

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV IMUNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Metody diagnostiky *Helicobacter pylori* a jejich
význam pro klinickou praxi**

Vypracoval:

Vedoucí bakalářské práce:

Studijní obor:

Studijní zaměření:

Miroslav Kuchta

MUDr. Emil Pavlík, CSc.

Specializace ve zdravotnictví

Zdravotnická technika

Praha 2006

Poděkování

Nejprve bych chtěl poděkovat vedoucímu práce MUDr. Emilu Pavlíkovi CSc. za cenné připomínky, jež významně přispěly ke kvalitě a odbornosti této práce. Dále chci poděkovat RNDr. Běle Potužníkové za zprostředkování stáží na níže uvedených odborných pracovištích. V neposlední řadě děkuji pracovníkům Ústavu imunologie a mikrobiologie 1. LF UK, Kliniky dětského a dorostového lékařství, VFN Praha, Odd. klinické mikrobiologie FN Na Bulovce a Nemocnice Milosrdných sester sv. Karla Boromejského v Praze, kteří mi vyčerpávajícím způsobem prakticky předvedli uvedené metody. Mé poděkování patří samozřejmě i MUDr. Tomislavu Švestkovi za oponentský posudek. Ještě jednou děkuji všem za vytvoření přátelské atmosféry.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

Souhlasím, aby tato práce byla uložena a zpřístupněna ke studijním účelům v knihovně 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

V Praze dne 20. 6. 2006

Miroslav Kuchta

Souhm

Infekce *H. pylori* postihuje více než polovinu světové populace. Tato bakterie osidluje především žaludek a dvanáctník, kde přežívá díky produkci vysoce aktivní ureázy, která ji chrání před kyselým pH žaludku. Epidemiologické studie naznačují že, cesty přenosu mohou být převážně oro-orální a feko-orální, nicméně otázka přenosu ještě není definitivně zodpovězena.

Diagnostické metody stanovující infekci *H. pylori*, jsou děleny podle toho, zda je k získání potřebného vzorku nutný invazivní zákrok (gastrofibroskopie) nebo nikoliv. Tato práce je zaměřena na metody neinvazivní a to především na metody přímého průkazu antigenu *H. pylori*, neboť nejvýznamnějším cílem medicíny je předcházet infekcím anebo infekci odhalit dříve než způsobí poškození organismu. Stanovení infekce *H. pylori* bez nutnosti laboratorního vybavení a specializovaných pracovníků poskytuje metoda LFIA (lateral flow immuno assay), pomocí níž lze určit antigen *H. pylori* ve stolici během pěti minut. Mezi metodami, které se užívají v běžné praxi je metoda LFIA nejvýhodnějším nástrojem k určení infekce. Do budoucna by se mohl tento jednoduchý test rozšířit o stanovení specifických antigenů jakou jsou například proteiny CagA, VacA, které jsou dnes považovány za významný faktor virulence této bakterie, což by velmi významně urychlilo nejen výzkum, ale i vyhledávání infekce *H. pylori*.

Summary

More than half of total world population has been infected by *Helicobacter pylori*. This bacteria colonizes stomach and duodenum, where survives producing highly active urease, that protects Helicobacter of gastric juice acidity. Although epidemiological studies provide data on oral-oral and feacal-oral transmission, the way and mechanism have not been made definitetely clear yet.

Diagnostic techniques for detection of *H. pylori* infection are invasive (requiring gastrofibroscopy) and non-invasive. This study has been focused on non-invasive techniques for direct detection of *H.pylori* antigen, as most important aim of medicine is prevention of the disease, that could be guarranteed by early diagnostics. Such diagnostics can use - among others - Lateral Flow Immunoassay - a relatively simple technique that does not require special laboratory equipment and staff skills. It enables detection of *H. pylori* antigen in stool specimens within 5 minutes. LFIA seems to be most advantegous technique out of many routine ones used for H. pylori infection diagnostics. In future, detection of some other specific antigens could be added to this test, e.g. proteins CagA and VacA, that are considered to be *H.pylori* virulence markers, which would support screening and research in this field.

Obsah

Obsah	4
1 CÍL PRÁCE	5
2 ÚVOD	6
2.1 Charakteristika druhu <i>Helicobacter pylori</i>	8
2.2 Epidemiologie	9
2.3 Metody diagnostiky <i>H. pylori</i>	10
2.3.1 Invazivní metody	11
2.3.1.1 Mikrobiologická vyšetření	11
2.3.2 Neinvazivní metody	12
2.3.2.1 Metody enzymové imunoanalýzy (EIA)	12
2.3.2.2 Metody elektroforézy a imunoblotu	13
2.3.2.3 Metody chromatografie	15
2.3.2.4 Dechové testy	16
3 METODY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	17
3.1 Metody přímého průkazu	17
3.1.1 Stanovení antigenu ve stolici metodou EIA	17
3.1.2 Stanovení antigenu ve stolici metodou LFIA	19
3.1.3 Dechové testy	20
3.2 Metody nepřímého průkazu	21
3.2.1 Stanovení protilátek IgG metodou EIA	21
3.2.2 Stanovení specifických protilátek IgG metodou westernblot	23
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	25
5 ZÁVĚR	27
6 Seznam použité literatury	28
Použité zkratky	30

1 CÍL PRÁCE

Cílem práce je zhodnotit metody diagnostiky *H. pylori*, jejich návaznost nejen na praxi klinickou, ale i experimentální (především z hlediska hygienicko-epidemiologických studií). Zaměřit se na metody neinvazivní a to především na metody enzymové imunoanalýzy, dechové testy a metody chromatografie. Provézt srovnání metod z hlediska nároků na laboratorní vybavení s tím související možností testování mimo specializované laboratoře, především v ordinacích praktického lékaře, který by se měl aktivně podílet na vyhledávání a eradikaci infekce. Dalším kritériem jsou nároky na specializaci laboratorních pracovníků, techniky a jednotlivé postupy zmiňovaných metod.

2 ÚVOD

Nejstarší známky pozorování bakterií šroubovitého tvaru jsou staré více než 120 let. První pozorování těchto bakterií na zvířatech popsal Rappin už v roce 1881 a následně Bizzozero v roce 1893 [1]. O tři roky později, tedy v roce 1896 Salomon popisuje tyto bakterie v žaludku psů, koček a norských krys [2].

Teprve začátkem osmdesátých letech dvacátého století, patolog Robin Warren a gastroenterolog Barry J. Marshall z Royal Perth Hospital v Austrálii zahájili práci na výzkumném projektu o bakteriální kolonizaci žaludku. V roce 1982, kdy se stále nedařila kultivace bakterií, standardní kultivační procedurou trvající 48 hodin, pomohla k tak významnému objevu náhoda. Díky pětidennímu volna v době velikonočních svátků, byly kultivační plotny odečteny až po pěti dnech, a k velkému překvapení se konečně objevily kolonie bakterií podobajících se *Campylobacter*ům, proto byly zpočátku pojmenovány **CLO** (campylobacter-like organisms), později *campylobacter pyloridis*. Warren a Marshall prokázali tyto bakterie u všech svých pacientů s duodenálním vředem a u 77 % pacientů s žaludečním vředem a poprvé tak popsali souvislost mezi těmito campylobactery a vředovou chorobou [3].

Postupem času se na základě molekulárně genetické analýzy (srovnání sekvencí bází 16S rRNA a zejména podle poměru cytosinu a guaninu v DNA) zjistili odlišnosti od rodu *campylobacter*, proto byla tato bakterie zařazena do nového druhu a v roce 1989 dostala již definitivní název *Helicobacter pylori*.

V roce 1994 WHO (Světová Zdravotnická Organizace) přidala tuto bakterii na seznam karcinogenů. Dalším alarmujícím faktorem je, že přibližně polovina světové populace je infikována *Helicobacterem pylori*.

Za dvacet let intenzivního studia vlastností bakterie a její interakce s hostitelským organismem bylo nashromážděno velké množství informací. Epidemiologická šetření ukázala, že *Helicobacter pylori* v celosvětovém měřítku patří mezi nejčastější původce onemocnění, a to především chronické gastritidy typu B, která může vyústit ve vředovou chorobu, proto řešení problémů diagnostiky onemocnění, cesty přenosu infekčního agens a prognóza průběhu infekce mají zásadní význam.

Velmi důležité je zdůraznit, že morfologické změny způsobené infekcí nemají pevnou vazbu na klinické projevy. Zatímco si někteří nemocní stěžují na dyspeptické potíže různého stupně, někteří nemocní si infekce nejsou vědomi a na žádné obtíže si nestěžují. Naopak gastroenterologové znají nemocné, kteří trpí dyspeptickými obtížemi

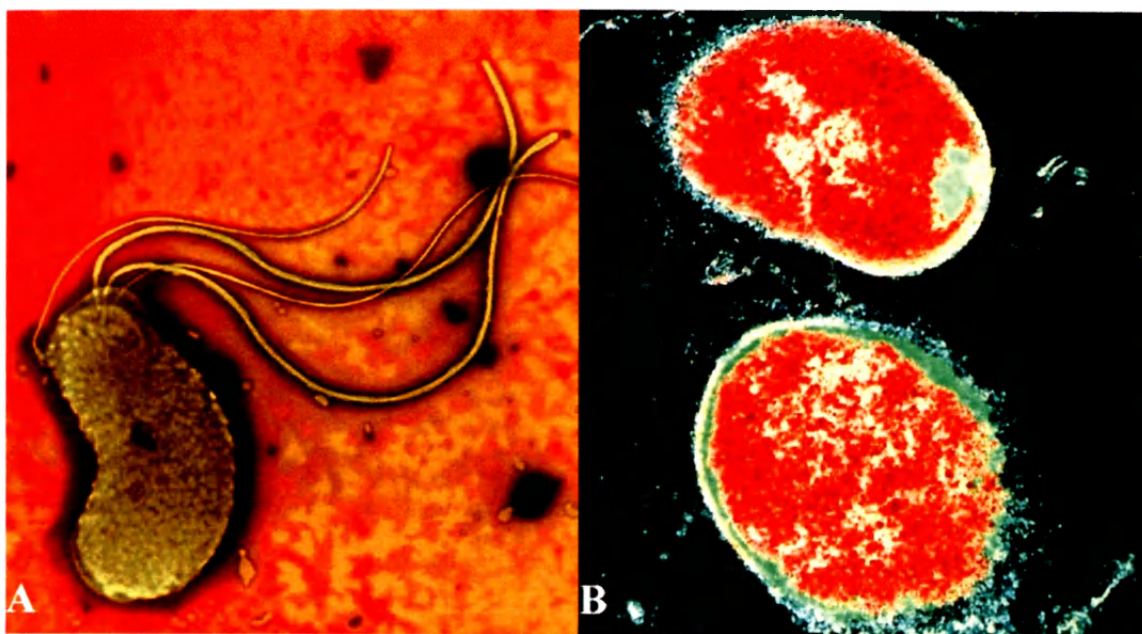
a infekci *Helicobacter pylori* nemají. Další průběh infekce může zůstat nadále bezpříznakový, může být provázen dyspeptickými obtížemi anebo se na podkladě chronické gastritidy vyvine vředová choroba.

V současnosti se hledají markery na straně infikujícího kmene, které by určovaly další průběh infekčního procesu, pozornost se zaměřuje jak na genotyp infikujícího kmene, tak na průkaz některých důležitých genů, které kódují proteiny, jejichž význam v patogenezi je nepochybný. Paralelně se shromažďují údaje o nemocných s různým průběhem jako je např. asymptomatická dyspepsie, vředová choroba. Nemocní jsou sledováni dlouhodobě a hledají se nálezy, které by přispěly k možnosti stanovit pravděpodobný další vývoj infekce. Eradikační terapeutické postupy se průběžně korigují tak, aby bylo dosaženo skutečné likvidace etiologického agens. Pokud se eradikace zdaří, zabrání se nejen vzniku eventuálních recidiv vředové choroby, ale i vzniku karcinomu v oblasti pyloru a duodena. Tato optimistická zjištění však byla poněkud zpochybněna tím, že se u nemocných po eradikaci infekce *Helicobacter pylori* významně zvyšuje výskyt gastroesofageálního refluxu a vzniku karcinomu jícnu. Tato pozorování inspirovala některé badatele k myšlence, že dlouhá kolonizace žaludku (zejména v korpusu) může ovlivňovat fyziologické pochody v horní části zažívacího traktu. Snižuje tak nebezpečí gastroesofageálního refluxu s následným vznikem karcinomu jícnu, tzn., že se *Helicobacter pylori* chová způsobem charakteristickým pro normální floru jako faktor chránící hostitele. Důležité je v této souvislosti zjištění, že klony které v žaludku zůstávají po eradikační terapii patří podle současných představ ke klonům s nízkou až nulovou virulencí. Je možno uvažovat o tom, že terapie snáze likviduje klony s vyšší virulencí a vyšší růstovou rychlostí, zatímco málo virulentní klony se jeví jako více rezistentní k terapii pro svou nižší růstovou rychlost [7].

Znalost mechanismů patogenity detekce jejích faktorů a příslušných genů mohou posloužit jako podklad pro stanovení prognosy infekce, ale zejména pro rozhodování o racionálním postupu eradikace infekce eventuálně i konstrukce očkovací látky.

2.1 Charakteristika druhu *Helicobacter pylori*

H. pylori (obr. 1) je gramnegativní zahnutá nebo spirální tyčka, 0,5-1,0 μm široká a až 5 μm dlouhá. Podobně jako campylobactery je přísně mikroaerofilní a pro svůj růst potřebuje oxid uhličitý. Rozdíl od campylobacterů tvoří trs (3-6) bičků, které jsou umístěny unipolárně. *H. pylori* kolonizuje kardii, korpus a antrum lidského žaludku. Přechodně se může vyskytnout v oblasti žaludeční metaplázie duodena, ve slinách, žaludeční šťávě a stolici. Tato bakterie žije primárně uvnitř žaludečního hlenu, ke kterému je přichycena pomocí malých adherentních ploch buněčného těla, nebo pod spodní vrstvou hlenu, která přímo sousedí s žaludečním epitelem. Ojediněle může pronikat až do krevního oběhu [10]. Šroubovitý tvar a bičíky umožňují bakterii snadnější pohyb v žaludečním hlenu. *H. pylori* je velmi dobře vybaven několika acidorezistentními mechanismy, z nichž nejvýraznější je produkce vysoce aktivní ureázy, která hydrolyzuje ureu na amoniak a CO_2 a vytváří tak kolem sebe zásaditý "mrak", který bakterii chrání před kyselým pH žaludku.



Obr. 1 [11] *H. pylori*, barevná TEM-transmisní elektronová mikrofie, zvětšení 11000x (A)
H. pylori v žaludečním hlenu, barevná TEM, zvětšení 58600x (B)

2.2 Epidemiologie

Současné poznatky naznačují, že získání infekce *H. pylori* se odehrává převážně v dětství a infekce přetrvává celoživotně. Spontánní vymizení infekce v dospělosti je velmi vzácné. Jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů infekce *H. pylori* je nízký socioekonomický status, což jsou především stísněné životní podmínky, nedostatek tekoucí teplé vody a špatná hygiena v dětství [14,15]. Proto epidemiologické studie ukazují velké rozdíly v prevalenci infekce *H. pylori* mezi vyspělými zeměmi, kde se typicky pohybuje kolem 30% a rozvojovými zeměmi, která činí více než 80% [4,12]. Názorným příkladem může být studie zaměřená na socioekonomické faktory, která odhaluje velké rozdíly v prevalenci mezi americkými a mexickými dětmi žijícími na protilehlých březích řeky Rio Grande, která odděluje Spojené Státy a Mexiko [13]. Prevalence je také závislá na věku a například ve Spojených Státech je infikováno přes 50 % šedesátiletých osob a asi 20 % třicetiletých. Spojitost s věkem je, ale následkem tzv. "birth-cohort" efektu, kdy současní šedesátiletí byli více osidlováni *H. pylori* v dětství než současní třicetiletí. Pokles prevalence a incidence v dnešní době je částečně způsoben zvyšováním životní úrovně a zvýšeným užíváním antibiotik.

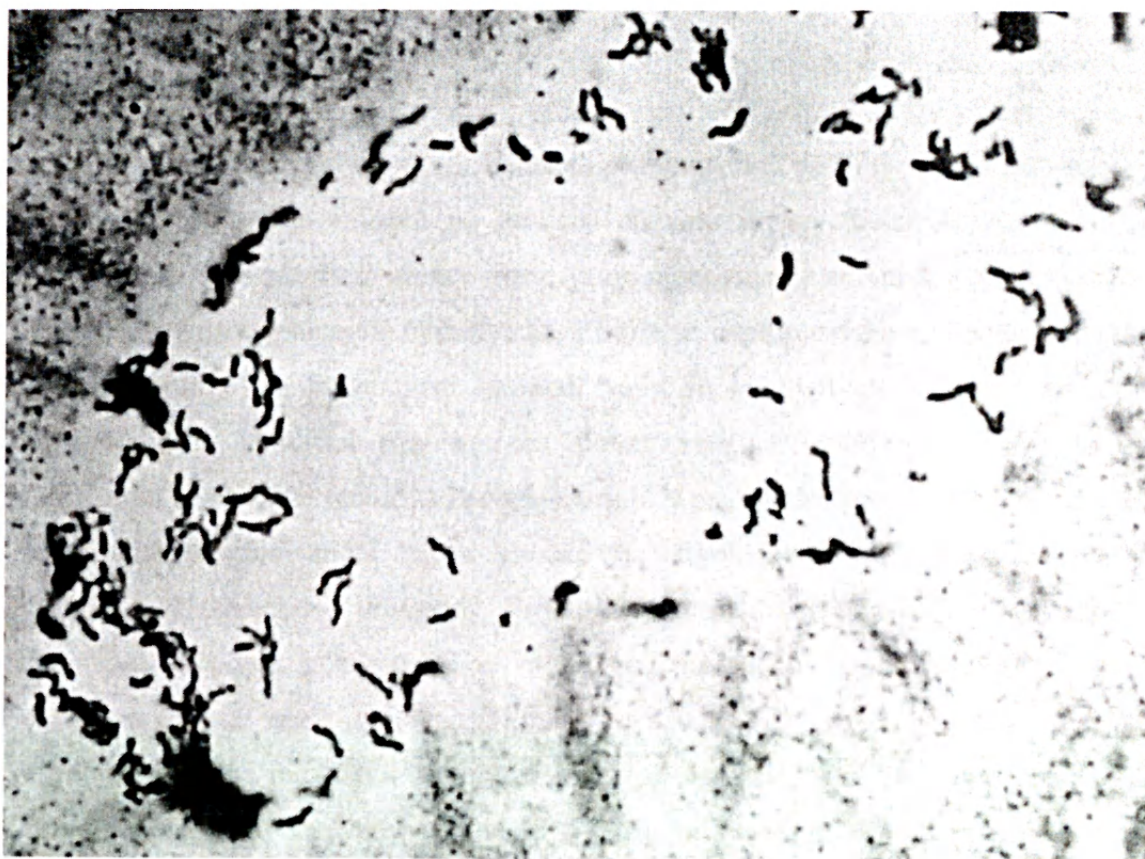
Na základě současných epidemiologických poznatků můžeme konstatovat, že člověk je jediným důležitým zdrojem šíření infekce *H. pylori* a proto mezilidský přenos hraje klíčovou roli. Existují samozřejmě i jiné přírodní zdroje infekce, ačkoli z nich nebyl *H. pylori* nikdy kultivován, molekulárně genetickými a imunologickými metodami byla prokázána jeho DNA ve vzorcích podzemní a komunální vody [17,18]. Dalším příkladem může být japonská studie sledující rodiny, kteří využívají pitnou vodu ze studny [16], přesto zatím nelze jednoznačně říci, že se jedná o hlavní zdroj infekce. Nicméně tyto i jiné studie naznačují, že se jedná pravděpodobně o přenos feko-orální. Časté nálezy *H. pylori* v dutině ústní a to především v zubním plaku [21], ukazují na možnou oro-orální cestu přenosu a dále mohou pomoci v otázkách časté reinfekce po úspěšné eradikaci infekce v oblasti žaludku či duodena. Nálezy *H. pylori* v sekretech a exkretech přirozeně infikovaných koček [19] a ovcí [20] ukazují, že částečný podíl na šíření infekce může mít i přenos zoonotický.

Jedním z nejdůležitějších kroků současného studia této bakterie zůstává sledování faktorů virulence a to především genů *cagA*, *vacA* a enzymu ureázy, jejichž rekombinací lze získat látku, která bude stimulovat imunitní odpověď, jak již bylo ukázáno na zvířecích modelech [7], a vyvinout tak očkovací látku, která by zásadně

ovlivnila dosavadní postupy a proto bych se rád v této práci zaměřil především na diagnostické metody, určující tyto markery virulence.

2.3 Metody diagnostiky *H. pylori*

Diagnostiku *H. pylori* rozdělujeme na **invazivní**, která zahrnuje především gastrofibroskopii a následnou analýzu bioptických vzorků ureázovým testem a mikrobiologickým vyšetřením. Využívá se především tam kde je podezření na gastritidu, žaludeční nebo duodenální vředy, a u starších lidí k vyloučení maligních procesů. Také **histologické vyšetření** podává poměrně přesný obraz infekce tímto mikroblem. Osvědčila se metoda stříbření *Warthin – Starry* (Obr. 2), kde jsou patrné typické tvary helikobakterů.



Obr. 2 Řez žaludeční sliznicí, metoda stříbření Warthin-Starry (foto G. H. Green, Worcester Royal Infirmary)

Dále se používají **neinvazivní** metody, které nevyžadují invazivní zákrok. Jsou to především sérologické metody, dechový test a nově test antigenu ve stolici. Používají se hlavně u dětí, u nejasných dyspeptických obtíží a tam kde není indikace k endoskopickému vyšetření.

2.3.1 Invazivní metody

Při endoskopickém vyšetření se obvykle odebírají vzorky žaludeční nebo duodenální sliznice. Vzhledem k nerovnoměrné distribuci agens na sliznici žaludku, je výhodnější pokud je k vyšetření zaslán větší počet menších kousků než jeden velký. Kultivace vzorků bývá obvykle úspěšná pokud jsou vzorky dopraveny do laboratoře do dvou hodin po odběru. Transport vzorků probíhá při pokojové teplotě a vzorky jsou uloženy v transportním mediu (např. thioglykolátová půda).

2.3.1.1 Mikrobiologická vyšetření

Ureázový test bývá první ukazatelem přítomnosti *H. pylori* v odebraném vzorku sliznice. Tento test je založen na průkazu enzymu ureázy, který *H. pylori* hojně produkuje. Vlivem působení ureázy hydrolyzuje močovina na amoniak a amid kyseliny uhličitě, který dále spontánně hydrolyzuje. Přitom se uvolňuje další molekula čpavku a uhličitě kyseliny. Za přítomnosti molekul vody se pak vytváří hydroxid amonný, zodpovědný za alkalické pH, na něž potom reaguje indikátor změnou barvy. Indikátorem je obvykle fenolová červeň, která je v neutrálním prostředí žlutá, zatímco v zásaditém prostředí mění barvu do červena. Rychlost změny barvy je úměrná množství vyprodukované ureázy[5]. Pro **mikroskopické vyšetření** je nejvýhodnější barvení dle *Grama* nebo *Giemsy*. V rukou zkušeného odborníka se vyšetření mikroskopem řadí mezi nejpřesnější metody detekce *H. pylori*. Problém detekce mikrobiologickými metodami spočívá v tom, že bakterie bývá distribuována velmi nerovnoměrně, proto ne vždy se podaří vyšetřit infikovanou tkáň. Další metodou je **kultivační vyšetření**, které se provádí v mikroaerofilním prostředí při teplotě 37 °C po dobu 4-7 dní. Kultivační medium se obvykle skládá z *Columbia* agarů obohaceného beraním nebo koňskými erytrocyty, séra a dalšími obohacovadly.

Ke kultivačnímu vyšetření patří i stanovení citlivosti na antibiotika avšak zatím je velmi obtížné izolované kmeny přeočkovat. Nejčastěji se testuje citlivost na *klaritromycin, tetracyklin nebo amoxicilin*.

V neposlední řadě jsou to molekulárněgenetické metody, jejíž hlavním představitelem je metoda **PCR**. V rutinní praxi se neprovádí, jsou však vysoce specifické a v experimentální mikrobiologii mají zásadní význam.

2.3.2 Neinvazivní metody

Mezi neinvazivní metody patří především celá řada serologických metod, založených na stanovení protilátek IgA, IgG, IgM metodou enzymové imunoanalýzy (**EIA**). Těchto metod se využívá v rutinní klinické praxi. Zatím nejpřesnější metodou (z dosud komerčně vyráběných) je imunoblot, které dosahují nejen velké specifity a senzitivity, ale dokážou určit zda se v antigenní struktuře této bakterie vyskytuje CagA protein, jež je významným faktorem virulence. Zcela jinou metodou jsou dechové testy a poměrně nová metoda přímého průkazu antigenu ve stolici založená na principu chromatografie.

2.3.2.1 Metody enzymové imunoanalýzy (EIA)

Stanovení protilátek třídy IgG, IgA a IgM proti *H. pylori* v lidském séru nebo plazmě se provádí převážně metodou EIA typu *sandwich*, kde na polystyrénovou mikrotitrační destičku je vázán antigen *H. pylori* (pevná fáze) proti vyšetřované protilátce. Místa na destičce, která nejsou obsazena antigenem se blokují inertní bílkovinou. Po přidání vzorku do jamky a inkubaci jsou destičky promývány a následně se přidá protilátka s navázaným enzymem (konjugát), většinou se jedná o kozí nebo králičí imunoglobulinové frakce. Poté se opět provede promytí a přidá substrát pro daný enzym, společně se substrátem je naředěn i chromogen, který celou reakci vizualizuje. Nakonec se ještě přidá zastavovací roztok, který může obsahovat kyselinu sírovou, fosforečnou apod.

Obdobně je tomu i u vyšetření antigenu ve stolici, s tím rozdílem, že pevnou fází tvoří protilátka proti vyšetřovanému antigenu. Reagencie a postup je obdobný jako u

serologického vyšetření protilátek. Komerčně vyráběné sety zpravidla obsahují mikrotitrační destičky a veškeré reagentie potřebné k provedení testu (Obr. 3).



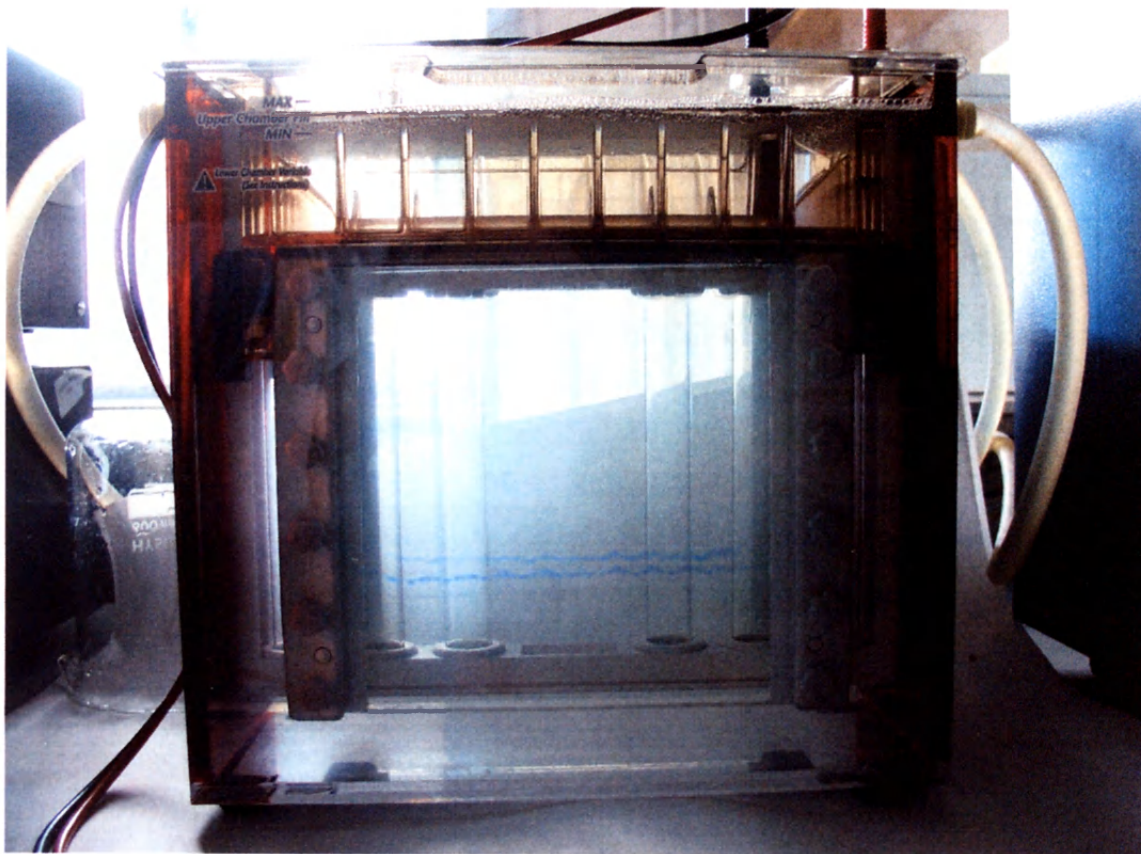
Obr. 3 Diagnostický test ke stanovení antigenu ve stolici (Premier Platinum HpSA, Meridian Bioscience), foto autor

2.3.2.2 Metody elektroforézy a imunoblotu

Stanovení specifických protilátek proti *H. pylori* se provádí gelovou elektroforézou **SDS – PAGE** (sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electroforesis) (Obr. 4). Velikost pórů gelu je volena tak, aby byla omezena pohyblivost sledovaných proteinů. Před nanesením gelu jsou vzorky povařeny v přítomnosti SDS a merkaptoethanolu. SDS svou vazbou na hydrofobní oblasti proteinové molekuly uvolňuje jednotlivé proteiny z jejich asociace s jinými molekulami proteinů nebo lipidů. Činí tak jednotlivé molekuly v detergentu volně rozpustné. Merkaptoethanol je redukční agens, které ruší disulfidické vazby proteinů, takže všechny polypeptidické řetězce molekul složených z několika podjednotek jsou oddělené. Všechny proteiny ve směsi mají díky navázanému SDS záporný náboj a po nanesení na gel putují v elektrickém poli ke kladné elektrodě. Velké proteiny se v sítu vytvořeném polyakrylamidovém gelu

pohybují mnohem pomaleji, než proteiny malé. Výsledkem je rozdělení komplexní směsi do série oddělených pásů, řazených podle molekulové hmotnosti. Poté jsou proteiny přeneseny na pevný nosič (nitrocelulózová membrána).

Účinnost přenosu lze ověřit obarvením přenesených proteinů. Před aplikací protilátek je nutné místa na nitrocelulóze, která nejsou obsazena přenesenými proteiny zablokovat, aby nedocházelo k nespecifické interakci protilátky s nosičem. K blokaci se používá celá řada činidel (např. neimunní séra, neiontové detergenty). Takto připravená nitrocelulóza je pak inkubována s protilátkou, která se naváže na odpovídající antigen. Po důkladném promytí je nitrocelulóza inkubována se sekundární protilátkou, která je druhově specifická a je konjugovaná s enzymem. Nejčastěji se používají protilátky značené křenovou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou. Po dalším promytí jsou sekundární protilátky konjugované s enzymy detekovány tak, že je nitrocelulóza inkubována se substrátem pro daný enzym a s chromogenem. Výsledkem chemické reakce je pak nerozpustný barevný produkt, který je lokalizován v místě antigenu [6].



Obr. 4 Elektroforéza SDS – PAGE ve vertikálním uspořádání v gradientovém gelu (150x150x1 mm), foto autor

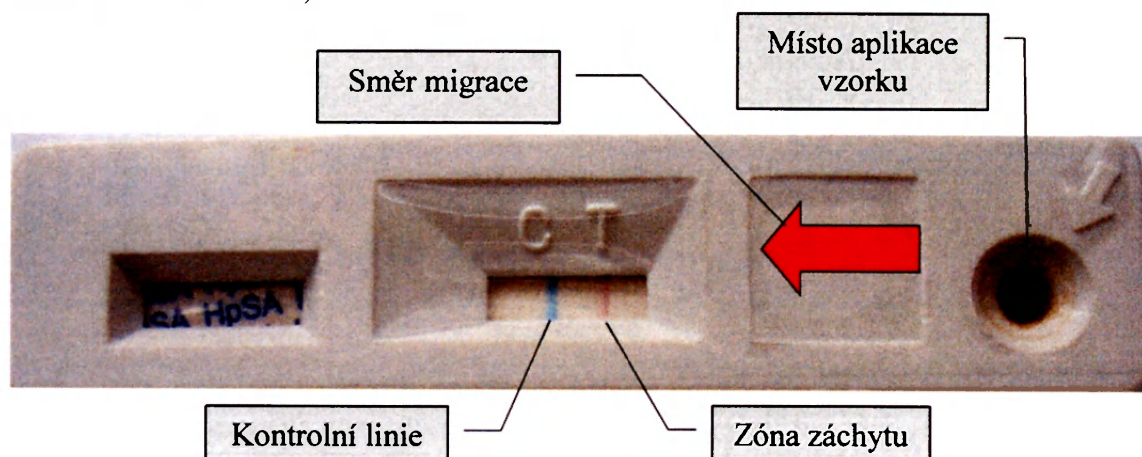
V současné době jsou na trhu dostupné komerční sety k detekci specifických protilátek třídy IgG, IgM a IgA proti separovaným antigenům *H. pylori*. Tyto **BLOTY**

obsahují testovací proužky s již přeneseným, elektroforeticky rozděleným antigenem. Při použití soupravy jsou jednotlivé stripy inkubovány s vyšetřovaným vzorkem séra, přičemž dochází k vazbě specifických protilátek přítomných ve vzorku na příslušné antigenní linie. Po promytí jsou stripy dále inkubovány s konjugátem. Vizualizace je provedena inkubací se substrátovým roztokem obsahující chromogen. Po vybarvení jsou jednotlivé stripy vysušeny a vyhodnoceny pomocí přiložené šablony. Pro stanovení validity testu obsahuje souprava vzorový strip detekovaný pomocí pozitivní kontroly obsažené v soupravě.

2.3.2.3 Metody chromatografie

Tato metoda přímého stanovení antigenu *H. pylori* ve stolici je založená na principu imunoafinitní chromatografie, typ LFIA (lateral flow immunoassay). Vzorek stolice se naředí v předem připraveném roztoku a nakape se do kulatého okénka na spodním okraji testovacího zařízení. Roztok s obsaženým antigenem dále migruje na základě kapilárních sil porézní vrstvou membrány až k zóně záchytu, kde je pevně navázán konjugát (monoklonální protilátka, latex) a pokud vyšetřovaný vzorek obsahuje antigen *H. pylori* potom dojde k vytvoření komplexu, který vybarví tuto zónu červeno-růžově. Migrace pokračuje dále až ke kontrolní linii, kde se objeví modrý proužek, jež ověří adekvátní průtok vzorku skrze testovací okno (Obr. 5).

Metoda LFIA je snadno dostupná pro ambulantní použití (neklade žádné nároky na laboratorní vybavení), a její největší výhodou je podstatné snížení doby analýzy (celý test trvá okolo 5 minut).



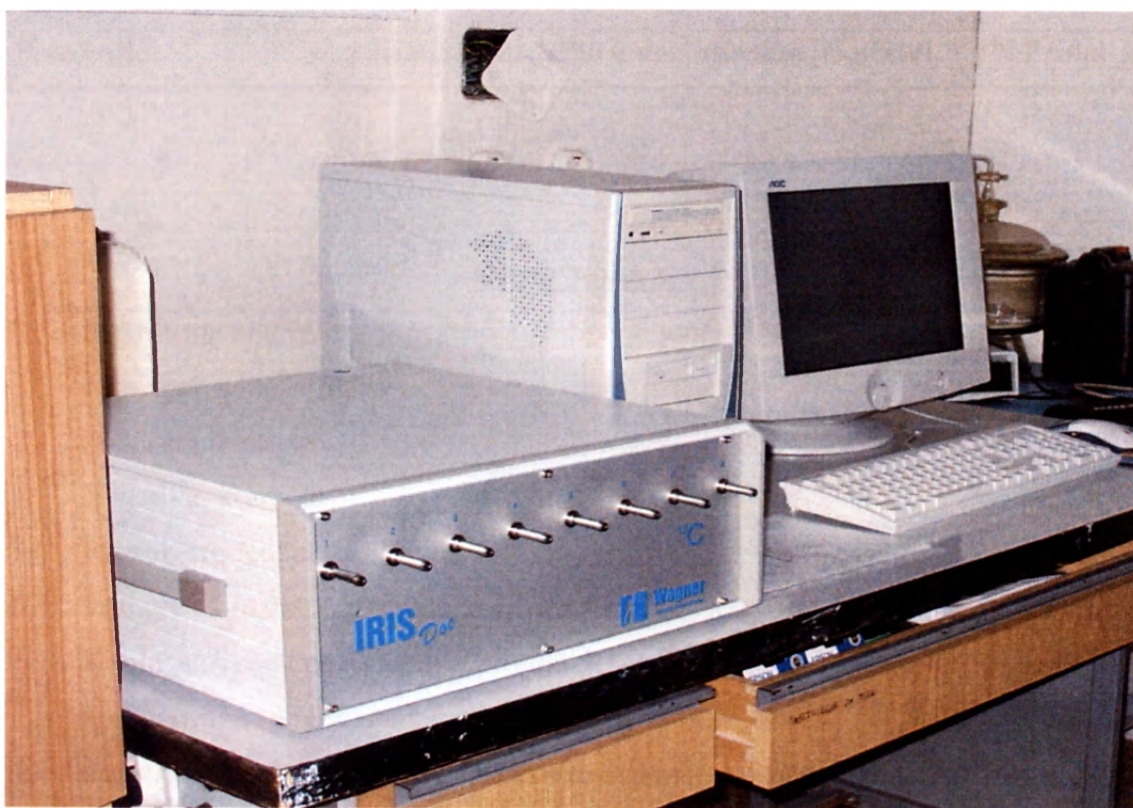
Obr. 5 Komerčně dostupný set ImmunoCard STAT! HpSA (Meridian Bioscience), foto a úpravy autor

2.3.2.4 Dechové testy

Metoda je založena na ústním podání substrátu v tomto případě močoviny značené izotopem uhlíku (^{13}C), kterou *H. pylori* štěpí na amoniak a oxid uhličitý (viz schéma 1), který se následně resorbuje do krevního oběhu a přes plíce je vydechován a detekován analyzátozem (Obr. 6) IRIS (Infra Red Isotope Analyser). Přístroj měří vydechnutý vzduch před podáním urey a 30 minut po podání. Z dynamiky změn poměrů $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ve vydechovaném vzduchu před a po podání značené urey lze prokázat infekci *H. pylori*.



Schéma 1 Štěpení močoviny na amoniak a oxid uhličitý, reakci katalyzuje enzym ureáza, produkovaná *H. pylori*



Obr. 6 Sestava - analyzátor IRIS + počítač s vyhodnocovacím software, Nem. Milosrdných sester sv. Karla Boromejského v Praze. foto a úprava autor

3 METODY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Diagnostika *H. pylori* se provádí buď metodami přímého průkazu což jsou především dechové testy, průkaz antigenu ve stolici anebo metodami nepřímého průkazu, kde největší skupinu tvoří serologické vyšetření protilátek třídy IgG, IgM, IgA (volba vyšetřované protilátky dle lékaře) metodou EIA a techniky imunoblotu .

3.1 Metody přímého průkazu

3.1.1 Stanovení antigenu ve stolici metodou EIA

Název testu:	Premier Platinum HpSA
Výrobce:	Meridian Bioscience, USA
Počet testů v soupravě:	48
Senzitivita:	96%
Specifita:	96%
Pracoviště:	Klinika dětského a dorostového lékařství, VFN Praha

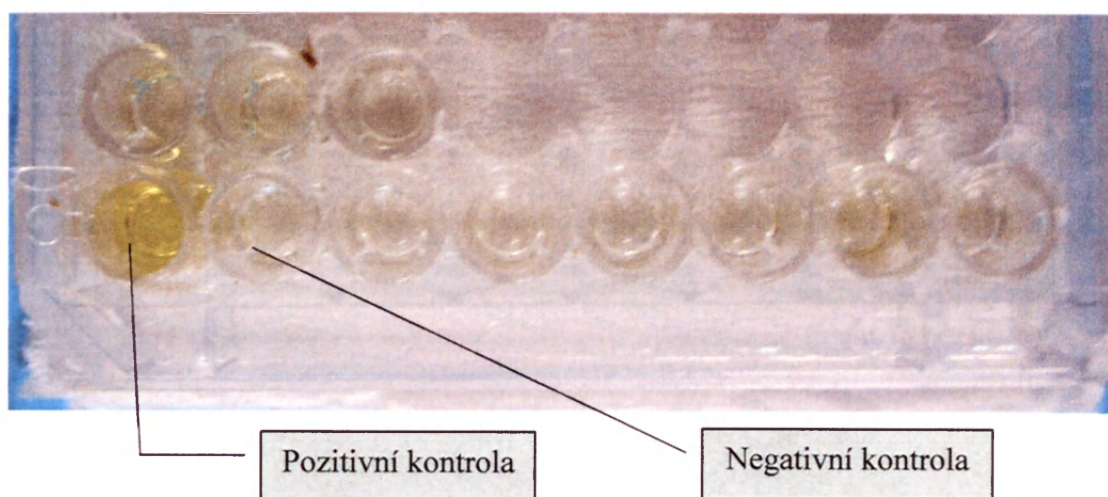
Obsah soupravy

1.	Mikrotitrační destičky potažené zaječí polyklonální protilátkou proti <i>H. pylori</i>	48 jamek
2.	Pozitivní kontrola	1,4 ml
3.	Negativní kontrola	1,4 ml
4.	Roztok pro ředění vzorků	18,8 ml
5.	Promývací roztok - 20x, koncentrovaný pufr	50 ml
6.	Konjugát (zaječí polyklonální protilátka specifická pro <i>H. pylori</i> konjugovaná s křenovou peroxidázou)	3,5 ml
7.	Substrát (roztok obsahující peroxid s navázaným chromogenem TMB - tetramethylbenzidin)	12,5 ml
8.	Zastavovací roztok (kyselina sírová, pH 1)	7 ml
9.	Pipety jednorázové	48 ks



Pracovní postup

1.	stolice o velikosti 5-10 mm se protřepe v 200 μ l ředícího pufru
2.	na příslušné pozice mikrotitrační destičky se nakape 1 pozitivní a 1 negativní kontrola
3.	50 μ l předředěného vzorku se nakape přiloženou pipetou do jamek mikrotitrační destičky
4.	do všech obsazených jamek se přidá konjugát
5.	destička se krátce protřepe a inkubuje se při laboratorní teplotě 1 hodinu
6.	všechny jamky se propláchnou 5x promývacím pufrem
7.	do promytých jamek se nakape substrát
8.	destička se opět protřepe a nechá se inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut
9.	barevná reakce v jamkách se zastaví přidáním jedné kapky zastavovacího roztoku
10.	výsledky se odečítají pomocí spektrofotometru při 450/630 nm



Obr. 7 Výsledek testu EIA, stanovení antigenu ve stolici, počet vyšetřovaných vzorků 9

3.1.2 Stanovení antigenu ve stolici metodou LFIA

Název testu:	ImunnoCard STAT! HpSA
Výrobce:	Meridian Bioscience, USA
Počet testů v soupravě:	20
Senzitivita:	96%
Specifita:	91%
Pracoviště:	Odd. klinické mikrobiologie FN Na Bulovce

Obsah soupravy

1.	Zkumavky pro ředění vzorků	20 ks
2.	Testovací karty	20 ks

Pracovní postup

1.	za použití aplikační tyčinky ředící zkumavky se přenese 5-6 mm stolice do roztoku ředícího vzorku
2.	zkumavka se uzavře protřepe po dobu 15 ti sekund
3.	špička uzávěru zkumavky se odlomí a nakapou se cca 4 kapky do kulatého okénka na okraji testovacího zařízení
4.	po pěti minutách odečteme výsledek

3.1.3 Dechové testy

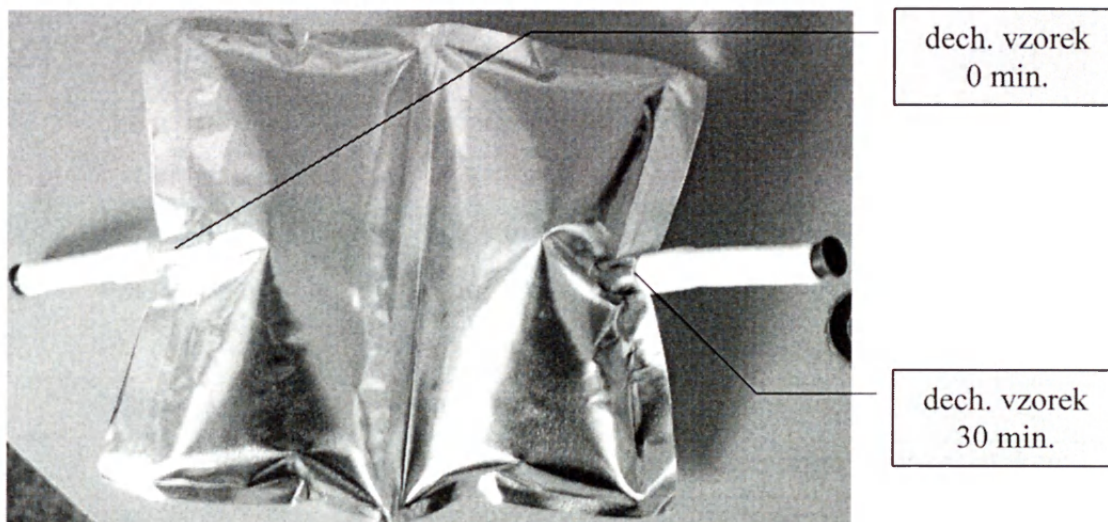
Název testu:	Dechový test vyhodnocený na principu infračervené spektroskopie
Výrobce:	Wagner Analysen Technik Vertriebs Gmbl
Počet testů v soupravě:	
Senzitivita:	98,3%
Specifita:	98,6%
Pracoviště:	Nemocnice Milosrdných sester sv. Karla Boromejského v Praze

Potřebné vybavení

1.	Analyzátor IRIS (současně vyšetřovaných vzorků)	8
2.	Aluminiový sáček pro dva jednotlivé dech. vzorky	1

Postup vyšetření

1.	odběr prvního dechového vzorku (pacient musí být nalačno)
2.	následně pacient vypije 200 ml pomerančové šťávy, ve kterém je rozpuštěno 75 mg ^{13}C značené urey
3.	po 30 minutách se provede druhý odběr
4.	vyhodnocení analyzátozem IRIS, rozdíl poměrů $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$



Obr. 8 Aluminiový sáček pro vyšetření dech. testem

3.2 Metody nepřímého průkazu

3.2.1 Stanovení protilátek IgG metodou EIA

Název testu:	EIA <i>H.pylori</i> IgG
Výrobce:	TEST - LINE, Clinical Diagnostics, ČR
Počet testů v soupravě:	96
Senzitivita:	91%
Specifita:	96%
Pracoviště:	Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK

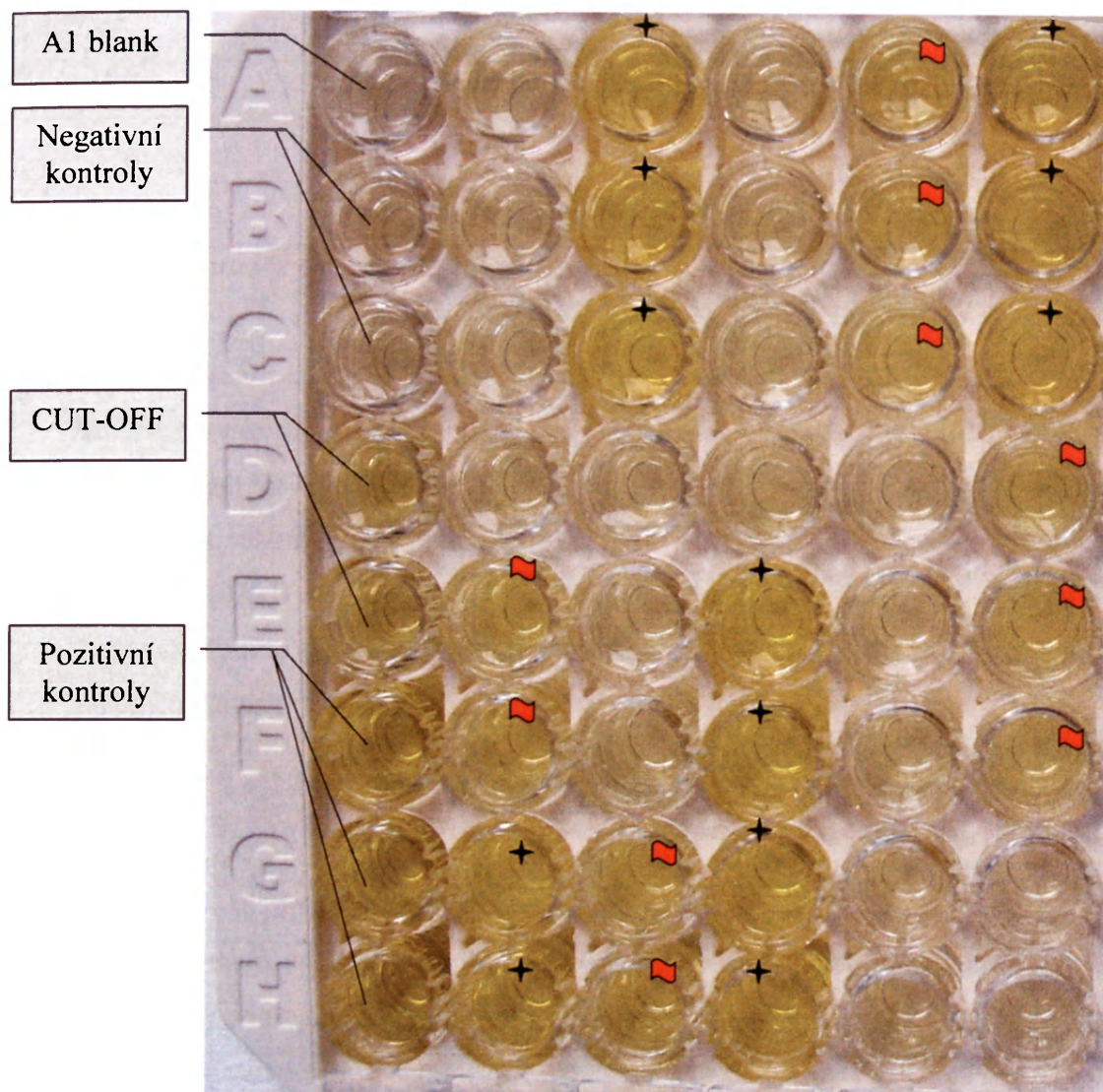
Obsah soupravy

1.	Mikrotitrační destička s navázaným antigenem	96 jamek
2.	Negativní kontrola (lidské sérum bez protilátek <i>H. pylori</i>)	0,2 ml
3.	CUT-OFF (lidské sérum obsahující protilátky proti <i>H. pylori</i> v hraniční koncentraci)	0,2 ml
4.	Pozitivní kontrola (lidské sérum obsahující protilátky <i>H. pylori</i>)	0,2 ml
5.	Konjugát (kozí imunoglobulin proti lidským IgG značený peroxidázou)	15 ml
6.	Substrátový roztok (pufr obsahující peroxid vodíku)	9 ml
7.	Chromogen (pufr obsahující TMB)	9 ml
8.	Ředící roztok vzorků (pufr se stabilizátory bílkovin)	200 ml
9.	Promývací roztok (koncentrovaný pufr)	75 ml
10.	Zastavovací roztok (kyselina sírová 1 mol/l)	15 ml

Pracovní postup

1.	100 µl ředícího roztoku se pipetuje do jamky A1 (blank - slepá zkouška)
2.	100 µl negativní kontroly ředěné 1:200 do jamky 1
3.	100 µl CUT-OFF ředěné 1:200 do dvou následujících jamek
4.	100 µl pozitivní kontroly ředěné 1:200 do jedné jamky
5.	100 µl testovaných vzorků ředěných 1:200 do zbývajících jamek
6.	destička se přikryje víčkem a inkubuje 1 hodinu při teplotě 37 °C
7.	poté se odsaje obsah jamek a 4x promyje pracovním promývacím roztokem
8.	dávkuje se 100 µl konjugátu poté se opět destička přikryje a inkubuje 1 hodinu

	při teplotě 37 °C
9.	dávkuje se 100 µl substrátu, destička se přikryje a inkubuje 10 minut při laboratorní teplotě v temnu
10.	reakce se zastaví přidáním 100 µl zastavovacího roztoku
11.	výsledky se odečítají spektrofotometrem při vlnové délce 450 nm



Obr. 8 Výsledek testu EIA, stanovení protilátky IgG

✦ - pozitivní

🚩 - CUT OFF hraniční koncentrace, ostatní negativní

3.2.2 Stanovení specifických protilátek IgG metodou westernblot

Název testu:	BLOT Helicobacter pylori IgG
Výrobce:	TEST - LINE, Clinical Diagnostics, ČR
Počet testů v soupravě:	16
Senzitivita:	97%
Specifita:	96%
Pracoviště:	Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK

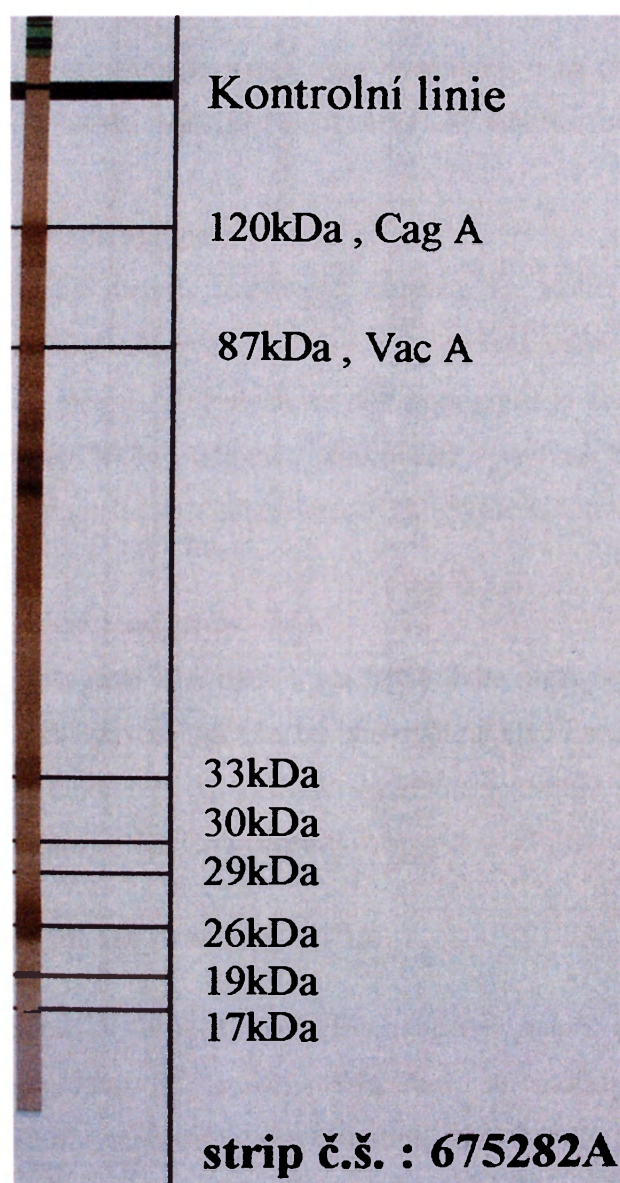
Obsah soupravy

1.	Testovací proužky s přeneseným elektroforeticky rozděleným antigenem	16 ks
2.	Negativní kontrola	0,2 ml
3.	Pozitivní kontrola	0,2 ml
4.	Konjugát IgG SwAHu/IgG-Px	36 ml
5.	Substrátový roztok (pufr s peroxidem vodíku)	36 ml
6.	Chromogen DAB	18 ks
7.	Univerzální roztok (pufr pro ředění vzorků a promývání stripů)	300 ml
8.	Inkubační vanička pro blot	2 ks

Pracovní postup

1.	do vaničky se pipetuje 2 ml univerzálního roztoku
2.	pomocí pinzety se přenesou testovací proužky do vaničky a inkubují se za občasného protřepání 10 minut při laboratorní teplotě
3.	odsaje se z vaniček univerzální roztok
4.	do vaniček se pipetuje 2 ml vzorků a kontrol a inkubuje se 1 hodinu za občasného protřepání při teplotě 37 °C
5.	po skončení inkubace se vzorky a kontroly odsají
6.	dále se vaničky promývají 3x 2 ml univerzálního roztoku po dobu 5 minut
7.	po odsátí univerzálního roztoku se pipetuje do každé vaničky 2 ml konjugátu a inkubuje se 1 hodinu za občasného protřepání při teplotě 37 °C
8.	po skončení inkubace se konjugát odsaje

9.	vaničky se opět promývají 3x 2 ml univerzálního roztoku po dobu 5 minut
10.	po odsátí univerzálního roztoku se pipetuje 2 ml substrátového roztoku s chromogenem a inkubuje při laboratorní teplotě 5-10 minut
11.	po skončení inkubace odsajeme substrátový roztok a promyjeme každý strip 2x 2 ml destilované vodě po dobu 5 minut
12.	po promytí vyjmeme stripy z inkubační vaničky a vložíme mezi dva listy filtračního papíru, zatížíme a vysušíme
13.	po vysušení se stripy vyhodnocují pomocí přiložené šablony (Obr. 9)



Obr. 9 Kontrolní strip pro test IMUNOBLOT

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Metody přímého průkazu *H. pylori* - Dechové testy

Dechový test může sloužit ke zjištění *H. pylori* positivity. Je metodou volby ke sledování úspěšnosti léčby a pro svou neinvazivnost je také vhodný pro děti. Test vyžaduje přípravu pacientů na vyšetření a to především vysazení interferujících medikamentů (antibiotika, antagonisté H₂ receptorů aj.) min. 4 týdny před vyšetřením. Z uvedených důvodů tento test nemusí být vhodný pro první záchyt infekce. Cena aluminiových sáčků je srovnatelná s ostatními metodami, cena přístrojového vybavení je poměrně vysoká. Vyšetření může provádět zaškolený laborant bez specializace.

Metody přímého průkazu antigenu - LFIA

Chromatografické metody stanovení antigenu ve stolici mohou být využity jednak ke screeningu, diagnostice infekce, ale i pro ověření eradikace infekce *H. pylori*. Specifita a senzitivita metod založených na chromatografii je srovnatelná s metodami EIA. Metoda nevyžaduje žádnou přípravu pacienta na vyšetření. Neklade žádné nároky na přístrojové vybavení ani na specializaci osoby, která provádí test.

Metody přímého průkazu antigenu - EIA

Vyšetření antigenu metodami EIA patří v současné době mezi nejrozšířenější. Metody jsou vhodné jak pro vyhledávání infekce, tak pro ověření eradikace infekce. Klade nízké nároky na vybavení laboratoří (k odečtení výsledků postačuje spektrofotometr) i na specializaci laborantů provádějících vyšetření.

Metody nepřímého průkazu protilátek - EIA

Většina nemocných infikovaných *Helicobacter pylori* produkuje specifické protilátky proti antigenům *H. pylori*. Vyšetření se indikuje u nemocných s dyspeptickými obtížemi, epigastrickými bolestmi, chronickou gastritidou, vředovou chorobou žaludku a duodena a u nádorů žaludku. Po eradikaci *H. pylori*, koncentrace protilátek postupně klesá. Vyšetření je významné v dětském věku, kdy většinou i infekční proces začíná. Průkaz protilátek ve většině případů svědčí pro infekci i u lidí, kteří nemají subjektivní potíže. Pro diagnostické závěry je nutno posoudit klinický

obraz onemocnění, případně indikovat další vyšetření (např. dechový test, invazivní vyšetření, stanovení antigenu ve stolici metodou chromatografie apod.). Test nevyžaduje přípravu pacienta. Pro vybavení laboratoří dostačuje spektrofotometr a výhodný (u větších laboratoří) je přístroj na promývání mikrotitračních destiček. Vyšetření je prováděno v běžných sérologických laboratořích a nevyžaduje specializaci laborantů.

Metody nepřímého průkazu protilátek - IMUNOBLOT

Vyšetření slouží především k detailnímu stanovení přítomnosti specifických protilátek proti antigenům *H. pylori* nebo k potvrzení nejednoznačných výsledků EIA testů, ale zejména pak k stanovení protilátek proti CagA antigenu, který je v současné době považován za důležitý marker virulence, a jehož přítomnost znamená zvýšené riziko vzniku závažných forem onemocnění. Metoda nevyžaduje přípravu pacienta na vyšetření. Test neklade nároky na vybavení laboratoře. Laborant provádějící vyšetření by měl mít určitou zkušenost s metodami westernblot.

	Stanovení antigenu LFIA	Stanovení antigenu EIA	Dechové testy	Stanovení protilátky EIA	Stanovení spec. protilátky BLOT
Typ vzorku	stolice	stolice	vydechnutý vzduch	sérum	sérum
Čas analýzy vzorku	6 min.	80 min.	2 min.	140 min.	165 min.
Nároky na vybavení	0	nízké	vysoké	nízké	0
Specializovaní pracovníci	0	ne	ne	ne	ano
Příprava pac. na vyšetření	ne	ne	ano	ne	ne

Tab. 1 Srovnání neinvazivních metod stanovení infekce *H. pylori*

5 ZÁVĚR

Metody EIA zůstanou doménou laboratoří, které těmito testy určují nejen pozitivitu infekce *H. pylori*, ale i celou řadu jiných infekčních onemocnění. Při této technice, je důležitá přesnost, preciznost a validita prováděných testů, stejně tak pro metody imunoblotu, kde je navíc důležitá zkušenost při odečítání vyšetřených stripů.

Dechové testy sice nekladou velké nároky na schopnosti laborantů provádějících vyšetření, ale pořizovací náklady na přístrojové vybavení jsou mnohonásobně vyšší než ostatní popisované metody. Dalším argumentem jsou lékové interference, které mohou zapříčinit falešně negativní nebo pozitivní výsledky. Malou dostupnost tohoto vyšetření v České Republice mohou vyvážit vzorky zasílané poštou jako je tomu ve Spojených Státech, ale tím se zvyšuje prodlení.

Nejvýznamnějšími metodami se tedy stávají metody založené na principu chromatografie s podtypem LFIA. Jejich jednoduchost, nenáročnost na vybavení a rychlost je řadí mezi metody s velmi širokým využitím a to především do ordinací praktických lékařů, dále ke screeningu nebo vyhledávání rizikových skupin obyvatelstva a v neposlední řadě jako vhodný diagnostický nástroj pro hygienicko-epidemiologické studie. Pro budoucí výzkum by se tyto testy mohly rozšířit o stanovení specifických proteinů (VacA, CagA, ale i dalších), které by pomocí následných studií významně přispěly k pochopení mechanismů patogenity a virulence této bakterie.

6 Seznam použité literatury

- [1] Bizzozero, G.: Über die Schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanal und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut. Arch Mikrobiol Anat 1893; 42: 82-152
- [2] Salomon, H.: Über das Spirillum des Säugetiermagens und sein Verhalten zu den Belegzellen. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg 1896; 19: 433-443
- [3] Warren, J. R., Marshall, B. J.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; I: 1273-1275
- [4] Rothenbacher, D., Brenner, H.: Burden of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. Microbes Infect 2003; 5: 693
- [5] Votava, M., a kol.: Přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii. Brno 2000; 143
- [6] Lukáš Z., Dráberová E., Feit J., Vojtěšek B.: Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. Masarykova Univerzita v Brně 1997; 34
- [7] Ghiara, P., Rossi M., Marchetti M., Di Tommaso A., Vindigni C., Ciampolini F., Covacci A., Telford J. L., De Magistris M. T., Pizza M., Rappuoli R., Del Giudice G.: Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. Infect. Immun. 1997; 65: 4996–5002
- [8] Andersen, L. P., Boye, K., Blom, J., Holck, S., Norgaard, A., Elsborg, L.: Characterization of a culturable „*Gastrospirillum hominis*“ (*Helicobacter heilmannii*) strain isolated from human gastric mucosa. 1999; 37: 1069-1076
- [9] Dewhirst, F. E., Fox, J. G., Mendes, E. N., Paster, B. J., Gates, C. E., Kirkbride, C. A., Eaton, K. A.: „*Flexispira rappini*“ strains represent at least 10 *Helicobacter* taxa. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000; 50: 1781-1787
- [10] J. Fox Versalovic, Bacteriology.
- [11] <http://www.sciencephotolibary.com>
- [12] Frenck, R. W. Jr., Clemens, J.: *Helicobacter* in the developing world. Microbes Infect 2003; 5: 705–13.

- [13] O'Rourke, K., Goodman KJ., Grazioplene, M., Redlinger, T., Day RS.: Determinants of geographic variation in *Helicobacter pylori* infection among children on the US-Mexico border. *Am J Epidemiol* 2003; 158: 816-24.
- [14] McCallion, W. A., Murray, L. J., Bailie, A. G., Dalzell, A. M., O'Reilly, D. P., Bamford, K. B.: *Helicobacter pylori* infection in children: relation with current household living conditions. *Gut* 1996; 39: 18-21.
- [15] Mendall, M. A., Goggin, P. M., Molineaux, N., Levy, J., Toosy, T., Strachan, D., Northfield, T. C.: Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* 1992; 339: 896-897.
- [16] Karita, M., Teramukai, S., Matsumoto, S.: Risk of *Helicobacter pylori* transmission from drinking well water is higher than that from infected intrafamilial members in Japan. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 1062-7
- [17] Hegarty, J. P., Dowd, M. T., Baker, K. H.: Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 87: 697-701
- [18] Hulten, K., Han, S. W., Enroth, H., Klein, P. D., Opekun, A. R., Gilman, R. H., Evans, D. G., Engstrand, L., Graham, D. Y., El Zaatari, F. A.: *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996; 110: 1031-1035
- [19] Fox, J. G., Perkins, S., Yan, L., Shen, Z., Attardo, L., Pappo, J.: Local immune response in *Helicobacter pylori*-infected cats and identification of *H. pylori* in saliva, gastric fluid and faeces. 1996; 88: 400-406
- [20] Dore, M. P., Sepulveda, A. R., El Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M. S., Mototsugu, K., Nieddu, A. M., Realdi, G., Graham, D. Y.: Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* 2001; 96: 1396-1401
- [21] Pytko-Polonczyk, J., Konturek, S. J., Karczewska, E., Bielanski, W., Kaczmarczyk-Stachowska, A.: Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. 1996; 47: 121-129

Použité zkratky

CLO	campylobakterům podobný organismus (campylobacter-like organisms)
DNA	kyselina deoxyribonukleová (deoxyribonucleic acid)
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
rRNA	ribosomální kyselina ribonukleová (ribosomal ribonucleic acid)
TEM	transmisní elektronová mikrofografie
WHO	Světová Zdravotnická Organizace (World Health Organization)
EIA	Enzymoimunoanalýza
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
SDS	Dodecylsulfát sodný (sodium dodecylsulfate)
PAGE	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (polyacrylamid gel electroforesis)
LFIA	Boční průtoková imunologická metoda (lateral flow immunoassay)
IRIS	Infračervený izotopový analyzátor (Infra Red Isotope Analyser)
TMB	3,3 5,5 tetrametylbenzidine
DAB	diaminobenzidin