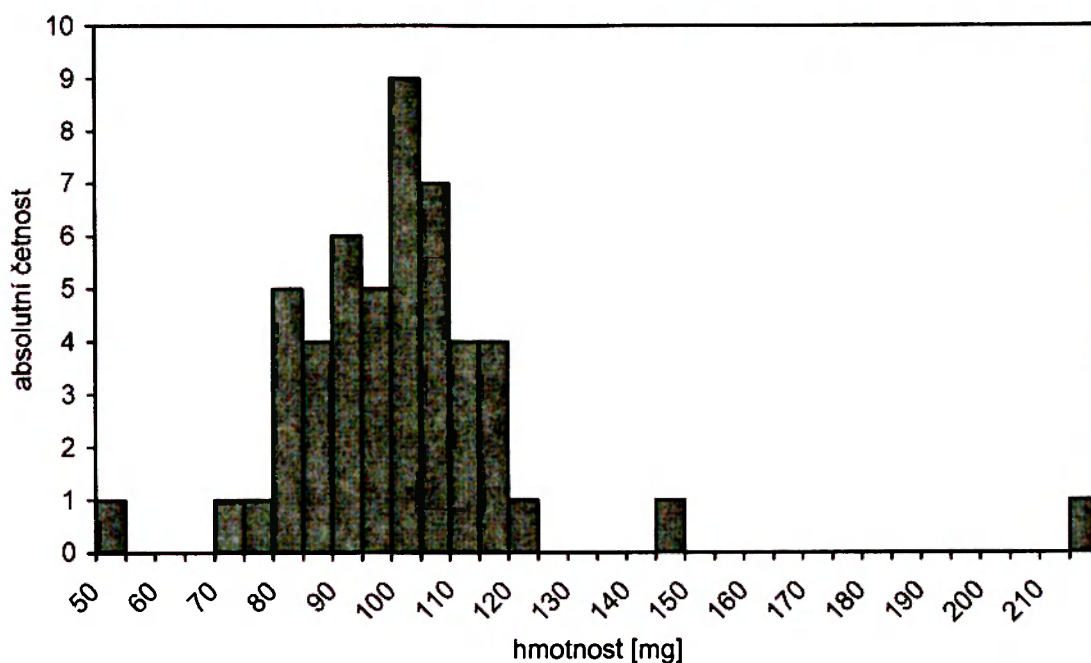
	helicoCARE direct	RAPID Hp StAR™
Aritmetický průměr	7,1	101,9
Směrodatná odchylka	1,9	22,6
Minimální hodnota	2,8	51,0
Maximální hodnota	11,0	218,0

**Tabulka 7** Statistické parametry hmotností použitých vzorků

Všechny hodnoty jsou uvedeny v miligramech.



**Graf 2** Histogram hmotností vzorků testovaných *helicoCARE direct*



**Graf 3** Histogram hmotností vzorků testovaných *RAPID Hp StAR™*

Přehled výsledků jednotlivých testů u extrémních hmotností vzorků vypisuje Tabulka 8, z níž vyplývá, že tyto extrémní hmotnosti neměly záporný vliv na shodu testů v důsledku chybných výsledků, způsobených množstvím vzorků. Jedinou pochybnost by mohl vzbudit vzorek 9, který však vyšel negativní u obou rapid testů.

Navíc se možnost, že by při tomto množství vzorku došlo k falešné negativě testu v důsledku vysycení protilátek, jeví jako nepravděpodobná (viz část 3.2).

Číslo vzorku	Iniciály	ELISA	helicoCARE direct		RAPID Hp StAR™	
			Hmotnost [mg]	Hodnocení	Hmotnost [mg]	Hodnocení
36	MP	NEG	6,0	NEG	51,0	NEG
9	ZS	POZ	5,7	NEG	218,0	NEG
3	SF	POZ	2,8	POZ	115,4	POZ
49	RH	NEG	11,0	NEG	109,0	NEG

**Tabulka 8** Výsledky rapid testů u extrémních hmotností vzorků

U žádného z rapid testů jsem nepozoroval závislost intenzity zbarvení pruhu „T“ na hodnotě absorbance měřené u metody ELISA. V některých případech testy výrazně reagovaly i při hraničních hodnotách ELISA, v jiných vycházely negativně, ačkoli absorbance u ELISA byla vysoká.

### 3.5 Zhodnocení vlastního provádění rapid testů

Při svém výzkumu jsem zjistil, že se stripy *RAPID Hp StAR™* vybarvují déle, často byly velice nevýrazné. Testové pruhy *helicoCARE direct* se barvily jasněji, a proto se mi lépe hodnotily.

Testy *helicoCARE direct* jsou vybaveny odběrovým systémem, což zajišťuje větší pohodlí pro vyšetřujícího, protože odpadá manipulace se stolicí. Vzorek totiž odebírá sám pacient. Zde bych ovšem viděl zdroj potenciálních problémů. Přestože je vyšetřovaný poučen informacemi pro pacienty, není možné zkontrolovat, jaké množství vzorku skutečně nabere. Další riziko by mohlo spočívat v eventualitě, že pacient (ať už náhodně nebo záměrně) vylije ze systému diluent, takže test nelze provést. Proto je tento systém vhodný pouze pro pacienty, kteří jsou vzorek schopni správně odebrat, což se dá předem ne vždy spolehlivě určit. Z 65 odběrových systémů, které jsem měl k dispozici, byly 3 defektní. V jednom diluent úplně chyběl, z jednoho velká část vytekla a v jednom bylo asi dvojnásobné množství. Problematické bylo i odlamování hrotu víčka, protože ho často bylo nutné nejprve naříznout skalpelem. Práce s odběrovým systémem však byla velice čistá a pohodlná.



Přesto ale vidím prostor na jeho vylepšení. Jednak by se do ústí nádoby mohla umístit přepážka s otvorem, která by zachytila přebytečnou stolici. Tímto způsobem jsou konstruované odběrové systémy jiných výrobců. Další možností by bylo zařadit do kapátka filtr, který by zabraňoval zanesení kousků stolice do testu. Otázkou však je, zda by toto opatření zlepšilo spolehlivost testu a neúměrně nezvýšilo náklady na výrobu. Posledním doporučením by pak bylo zajištění patřičného množství diluentu ve všech systémech.

Součástí testu *RAPID Hp STAR™* žádný odběrový systém není, takže je potřeba k nákladům na vyšetření připočítat ještě výdaje za vlastní odběrovou nádobku. Při tomto uspořádání odpadají problémy popsané výše, protože množství stolice určuje až vyšetřující. Ani u jednoho z 60 diluentů jsem se nesetkal s nesprávně nadávkovaným objemem. Práce však nebyla tak čistá a pohodlná jako u druhého rapid testu. Mimo to, že se stolice přenáší špejlí do diluentu, musí se ještě vzniklá suspenze přepipetovat do plastové zkumavky. Během těchto úkonů existuje nebezpečí vylití diluentu či suspenze, což je u *helicoCARE direct* vyloučené.

Pokud jde o testové stripy, vytkl bych, že byly s uzávěrem spojeny příliš volně, takže v několika případech vypadly, což znepráhňuje a zdržuje práci. Strip je třeba zasouvat zpět do zkumavky tak, aby byl natočen testovým polem do místa, které není přešlepeno štítkem, jinak by nešel odečíst.

Z ergonomického hlediska tedy hodnotím lépe test *helicoCARE direct*. Vyhovovala mi čistota a přímot práce i kazetové uspořádání testu.

## 4 Závěry

Během mé práce se mi podařilo splnit vytyčené cíle, jeden z nich však jen částečně.

(1) Stabilita antigenu Hp ve vzorcích stolic uchovávaných při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  zůstala zachována i po 5 letech.

(2) Vliv množství stolice na výsledky rapid testů se mi nepodařilo jednoznačně prokázat z důvodu nízkého počtu provedených testů. Ze získaných podkladů lze usuzovat na to, že dvojnásobné množství nabrané stolice nezpůsobí vysycení protilátek v testu, a tudíž nevede k falešně negativnímu výsledku. Ani falešná pozitivita se u suspenzí s vysokou koncentrací neprojevila. Poloviční množství testovaného vzorku však může, minimálně u testu *helicoCARE direct*, zapříčinit falešně negativní výsledek. Pro validní závěry by bylo nezbytné zopakovat tento experiment s větším počtem vzorků.

(3) Provedení rapid testu je oproti metodě ELISA rychlejší, lze vyšetřit pouze jeden vzorek, a to přímo v ordinaci lékaře a nevyžaduje laboratorní vybavení. Metoda ELISA je naproti tomu přesnější a její vyhodnocení je objektivní. Vyšetření rapid testem je asi o polovinu dražší než vyšetření jednoho vzorku metodou ELISA (pokud je ovšem použita celá deska a analýza se neprovádí v dubletech).

(4) Výsledky obou rapid testů se shodovaly v 80 %, míra shody vyjádřená koeficientem  $\kappa$  byla 0,605 (95% interval spolehlivosti 0,386–0,824).

S rutinní metodou ELISA dosáhl vyšší míry shody test *helicoCARE direct*. Koeficient  $\kappa = 0,672$  (95% interval spolehlivosti 0,465–0,878) se blíží číslu 0,7, které je považováno za hranici dobré shody. Testy se ve výsledcích shodovaly v 84 %. Relativní senzitivita, specifická a přesnost tohoto testu vzhledem k metodě ELISA byly 79 %, 94 % a 84 %.

Imunochromatorgrafický test *RAPID Hp StAR™* měl s metodou ELISA shodných jen 76 % výsledků, míra shody  $\kappa = 0,543$  (95% interval spolehlivosti 0,312 až 0,775). Mé výsledky se tak neshodují s informacemi výrobce, který uvádí shodu s ELISA metodou *Amplified IDEIA™ Hp StAR™* 93 %. Relativní senzitivita, specifická a přesnost tohoto testu vzhledem k metodě ELISA byly 64 %, 100 % a 76 %.

Jelikož se intervaly spolehlivosti koeficientů  $\kappa$  překrývají, nelze hovořit o statisticky významném rozdílu shody jednotlivých rapid testů s testem ELISA.

(5) Souprava testu *RAPID Hp StAR™* byla kompletní a neshledal jsem na ní žádné závady. V případě testu *helicoCARE direct* byla sice souprava také kompletní, ale 3 odběrové systémy byly defektní.

Ačkoli je test *RAPID Hp StAR™* esteticky přívětivější, z hlediska ergonomie hodnotím lépe test *helicoCARE direct*. Práce s ním je čistá a přímá. Připravená suspenze vyšetřované stolice se nakape do testové kazety přímo z odběrového systému na rozdíl od testu *RAPID Hp StAR™*, u něhož se přepipetovává do testové zkumavky. Nesporné výhody odběrového systému *helicoCARE direct* jsou však vykoupeny některými nevýhodami, neboť vzorek připravuje **pouze pacient**. Mezi ně patří nemožnost kontroly odebraného množství stolice pacientem nebo vylití diluentu. Test je proto vhodný pouze pro pacienty, kteří jsou schopni odebrat vzorek správně. Pro použití v českých podmínkách by bylo také nezbytné přiložit informace pro pacienty v českém jazyce. U testu *RAPID Hp StAR™* připravuje vzorek **pouze vyšetřující**, takže nehrozí vznik preanalytických chyb způsobených pacientem. Preanalytická fáze je proto spolehlivější u tohoto testu. Je však potřeba přičíst k nákladům na vyšetření výdaje za odběrovou nádobku.

Náklady na jedno vyšetření jsou u obou rapid testů srovnatelné.

Na základě těchto výše uvedeného jsem došel k závěru, že rapid test *helicoCARE direct* je vhodnější alternativou k rutinně prováděné metodě ELISA.

## 5 Literatura

- [1] *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](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html)>.
- [2] BUREŠ, J., et al. Infekce *Helicobacter pylori* : Doporučený postup České gastroenterologické společnosti ČSL JEP pro dospělé. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*. 2004, roč. 58, č. 4, s. 151–155.
- [3] BUREŠ, J., et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in the Czech Republic. *Helicobacter*. 2006, vol. 11, is. 1, s. 56–65.
- [4] JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha : Karolinum, 2006. s. 268–271.
- [5] RADOSZ-KOMONIEWSKA, H., et al. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology and Infection*. 2005, vol. 11, no. 8, s. 602–610.
- [6] NILSSON, H., et al. *Helicobacter pylori* and Extragastric Diseases – Other Helicobacters. *Helicobacter*. 2005, vol. 10, suppl. I, s. 54–65.
- [7] MARTÍNEK, J., et al. Vliv eradikace *H. pylori* na vznik refluxní choroby jícnu : Randomizovaná dvojitě slepá studie. *Praktický lékař*. 2005, roč. 85, č. 3, s. 133–138.
- [8] DÍTĚ, P. Současnost diagnostiky a léčby infekce *Helicobacter pylori*. *Causa subita*. 2005, roč. 85, č. 2, s. 72–73.
- [9] NAKATA, H., et al. Immunological rapid urease test using monoclonal antibody for *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2004, vol. 19, no. 9, s. 970–974.
- [10] SCHABEREITER-GURTNER, C., et al. Novel Real-Time PCR Assay for Detection of *Helicobacter pylori* Infection and Simultaneous Clarithromycin Susceptibility Testing of Stool and Biopsy Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 42, no. 10, s. 4512–4518.
- [11] WANG, G., et al. Dual Roles of *Helicobacter pylori* NapA in Inducing and Combating Oxidative Stress. *Infection and Immunity*. 2006, vol. 74, no. 12, s. 6839–6846.

- [12] SUN, B., et al. Construction of an oral recombinant DNA vaccine from H pylori neutrophil activating protein and its immunogenicity. *World Journal of Gastroenterology*. 2006, vol. 12, no. 43, s. 7042–7046.
- [13] VOTAVA, M., et al. *Lékařská mikrobiologie II : Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii*. Brno : MU, 2000. s. 142–145.
- [14] POSTERARO, P., et al. Rapid detection of clarithromycin resistance in Helicobacter pylori using a PCR-based denaturing HPLC assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, vol. 57, no. 12, s. 71–78.
- [15] BUREŠ, J., et al. Diagnostika Helicobacter pylori pomocí dechového testu s ureou značenou přirozeným izotopem uhlíku  $^{13}\text{C}$  : metodika vyšetření. *Časopis lékařů českých*. 2000, roč. 139, č. 24, s. 776–778.
- [16] KROPÁČOVÁ, M., VOŘÍŠEK, V., BUREŠ, J. Funkční dechové testy se stabilními izotopy v gastroenterologii. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*. 2003, roč. 48, Supplementum, s. 31–33.
- [17] VAIRA, D., et al. Gastroduodenální vředová choroba a Helicobacter pylori : Uplatnění nových poznatků v diagnostice a terapii. *Medicina po promoci*. 2005, roč. 6, č. 7, s. 8–14.
- [18] LEE, H., et al. Validation of [ $^{13}\text{C}$ ]urea breath test for Helicobacter pylori using a simple gas chromatograph-mass selective detector. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 1998, vol. 10, no. 7, s. 569–572.
- [19] BAZZOLI, F., et al. Validation of the  $^{13}\text{C}$ -Urea Breath Test for the Diagnosis of Helicobacter pylori Infection in Children : A Multicenter Study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000, vol. 95, no. 3, s. 646–650.
- [20] LOCHMAN, I., NOVÁK, V., KLOUDOVÁ, A. Test na stanovení antigenů Helicobacter pylori ve stolici (HpSA) v gastroenterologii – naše zkušenosti. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*. 2004, roč. 58, č. 3, s. 105–109.
- [21] VAIRA, D., et al. Noninvasive Antigen-Based Assay for Assessing Helicobacter pylori Eradication : A European Multicenter Study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2000, vol. 95, no. 2, s. 925–929.

- [22] ODAKA, T., et al. Evaluation of the Helicobacter pylori Stool Antigen Test for Monitoring Eradication Therapy. *The American Journal of Gastroenterology*. 2002, vol. 97, no. 3, s. 594–599.
- [23] LEODOLTER, A., et al. Comparison of Two Enzyme Immunoassays for the Assessment of Helicobacter pylori Status in Stool Specimens After Eradication Therapy. *The American Journal of Gastroenterology*. 2002, vol. 97, no. 7, s. 1682–1686.
- [24] ANDREWS, J., et al. Comparison of three stool antigen tests for Helicobacter pylori detection. *Journal of Clinical Pathology*. 2003, vol. 56, no. 10, s. 769–771.
- [25] DOMÍNIGUEZ, J., et al. Comparison of a monoclonal with a polyclonal antibody-based enzyme immunoassay stool test in diagnosing Helicobacter pylori infection before and after eradication therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006, vol. 23, is. 12, s. 1735–1740.
- [26] KONSTANTOPOULOS, N., et al. Evaluation of the Helicobacter pylori Stool Antigen Test (HpSA) for Detection of Helicobacter pylori Infection in Children. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001, vol. 96, no. 3, s. 677–683.
- [27] ODERDA, G., et al. Usefulness of Helicobacter pylori stool antigen test to monitor response to eradication treatment in children. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2001, vol. 15, is. 2, s. 203–206.
- [28] KATO, S., et al. Accuracy of the Stool Antigen Test for the Diagnosis of Childhood Helicobacter pylori Infection : A Multicenter Japanese Study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2003, vol. 98, no. 2, s. 296–300.
- [29] KOLETZKO, S., et al. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of Helicobacter pylori antigen in stool from children. *Gut*. 2003, vol. 52, no. 6, s. 804–806.
- [30] SÝKORA, J., et al. Diagnostika infekce Helicobacter pylori v dětském věku novou enzymoimunoanalytickou metodou stanovením antigenu ve stolici (HpSTAR) pomocí monoklonálních protilátek. *Časopis lékařů českých*. 2003, roč. 142, č. 11, s. 687–690.

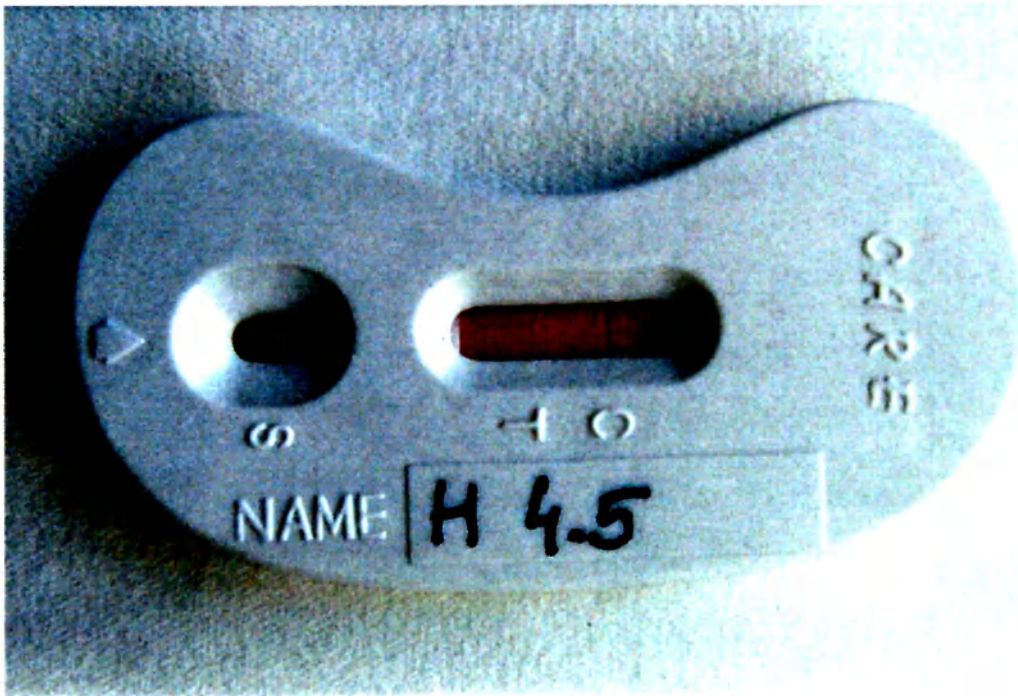
- [31] GATTA, L., et al. A rapid immunochromatographic assay for *Helicobacter pylori* in stool before and after treatment. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2004, vol. 20, is. 4, s. 469–474.
- [32] TREVISANI, L., et al. Evaluation of a new rapid immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in faeces : a prospective pilot study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2005, vol. 12, is. 4, s. 485–489.
- [33] ANTOŠ, D., et al. Evaluation of a Novel Rapid One-Step Immunochromatographic Assay for Detection of Monoclonal *Helicobacter pylori* Antigen in Stool Samples from Children. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, vol. 43, no. 6, s. 2598–2601.
- [34] HAUSER, B., et al. Multiple-step polyclonal versus one-step monoclonal enzyme immunoassay in the detection of *Helicobacter pylori* antigen in the stools of children. *Acta Pædiatrica*. 2006, vol. 95, no. 3, s. 297–301.
- [35] ŞEN, N., et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA by a Simple Stool PCR Method in Adult Dyspeptic Patients. *Helicobacter*. 2005, vol. 10, no. 4, s. 353–359.
- [36] JEŘÁBEK, J., KOCNA, P. Stanovení antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici rapid testem. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2007, suppl. 1 (in press).

## 6 Seznam zkratek

<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, destičková enzymová imunoanalýza
<b>CagA</b>	Cytotoxin-associated antigen A, s cytotoxinem asociovaný antigen A
<b>CLO</b>	Campylobacter-Like Organism, Campylobacteru podobný organismus
<b>ČLS JEP</b>	Česká lékařská společnost J. E. Purkyně
<b>Hp</b>	Helicobacter pylori
<b>HPLC</b>	High-Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>HP-NAP</b>	viz NapA
<b>IRMS</b>	Isotope Ratio Mass Spectrometry
<b>IRUT</b>	Immunologic Rapid Urease Test, imunologický rychlý ureázový test
<b>LARA</b>	Laser Associated Ratio Analysis
<b>MALT</b>	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, s mukózou asociovaná lymfatická tkáň
<b>NapA</b>	Neutrophil activating protein, neutrofilů aktivující protein
<b>NDIRS</b>	NonDispersive Infrared Spectrometry
<b>NEG</b>	negativní
<b>NS</b>	nestanoveno
<b>PAI</b>	Pathogenicity Island, ostrůvek patogenity
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce
<b>POCT</b>	Point-Of-Care Test, vyšetření u lůžka pacienta
<b>POZ</b>	pozitivní
<b>RUT</b>	Rapid Urease Test, rychlý ureázový test
<b>UBT</b>	Urease Breath Test, ureázový dechový test
<b>ÚKBLD</b>	Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky
<b>VacA</b>	Vacuolating cytotoxin, vakuolizační cytotoxin
<b>WHO</b>	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace



## 7 Přílohy



Obrázek 1 Test *helicoCARE direct* – negativní výsledek



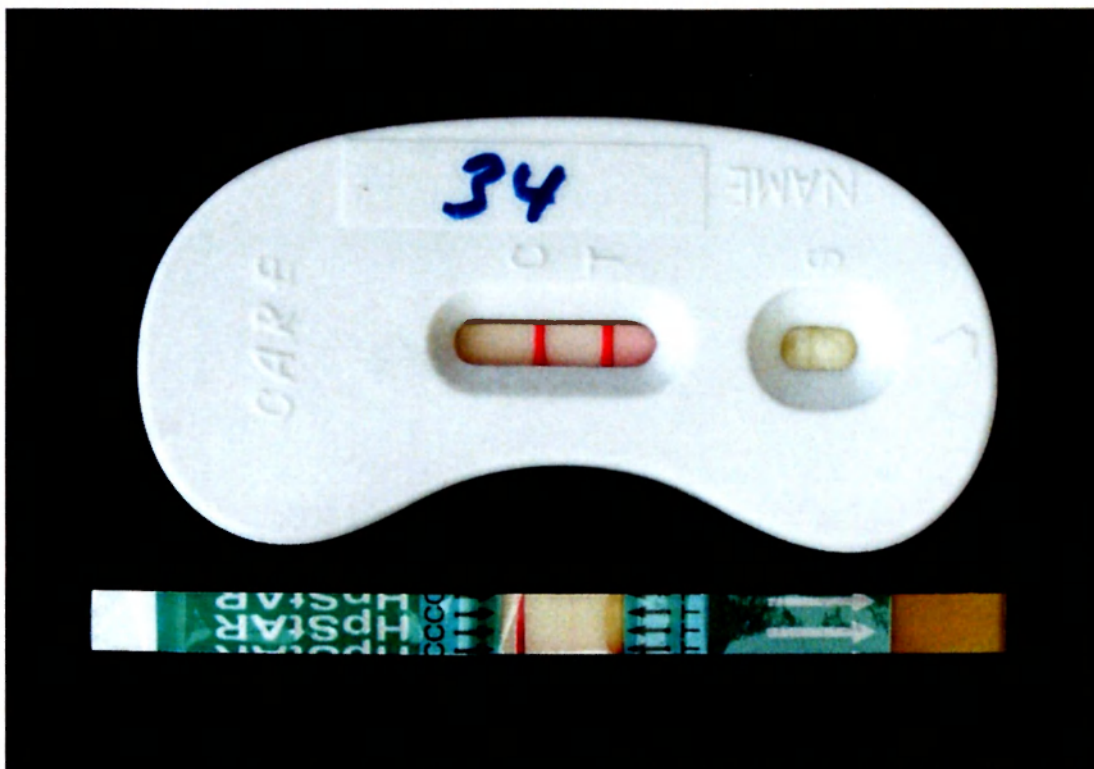
Obrázek 2 Test *helicoCARE direct* – pozitivní výsledek



Obrázek 3 Test *RAPID Hp StAR*<sup>™</sup> – nádoby s rozpuštěnými vzorky a jednorázovými pipetami



Obrázek 4 Test *RAPID Hp StAR*<sup>™</sup> – testové zkumavky



Obrázek 5 Rapid testy u téhož vzorku – *helicoCARE* direct pozitivní, *RAPID Hp StAR™* negativní



Obrázek 6 Rapid testy u téhož vzorku – oba pozitivní