

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta

## **Laboratorní diagnostika *Helicobacter pylori***

Bakalářská práce

Autor práce: Jana Obermajerová  
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Petra Dovinová

Datum odevzdání práce: 3.5. 2013

## Abstrakt

V roce 1983 vědci Marshall a Warren objevili ve vzorku žaludeční sliznice spirálovité bakterie, které později pojmenovali *Helicobacter pylori* a zařadili je do samostatného rodu *Helicobacter*.

*Helicobacter pylori* je gramnegativní zakřivená bakterie, ke svému růstu potřebuje mikroaerofilní prostředí a CO<sub>2</sub>. Z biochemických vlastností je důležitá produkce ureázy, katalázy, alkalické fosfatázy a fosfolipázy a dalších enzymů. Jednotlivé kmeny se mohou lišit v genetickém základu a v biologických vlastnostech, podle toho se rozdělují na dva základní typy. Do typu I se řadí kmeny obsahující kompletní „ostrov patogenity“, jehož součástí jsou geny např. *cagA* a *vacA*, které jsou odpovědné za virulenci kmene a jsou často nalézány u pacientů s peptickým vředem a karcinomem žaludku. Do typu II se řadí kmeny, které nezpůsobují závažné poškození žaludeční sliznice.

*Helicobacter pylori* kolonizuje žaludeční sliznici v oblasti antra, při masivní infekci může přecházet i do těla žaludku. Podílí se na rozvoji zánětu žaludeční sliznice a to především sliznice antra, který ve většině případů přechází do chronické fáze. Podílí se na rozvoji peptického vředu duodena a žaludku, je prokázána souvislost s karcinomem a MALT lymfomem žaludku.

K léčbě infekce *Helicobacter pylori* se standardně používá trojkombinace léků – inhibitoru protonové pumpy (IPP) a dvou antibiotik. Nejčastěji to bývá kombinace amoxicilinu s klaritromycinem a IPP (např. omeprazolem). Další možností je kombinace metronidazolu s klaritromycinem a IPP. Příčinou selhání eradikační léčby může být rezistence *Helicobacter pylori* na některé použité antibiotikum.

K diagnostice infekce *Helicobacter pylori* slouží invazivní a neinvazivní metody. Pro invazivní metody je nutné odebrat biopsický vzorek žaludeční sliznice, který je určený pro histologické nebo mikrobiologické vyšetření. Mezi mikrobiologické metody patří mikroskopické vyšetření, rychlý ureázový test a kulturační vyšetření. Mikroskopie je standardně používanou metodou na mikrobiologických pracovištích. Výsledek mikroskopie bývá zpravidla ještě týž den. Další metodou je rychlý ureázový test. Je

snadno dostupný a výsledek testu je za 16-24 hod. Senzitivita testu je až 90%, ale může být ovlivněna koncentrací bakterií přítomných ve vzorku (pro pozitivitu testu je třeba nejméně  $10^5$  mikroorganismů ve vzorku). Kultivační vyšetření je náročná metoda, protože *Helicobacter pylori* vyžaduje speciálně obohacené kultivační půdy a mikroaerofilní atmosféru. Kultivace je i časově náročná – trvá 5-7 dní. Kvůli nerovnoměrnému osídlení žaludeční sliznice *Helicobacter pylori* se doporučuje pro mikrobiologické vyšetření odebrat více bioptických vzorků. Neinvazivní metody (dechový test, průkaz antigenu ve stolici) se zpravidla používají pro ověření eradikační léčby infekce. Dechový test je velice spolehlivá diagnostická metoda s 95% senzitivitou, ale nevýhodou je jeho vysoká pořizovací cena, proto se provádí jen na některých pracovištích. Detekce antigenu ve vzorku stolice se stanovuje buď imunochromatografickou metodou nebo metodou ELISA. Metoda ELISA se také používá k průkazu specifických protilátek v krevním séru.

Tématem práce bylo porovnání jednotlivých mikrobiologických vyšetřovacích metod – mikroskopie, kultivace a rychlého ureázového testu, které se pro diagnostiku *Helicobacter pylori* používají na Pracovišti bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s.

Materiálem byly bioptické vzorky žaludeční sliznice zaslané na Pracoviště bakteriologie v roce 2011. Vzorky byly nejčastěji odebírány na Gastroenterologickém oddělení a Dětském oddělení. Každý bioptický vzorek se vždy rozdělil na tři části pro jednotlivé metody. Z části vzorku se zhotovil mikroskopický preparát. K obarvení dle Grama se použil barvicí automat - systém MIRASTAINER<sup>®</sup>. Při pozorování v optickém mikroskopu (imerzním systémem při zvětšení 1000×) byly v případě pozitivního nálezu patrné štíhlé esovitě zahnuté gramnegativní tyčinky. Další část vzorku se použila pro ureázový test dle Christensena v tekutém médiu. Test se vyhodnotil následující den, pro pozitivitu svědčilo zčervenání média. Zbylá část vzorku se použila pro kultivační vyšetření. Materiál se naočkoval na diagnostickou kultivační půdu HPFA od firmy fa Dulab a souběžně na neselektivní krevní agar (pro vyloučení kontaminující flóry). Kultivace probíhala v mikroaerofilní atmosféře (docílilo se v LAS systému) 5-7 dní při

37 °C. V případě pozitivního kultivačního nálezu (pro *H. pylori* jsou typické drobnější, našedlé a částečně transparentní kolonie) se testovala citlivost k antibiotikům.

Na Pracovišti bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s. bylo v roce 2011 vyšetřeno 599 bioptických vzorků žaludeční sliznice. Infekce *Helicobacter pylori* byla prokázána u 161 pacientů. Z výsledků práce vyplývá, že citlivost kultivačního vyšetření je srovnatelná s mikroskopií. Nejnižší citlivost měl ureázový test. Infekce byla diagnostikována nejčastěji ve věkové skupině 40-59 let, z toho bylo 47,5 % mužů a 52,2 % žen. U 137 kmenů *Helicobacter pylori* byla stanovena citlivost k vybraným antibiotikům. 42 % kmenů bylo rezistentních k metronidazolu a 18 % kmenů k azitromycinu.

## Abstract

In 1983 two scientists, Marshall and Warren, discovered a spiral-shaped bacteria in a sample of gastric mucosa which they later named *Helicobacter pylori*, and classified this group into the individual *Helicobacter* family.

*Helicobacter pylori* is a Gram-negative, microaerophilic bacterium requiring for its growth and development a microaerophilic environment and carbon dioxide. The most important biochemical properties include the production of urease, catalase, alkaline phosphatase, and phospholipase as well as other enzymes. Individual phyla can vary in genetic basis and biological properties. They are divided according to these criteria into two principal types. The first type (known as Type I) comprises the phyla containing the complete „pathogenic island“, part of which is created by genes, such as *cagA* and *vacA*, responsible for phylum virulence. These genes can often be found in patients suffering from peptic ulcers and gastric carcinoma. The second type (known as Type II) includes phyla which do not cause any major damage to the gastric mucosa.

*Helicobacter pylori* colonises the gastric mucosa in the area of the antrum and may be transferred into the body of the stomach (Corpus gastricum) in the event of massive infection. It contributes to the development of gastric mucosal inflammation, especially the antrum mucosa, which later, in the majority of cases, passes to the chronic stage. It also contributes considerably to the development of both duodenal and gastric peptic ulcers. The connection between carcinoma and gastric MALT lymphoma has been proved.

The treatment of *Helicobacter pylori* infection usually requires a triple combination of medicines – a proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics. Most frequently, the combination comprises amoxicillin and clarithromycin and the PPI (i. g. omeprazole). Another possibility offers a combination of metronidazole with clarithromycin and the PPI. The failure of eradication therapy may be often caused by *Helicobacter pylori* resistance to some of the antibiotics which have been used.

Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection can be made by invasive and non-invasive methods. In order to proceed to the invasive method, a biopsy sample of the

gastric mucosa must be taken. This sample is later submitted for histological and microbiological examination. The microbiological methods include microscopic examination, rapid urease test and *H. pylori* cultivation test. Microscopy is a commonly used method at microbiological institutes. The result of microscopy is usually available on the same day. Another method is provided by a rapid urease test, which is easily available and the test result is usually ready within 16 to 24 hours. The sensitivity of the test is up to 90%, however, it may be influenced by the concentration of bacteria present in the sample (in order to define whether a test is positive, at least  $10^5$  microorganisms in the sample is required). Examination through *Helicobacter pylori* cultivation is a highly demanding method because the given bacteria require a rich cultivation environment under a microaerophilic atmosphere. Cultivation is also a time-consuming process lasting from 5 to 7 days. Due to the uneven *Helicobacter pylori* habitat of the gastric mucosa, it is recommended to take a large number of biopsy samples in order to carry out a successful microbiological examination. In principal, non-invasive methods (breath test, stool antigen test) are used for the verification of eradication treatment. A breath test is a highly reliable diagnostic method with 95% of sensitivity. However, its high purchase price is a great disadvantage and only certain institutes can afford to use it. Antigen detection in the stool sample can be determined by either the immunochromatographic method, or by the ELISA method. The latter is also implemented for proving the specific antibodies in blood serum.

The topic of the thesis dealt with the comparison of individual microbiological examination methods – microscopy, cultivation and rapid urease test which are used at the Bacteriology Institute of Hospital of České Budějovice, a.s in order to diagnose *Helicobacter pylori*.

Biopsy samples of the gastric mucosa sent to the Bacteriology Institute in 2011 were used as the main material for the given study. The samples were most frequently taken at the Gastroenterology Department and Children's Department. Each biopsy sample was divided into three parts for individual methods. A microscopic preparation was elaborated from a part of the sample. The stain device - MIRASTAINER<sup>®</sup> system was used for the Gram staining. During observations in the optic microscope

(immersion lens system with 1000×) fine S-shaped Gram-negative rods were visible in the event of a positive finding. Other parts of the sample were used for the urease hydrolyses test (Christensen's) in the liquid media. The test was assessed the following day, in the case of a positive finding the media went red. The remaining part of the sample was used for the cultivation examination. The material was inoculated into the HPFA diagnostic cultivation media provided by the Dulab Company and, at the same moment, on non-selective blood agar (in order to exclude contaminating microflora). The cultivation was executed in a microaerophilic atmosphere (obtained in the LAS system) from 5 to 7 days at 37 °C. In the event of a positive cultivation finding (often represented in case of *H. pylori* by typical, finer, slightly grey and partially transparent colonies) the sensitivity to antibiotics was tested.

In 2011, the Bacteriology Department at the Hospital of České Budějovice, a.s. examined 599 biopsy samples of the gastric mucosa. The examination proved the presence of *Helicobacter pylori* infection in the bodies of 161 patients. The results of the study reveal that the sensitivity of the cultivation examination is comparable to microscopy. The lowest sensitivity was proved in the case of the urease test. The infection was the most commonly diagnosed in the age group between 40 and 59 years (47.5 % of men and 52.2 % of women). The sensitivity to selected antibiotics was determined in the case of 137 phyla. 42 % of phyla were resistant to metronidazole and 18% of phyla to azithromycin.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2013

.....  
Jana Obermajerová



## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce MUDr. Petře Dovinové za její cenné rady a odborné vedení práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu na Pracovišti bakteriologie v Laboratoři lékařské mikrobiologie v Centrálních laboratořích Nemocnice České Budějovice, a.s. za poskytnutí podkladů pro bakalářskou práci a umožnění laboratorní práce v laboratoři.

# Obsah

Úvod .....	12
<b>1. Současný stav .....</b>	<b>13</b>
1.1 Charakteristika <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
1.1.1 Morfologie <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
1.1.2 Biochemická aktivita .....	16
1.2 Faktory virulence .....	17
1.2.1 Faktory kolonizační .....	17
1.2.2 Faktory perzistence .....	18
1.2.3 Faktory působící poškození žaludeční sliznice.....	19
1.3 Onemocnění vyvolaná <i>Helicobacter pylori</i> .....	20
1.4 Epidemiologie a přenos .....	21
1.5 Terapie infekce <i>Helicobacter pylori</i> .....	22
1.5.1 Prognóza onemocnění vyvolaných <i>Helicobacter pylori</i> .....	23
1.6 Diagnostika infekce <i>Helicobacter pylori</i> .....	24
1.6.1 Neinvazivní metody .....	24
1.6.1.1 Dechový test .....	24
1.6.1.2 Průkaz antigenu ve stolici .....	26
1.6.1.3 Serologická diagnostika.....	27
1.6.2 Invazivní metody .....	28
1.6.2.1 Histologické vyšetření .....	29
1.6.2.2 Molekulárně genetické metody.....	30
1.6.2.3 Mikrobiologické metody .....	31
1.6.2.3.1 Mikroskopie .....	31
Barvení dle Grama .....	32
1.6.2.3.2 Rychlý ureázový test.....	33
1.6.2.3.3 Kultivace .....	34
1.7 Stanovení citlivosti k antibiotikům .....	35
1.7.1 Diskový difuzní test.....	35

1.7.2 E-test .....	35
<b>2. Cíl práce.....</b>	<b>37</b>
<b>3. Metodika .....</b>	<b>38</b>
3.1 Charakteristika zkoumaného souboru.....	38
3.2 Odběr a transport materiálu do mikrobiologické laboratoře.....	38
3.3 Metody .....	39
3.3.1 Mikroskopický preparát.....	39
3.3.2 Rychlý ureázový test.....	40
3.3.3 Kultivace.....	41
3.3.4 Stanovení citlivosti k antibiotikům.....	42
3.3.5 Průkaz antigenu <i>Helicobacter pylori</i> ve stolici .....	43
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>46</b>
<b>5. Diskuse .....</b>	<b>54</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>57</b>
<b>7. Klíčová slova.....</b>	<b>58</b>
<b>8. Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>59</b>
<b>9. Přílohy.....</b>	<b>64</b>

## Úvod

Prevalence výskytu infekce *Helicobacter pylori* je vysoká – celosvětově je infikováno 50 % populace, v rozvojových zemích až 80 %.

*Helicobacter pylori* je příčinou chronické perzistující infekce žaludeční sliznice. Ve většině případů se jedná o asymptomatický zánět v antru žaludku. Asi 10 % infikovaných má klinické – obvykle dyspeptické potíže. Chronická infekce může vést ke vzniku peptického vředu, u infikovaných osob bylo prokázáno zvýšené riziko vzniku adenokarcinomu a MALT lymfomu.

K diagnostice infekce *Helicobacter pylori* se používají jak metody invazivní, tak neinvazivní. Mezi neinvazivní metody (k jejich provedení není nutné endoskopické vyšetření) patří serologické vyšetření na průkaz protilátek, dechový test a průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici.

Invazivní metody jsou spojené s odběrem bioptického vzorku žaludeční sliznice při endoskopickém vyšetření. Patří sem histologické vyšetření a mikrobiologické metody: mikroskopické vyšetření, rychlý ureázový test a kultivace. Výsledek těchto vyšetření může být falešně negativní, pokud se při odběru nezachytí ložisko infekce. Vícečetný odběr zvyšuje pravděpodobnost průkazu infekce. Při pozitivním kultivačním nálezu je možné stanovit i citlivost k antibiotikům. K léčbě infekce lze použít metronidazol, amoxicilin, klaritromycin a tetracyklinová antibiotika.

# 1. Současný stav

## 1.1 Charakteristika *Helicobacter pylori*

Původní domněnka byla, že veškeré bakterie jsou v žaludku usmrcovány působením žaludečních šťáv a kyselého pH prostředí. Předpokládalo se, že přežít mohou jen nejodolnější bakterie, ale neočekávalo se, že se v žaludku mohou také množit. Proto po dlouhá desetiletí byly opomíjeny histologické nálezy z konce 19. století, které poukazovaly na přítomnost spirálních bakterií na povrchu žaludeční sliznice. Pokusy o kultivaci mikroorganismů ze vzorků žaludečních sliznic, nebyly úspěšné až do počátku 80. let 20. století, kdy se v roce 1983 podařilo Warrenovi a Marshallovi tuto bakterii poprvé vykultivovat z materiálu žaludeční sliznice od nemocného člověka s chronickou gastritidou (Bednář a kol. 1996, Greenwood a kol. 1999, Krejssek 2004). Následovaly pokusy o taxonomické zařazení této bakterie. Podle morfologie ve světelném mikroskopu Warren usoudil, že se podobá bakterii *Campylobacter jejuni*. Elektronová mikroskopie později prokázala jistou odlišnost - kmeny kamylobaktera mají jeden neobalený bičík, ale nově izolovaná bakterie má 4–5 obalených bičíků, což poukazovalo spíše na příbuznost s rodem *Spirillum*. Ale další znaky jako jsou např. mikroaerofilie, neschopnost štěpit cukry a poměr bází guanin + cytozin zase svědčily pro určitou příbuznost s kamylobaktery. Marshall označil tuto bakterii jako *Campylobacter pyloridis*. Do rodu *Campylobacter* patří gramnegativní tenké zahnuté pohyblivé tyčky s jedním polárním bičíkem, mikroaerofilní, neprodukující kyseliny z cukrů. Osidlují především střevní trakt a způsobují septická a průjemová onemocnění lidí a zvířat. V popisu nového druhu *Campylobacter pyloridis* však bylo uvedeno, že neprodukuje ureázu, ale jak se později ukázalo, právě produkce ureázy je jedním z výrazných rozlišovacích znaků a je velice důležitá pro diagnostiku. Později byl chybný název opraven na *Campylobacter pylori*.

Thomson se zabýval fylogenetickými vztahy veškerých druhů řazených do rodu *Campylobacter* a zjistil, že tvoří tři homologní skupiny. Také upozornil, že není správné všechny druhy řadit do stejného rodu. Z těchto poznatků vyplynulo, že *Campylobacter pylori* nepatří do rodu *Campylobacter*.

V roce 1989 Goodwin se svými spolupracovníky navrhli nový rod s názvem *Helicobacter* a zařadil dosavadní bakterii *Campylobacter pylori* do tohoto rodu s názvem *Helicobacter pylori* (Sedláčková 1996).

Dalším druhem izolovaným od lidí, ale také od zvířat je *Helicobacter heilmannii*, byl prokázán v žaludeční sliznici, také produkující ureázu. Z bioptických vzorků žaludeční sliznice člověka se prokazuje mikroskopicky - svou typickou morfologií (bakterie svými tuhými závití připomíná vývrtku) se liší od ostatních kampylobacterů a helikobakterů. Kultivační záchyt této bakterie nebyl dosud úspěšný. V žaludeční sliznici prasat byla objevena bakterie podobné morfologie - *Gastrospirillum suis*.

Ze žaludeční sliznice fretek byla izolována podobná spirální bakterie jako je *Helicobacter pylori*, ale taxonomicky odlišná. Dlouhodobě perzistuje a vyvolává gastritidu. Byla označena jako *Helicobacter mustelae*, která se dříve též řadila do rodu *Campylobacter*.

Také ze žaludku koček byla objevena spirální bakterie rovněž příbuzná helikobakterům a pojmenována *Helicobacter felis*.

Nově popsány druhy jsou také *Helicobacter hepaticus* a *Helicobacter bilis*, které byly izolovány z myší a vyvolávají u nich hepatitidu (Sedláčková 1996).

Od roku 1982 se počet popsáných druhů zařazených do rodu *Helicobacter* výrazně rozšířil na dvacet čtyři. Dá se předpokládat, že počet není konečný, protože bylo izolováno dalších nejméně 35 bakteriálních druhů, které mají povahu helikobakterů a čekají na taxonomický popis (Krejsek 2004).

Tabulka 1: Rod *Helicobacter*

<i>H. pylori</i>	člověk, vepř, primáti, kočka (žaludeční sliznice)
<i>H. mustelae</i>	fretka (žaludeční sliznice)
<i>H. felis</i>	kočka (žaludeční sliznice)
<i>H. nemestrinae</i>	makak (žaludeční sliznice)
<i>H. cinaedi</i>	člověk (střevo)
<i>H. fennelliae</i>	člověk (střevo)
<i>H. heilmannii</i> typ 1 a 2 ( <i>Gastrospirillum hominis</i> )	člověk (žaludeční sliznice)
<i>Gastrospirillum suis</i>	vepř (žaludeční sliznice)
<i>H. muridarum</i>	myš
<i>H. bilis</i>	myš (střevo)
<i>H. hepaticus</i>	myš (střevo)
<i>H. acinomyx</i>	gepard asijský
<i>H. bizzozeronii</i>	pes

Zdroj: Sedláčková (1996)

### 1.1.1 Morfologie *Helicobacter pylori*

V mikroskopickém obrazu ze vzorku z klinického materiálu (biopsie žaludeční sliznice) je bakterie *Helicobacter pylori* lokalizována nerovnoměrně, vyskytuje se hlavně v hlenu. V těchto místech je možné pozorovat gramnegativní bakterie spirálovitého tvaru 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  silné a 2,5-5  $\mu\text{m}$  dlouhé. Typický je také tvar písmene S nebo V (Votava a kol. 2003, Greenwood a kol. 1999).

V elektronovém mikroskopu je možné pozorovat bičíky - na jednom pólu je 4-6 bičíků, které bakterii umožňují pohyb (Beneš 2009). Bičíky jsou obaleny pochvou, která plynule přechází v zevní membránu buněčné stěny. Bičíky jsou na konci paličkovitě rozšířené (Bednář a kol. 1996). Vlákna bičíků jsou flageliny, tvořené

polymery dvou peptidových subjednotek – *FlaA* a *FlaB*. Vlákna jsou chráněna obalem, který je tvořen dvěma vrstvami fosfolipidů. Obal chrání bičinky před nízkým pH. Bez něj by nastala v kyselém prostředí žaludku depolymerizace flagelinů a došlo by ke ztrátě pohyblivosti bakterie.

Bičinky bakterii také umožňují proniknout vrstvou mimořádně viskózního hlenu, který pokrývá epitelové buňky žaludeční sliznice (Kyzelová 1998).

*Helicobacter pylori* roste na obohacených kultivačních půdách při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí za přísně mikroaerofilních podmínek v atmosféře s 85 % dusíku, 10 % oxidu uhličitého, 5 % kyslíku. Mikroaerofilní bakterie ke svému růstu potřebují přítomnost kyslíku jen v nízkých koncentracích. Kultivace trvá 5-7 dní, kolonie jsou ploché s našedlým povrchem, částečně transparentní. Po léčbě antibiotiky bývají kolonie drobnější a doba růstu se prodlužuje až na 7 dní (Votava a kol. 2003).

### **1.1.2 Biochemická aktivita**

Typickou schopností *Helicobacter pylori* je produkce enzymů oxidázy, katalázy, kyselé a alkalické fosfatázy, fosfolipázy a ureázy. Nejvýznamnějším enzymem je ureáza, která je bakterií vylučována do okolí, štěpí močovinu za vzniku amoniaku, který neutralizuje kyselinu chlorovodíkovou a umožňuje bakterii dlouhodobé přežívání na žaludeční sliznici. Ureázová aktivita se využívá k rychlému biochemickému průkazu přítomnosti *Helicobacter pylori* v odebraném vzorku tkáně. Produkce ureázy není specifická pouze pro tuto bakterii. Z biochemických vlastností jsou dále prokazovány produkce sirovodíku, utilizace karbohydrátů, produkce indolu a hydrolýza inoxylacetátu (Bednář a kol. 1996, Sedláčková 1996, Votava a kol. 2010).



## 1.2 Faktory virulence

Virulence je míra patogenity a její kvantitativní vyjádření u jednotlivých kmenů. Patogenitou se rozumí schopnost bakterie vyvolat onemocnění. Jednotlivé kmeny *Helicobacter pylori* se mohou od sebe lišit ve svém genetickém základu a v biologických vlastnostech. Lze je rozdělit na dva typy. Do typu I se řadí kmeny s výrazným patogenním potenciálem. Kmeny, které nezpůsobují závažné poškození žaludeční sliznice jsou označovány jako typ II. Infekce typem II probíhá asymptomaticky (Krejsek 2004, Schindler 2010).

### 1.2.1 Faktory kolonizační

*Helicobacter pylori* osidluje žaludeční sliznici, ale neproniká do epiteliálních buněk, proto je považován za neinvazivní bakterii. Proniká pouze do hlenové vrstvy žaludku a přilne pomocí adhezínů na povrch epiteliálních buněk.

Bičíky bakterii umožňují pohyb a tím usnadňují proniknout hlenem k epiteliálním buňkám žaludku. Průnik vrstvou hlenu je usnadněn zakřiveným tvarem bakterie a také díky produkci enzymu mucinázy, která rozkládá hlen.

Adheziny jsou různé chemické povahy, nejčastěji jsou to glykoproteiny, které pokrývají celý povrch bakterie. Reagují s receptory na povrchu buněk sliznice a bakterie se pak mohou na buňky navázat. Adheziny *Helicobacter pylori* jsou tkáňově a druhově specifické a vážou se pouze na žaludeční epiteliální buňky.

Přežití bakterií v kyselém prostředí žaludku je možné díky produkci enzymu ureázy. Ureáza se uvolňuje do prostředí při autolýze bakterií. Uvolněná ureáza je využívána k ochraně ostatních helikobakterů. Adsorbují ureázu na svůj povrch, ze kterého se pak ureáza uvolňuje a štěpí ureu na bikarbonát a amoniak, který neutralizuje kyselinu chlorovodíkovou a tím se zvyšuje pH v okolí bakterie. Bakterie tak může přežít v kyselém prostředí. Enzymová aktivita ureázy je závislá na pH prostředí,

v neutrálním prostředí se produkce ureázy snižuje a naopak v kyselém se zvyšuje. Bylo prokázáno, že některé mutanty *Helicobacter pylori* neprodukují ureázu a nejsou virulentní.

Při dlouhodobé kolonizaci žaludeční sliznice *Helicobacter pylori* může docházet ke změně morfologie epitelálních buněk a může se měnit také množství a složení hlenu (Krejsek 2004, Sedláčková 1996).

### 1.2.2 Faktory perzistence

*Helicobacter pylori* je schopný unikat obranným mechanismům imunitního systému. Produkuje enzymy třídy proteáz, které štěpí specifické IgA protilátky.

Součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií je lipopolysacharid (LPS). LPS u *Helicobacter pylori* obsahuje krevně skupinové antigeny Lewis X ( $Le^x$ ) a Lewis Y ( $Le^y$ ), které se také nacházejí na buňkách žaludeční sliznice. Imunitní systém hostitele jej nerozpozná jako cizorodý a nereaguje na něj. Tím *Helicobacter pylori* může dlouhodobě přežívat v těle hostitele. Strukturálně se LPS *Helicobacter pylori* podobá spíše lipopolysacharidu druhu *Bacteroides fragilis*, který je komenzálem lidského střevního traktu. LPS *Helicobacter pylori* také přispívá k patogenitě bakterie tím, že usnadňuje průnik mezi epitelálními buňkami (Krejsek 2004, Sedláčková 1996).

Důležitá je také rezistence k oxidativnímu stresu. Infekce *Helicobacter pylori* vede ke gastritidě, při které se zvyšují hladiny toxických metabolitů kyslíku (např.  $H_2O_2$ ) v žaludeční sliznici. Díky produkci enzymu katalázy, která rozkládá peroxid vodíku je *Helicobacter pylori* částečně chráněn před usmrcením i ve fagocytech (Wang 2004).

### 1.2.3 Faktory působící poškození žaludeční sliznice

Kmeny typu I mají ve svém genomu kompletní tzv. „ostrov patogenity“ označovaný jako CagPAI. Jeho součástí je cca 40 genů, které většinou kódují proteiny odpovědné za patogenitu *Helicobacter pylori*. Jsou jimi např. proteiny, které se podílejí na sestavení bičíku bakterie, dále enzymy (proteázy, permeázy) a bílkoviny, které jsou součástí sekrečního systému. Všechny tyto proteiny vyvolávají zánětlivou odpověď hostitele a zvyšují tak riziko vzniku peptického vředu a rakoviny žaludku (Miernik et al. 2011).

Neméně důležitým faktorem je tvorba toxinů. Nejdůležitějšími jsou hemolyzin a cytotoxin VacA (vakuolizační cytotoxin). Toxin VacA je kódovaný genem *vacA* (vacuolating cytotoxin gene). Cytotoxin je protein o molekulové hmotnosti 140 kDa a je složený z podjednotek označených jako p33 a p55 o molekulové hmotnosti 88 kDa, způsobuje vznik vakuol v epitelových buňkách (Queiroz 2010). Cytotoxin je vázaný na stěnu bakteriální buňky a je v malém množství uvolňován do prostředí.

Cytotoxické kmeny *Helicobacter pylori* tvoří ještě vedle cytotoxinu protein CagA (s cytotoxinem asociovaný antigen A) o molekulové hmotnosti 128 kDa. Je kódovaný genem *cagA* (cytotoxicity-associated gene A). Protein není toxinem, ale je důležitým znakem virulence kmene, neboť kmeny CagA pozitivní jsou často spojovány s vyšším poškozením žaludeční sliznice a často jsou nacházeny u osob s duodenálními nebo žaludečními vředy.

U některých virulentních kmenů byla zjištěna přítomnost vnějších membránových proteinů Hom (*Helicobacter* outer membrane). Zatím nejlépe prostudované membránové proteiny jsou označovány jako HomA a HomB, které jsou často nalézány u kmenů izolovaných u závažných onemocnění např. rakoviny žaludku (Abadi et al. 2011).

Důležitým faktorem virulence je produkce enzymů - fosfolipázy A a C, které atakují fosfolipidy buněk membrán a dochází k narušení ochranné slizniční bariéry. Dále se na poškození podílí ureáza, rozkládá močovinu za vzniku amoniaku. Amoniak přímo poškozuje epitelové buňky a zesiluje cytotoxické působení imunitních buněk

neutrofilních granulocytů. Samotná ureáza aktivuje monocytové buňky pro tvorbu prozánětlivých cytokinů.

Prozánětlivý cytokin IL-8 zvyšuje produkci hormonu gastrinu, který zvyšuje tvorbu kyseliny chlorovodíkové a vede ke vzniku vředů. Gastrin je hormon tvořený v G-buňkách sliznice žaludku. Indukce cytokinů v epitelových buňkách žaludeční sliznice je podstatně vyšší u kmenů *Helicobacter pylori*, které jsou Cag A pozitivní než u kmenů Cag A negativních.

Při aktivaci neutrofilních granulocytů dochází k produkci biologicky aktivních látek, které mohou poškozovat žaludeční epitel. Neméně významná je aktivace makrofágů, které uvolňují prozáněťové cytokiny, např. TNF $\alpha$  a IL-1. Makrofágy jsou fagocytující buňky, které po pohlcení a zpracování bakterie prezentují její antigeny na svém povrchu pro T lymfocyty. T lymfocytární imunitní odpověď reguluje tvorbu specifických protilátek, které zajišťují obranu proti infekci *Helicobacter pylori*. U tvorby protilátek namířených proti molekulám lipopolysacharidu *Helicobacter pylori*, který obsahuje stejné cukerné antigeny (Le<sup>x</sup>) a (Le<sup>y</sup>) jako se nacházejí na žaludeční sliznici se rozvíjí autoimunitní reakce.

Je prokázáno, že dlouhodobá aktivace B lymfocytárního systému *Helicobacter pylori* vede k nahromadění genetických poruch a může vést ke vzniku nonhodgkinského lymfomu (NHL-lymfom) (Krejsek 2004).

### **1.3 Onemocnění vyvolaná *Helicobacter pylori***

Infekce *Helicobacter pylori* vyvolává u lidí nejdříve akutní gastritidu, která pak postupně přechází do chronické fáze, která bývá asymptomatická. Kolonizuje nejčastěji antrální část žaludku. Infekce bývá často spojována se zvýšenou sekrecí kyseliny chlorovodíkové, kterou vyvolává hypergastrinemie a zmnožením parietálních buňek. Dlouhodobé působení kyseliny chlorovodíkové na sliznici duodena, může vést ke vzniku duodenálních vředů a žaludeční metaplazii (Zelenková 2006).

Inkubační doba od nákazy do prvních projevů infekce trvá několik dnů. Častými příznaky akutní gastritidy jsou nauzea, bolest v břiše, zvracení, pálení žáhy, flatulence (Greenwood a kol. 1999).

Závažnost u chronické infekce spočívá jak v působení patogenetických faktorů *Helicobacter pylori*, tak zánětlivou odpovědí, která je indukována v hostiteli působením bakterie a vede ke vzniku atrofické gastritidy. Histopatologicky je charakterizována silnou neutrofilní infiltrací epitelové vrstvy a degenerací epitelových buněk. Zvyšuje se aktivita žaludečních žlázek. V lamina propria jsou přítomny neutrofilní granulocyty společně s mononukleárními buňkami. Vlivem těchto poškozujících faktorů, může nakonec onemocnění vyústit až v maligní transformaci v adenokarcinom. *Helicobacter pylori* velice silně stimuluje B lymfocyty a tato stimulace je spjatá s rozvojem NHL lymfomů, které vycházejí z B lymfocytů slizničního imunitního systému a označují se jako MALT lymfomy (*mucosa-associated lymphoid tissue*) (Krejsek 2004).

Vlivem zánětu na sliznici žaludku dochází k hypochlorhydrii, ke snížení obraných mechanismů a vytváří se tak předpoklad pro vznik vředu (Zelenková 2006).

Většina chronicky infikovaných lidí výše uvedenými chorobami během života neonemocní. Podle některých názorů je bakterie u těchto osob součástí běžné mikrobiální flóry (Beneš 2009).

#### 1.4 Epidemiologie a přenos

*Helicobacter pylori* je adaptován na žaludeční sliznici člověka. Nákaza *Helicobacter pylori* je antroponóza - zdrojem i rezervoárem infekce je člověk. Pro přenos infekce ze zvířat není v současnosti jasný důkaz. Kromě primátů byl však *Helicobacter pylori* izolován ze žaludku koček (Bednář a kol. 1996). Infekce koček je provázena histologicky ověřenou perzistující gastritidou. Nelze tedy vyloučit, že by kočka domácí mohla být přenašečem infekce na člověka.

*Helicobacter pylori* byl u lidí izolován ze zubních povlaků a slin, které mohou být rezervoárem bakterií. *Helicobacter pylori* je vylučován stolicí. Přenos je tedy orálně-

orální – kontaktem s infikovanou osobou, nebo fekálně-orální cestou – vodou a potravou kontaminovanou lidskými výkaly při nedodržení hygienických návyků.

Bakterie je schopna vytvářet mimo žaludeční sliznici kokoidní útvary, které jsou odolné vůči vnějšímu prostředí a zřejmě představují infekční formu bakterie (Votava a kol. 2003).

Infekce *Helicobacter pylori* patří pravděpodobně mezi vůbec nejčastější nákazy. V rozvojových zemích většinou dochází k nákaze již v dětském věku nebo v ranné dospělosti. Důvodem časně infekce je extrémní chudoba a špatné hygienické návyky. V rozvojových zemích je rozšíření infekce velice vysoké - až 80 % (Beneš 2009, Zelenková 2006). Ve vyspělých zemích světa se prevalence infekce pohybuje v rozmezí 40-50 %. V těchto zemích lidé žijí v dobrých socioekonomických podmínkách a primoinfekce se posouvá do vyššího věku. V České republice byla prokázána u 42 % vyšetřovaných osob (Beneš 2009, Krejsek 2004).

### **1.5 Terapie infekce *Helicobacter pylori***

Dříve byla doporučována eradikační léčba infekce *Helicobacter pylori* (tj. trvalé odstranění bakterie) bizmutovými solemi (koloidní bizmutsubcitrát nebo subsalicylát) a antibiotiky (metronidazolem, amoxicilinem nebo tetracyklinem) po dobu 14 dní. Nevýhodou této léčby byl poměrně pozdní nástup účinku (tj. vymizení bolestí). Navíc docházelo k tmavému zbarvení jazyka a stolice. Proto v dnešní době již nejsou farmaceutické preparáty s obsahem bizmutových solí k dispozici (Kohout 2005).

Standardní léčebný postup zahrnuje podání dvou antimikrobiálních léků a inhibitoru protonové pumpy (IPP). Preferuje se podání amoxicilinu, na který je rezistence zatím vzácná. Je to optimální léčba, která je jednoduchá, nezatěžuje pacienta a je spojená s vysokou eradikační schopností. Ovšem je možné jí použít pouze tehdy, pokud pacient netrpí alergií na penicilinová antibiotika. Trojkombinace se podává po dobu 7 dní a poté se provádí kontrolní endoskopické vyšetření nebo globální test. Příčinou selhání eradikační léčby bývá často nedodržení léčebného režimu pacientem.

Další příčinou selhání je rezistence *Helicobacter pylori* na antibiotika. Je doporučeno po selhání eradikační léčby minimálně za 8 týdnů léčbu zopakovat s použitím jiné kombinace antibiotik, např. použití metronidazolu a klaritromycinu. Při opakovaném selhání je doporučováno kultivační vyšetření. Při selhání léčby obou trojkombinací je Maastrichtskou konferencí doporučována léčba čtyřkombinací (IPP, koloidní vizmut, tetracyklin nebo amoxicilin, metronidazol), která je ale hůře snášena pacienty (Švestka 2011).

U pacientů s MALT lymfomem vede při použití antibiotické léčby k regresi tumoru v jeho počátečních stádiích. U pokročilých forem samotná eradikační léčba k vyléčení nestačí (Beneš 2009).

V některých zemích dochází k velkému nárůstu rezistence *Helicobacter pylori* ke klaritromycinu a metronidazolu. Této problematice se věnoval i evropský mikrobiologický kongres ECCMID konaný v roce 2009 v Helsinkách. Velký nárůst rezistence byl zaznamenán i u dětí a byly zjištěny výrazné rozdíly v různých zemích. Souborná práce T. Areense z roku 2008 uvádí, že rezistence *Helicobacter pylori* ke klaritromycinu je v Evropě vyšší než 20 %. V USA a v západní Evropě jsou tyto hodnoty ještě vyšší. Na zvýšených hodnotách v těchto státech se značně podílejí děti z imigračních rodin Afriky a Asie, kde je rezistence vysoká (Lochmannová 2010).

V roce 2004 popsala Lochmanová ve své práci zvyšující se rezistenci k metronidazolu ve sledovaném období 1998-1999. Rezistence metronidazolu byla 42 %, podle studie je hodnota srovnatelná s hodnotami rezistence *Helicobacter pylori* ve východní Evropě v letech 1998-2000. Rezistence se pohybovala kolem 40 % (Lochmannová a kol. 2004).

### **1.5.1 Prognóza onemocnění vyvolaných *Helicobacter pylori***

Prognóza závisí na klinických projevech onemocnění. Nejhorší prognózu má karcinom žaludku. Prognóza MALTomu je vždy nejistá.

## 1.6 Diagnostika infekce *Helicobacter pylori*

### 1.6.1 Neinvazivní metody

Neinvazivní metody se neprovádějí z bioptických vzorků a není potřeba endoskopického vyšetření. K těmto testům se řadí dechový test, průkaz antigenu ve stolici a serologické metody.

Tyto metody nejčastěji slouží k průkazu infekce u pacientů s dyspepsií horního typu mladších než 45 let. Dále se používají při ověření úspěšné eradikační léčby u pacientů, kde je provedení endoskopického vyšetření rizikové, například u těhotných žen.

Výsledky neinvazivních metod (dechového testu a průkazu antigenu ve stolici) mohou být ovlivněny současnou léčbou. Při léčbě antibiotiky, bismutem či léky inhibující žaludeční sekreci jsou tyto testy velmi často falešně negativní, jejich účinek totiž tlumí metabolismus bakterie *Helicobacter pylori*. Proto před provedením těchto testů je nutné léčbu na dostatečně dlouhou dobu vysadit (Martínek 2001, Zálabská 2011).

#### 1.6.1.1 Dechový test

Dechový test je test „globální“ (tzn., že posuzuje přítomnost *Helicobacter pylori* v celé sliznici žaludku, na rozdíl od testů „neglobálních“, při kterých se odebírá bioptický vzorek) Je to neinvazivní spolehlivý test s 95% senzitivitou a 96% specifitou (Martínek 2001, Tekin et al. 2010). Slouží ke kontrole úspěšnosti eradikační léčby a to u pacientů s nekomplikovaným vředem duodena, kdy není nutné endoskopické vyšetření.

Princip testu je založen na detekci značeného oxidu uhličitého, jenž vzniká štěpením substrátu enzymem ureázou, která je produkována *Helicobacter pylori*.



Substrátem je orálně podaná močovina se značeným izotopem uhlíku  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  –UBT) (Prokopcová a kol. 2008). Při analýze vydechovaného vzduchu se měří poměr mezi značeným a přírodním izotopem uhlíku (tento poměr se značí  $\delta\text{CO}_2$ ).  $\delta\text{CO}_2$  se stanovuje před podáním urey a 30 min po jejím podání. Rozdíl těchto hodnot určuje  $\delta$  rozdíl („excess“), přičemž poměr na počátku je definován jako nulová hodnota. Pokud je rozdíl obou hodnot (čili  $\delta$  rozdíl) větší než 5 ‰, test je považován za pozitivní (Martínek 2001). Izotop  $^{13}\text{C}$  není radioaktivní a je stabilní, proto vzorky dechu není nutné vyšetřovat ihned a mohou se skladovat delší dobu (Silva et al. 2010).

Dechový test je jednoduchý a netrvá příliš dlouho. Pacient by neměl hodinu před testem jíst ani kouřit. Odebírají se 2 až 3 vzorky vydechovaného vzduchu do zkumavky pomocí plastického brčka. Do zkumavky je potřeba zachytit vzduch z konečné fáze výdechu. Zkumavka se uzavře vakuovým uzávěrem, aby vzduch neunikl. Poté následuje vypití 200 ml pomerančového džusu nebo roztoku kyseliny citrónové pro navození optimální aktivity ureázy. Těsně před testem nebo spolu s testovacím nápojem spolknou pacient 100 mg (u dětí poloviční dávku) urey značenou izotopem  $^{13}\text{C}$ .

Po třiceti minutách vydechne vzduch do dalších tří zkumavek stejným způsobem jako na začátku testu. Pro hodnocení testu je stanoveno kritérium změny poměru mezi vzorkem v čase  $T_{30}$  oproti vzorku  $T_0$  větší než 5 ‰. Stanovení přírůstku  $^{13}\text{C}$  oxidu uhličitého je možné detekovat třemi metodami. Všechny tři jsou stejně přesné, liší se pouze pořizovací cenou. Nejpoužívanější je hmotová spektrometrie, dále infračervený analyzátor, který vyžaduje větší objem vydechovaného vzduchu. Poslední možností je laserová analýza (Martínek 2001). Dechový test vykazuje negativitu již po třech měsících léčby, na rozdíl od serologického vyšetření (viz dále), kdy protilátky proti *Helicobacter pylori* mohou přetrvávat i 6 měsíců po léčbě (Silva et al. 2010).

Výsledek vyšetření může významně ovlivnit řada faktorů, např. čas odběru vzorku, množství užívané urey. Významným faktorem je anatomie a motilita žaludku. Test může ovlivnit porucha vyprazdňování žaludku nebo retence jídla, nebo naopak jeho urychlené vyprazdňování. Také po resekci žaludku, může být čas kontaktu substrátu (urey) se žaludeční stěnou příliš krátký a může tak dojít k falešně negativním výsledkům. Také vliv léků velmi často ovlivňuje výsledek testu. Léčba antibiotiky a

bizmutovými preparáty může vést k útlumu aktivity *Helicobacter pylori*. Test se provádí alespoň 4-6 týdnů po ukončení léčby těmito léky. Léky, které mohou interferovat s aktivitou ureázy (pirenzepin, antacida) je doporučeno vysadit 5 dní před provedením testu. Pokud vyjde u léčených pacientů těmito léky negativní výsledek, doporučuje se test zopakovat s delším časovým odstupem, pro ověření jeho správné negativity (Martínek 2001).

V současné době jsou k dispozici i dechové testy pracující s radioaktivním izotopem  $^{14}\text{C}$ . Provedení testu trvá přibližně 15 minut. Před provedením testu pacient musí být nalačno, nesmí užívat alespoň týden před testem antibiotika, inhibitory protonové pumpy, nebo látky snižující žaludeční kyselost. Pacient spolkně jednu tobolku (reagencie v podobě kapsle), kterou zapije 50 ml čisté vody bez bublinek. Po 10 minutách vydechne vzduch do dechové karty, která obsahuje barevný indikátor. Dechová karta se poté vloží do analyzátoru, který vyhodnotí výsledek do 4 minut. Výhodou tohoto testu je, že vyhodnocení výsledků může být prováděné v přítomnosti pacienta a díky dlouhému poločasu rozpadu izotopu  $^{14}\text{C}$  ( $T_{1/2} = 5730$  let) i dlouhodobá použitelnost karty, která by mohla být posílána (ve vhodném transportním médiu) i poštou. Tím by se zvýšila dostupnost tohoto vyšetření i pro praktické lékaře (Kopáčková 2003, Prokopcová a kol. 2008).

### **1.6.1.2 Průkaz antigenu ve stolici**

Antigen *Helicobacter pylori* (HpsAg) ve vzorku stolice se stanovuje imunochromatografickými metodami nebo metodou ELISA (enzym-linked immunosorbent assay).

Imunochromatografické metody využívají barevně značené monoklonální protilátky proti antigenu *Helicobacter pylori*. Provádí se na membránové destičce. Značené protilátky se navážou na antigen a pomocí kapilárního vztlínání prochází membránou a jsou zachyceny prostřednictvím jiné specifické protilátky v zóně testovací linie. V případě pozitivity se testovací linie zbarví příslušnou barvou.

Provedení testu je snadné, rychle a nezatěžuje pacienta. Senzitivita imunochromatografické metody je 92 %.

Druhou metodou průkazu antigenu ve stolici je metoda ELISA. Ta se stanovuje pomocí monoklonální protilátky specifické pro daný antigen. Provádí se na mikrotitračních destičkách. Provedení testu je velmi snadné a rychlé bez jakékoli zátížení pacienta. Test má 94% senzitivitu a 91% specificitu. Senzitivita je srovnatelná s dechovým testem. Dobré výsledky má i při kontrole úspěšnosti eradikační léčby u dospělých a dětí. Je levnější než dechový test. Vzoroky stolice se uchovávají při teplotě 2-8 °C maximálně 3 dny. Při užívání léků (antibiotik, IPP) je doporučeno 4-6 týdnů před provedením testu přerušit léčbu (*H. pylori* – současný stav 2010).

### **1.6.1.3 Serologická diagnostika**

Při serologickém vyšetření se stanovují protilátky proti *Helicobacter pylori* v krevním séru. K průkazu specifických protilátek slouží imunochemické metody, do kterých patří metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a imunoblotové techniky.

Metodou ELISA se stanovují protilátky ve třídách IgM, IgG a IgA (vysvětleno níže). Metoda se provádí na polystyrenové mikrotitrační destičce. Specifický antigen je navázaný na pevné fázi, na který se naváže specifická protilátka, pokud je přítomna v krevním séru. Po vazbě antigenu a protilátky se naváže tzv. konjugát, tj. protilátka s navázaným enzymem. Aby byla reakce viditelná přidává se substrát, který je štěpen enzymem navázaným na protilátce. Tím vzniká barevná reakce, která se měří fotometricky.

Imunoblotové techniky jsou analytické techniky, které využívají elektroforézu, při nichž dojde k rozdělení antigenu podle molekulové hmotnosti. Posléze jsou antigeny přeneseny na pevnou fázi, nejčastěji to bývá nitrátcelulózová membrána, na jejímž povrchu jsou antigeny detekovány specifickými protilátkami. Imunoblotové techniky slouží k detekci specifických protilátek namířených proti jednotlivým antigenům

*Helicobacter pylori*. Je tedy možné odlišit jednotlivé kmeny, které nesou faktory patogenity např. CagA (Bartůňková a kol. 2011).

Stanovení protilátek však neurčuje aktuální stav infekce, protože pozitivita u pacientů přetrvává i několik měsíců až let po úspěšné léčbě. Falešně negativní testy jsou časté u dětí a imunodeficitních osob. Serologické vyšetření je vhodné pro epidemiologické studie, nebo při vyhledávání *Helicobacter pylori* v rodinách pacientů trpící chorobou způsobenou *Helicobacter pylori* (např. karcinom žaludku, perforace peptického vředu). Je nevhodná ke kontrole úspěchu léčby, neboť pokles protilátek je velice pozvolný, trvá 6-12 měsíců a k úplné negativitě nemusí dojít ani po dvou letech (Martínek 2001).

### ***Třídy protilátek a jejich diagnostický význam***

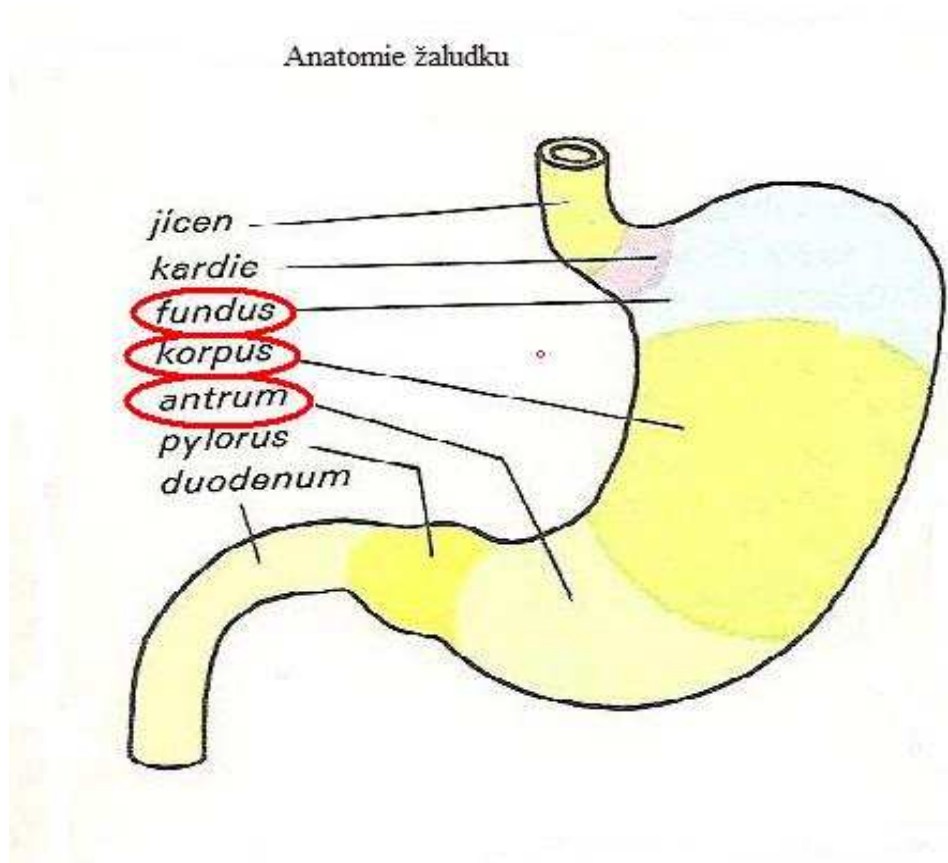
Třídy protilátek IgA jsou přítomné při akutní fázi onemocnění spolu s protilátkami třídy IgG. Jejich zvýšení bylo také popsáno u pacientů s rizikem karcinomu žaludku. Protilátky třídy IgG jsou přítomny v akutní i chronické fázi onemocnění. Přítomnost protilátek třídy IgG tedy není indikátorem aktivity infekce, ale potvrzuje kontakt s *Helicobacter pylori*. Protilátky třídy IgM jsou zvýšené při akutní fázi onemocnění, vyskytují se pouze u 10 % infikovaných, převážně u dětí. Stanovení IgM se proto k diagnostice infekce většinou nepoužívá (Martínek 2001).

### **1.6.2 Invazivní metody**

U invazivních metod je nutné odebrat bioptické vzorky žaludeční sliznice při endoskopickém vyšetření. Endoskopické vyšetření je indikováno u pacientů nad 45 let věku kvůli vyloučení karcinomu žaludku a také u pacientů po léčbě, kteří jsou nadále symptomatictí.

### 1.6.2.1 Histologické vyšetření

Obrázek 1: Anatomie žaludku



Zdroj:Silbernagl (1981)

K histologickému vyšetření se doporučuje odebrat dva vzorky z antra a dva z těla žaludku. Při barvení vzorků se dříve užívala impregnace stříbřením podle Warthina-Starryho. Nyní se dává přednost metodě podle Giemsy. Užívá se i novější metoda dle Genty, kde je dobře viditelná i okolní tkáň. *Helicobacter pylori* je patrný i v běžném barvení hematoxylin–eosin. Výhodou histologického vyšetření je možnost určit pokročilost zánětu a odhalit přítomnost případných změn žaludeční sliznice, jako jsou atrofie, intestinální metaplazie, dysplazie, popřípadě i jiné histopatologické změny. Slouží i ke stanovení přítomnosti a počtu *Helicobacter pylori*. Senzitivita a specificita testu je asi 90 % a závisí na typu barvení.

Pro dosažení co nejlepších výsledků u pacientů s léčbou protonovými inhibitory je nezbytné odebrat větší množství vzorků ze všech oblastí žaludku, protože při léčbě dochází k šíření *Helicobacter pylori* z antra do těla a fundu žaludku (*H. pylori* – současný stav 2010, Švestka 2011). Jednotlivé části žaludku jsou zobrazeny na obrázku č. 1.

### 1.6.2.2 Molekulárně genetické metody

Molekulárně genetické metody jsou velice přesné metody s vysokou senzitivitou a specificitou. Prokazuje se jimi přítomnost DNA bakterie ve vyšetřovaných vzorcích. Mohou se využít k dourčení kmene *Helicobacter pylori* z narostlé kultury při kultivačním vyšetření. Umožňují prokázat *Helicobacter pylori* dokonce i v kontaminovaných vzorcích, např. ve slinách, stolici a dokonce i ve zdrojích pitné vody (v tomto případě by se jednalo o neinvazivní metody).

Pro průkaz přítomnosti nukleových kyselin *Helicobacter pylori* se nejčastěji využívá polymerázová řetězová reakce (PCR).

PCR prokazuje určitý fragment deoxyribonukleové kyseliny po jeho namnožení (amplifikaci), která je zahájena přidáním specifického primeru. Reakce probíhá v termocykleru. PCR se skládá z několika kroků. Prvním krokem je denaturace DNA, při které dochází k rozvolnění dvoušroubovice při teplotě 95 °C. V druhém kroku (hybridizace) se primery (syntetické oligonukleotidy) navážou na specifická místa DNA podle komplementarity bází. Tento krok probíhá při 50-60 °C. Ve třetím kroku (polymerace) dochází díky polymeráze k syntéze nového řetězce od primeru. To probíhá při teplotě 72 °C. Tyto kroky se cyklicky opakují – cca třicetkrát. K vizualizaci se používá gelová elektroforéza s ethidiumbromidem. Velmi důležitým bodem je volba správného primeru, který se váže na daný úsek cílové DNA - jeho specificita určuje specifitu reakce. Pro detekci *Helicobacter pylori* se používá specifických primerů, které se vážou v oblasti genu pro ureázu *UreA* a *glmM* (dříve *ureC*), bičíky, nebo geny pro protein *cagA* nebo *vacA*. (Dongyou 2011, Sedláčková 1996).

Další molekulárně genetickou metodou je tzv. FRET PCR (Fluorescence resonance energy transfer) v reálném čase, která slouží k odhalení genových mutací z izolované kultury *Helicobacter pylori* získanou z bioptických vzorků žaludeční sliznice. Je schopna detekovat na rRNA geny kódující rezistenci bakterie k často užívanému antibiotiku – klaritromycinu (Dongyou 2011).

### 1.6.2.3 Mikrobiologické metody

Pro mikrobiologické metody se odebírají 2-4 vzorky z antra žaludeční sliznice (asi dva centimetry od pyloru) a eventuelně i z těla žaludku. Při větším odběru vzorků se senzitivita invazivních metod zvyšuje. Kolonizace žaludku *Helicobacter pylori* bývá někdy trvale ložisková. Bakterie má afinitu hlavně ke sliznici antra, později je zasažena i korporální sliznice. Po odběru se bioptický vzorek umístí do transportního media. Nejvhodnějším transportním mediem je např. thioglykolátová půda, Stuartovo transportní medium nebo také fyziologický roztok. Transportní medium zabraňuje vyschnutí vzorku a brání přístupu kyslíku. Transport vzorku se provádí při pokojové nebo chladničkové teplotě (Sedláčková 1996, Švestka 2011).

Mezi mikrobiologické metody patří mikroskopické vyšetření, rychlý ureázový test a kulturační vyšetření. Provádějí se na specializovaných pracovištích bakteriologie.

#### 1.6.2.3.1 Mikroskopie

Mikroskopické vyšetření je standardně používanou metodou. Vzorek musí být dobře rozmělněn na podložní sklíčko, fixován a obarven. Preparát se barví podle Grama (viz. níže), nebo jen karbolfuchsinem po dobu 20 sekund. Je možné také při endoskopickém vyšetření odebrat kartáčkem vzorek hlenové vrstvy, která kryje žaludeční sliznici. Hlen se rozetře na podložní sklíčko a je obarven podle Grama nebo Giemsky. Pozitivním nálezem jsou typické gramnegativní tyčky spirálovitého tvaru,

nebo zakřivené do tvaru písmene „S“ nebo „V“. V preparátu jsou často rozloženy nerovnoměrně, nejčastěji se nacházejí v hlenové vrstvě (Kyzeková 1998, Sedláčková 1996, Votava a kol. 2003).

### ***Barvení dle Grama***

Barvení dle Grama je jednou z nejpoužívanějších diagnostických metod při určování bakterií. Pomocí Gramova barvení se zjišťuje tvar bakterií, jejich velikost a uspořádání. Především pomáhá bakterie rozdělit na dvě základní taxonomické skupiny. Základním rozdělením bakterií je grampozitivní bakterie (G+) a gramnegativní bakterie (G-) Vyplyvá to z odlišné stavby buněčné stěny (Votava 2010).

Postup barvení dle Grama:

1. Zhotoví se nátěr suspenze bakteriální kultury
2. Preparát se ofixuje nad plamenem
3. Sklíčko se ve vodorovné poloze pokryje roztokem krystalové violeti
4. Na krystalovou violet se nalije Lugolův roztok
5. Preparát se opláchne vodou
6. Preparát se opláchne acetonem
7. Preparát se opláchne vodou
8. Preparát se dobarví ředěným karbolfuchsinem nebo safraninem
9. Preparát se nechá osušit a prohlíží se při imerzním zvětšení (1000×)

Barvení dle Grama se provádí buď ručně nebo v barvicích automatech. Fixovaný preparát se nejprve barví krystalovou violetí, která všechny bakteriální buňky obarví tmavomodře. Poté se přidá roztok s jódem, používá se Lugolův roztok. Krystalová violet s jódem vytvoří komplex, který se naváže na peptidoglykany, vyskytující se v bakteriální stěně. Poté následuje odbarvování preparátu acetonem. U grampozitivních



bakteriích se komplex nevyplaví a zůstanou tmavomodré. Pokud se komplex vyplaví, tak se bakterie následně obarví červeným barvivem - safraninem nebo zředěným karbofuchsinem. Výsledné barvení je červené - u gramnegativních bakterií.

Stěna grampozitivních bakterií je složena z peptidoglykanu, převážně z kyseliny acetylmuranové. Takto uspořádané složení brání vyplavení komplexů krystalové violeti s jódem.

U gramnegativních bakterií je bakteriální stěna slabší. Jedna z hypotéz poukazuje, že stěna obsahuje více lipidů než je tu u grampozitivních bakterií a vlivem odbarvování alkoholem dochází k tvorbě vakuol a tím se barevný komplex snáz vyplaví (Kramář 2007, Votava 2010).

#### **1.6.2.3.2 Rychlý ureázový test**

Rychlé ureázové testy jsou velmi rozšířené, protože jsou levné, snadno dostupné a rychlé. V současnosti je na trhu celá řada těchto testů (např. CLO test). K tomuto vyšetření se odebírá jedna nebo dvě biopsie (z antra a těla žaludku), které se umístí do předem připravených platíček nebo zkumavek s tekutým nebo polotekutým médiem. Test se provádí ve zkumavce obsahující substrát, močovinu a indikátor pH, kterým je fenolová červeň. Pokud je ve vzorku přítomna ureáza, štěpí močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Dojde ke zvýšení pH a nažloutlá barva indikátoru se v zásaditém prostředí změní na červenou. U některých pacientů je vzorek pozitivní do několika minut. Za negativní výsledek se považuje, pokud nedojde k barevné změně indikátoru do 24 hodin. Senzitivita testu je až 90 %, ale je často ovlivněna množstvím bakterií ve vzorku. K pozitivní reakci dojde, pokud je nejméně  $10^5$  mikroorganismů ve vzorku. Pokud je pacient léčen antibiotiky nebo IPP, senzitivita se snižuje, jako u ostatních testů založených na enzymatické aktivitě mikroorganismů. Falešná pozitivita testu může být způsobena přítomností jiných bakterií produkujících ureázu ve vzorku.

Jsou k dispozici i ureázové testy, podle kterých lze hodnotit denzitu bakteriálního osídlení semikvantitativně. Denzita je přímo úměrná zabarvení indikátoru. Senzitivita a

specifická je až 89 %. Vyvíjejí se i další testy s novými indikátory, které mění barvu rychleji než u dosud užívaných testů a lze je aplikovat i během endoskopického vyšetření přímo na žaludeční sliznici (Dongyou 2011, Martínek 2001, Votava 2010).

### **1.6.2.3.3 Kultivace**

Kultivace je poměrně drahá a časově náročná metoda. Ze studií vyplývá senzitivita 80-90 %, specifická dosahuje 98-100 %. Životaschopnost bakterií se snižuje při vystavení nepříznivým podmínkám jako je např. expozice kyslíku. Koncentrace bakterií ve vzorku nebo přítomnost kokoidních forem může také ovlivnit citlivost tohoto testu (Fonseca 2009, Zálabská 2010).

Je doporučována při selhání eradikační léčby a umožňuje stanovení citlivosti k běžně používaným antibiotikům při eradikační léčbě (Leszcynska 2010).

*Helicobacter pylori* patří mezi obtížně kultivované bakterie. Potřebuje speciální obohacené půdy, delší dobu kultivace a mikroaerofilní prostředí. Materiál se očkuje na tuhé půdy - jako základ půd se používá BHI nebo *Columbia*, připravené již ve formě čokoládového agarů, nebo mohou být doplněné lyzovanou krví (nejčastěji koňskou), nebo obohacené růstovými faktory např. IsoVitaleXem a heminem.

Selektivní půdy jsou obohaceny tzv. Dentovým suplementem obsahující 10mg vankomycinu, 5mg trimethoprimu, 5mg cefsulodinu a 5mg amfotericinu B na litr media (Votava 2000).

Inkubuje se při 37 °C za mikroaerofilních podmínek (5 % kyslíku, 10 % oxidu uhličitého 85 % dusíku) po dobu 5-7 dnů (Fonseca 2009).

#### ***Příprava půdy BHI***

Směs se sterilizuje v autoklávu 15 minut. Po vyndání z autoklávu se ještě do horké půdy přidá 80 ml beraní krve. Po obohacení beraními erytrocyty se půda zchladí na 50

°C. Poté se přidá 50 ml koňského séra a 10 ml suplementu A. Půda musí mít neutrální pH.

## **1.7 Stanovení citlivosti k antibiotikům**

Po kultivaci následuje stanovení citlivosti k antibiotikům. Zjištění citlivosti je důležité pro eradikační léčbu infekce. Stanovuje se diskovým difúzním testem a E-testem.

### **1.7.1 Diskový difuzní test**

Diskový difuzní test je nejvíce používaným testem ke stanovení citlivosti v praxi. Jedná se o kvantitativní test. Agarová plotna se očkuje suspenzí bakterie *Helicobacter pylori* o hustotě 3-4 McFarland. Na naočkovánou plotnu se položí disky s antibiotiky. Inkubuje se 48 hodin při 37 °C v mikroaerofilní atmosféře. Poté se změří průměr inhibiční zóny v mm, buď ručně pomocí posuvného měřítka nebo automaticky digitálním zařízením. Pokud inhibiční zóna je větší nebo rovna stanovené hraniční hodnotě (v mm), je bakterie k antibiotiku citlivá. Je-li zóna menší než hraniční hodnota, nebo je růst patrný až k disku, je bakterie k antibiotiku rezistentní. Disková difuzní metoda nebyla pro *Helicobacter pylori* dosud standardizována (Lee 1996, Schindler 2010).

### **1.7.2 E-test**

E-test je kvantitativní difuzní metoda. Z narostlé kultury se připraví suspenze o hustotě 3 McFarland a naočkuje se na neselektivní kultivační půdu. Poté se na naočkovanou půdu položí plastický proužek obsahující antibiotikum v koncentračním

gradientu. Po inkubaci je patrná zóna zábrany růstu elipsovitého tvaru. V místě, kde zóna přetíná proužek se odečítá tzv. MIC (minimální inhibiční koncentrace). Pokud je MIC menší nebo rovna hraniční koncentraci (break-pointu) pro dané antibiotikum, je bakterie k antibiotiku citlivá, pokud je MIC větší než hraniční koncentrace, je bakterie k antibiotiku rezistentní (Lee 1996).

## 2. Cíl práce

- Zhodnocení současných možností laboratorní diagnostiky *Helicobacter pylori* v mikrobiologické laboratoři
- Porovnání senzitivity jednotlivých diagnostických metod prováděných na Pracovišti bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s.
- Zhodnocení věkové distribuce výskytu *Helicobacter pylori* ve vzorku populace
- Stavů rezistence *Helicobacter pylori* k antimikrobiálním látkám ve vzorku populace

## **3. Metodika**

### **3.1 Charakteristika zkoumaného souboru**

Na Pracovišti bakteriologie v Laboratoři lékařské mikrobiologie v Centrálních laboratořích Nemocnice České Budějovice, a.s. (dále jen Pracoviště bakteriologie) jsem vyšetřovala materiál na průkaz *Helicobacter pylori*. Vyšetřovaným materiálem byly bioptické vzorky žaludeční sliznice odebírané zejména na Gastroenterologickém oddělení a Dětském oddělení nemocnice.

Dále jsem prováděla průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ze vzorku stolice. Tento materiál zasílalo nejčastěji Dětské oddělení a ambulantní specialisté.

### **3.2 Odběr a transport materiálu do mikrobiologické laboratoře**

Bioptický vzorek žaludeční sliznice odebraný při endoskopickém vyšetření se obvykle transportuje do laboratoře přímo na tuhé kultivační půdě (lehce vtisknut pod povrch půdy). Vzorek lze také zaslat v transportním mediu ve zkumavce (např. v cca 1ml thioglykolátového bujónu). Na Gastroenterologickém oddělení se vždy odebírají dva vzorky z antra a těla žaludku pro lepší záchyt *Helicobacter pylori*. Na Dětském oddělení odebírají zpravidla vždy jen jeden bioptický vzorek. Do transportu se vzorek uchovává při chladničkové teplotě.

### 3.3 Metody

Vzorek žaludeční biopsie jsem nejdříve pečlivě zhomogenizovala mezi dvěma sterilními podložními sklíčky a rozdělila ho na tři části pro jednotlivé diagnostické metody, kterými jsou mikroskopický preparát, kultivace a rychlý ureázový test.

#### 3.3.1 Mikroskopický preparát

Nejprve se na spodní stranu podložního sklíčka napíše číslo vzorku. Homogenizovaný vzorek se rozetře na podložní sklíčko a ofixuje se nad plamenem. Poté se obarví dle Grama. Na Pracovišti bakteriologie se barví v barvicím automatu systému MIRASTAINER<sup>®</sup>, který dokáže obarvit až 30 sklíček najednou. Sklíčka se vkládají do držáku, který se upevní na rameno automatu. Držák se sklíčky se zanořuje do jednotlivých barvicích lázní s roztokem umístěných v automatu. Proces barvení je podrobně popsán v tab. 2. Doba barvení je 8 minut a systém MIRASTAINER<sup>®</sup> konec barvení oznámí zvukovým signálem. Preparát se prohlíží pod imerzním olejem při zvětšení 1000×. Prohlíží se celá plocha preparátu. Zejména v hlenové vrstvě jsou nalézány štíhlé esovitě zahnuté gramnegativní bakterie (Příloha 1). Hodnotí se i kvantita nálezu *Helicobacter pylori* (+, ++, +++). Kromě přítomnosti nebo nepřítomnosti *Helicobacter pylori* se v mikroskopickém preparátu popisuje nález epitelí, leukocytů, erytrocytů a eventuálně i přítomnost jiné mikrobiální flóry. Výsledek mikroskopie se telefonicky sděluje ještě tentýž den na příslušná oddělení.

Tabulka 2: Postup barvení dle Grama v barvicím automatu

Roztok	Čas
roztok krystalové violeti	1 min. 30 sek.
proplach	30 sek.
Lugolův roztok	1 min. 30 sek.
proplach	30 sek.
odbarvovací roztok	30 sek.
proplach	30 sek.
roztok safraninu	30 sek.
proplach	30 sek.
sušení	2 min.

### 3.3.2 Rychlý ureázový test

Rychlý ureázový test se provádí metodou dle Christensena v tekutém médiu. Princip metody spočívá ve změně pH citlivého indikátoru při rozpadu močoviny na amoniak a oxid uhličitý. Reakce probíhá pouze v přítomnosti ureázy ve vyšetřovaných vzorcích. Amoniak způsobí v tekutém prostředí zvýšení pH a dojde k červenému zabarvení indikátoru, kterým bývá fenolová červeň. Provedení testu je jednoduché. Do tekutého média se ponoří vzorek bioptické tkáně a inkubuje se cca 16 hod při 37 °C. Druhý den ráno se odečítá barevné zabarvení indikátoru. Pokud nedojde k barevné změně je výsledek považován za negativní. Pozitivní a negativní ureázový test je zobrazen v příloze 3.



### 3.3.3 Kultivace

Materiál se naočkuje na diagnostickou půdu HPFA (se suplementem F) od firmy fa Dulab s.r.o. a paralelně se také naočkuje na krevní agar (neselektivní pevnou kultivační půdu) pro vyloučení přítomnosti kontaminující flóry, která by mohla způsobit falešnou pozitivitu ureázového testu.

Kultivace probíhá v mikroaerofilní atmosféře. Vhodné mikroaerofilní atmosféry (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> a 10 % H<sub>2</sub>) se docílí v LAS (Látalův anaerobní systém) systému (Příloha 5).

Veškeré části systému LAS dodává firma Trios, spol. s. r.o. Systém LAS se skládá z těchto základních částí:

- přístroj LAS
- plynová láhev
- dvoucestný redukční ventil
- aplikační sáček
- plyn nebo směs plynů
- katalyzátor

Přístroj LAS je zařízení, ve kterém se odsaje vzduch z uzavřeného prostoru (tzv. vakuování komory) pomocí výkonné elektrické rotační vývěvy a následně dojde k naplnění vakuovací komory plynem definovaného složení, kvality a objemu z připojené plynové lahve.

Na Pracovišti bakteriologie se LAS využívá jednak pro vytvoření anaerobní atmosféry, kdy dochází k úplné vakuaci (ze 100 %), používá se kultivační sáček zlaté barvy a katalyzátor. Pro vytvoření mikroaerofilní atmosféry dochází pouze k částečné vakuaci ze 75 %, používá se průhledný kultivační sáček bez katalyzátoru.

Petriho miska se vkládá opačně než je běžně zvykem, tj. tedy víčkem nahoru a kultivační půdou dolů, proto aby se zamezilo uvolnění agarů během cyklu vakuování.

Velikost aplikačního sáčku se volí dle velikosti a počtu kultivovaných misek. Aby zatavení sáčku bylo kvalitní je nutné nechat dostatečně velký okraj sáčku tj. 40 – 50 mm.

Horní okraj sáčku se vkládá do zářezu držáku plynové trysky. Víko vakuovací komory se zavírá oběma rukama současně a mírně se přitlačí, dokud se nerozběhne cyklus vakuování. Přístroj začne vytvářet vakuum, které udrží víko zavřené. Po vyčerpání vzduchu se do komory automaticky vpustí předem definované množství směsi plynů z plynové lahve. Vlivem tlakových změn může v této fázi docházet k pohybu misek v sáčku. Naplnění sáčku plynem závisí na jeho velikosti a počtu vložených misek. Příliš malé množství plynu může způsobit deformaci misky, až její znehodnocení. Před prvním použitím přístroje je doporučeno si vyzkoušet optimální nastavení množství plynu. Zatavený sáček se dále kultivuje v termostatu.

Kultivace v termostatu při 37 °C trvá 5-7 dní. Narostlé kolonie *Helicobacter pylori* jsou drobné, našedlé, ploché a částečně transparentní. Pro ověření identifikace je možné zhotovit z narostlé kultury mikroskopický preparát. Pro *Helicobacter pylori* je charakteristická polymorfie gramnegativních tyček a vláken, typické je zakřivení do tvaru písmene J a U (Příloha 2). Z biochemických testů je možné provést oxidázový test a katalázový test, které jsou u kmenů *Helicobacter pylori* pozitivní. V případě pochybností je možné identifikace kmene z narostlé kultury potvrdit metodou PCR.

### **3.3.4 Stanovení citlivosti k antibiotikům**

Stanovení citlivosti k antibiotikům se provádí na Pracovišti bakteriologie diskovým difuzním testem. Po úspěšné kultivaci se naočkují suspenzí kmene 4 neselektivní půdy bez přidaných antibiotik M-HF by Biorad. Disk je napuštěný určitým množstvím antibiotika a pokládá se vždy doprostřed neselektivní půdy. Na jedné půdě se testuje vždy jen jedno antibiotikum. Inkubuje se 48 hodin při 37 °C v mikroaerofilním prostředí. Po inkubaci se změří průměr inhibiční zóny okolo disku. Průměr inhibiční zóny se měří v mm a porovnává se s hraniční hodnotou (také v mm) pro dané

antibiotikum. Pokud bakterie neroste v okolí disku a zóna zábrany růstu je větší nebo rovna hraniční hodnotě, je bakterie citlivá k danému antibiotiku. Pokud je k antibiotiku rezistentní, tak je inhibiční zóna menší než hraniční hodnota, nebo inhibiční zóna není patrná a bakterie roste až k disku. U kmenů *Helicobacter pylori* se testuje citlivost k azitromycinu, metronidazolu, ampicilinu a doxycyklinu.

Tabulka 3: Hraniční hodnoty inhibičních zón pro *Helicobacter pylori* u vybraných antibiotik

Kód ATB	Antibiotikum	Citlivost	Rezistence
AZI	azitromycin	$\geq 15$	$< 15$
MET	metronidazol	$\geq 20$	$< 20$
AMP	ampicilin	$\geq 17$	$< 17$
DOX	doxycyklin	$\geq 19$	$< 19$

Poznámka: hodnoty v tabulce udávají průměr inhibiční zóny v mm

Zdroj: Pracoviště bakteriologie

### 3.3.5 Průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici

Průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve vzorku stolice je neinvazivní membránový test založený na principu imunochromatografické metody. Test je přesný, snadno proveditelný a rychlý a výsledek je během několika minut.

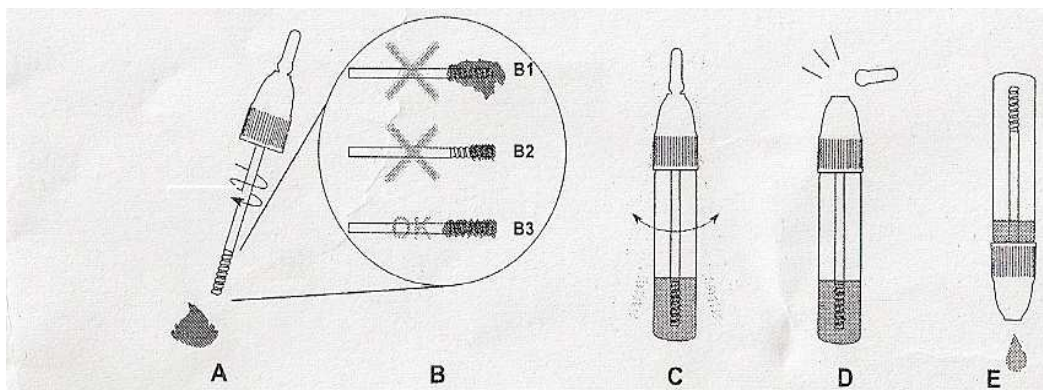
Test využívá monoklonální protilátku proti antigenu *Helicobacter pylori*. Po přidání vzorku (stolice rozpuštěná v pufru) se barevně označené protilátky navážou na bakterie, pokud jsou přítomny ve vzorku a vytvoří se komplex. Ten přechází přes membránu pomocí kapilárního vztlínání a je zachycen pomocí jiných specifických protilátek v zóně testovací linie testu. Objeví se červená testovací linie. Pokud není přítomen *Helicobacter pylori* ve vzorku, nedojde k navázání barevně značených protilátek v zóně testovací linie T a nevytvoří se žádná testovací linie. Za pozitivní

výsledek lze považovat přítomnost červené testovací linie, její nepřítomnost značí negativitu testu.

Je nutné aby se objevila barevná linie i v kontrolní zóně. Potvrzuje, že bylo adekvátní množství vzorku a došlo ke správnému vzlínání na membráně.

Na Pracovišti bakteriologie používají diagnostický test od firmy Coris BioConcept. Každý diagnostický set obsahuje testovací kazetu a plastovou nádobku s pufrem. Nejprve se set nechá vytemperovat na pokojovou teplotu (15-30 °C). Po vytemperování se vyjme testovací kazeta z obalu a popíše se příslušným číslem vzorku. Pak se odšroubuje víčko s odběrovou tyčinkou nádobky a pomocí ní se odebere vzorek stolice (obr. 2). Odebírá se tak aby stolice ulpěla ve spirále odběrové tyčinky. U tekuté stolice se odebírá pomocí jednorázové pipety 80 µl. Aplikátor se vrátí zpět do nádobky a víčko se pevně zašroubuje. Poté se pomocí třepačky vzorek důkladně promíchá s pufrem. Po protřepání vzorku se odlomí špička na víčku nádobky a nakapou se čtyři kapky do kruhové jamky testovací kazety pomocí jemného tlaku na stěnu testovací nádobky (obr. 3). Je důležité kapat bez vytvoření vzduchových bublin. Výsledek testu se odečítá za 15 minut. Vyhodnocení testu zobrazuje obrázek 3.

Obrázek 2: Odběr vzorku a provedení testu



Zdroj: Příbalový leták diagnostického testu od firmy Coris BioConcept

Popis obrázku:

A - náběr stolice

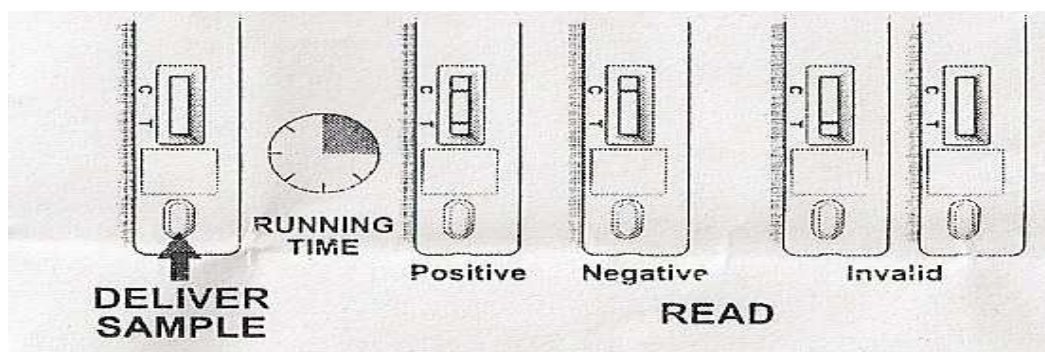
B - B1- nadměrné množství stolice, B2- malé množství stolice, B3- ideální odběr

C - homogenizace vzorku

D - odlomení špičky uzávěru

E - nakapání suspenze do jamky testovací kazety

Obrázek 3: Vyhodnocení testu



Zdroj: Příbalový leták diagnostického testu od firmy Coris BioConcept

## 4. Výsledky

V roce 2011 bylo na Pracovišti bakteriologie vyšetřeno 599 bioptických vzorků žaludeční sliznice na průkaz infekce *Helicobacter pylori*. Pro průkaz infekce *Helicobacter pylori* svědčila pozitivita alespoň jednoho ze tří diagnostických testů – mikroskopie, ureázového testu a kultivace. V případě, že byly od pacienta najednou odebrány dva bioptické vzorky, vyšetřily se paralelně všemi třemi metodami, ale nakonec byly vyhodnoceny jako jeden vzorek.

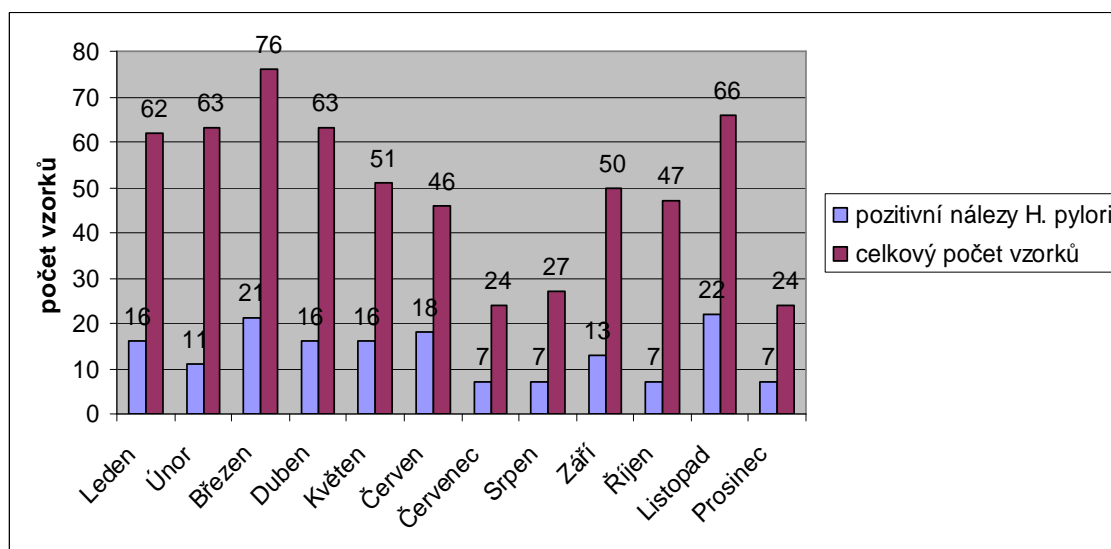
Nejčastěji byly vzorky odebírány na Gastroenterologickém oddělení. Druhým nejčastěji zasílajícím oddělením bylo Dětské oddělení.

Tabulka 4: Počet pozitivních a negativních nálezů ze souboru vzorků za rok 2011

	Počet pozitivních nálezů		Počet negativních nálezů		Celkem
	muži	ženy	muži	ženy	
Leden	7	9	15	31	62
Únor	6	5	20	32	63
Březen	12	9	18	37	76
Duben	5	11	21	26	63
Květen	9	7	12	23	51
Červen	8	10	15	13	46
Červenec	5	2	9	8	24
Srpen	4	3	8	12	27
Září	7	6	18	19	50
Říjen	3	4	14	26	47
Listopad	11	11	19	25	66
Prosinec	5	2	8	9	24
Celkem	82	79	177	261	599

Infekce byla prokázána u 161 pacientů (26,9 %). Z nichž bylo 82 (51 %) mužů a 79 žen (49 %).

Graf 1: Počet pozitivních nálezů ze souboru biotických vzorků v jednotlivých měsících



Nejvíce pozitivních nálezů bylo v měsíci březnu a listopadu.

Tabulka 5: Možné kombinace pozitivity a negativity jednotlivých diagnostických testů a jejich procentuální vyjádření

Diagnostické testy			Počet vzorků	Procentuální vyjádření
mikroskopie	ureázový test	kultivace		
+	-	-	7	4,3 %
-	+	-	3	1,9 %
-	-	+	15	9,3 %
+	+	-	11	6,8 %
-	+	+	1	0,62 %
+	-	+	64	39,8 %
+	+	+	60	37,3 %

pozitivní (+), negativní (-)

Nejčastěji byla infekce potvrzena pozitivitou mikroskopie a kultivace – 39,8 %.  
Následovala pozitivita všech tří testů v 37,3 %.

Tabulka 6: Počet a procentuální vyjádření positivity jednotlivých testů

Diagnostický test	Pozitivita	Procentuální vyjádření
mikroskopie	142×	88,2%
ureázový test	75×	46,5%
kultivace	140×	86,9%

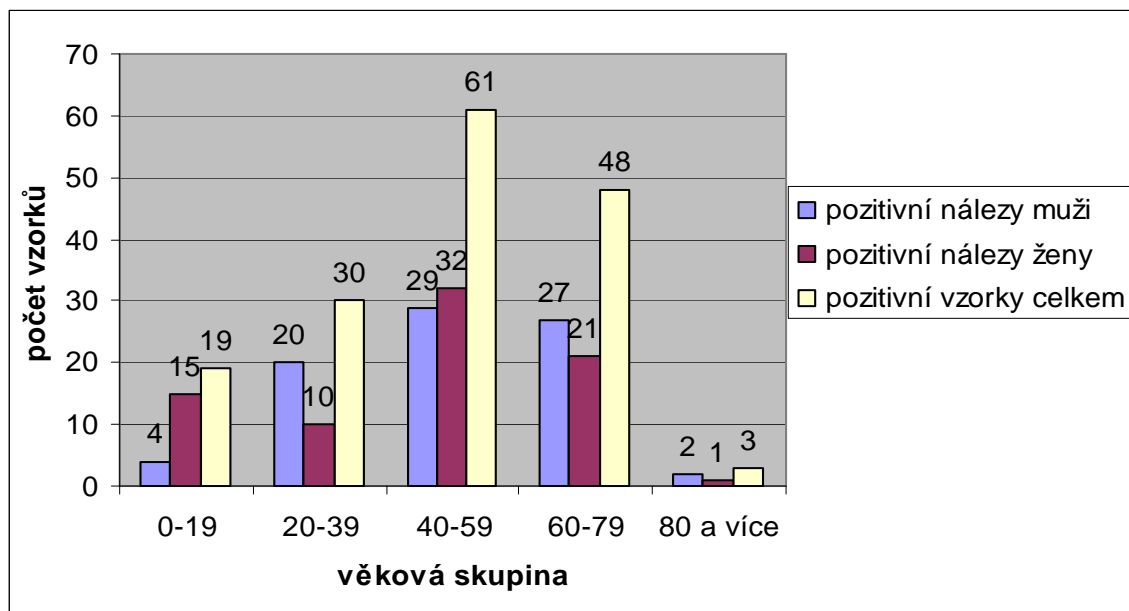
Jako nejméně senzitivní vychází ureázový test. Senzitivita je přibližně poloviční oproti mikroskopii a kultivaci.

Tabulka 7: Počet pozitivních nálezů v závislosti na pohlaví a jejich procentuální vyjádření u věkových skupin

Věková skupina	Pozitivní nálezy v závislosti na pohlaví				Celkem (pozitivních nálezů)
	muži	muži [%]	ženy	ženy [%]	
0-19	4	21,1	15	78,9	19
20-39	20	66,6	10	33,3	30
40-59	29	47,5	32	52,5	61
60-79	27	56,3	21	43,8	48
80 a více	2	66,7	1	33,3	3



Graf 2: Pozitivní nálezy *Helicobacter pylori* ze souboru biotických vzorků v závislosti na věkové skupině



Nejvyšší záchyt infekce *Helicobacter pylori* byl u věkové skupiny 40-59 let (61 pozitivních nálezů), poté následovala skupina 60-79 let (48 pozitivních nálezů).

V případě pozitivního kultivačního nálezu *Helicobacter pylori* byla testována citlivost k vybraným antibiotikům diskovým difuzním testem. Testovala se citlivost k ampicilinu, metronidazolu, azitromycinu a doxycyklinu. Citlivost se testovala u 140 kmenů. U tří kmenů citlivost nevyrostla. Citlivost byla vyhodnocena u 137 kmenů (Tab. 8), (Graf 3).

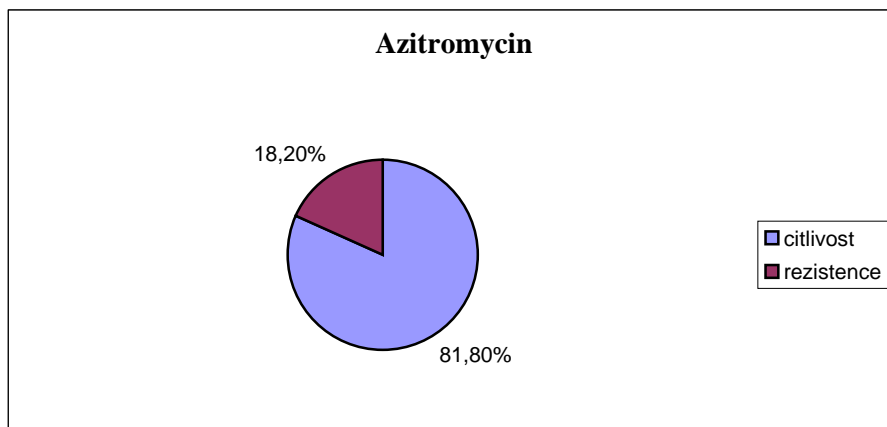
Tabulka 8: Přehled citlivosti a rezistence u kmenů *Helicobacter pylori* k jednotlivým antibiotikům

Antibiotikum	Počet testovaných kmenů	Citlivost (počet kmenů)	Citlivost [%]	Rezistence (počet kmenů)	Rezistence [%]
azitromycin	137	112	81,8	25	<b>18,2</b>
metronidazol	137	79	57,7	58	42,3
ampicilin	137	134	97,8	3	2,2
doxycyklin	137	137	100	0	0

Pro lepší přehlednost je znázorněna v grafu 3 citlivost k jednotlivým antibiotikům. Z grafu vyplývá, že metronidazol je antibiotikum, ke kterému je kmen *Helicobacter pylori* nejvíce rezistentní. U žádného kmene nebyla zaznamenána rezistence k doxycyklinu.

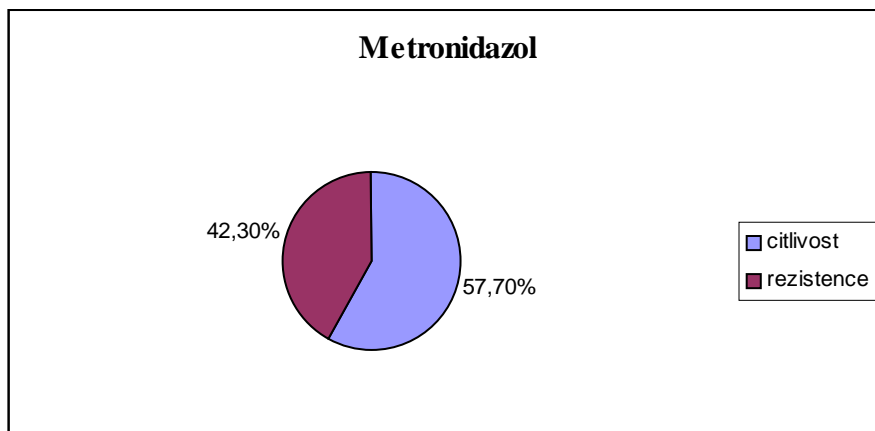
Graf 3: Citlivost *Helicobacter pylori* k antibiotikům

Graf 3.1: Citlivost k azitromycinu



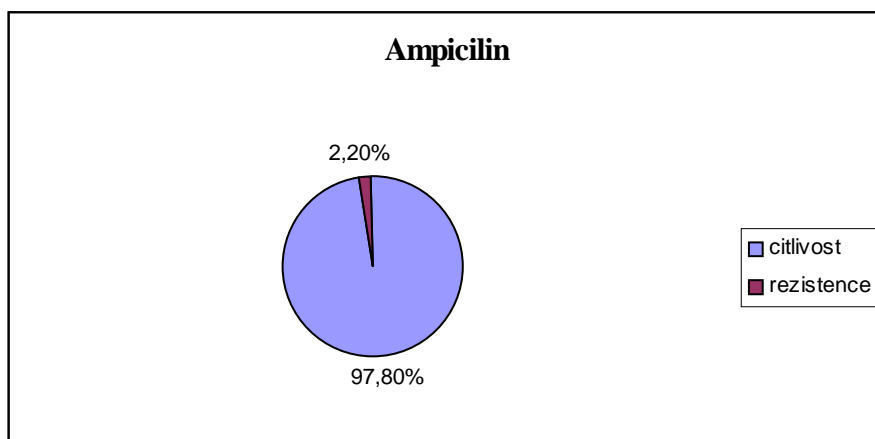
Z celkového počtu 137 kmenů *Helicobacter pylori* byla zjištěna rezistence u 25 kmenů - 18,2 % kmenů bylo rezistentních k azitromycinu.

Graf 3.2: Citlivost k metronidazolu



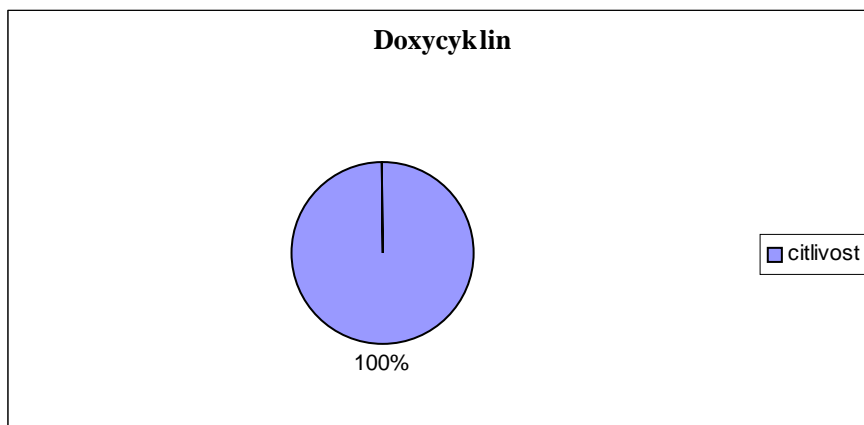
Z celkového počtu 137 kmenů *Helicobacter pylori* byla zjištěna rezistence u 58 kmenů - 42,3 % kmenů bylo rezistentních k metronidazolu.

Graf 3.3: Citlivost k ampicilinu



Z celkového počtu 137 kmenů *Helicobacter pylori* byla zjištěna rezistence pouze u 3 kmenů - 2,2 % kmenů bylo rezistentních k ampicilinu.

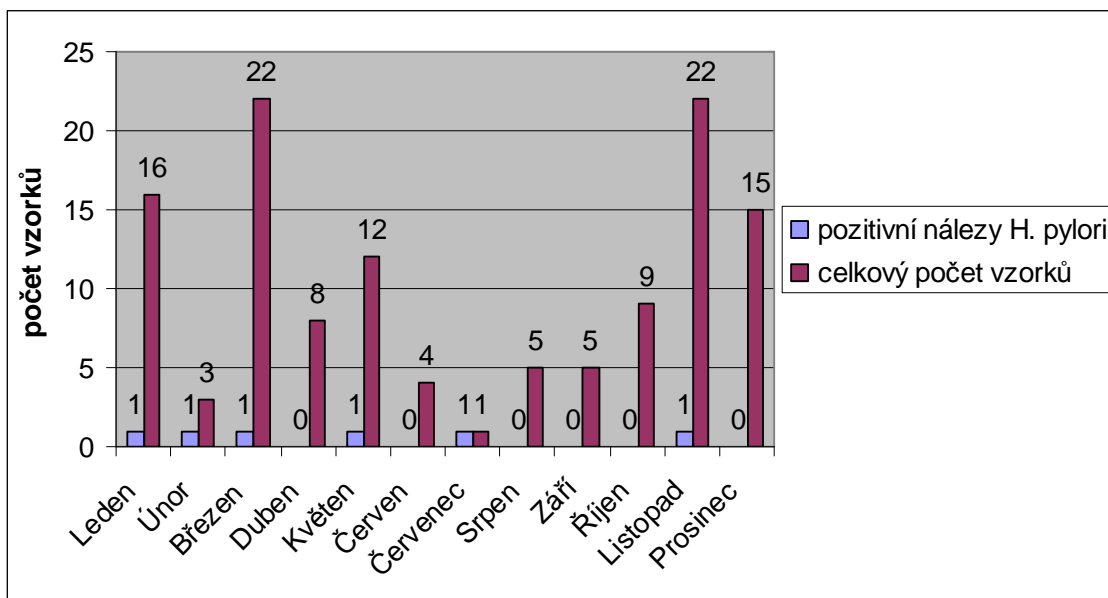
Graf 3.4: Citlivost k doxycyklinu



U žádného kmene *Helicobacter pylori* z celkového počtu 137 nebyla zjištěna rezistence k doxycyklinu.

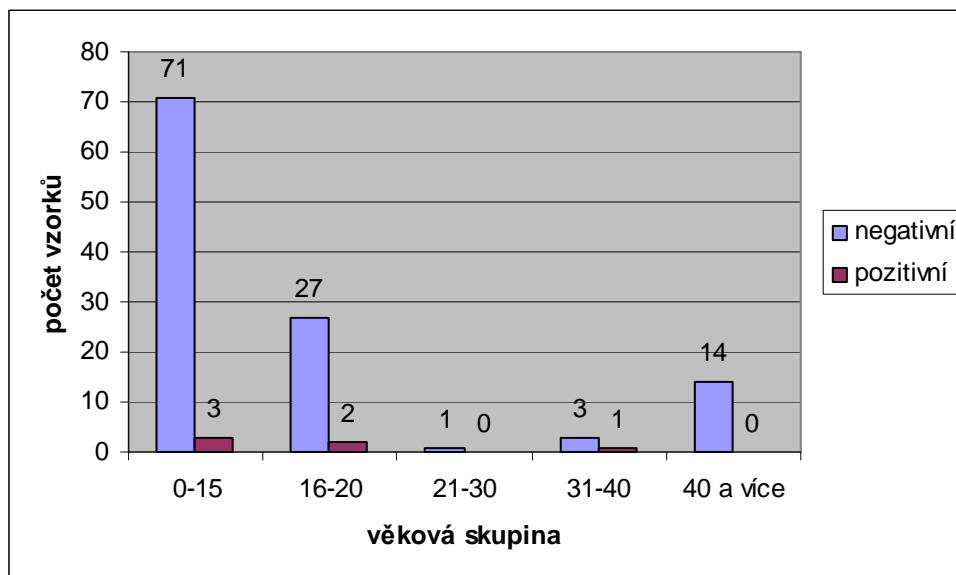
Za rok 2011 bylo zasláno na Pracoviště bakteriologie Nemocnice České Budějovice, a.s. 122 vzorků stolice k detekci antigenu *Helicobacter pylori* (Graf 4).

Graf 4: Počet pozitivních nálezů antigenu *Helicobacter pylori* ve vzorku stolice v jednotlivých měsících



Nejčastěji byla zasílána stolice k průkazu antigenu v měsíci březnu a listopadu. Antigen byl prokázán u 6 vzorků.

Graf 5: Počet pozitivních a negativních nálezů průkazu antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici v závislosti na věkové skupině



Nejčastěji byly vzorky stolice odebírány od dětských pacientů ve věku 0-15 let.

## 5. Diskuse

*Helicobacter pylori* je původce chronické gastritidy. V současné době je k dispozici řada diagnostických metod, které potvrdí infekci. Pro přímý průkaz infekce (pro histologické vyšetření a mikrobiologické metody) se odebírá vzorek žaludeční sliznice, nebo vzorek stolice na průkaz antigenu *Helicobacter pylori*. Pro nepřímý průkaz infekce (pro průkaz protilátek) se odebírá vzorek srážlivé krve. Na některých pracovištích se provádí dechový test.

Na Pracovišti bakteriologie v Laboratoři lékařské mikrobiologie v Centrálních laboratořích Nemocnice České Budějovice, a.s. se bioptický vzorek žaludeční sliznice vyšetřuje třemi diagnostickými metodami: mikroskopií, kultivačním vyšetřením a ureázovým testem. Pro průkaz infekce svědčí pozitivita alespoň jedné z těchto tří metod. V roce 2011 bylo na Pracovišti bakteriologie vyšetřeno 599 bioptických vzorků. Infekce byla prokázána u 161 pacientů. Nejčastěji byla infekce potvrzena pozitivitou mikroskopie a kultivace – u 64 vzorků, následovala pozitivita všech tří testů – u 60 vzorků. Mikroskopie byla pozitivní celkem 142×, kultivace 140× a ureázový test 75×. Ureázový test byl negativní u 53,4 % pozitivních nálezů *Helicobacter pylori*. Příčina nízké senzitivity ureázového testu může být v provedení jednotlivých diagnostických metod. Jeden odebraný bioptický vzorek se používá pro všechny tři diagnostické metody. Část bioptického vzorku se použije pro zhotovení mikroskopického preparátu, další část slouží ke kultivačnímu vyšetření a zbytek vzorku se ponoří do tekutého média (obsahující močovinu) pro ureázový test. Příčinou falešné negativity testu může být velice malá část vzorku, která obsahuje nízkou koncentraci bakterií, nebo ve vzorku bakterie přítomné nejsou vůbec (kvůli nerovnoměrnému osídlení žaludeční sliznice helikobakterem). Ureázový test je závislý na enzymové aktivitě. Pokud je aktivita ureázy nízká, nedojde k barevné změně indikátoru a test se vyhodnotí jako negativní. Přesnějších výsledků ureázového testu se může dosáhnout, pokud se odebírá více vzorků - zvyšuje se tak pravděpodobnost vyššího záchytu (na Dětském oddělení odebírají zpravidla jen jeden bioptický vzorek, na Gastroenterologickém oddělení

většinou dva vzorky). Senzitivita ureázového testu může být také ovlivněna použitou - home-made metodou dle Christensena, která nemusí dosahovat tak vysoké senzitivity (jako např. u CLO testu 90 %).

Vzhledem k nízké senzitivitě ureázového testu je otázkou zda je možné brát k průkazu infekce *Helicobacter pylori* samotný ureázový test. Mohlo by se jednat i o falešnou pozitivitu testu – např. kvůli přítomnosti jiných bakterií produkujících ureázu ve vzorku, mezi které patří například: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella* a *Providencia*. V tomto případě by bylo vhodné vyšetření opakovat. Ve sledovaném období se jednalo o tři samotné positivity ureázového testu. U jednoho případu byla paralelní kultivací na krevním agaru potvrzena kontaminující flóra.

V současné době je celosvětově zaznamenána narůstající rezistence bakterií k antibiotikům a tento problém se týká i druhu *Helicobacter pylori*. Z testovaných kmenů bylo 12,2 % rezistentních k azitromycinu, 2,2 % rezistentních k ampicilínu a žádný kmen nebyl rezistentní k doxycyklinu. Kmenů *Helicobacter pylori* rezistentních k metronidazolu bylo 42,3 %. Podle studie Lochmannové vydané v roce 2004 byla v České republice ve sledovaném období 1998-1999 rezistence *Helicobacter pylori* k metronidazolu 42 % (Lochmannová 2004). Moje studie byla prováděna v roce 2011 a rezistence je srovnatelná se studií Lochmannové. Mezi studii je rozdíl 12ti let a rezistence se nijak nezměnila. Podle studie Lochmannové z roku 2010 je průměrná celosvětová rezistence k metronidazolu velice vysoká a dosahuje až 80 %. Kritická hranice pro úspěšné klinické použití v léčbě je výskyt rezistence *Helicobacter pylori* k metronidazolu 40 %. V případech, že je rezistence nižší než 40 %, lze tento přípravek v léčebné kombinaci ještě použít. Při rezistenci vyšší než 40 % je doporučeno tento lék v klinické praxi již nepodávat (Lochmannová 2010).

Nejčastěji byla infekce *Helicobacter pylori* prokázána u věkové skupiny 40-59 let. Ve vyspělých státech je výskyt infekce častý u vyšší věkové skupiny a u dětí je relativně nízký.

Na Pracoviště bakteriologie bylo v roce 2011 vyšetřeno celkem 122 vzorků stolice k detekci antigenu *Helicobacter pylori* imunochromatografickou metodou. Nejčastěji

byly vzorky odebírány u dětí do 15 let. Detekce antigenu je vhodná pro dětské pacienty, protože nemusí podstupovat endoskopické vyšetření.



## 6. Závěr

Infekce *Helicobacter pylori* v populaci je velice častá a je celosvětově rozšířená. V roce 2011 bylo na Pracovišti bakteriologie v Českých Budějovicích vyšetřeno 599 bioptických vzorků žaludeční sliznice, z toho bylo u 161 vzorků prokázán *Helicobacter pylori*. Infekce byla nejčastěji diagnostikována u věkové kategorie 40-59 let bez závislosti na pohlaví. V současné době je k dispozici řada laboratorních metod sloužících k průkazu infekce. Porovnáním jednotlivých diagnostických metod prováděných na Pracovišti bakteriologie bylo zjištěno, že citlivou metodou je mikroskopie a kultivační vyšetření. U pozitivního kultivačního nálezu byla testována citlivost k antibiotikům. Rezistence k metronidazolu byla zjištěna u 42,3 % kmenů, k azitromycinu u 18,2 % kmenů, k ampicilinu u 2,2 % kmenů a u žádného kmene nebyla zaznamenána rezistence k doxycyklinu. Na Pracovišti bakteriologie se provádí i jedna neinvazivní metoda - průkaz antigenu *Helicobacter pylori* ve vzorku stolice. Za rok 2011 bylo zasláno 122 vzorků nejčastěji z Dětského oddělení. Antigen byl prokázán pouze u 6 pacientů.

## 7. Klíčová slova

- *Helicobacter pylori*
- Mikroaerofilní bakterie
- CagA a VacA antigen
- Žaludeční a duodenální vřed
- MALT lymfom
- Rychlý ureázový test

## 8. Seznam použitých zdrojů

ABADI, Amin Talebi Bezmin et. al. *Helicobacter pylori* homB, but Not *cagA*, Is Associated with Gastric Cancer in Iran. *Journal of clinical microbiology*. 2011, vol. 49, s. 3191-3197. DOI 10.1128/JCM.00947-11

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, PAULÍK, Milan. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. 48 s. ISBN 978-80-3533-7

BEDNÁŘ, Marek. a kol. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996. s. 285-286. ISBN 8594031505280

BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén, 2009. s. 244-246 ISBN-13: 978-80-7262-644-1

DONGYOU, Liu. *Molecular detection of human bacterial pathogens*. Boca Raton: Taylor & Francis/CRC Press, 2011. s. 1141-1149. ISBN 978-1-4398-1238-9

FONSECA, Tesiê L. et al. Detection of *Helicobacter pylori* by Phenotypic and Genotypic Methods. *Springer Science+Business Media*, 2009, vol. iss. 6, s. 1643-1648. DOI 10.1007/S10620-009-0928-8

GREENWOOD, David. a kol. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 1999. s.306-309. ISBN-80-7169-365-0

*Helicobacter pylori* – současný stav 1. část. *Farmakoterapeutické informace*. 2010, č. 4, s.1-4. ISSN 1211-0647

HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. 40 s. ISBN 978-80-7387-280-9

KOHOUT, Pavel. *Vředová choroba*. Praha: Maxdorf 2005. s. 53-54. ISBN 80-7345-077-1

KOPÁČKOVÁ, Marcela, VOŘÍŠEK, Viktor, BUREŠ, Jan. *Využití dechových testů v gastroenterologii. Jaká je teorie a jaké jsou možnosti praktického využití*. [online] 2003 [cit. 2013-03-22]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/vyuziti-dechovych-testu-v-gastroenterologii-jaka-je-teorie-a-jak-154756>

KRAMÁŘ, Radim. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2007. s. 15. ISBN 978-80-7394-021-8

KREJSEK, Jan, KOPECKÝ, Otakar. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nukleus, 2004, s. 492-499. ISBN 80-86-225-50-X

KYZEKOVÁ, Jozefína. *Žaludeční dyspepsie a Helicobacter pylori*. Praha: Grada, 1998. s. 30-36. ISBN 80-7169-621-8

LEE, A., MÉGRAUD, F.: *Helicobacter pylori: techniques for clinical diagnosis & basic research*. London: Byk Gulden, 1996, 25 s. ISBN 0-7020-2225-X

LESZCYNSKA, K et al. Patient factors affecting culture of *Helicobacter pylori* isolated from gastric mucosal specimen. *Advances in Medical Science* 2010, vol. 55, iss.2, s.161-166. DOI 10.2478/V10039-010-0028-1

LOCHMANOVÁ, Jindra, KOLÁŘ, Milan, LOCHMANN, Otto. *Problematika rezistence Helicobacter pylori k antimikrobním léčivům*. [online] 2004 [cit.2013-03-13]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2004/03/03.pdf>.

LOCHMANOVÁ, Jindra. Současný pohled na problematiku rezistence kmenů *Helicobacter pylori* vůči antimikrobním léčivům. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010, roč. 8, č. 6, s. 199-202. ISSN 1211-264X

MARTÍNEK, J., HUCL, T., ŠPIČÁK, J. Diagnostika a léčba *Helicobacter pylori* na přelomu milénia, *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2001, roč. 7, č. 3, s.58 – 65.

MIERNYK, Karen et al. Characterization of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Genotypes among Alaskans and Their Correlation with Clinical Disease. *Journal of Clinical Microbiology*.2011, vol.49, s. 3114-3121. DOI 10.1128/JCM.00469-11

PROKOPCOVÁ, I. a kol. Přínos dechových testů v gastroenterologii. *Medicína pro praxi*. 2008, roč. 5, č. 9, s. 308-309. ISSN 1214-8687

QUEIROZ, Dulciene Maria de Magalhães et al. *Helicobacter pylori* virulence factors as tools to study human migrations. *Toxicon* 2010, vol. 56, iss. 7, s.1193-1197. DOI 10.1016/j.TOXICON.2010.01.018

SEDLÁČKOVÁ, Miloše. *Infekce Helicobacter pylor*. Praha: Maxdorf, 1996, s. 38-55. ISBN 80-85800-32-2

SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010. s. 54-55. ISBN 978-80-247-3170-4

SILBERNAGL, S., DESPOPOUS. *Atlas fyziologie člověka*. Praha: Avicenum, 1981.

SILVA, JMK et al. Validation of a rapid stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Revista do instituto de medicina tropical de Sao Paulo* 2010, vol. 52, iss. 3, s. 125-128. DOI 10.1590/S0036-46652010000300002

ŠVESTKA, Tomislav. Infekce *Helicobacter pylori*. *Medicina pro praxi*. 2011, roč. č. 3, s. 123-126. ISSN 1214-8687

TEKIN, Karsligil et al. eUrea Breath test and specific IgA in *Helicobacter pylori* infection. *Nobel medicus*. 2010, vol. 6, iss.3, s. 45-50

VOTAVA, Miroslav. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. Brno: Hortus, 2000. s. 189-190. ISBN- 80-238-5058-X

VOTAVA, Miroslav. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vydání. Brno: Neptun, 2003. s. 50-52. ISBN-80-902896-6-5

VOTAVA, Miroslav a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010. s. 273-274 ISBN-978-80-8685-004-7

WANG, G., MAIER, R. An NADPH quinone reductase of *Helicobacter pylori* plays an important role in oxidative stress resistance and host colonization. *Infection and immunity*. 2004, vol. 72, iss. 3, s.1391-1396. DOI 10.1128/A.72.3.1391-1396.2004

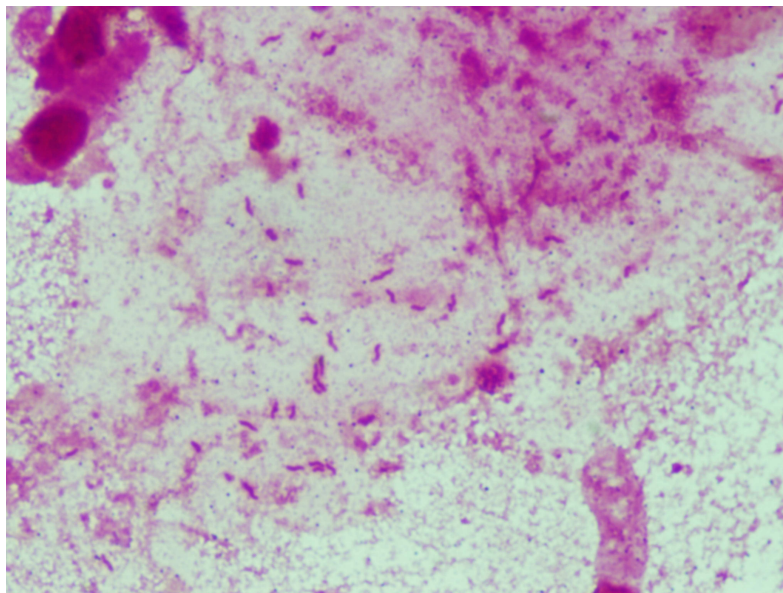
ZÁLABSKÁ, Eva. Má průkaz protilátek proti *Helicobacter pylori* přínos v jeho diagnostice? *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2011, roč.17, č.1, s.33 -37. ISSN 1211-264X

ZÁLABSKÁ, Eva. Průkaz *Helicobacter pylori* v bioptátu žaludku a ve stolici. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2010, roč. 16, č. 6, s. 203 -205. ISSN 1211-264X

ZELINKOVÁ, Jitka. *Helicobacter pylori*. *Causa subita*, 2006, roč. 9, č. 5 , s.177-178. ISSN 1212-0197

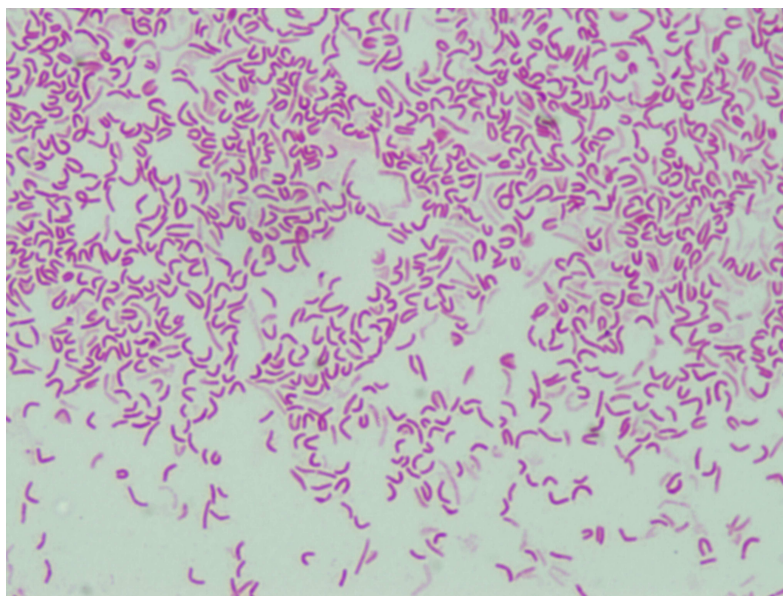
## 9. Přílohy:

Příloha 1: Mikroskopický obraz *Helicobacter pylori* z bioptického vzorku



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 2: Mikroskopický obraz *Helicobacter pylori* z narostlé kultury



Zdroj: vlastní fotografie



Příloha 3: Pozitivní ureázový test (levé dvě zkumavky- růžové)



*Zdroj: vlastní fotografie*

Příloha 4: Zatavené kultivační půdy v sáčku (v mikroaerofilní atmosféře) a připravené ke kultivaci v termostatu



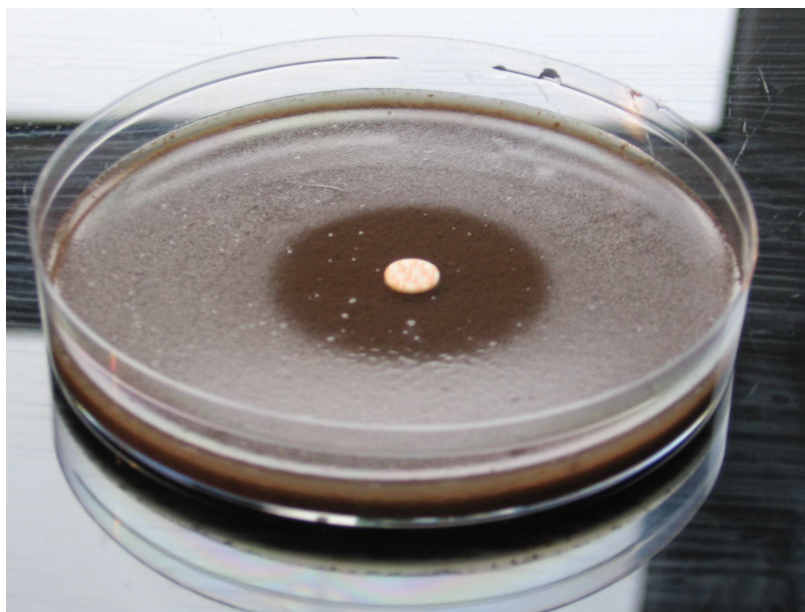
*Zdroj: vlastní fotografie*

Příloha 5: LAS systém



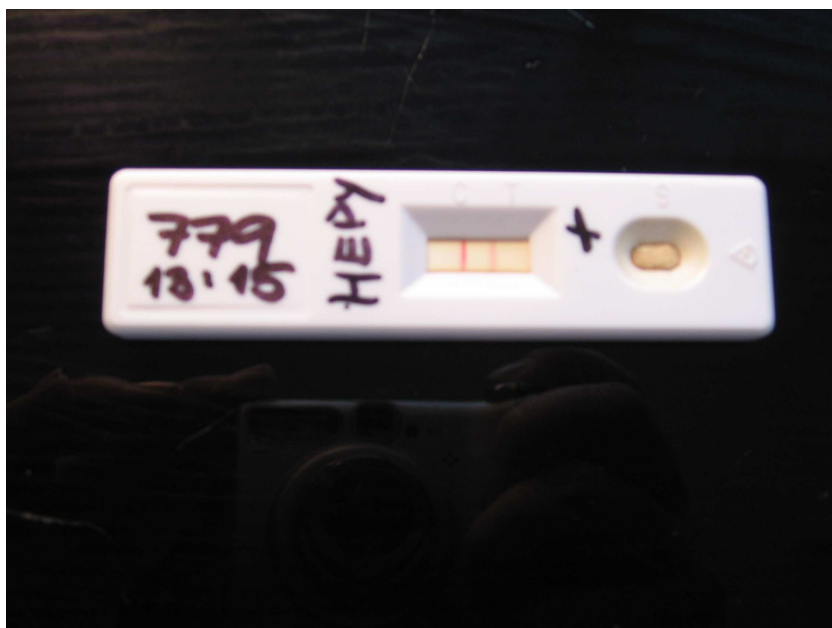
Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 6: Narostlá kultura *Helicobacter pylori* + stanovení citlivosti k antibiotiku diskovým difuzním testem



Zdroj: vlastní fotografie

Příloha 7: Pozitivní test antigenu *Helicobacter pylori* ze vzorku stolice



Zdroj: vlastní fotografie