



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra klinických a preklinických oborů

Bakalářská práce

## ***Způsoby vyšetřování *Helicobacter pylori* a *Kalprotektinu****

Vypracovala: Lucie Lavičková

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc., dr. h. c.

České Budějovice 2015

## Abstrakt

*Helicobacter pylori* je gramnegativní tyčka spirálovitého tvaru. Je přísně mikroaerofilní. Pro *H. pylori* je typická především mohutná ureázová aktivita. Kolonizuje povrch žaludeční sliznice a je prokázáno, že téměř polovina populace je jím kolonizovaná. Působením dalších faktorů dochází ke vzniku gastritidy, která později může přejít na chronickou formu. Na podkladě chronické gastritidy mohou vzniknout další závažné choroby – gastroduodenální vředová choroba nebo adenokarcinom žaludku. *H. pylori* je vyhlášen za karcinogen 1. třídy.

Kalprotektin je cytosolový protein. Uvolňuje se postupně z leukocytů po jejich aktivaci nebo lýze. Tvoří ho zejména monocyty a neutrofilové. Koncentrace kalprotektinu ve vzorku stolice koreluje s množstvím leukocytů vyloučených do střevního lumen. Toto zjištění umožňuje lékařům dle stanovení hodnot kalprotektinu odhadnout stupeň infiltrace střevní sliznice leukocyty. Kalprotektin je svou vysokou citlivostí k přítomnosti střevních zánětů velmi vhodným ukazatelem při diagnostice tzv. nespecifických střevních zánětů.

Cílem mé bakalářské práce je osvojení si identifikačních metod *Helikobaktera pylori* a kalprotektinu v rámci laboratorní praxe. Druhým cílem je osvojení si základní interpretace výsledků těchto metod. Stanovila jsem jednu hypotézu, kterou jsem se pokusila potvrdit. Dále jsem stanovila jednu výzkumnou otázku, na kterou jsem hledala odpověď.

V teoretické části mé práce jsem se zaměřila na dosavadní poznatky o *H. pylori* a kalprotektinu. Popsala jsem současné metody jejich diagnostiky, onemocnění s nimi související a jejich léčbu.

Praktickou část jsem prováděla na oddělení mikrobiologie v laboratoři Stafila spol. s.r.o., kde jsem průkaz *H. pylori* ve vzorcích stolice vyšetřovala pomocí metody DIMA *H. pylori* test. Hladinu kalprotektinu jsem stanovovala pomocí metody BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites. Sama jsem vyšetřovala v obou

případech 25 vzorků. Veškeré práce jsem prováděla pod odborným dohledem MUDr. Cihlové a pracovníků laboratoře.

Další část mé práce je věnována výsledkům. Vypracovala jsem statistiku četností výskytu *H. pylori* a pomocí statistických výpočtů vyvrátila svou stanovenou hypotézu. Zpracovala jsem také statistiku četností negativních, pozitivních a silně pozitivních výsledků hladin kalprotektinu ve vzorcích stolice a našla jsem odpověď na výzkumnou otázku.

Klíčová slova: *Helicobacter pylori*, kalprotektin, kolonizace, gastritida, nespecifické střevní záněty

## Abstract

*H. pylori* is a gram-negative rod bacteria of a spiral shape. It is obligatory microaerophile. It has strong urease activity. It colonize the stomach mucosa and it is proved, that almost the half of human population is colonized. *H. pylori* concluding other factors can cause gastritis which can become chronic. Other diseases can be influenced by chronic gastritis - for example: gastroduodenal ulcer disease and stomach adenocarcinoma. *H. pylori* is concerned to be carcinogen of the first class.

Calprotectin is a cytosol protein. It gradually releases from activated or lytic leucocytes. It is made of monocytes and neutrophils. Calprotectin concentration in in faecal specimen correlates with the amount of leucocytes in intestine's lumen. This finding allows doctors to estimate the amount of intestine mucosas' infiltration by leucocytes according to evaluation of calprotectin levels. Calprotectin is highly sensitive to the presence of intestine inflammation, so it is a proper indicator of unspecific intestine inflammation diagnostics.

The main aim of my bachelor thesis is to become familiar with identification methods of *H. pylori* and calprotectin in labs. Moreover, I aimed to become familiar with proper results interpretation of used methods. I estimated a hypothesis and an experimental question.

In the theoretical part I focused on contemporary knowledge about *H. pylori* a calprotectin. I described common diagnostic methods, illnesses they cause and their treatment.

The experimental part took place at Microbiology department of Stáfila spol. sro laboratories. I examined the presence of *H. pylori* in faecal specimen by DIMA method. I determined the calprotectin levels by BUHLMANN method. I personally worked with 25 samples. I did my work in guidance of MUDr. Cihlová and her colleagues.

I statistically examine my results. I made statistics of *H. pylori* frequency and determined the hypothesis. I also made statistic of negative, positive and strongly positive numerosity levels of calprotectin in faecal specimen and found the answer to my question.

Keywords: *H. pylori*, calprotectin, colonize, gastritis, unspecific intestinal inflammation

## **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 10. 8. 2015

.....

Lucie Lavičková

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc., dr. h. c., který mi předal spoustu cenných rad a vedl mou bakalářskou práci. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Věře Cihlové a pracovníkům mikrobiologické laboratoře Stafila spol s.r.o. za ochotu, vstřícnost a pomoc při praktickém zpracování práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě při studiu nesmírně podporovala.

## Obsah

1	Úvod .....	10
2	Současný stav problematiky .....	12
2.1	<i>Helicobacter pylori</i> - Historie .....	12
2.2	Obecné rozdělení.....	12
2.3	Morfologie.....	13
2.4	Faktory patogenity .....	13
2.5	Laboratorní diagnostika .....	15
2.5.1	Invazivní metody .....	15
2.5.3	Neinvazivní metody .....	17
2.6	Onemocnění způsobená <i>H. pylori</i> .....	19
2.7	Průběh infekce.....	20
2.8	Léčba .....	20
2.9	Epidemiologie .....	21
2.10	Kalprotektin obecná charakteristika .....	23
2.11	Orgánová onemocnění.....	24
2.11.1	Crohnova choroba .....	24
2.11.2	Ulcerózní kolitida.....	27
2.12	Funkční onemocnění .....	29
2.12.1	Syndrom dráždivého tračníku .....	29
2.13	Metody stanovení .....	31
3	Praktická část.....	32
3.1	Cíle práce .....	32
3.2	Hypotéza a výzkumná otázka.....	32



3.3	Charakteristika zkoumaného souboru .....	32
3.4	Odběr a transport vzorků.....	33
3.5	Použité metody a techniky .....	35
3.5.1	DIMA <i>H. pylori</i> test .....	35
3.5.2	Postup analýzy.....	36
3.5.3	Interpretace výsledků .....	37
3.5.4	BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites.....	39
3.5.5	Postup analýzy.....	39
3.5.6	Interpretace výsledků .....	40
4	Výsledky.....	43
4.1	<i>Helicobacter pylori</i> .....	43
4.2	Stanovení hladiny fekálního kalprotektinu .....	48
5	Diskuse .....	51
6	Závěr.....	54
7	Seznam použité literatury .....	55

# 1 Úvod

Zaměření mé bakalářské práce jsem soustředila na v dnešní době aktuální problematiku infekce *Helicobacter pylori* spojené se stanovením zánětlivého markeru, o kterém laická veřejnost prozatím tolik informací nemá. Jedná se o stanovení hodnot kalprotektinu v neinvazivně odebraných vzorcích. Patogen a zánětlivá marker mají společnou vlastnost a to materiál, ze kterého jejich přítomnost lze diagnostikovat. Jde o vyšetření vzorku stolice. Dalším důvodem výběru je výskyt gastroduodenálních vředů v mé rodinné anamnéze. Z toho důvodu jsem se chtěla tomuto problému věnovat blíže.

Infekce *Helicobacter pylori* patří dnes mezi nejrozšířenější. Prevalence výskytu u nás v České Republice je téměř 42 % a to i přes to, že naše země patří mezi vyspělé. V zemích s horšími socioekonomickými podmínkami se prevalence výskytu infekce rapidně zvyšuje až na 85 %.

*Helicobacter pylori* je původcem vzniku chronického zánětu žaludeční sliznice – chronické gastritidy. Ta se stává předvojem možného vzniku dalších onemocnění s horší prognózou. Řeč je o gastroduodenálních vředech a adenokarcinom žaludku. Bakterie se vyskytuje především v hlenu, který sliznici chrání. Rozložení výskytu patogenu je nerovnoměrné, proto se při odebrání vzorků musí dbát na nutnost odběru z více míst. Toto platí pro odběr materiálu sloužícího k vyšetření pomocí invazivních metod. Mezi ně spadají kultivace, rychlý test na ureázu a histologické vyšetření – mikroskopie. Platí však i pro odběr vzorku stolice používané k některým metodám neinvazivních vyšetření. K neinvazivním metodám řadíme dechový test, stanovení protilátek v séru a průkaz antigenu ve stolici.

Vyšetření pro stanovení hodnot kalprotektinu ve vzorku se v dnešní době stále více rozmáhá. Jeho výhoda je v neinvazivnosti a rychlosti. Především u pediatrů je velice oblíbenou metodou určení toho, jestli se v těle dětského pacienta nachází zánět. Hladina kalprotektinu koreluje s množstvím leukocytů vyloučených do střevního lumen. Toto zjištění umožňuje lékařům odhadnout stupeň infiltrace střevní sliznice leukocyty – potvrdí nebo vyvrátí přítomnost zánětu. Vyšetření lze považovat za předvoj

kolposkopie. V případě vysoké hladiny kalprotektinu ve vzorku lékař postupuje v léčebném postupu kolonoskopickým vyšetřením. Pokud je naopak hladina kalprotektinu vyhodnocena jako nízká, lékař od invazivní kolonoskopie ustupuje.

Cílem mé práce je osvojení si identifikačních metod *Helikobaktera pylori* a kalprotektinu v rámci laboratorní praxe – v laboratoři Stafila spol s.r.o. Druhým cílem je osvojení si základní interpretace výsledků těchto používaných metod. Stanovila jsem také jednu hypotézu, kterou se pokusím potvrdit, nebo vyvrátit. Pokusím se také najít odpověď na jednu výzkumnou otázku.

## 2 Současný stav problematiky

### 2.1 *Helicobacter pylori* - Historie

*Helicobacter pylori* byl objeven v Austrálii roku 1983 dvěma vědci z Royal Perth Hospital, kteří se zabývali kolonizací žaludeční stěny. Dříve byl tento mikrob řazen mezi kampylobaktery – nejčastější původce akutního průjmového onemocnění. Rod kampylobakter byl poznán a následně rozšířeno povědomí o něm až v 70. letech, protože jeho kultivace vyžaduje neobvyklé podmínky. Po oddělení *Helicobacter pylori* od rodu kampylobakter bylo zjištěno, že přibližně u jedné čtvrtiny dospělých osob kolonizuje žaludeční sliznici a prokázala se jeho spojitost s gastritidou, histologickými nálezy peptidického vředu a adenokarcinomem žaludku. *H. pylori* je vyhlášen za karcinogen 1. třídy. Sedláčková (28), Votava a kol. (35)

### 2.2 Obecné rozdělení

V dnešní době známe 3 různé druhy rodu helikobakter. Z diagnostiky biologických materiálů od pacientů byly dosud izolovány druhy *Helicobacter cinaedi* - izolován ze vzorků při prokázané bakteriémii. U osob, kterým vzorky patřily, byla prokázána současně nákaza HIV a tuberkulózou. Dalším diagnostikovaným druhem je *Helicobacter fennelie* – získaný většinou z rektálních výtěrů mužů homosexuálů. Dalším diagnostikovaným druhem je *Helicobacter pylori*. Ten je znám svou spoluúčastí při vzniku gastritidy, doudenálních a žaludečních vředů a adenokarcinomu žaludku.

Greenwood (14), Krejsek (21)

## 2.3 Morfologie

*Helicobacter pylori* je tyčka spirálovitého tvaru gramnegativního charakteru. Beneš (4) Případně je možná podoba s písmeny V nebo Y. Jedná se o přísně mikroaerofilního mikroba o šířce 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$  a délce přibližně 3  $\mu\text{m}$ . Při kultivaci ke svému růstu vždy potřebuje  $\text{CO}_2$ . V jeho stavbě lze vidět rozdíly oproti rodu kampylobakter. *Helicobacter* má na svém povrchu trs polárních bičíků, které chrání pochva, kampylobakter má pouze jeden holý bičík. Kyzelová (22) Pro tuto bakterii je typická především mohutná ureázová aktivita. Ta ji charakterizuje při běžných testech, kdy *H. pylori* není sám o sobě biologicky aktivní a v žaludeční sliznici ho rozpoznáme právě díky produkci nesmírně aktivní ureázy. Při rozboru klinického materiálu je tato bakterie nerovnoměrně rozložena po povrchu žaludeční stěny. Nejčastěji bývá distribuována především v hlenu. Greenwood (14), Sedláčková (28)

## 2.4 Faktory patogenity

*H. pylori* je patogenní pouze pro člověka s vysokou adaptací na jeho žaludeční sliznici. U pacientů s vředovým onemocněním duodena či žaludku byla kolonizace žaludeční sliznice touto bakterií prokázána téměř ve všech případech. Taktéž je spoluúčastníkem vzniku chronické gastritidy. Infekce sliznice žaludku probíhá ve většině případů inaparentně, její vzhled je při endoskopickém vyšetření normální.

Greenwood (14), Bednář a kol. (5)

Bakterie se může vyskytovat i mimo sliznici žaludku, kde tvoří kokoidní útvary. Tyto útvary jsou infekční formou přenosu vzduchem. Jedná se o formu odolnou vůči vnějšímu prostředí. *H. pylori* má různé druhy významných faktorů patogenity. První skupinou jsou faktory vázané přímo na buňku – do této skupiny patří například adheziny a stěnový lipoprotein. Další skupinou jsou extracelulární substance, které *H. pylori* produkuje. Mezi ty nejdůležitější patří oxidáza, kataláza a především ureáza. Ureáza je katalyzátorem hydrolýzy močoviny za vzniku amoniaku a vyskytuje se hojně

v okolní žaludeční sliznici. Mohutná ureázová aktivita je pro bakterii typická a je podstatou dnes hojně využívaného ureázového testu. Jako další zástupce extracelulární substance bakterie produkuje hemoliziny, cytotoxiny, glykofosfatázu, fosfolipázu, aldehyddehydrogenázu, proteázu a v neposlední řadě protein inhibující tvorbu HCl. Produkce proteáz a fosfolipáz pomáhá šíření *Helicobacter pylori* po sliznici.

Krejsek (21), Schindler (30), Šachlová (32)

*Helicobacter pylori* pomocí exogenních produktů ovlivňuje indukci leukotrienů, prokoagulační aktivitu interleukinů, indukci některých destičkových faktorů a autoimunitních reakcí. Bednář a kol. (5)

## **2.5 Laboratorní diagnostika**

### **2.5.1 Invazivní metody**

#### **2.5.1.1 Histologické metody**

##### **2.5.1.1.1 Mikroskopie**

Jako první byl *H. pylori* pozorován v histologických řezech. Dnes je mikroskopie považována za velmi efektivní a citlivou metodu průkazu. Jelikož se *H. pylori* v žaludeční sliznici vyskytuje velmi nerovnoměrně, tak je pro jeho průkaz doporučeno odebrat více vzorků z různých míst. Odebírají se dva vzorky z antra a dva z těla žaludku. Před vyšetřením jsou vzorky naloženy do 10 % formaldehydu. Kyzeková (22)

Nejvíce zřetelně jsou bakterie vidět při použití impregnace stříbřením podle Warthina-Starryho. Od této metody se v dnešní době upouští. Lee et al. (23)

Dnes se využívá metoda barvení dle Giemsy a vyšetřované vzorky jsou dobře pozorovatelné i při barvení hematoxylin – eozinem. Histologické vyšetření má výhodu v možnosti určení pokročilosti zánětu. Z mikroskopického nátěru lze odhalit přítomnost patologických změn na žaludeční sliznici. Senzitivita testu je vysoká a to až 90 %.

Votava a kol. (35)

#### **2.5.1.2 Kultivační vyšetření**

Při kultivaci *H. pylori* je nutné vyšetřit vzorky maximálně 2 hodiny od odběru. Pro vyšetření se používají bioptické vzorky odebrané z žaludeční sliznice, v nejlepším případě z antra. Z toho důvodu, že mikrob osazuje místa organismu, kde se v normálním případě žádné jiné bakterie nevyskytují, se použití selektivních pŮd jeví jako zbytečné. I přes tuto teorii je vhodné využít k inkubaci bioptického vzorku tkáně současně dvě pŮdy. Jedná se o jednu pŮdu neselektivní a druhou s přídavkem antibiotik

a antimykotik. Mezi vhodná přidaná antibiotika řadíme cefsulodin, trimethoprim, nebo například vankomycin, jako antimykotikum bývá použit amfotericin B. Přínosem je toto využití především u vyšetření osob se sníženou aciditou žaludku. Ta totiž vede k možné kontaminaci odebraných vzorků kvasinkami, rezistentními grampozitivními koky nebo nefermentujícími bakteriemi. K záchytu *H. pylori* bylo připraveno velké množství různých kultivačních pūd, jejichž základem je v každém případě čokoládový agar. Velmi důležité je, aby se používané pūdy předem nevysušovaly. Inkubace medií probíhá ve vlhkém prostředí při 37 °C přibližně až 7 dnů. Důležité jsou přísně mikroaerofilní podmínky v atmosféře s 85 % dusíku, 10 % CO<sub>2</sub> a 5 % O<sub>2</sub>. Plotny se při procesu neotevírají a za negativní se mohou považovat a odložit za týden. Při odečítání vidíme *H. pylori* v malých koloniích, které mají lehce navality charakter. Identifikace *Helicobacter pylori* je v praxi zkušeným okem lékaře relativně snadná. Kolonie pozná na základě morfologie buněk, dalším znakem je pozitivní katalazová a oxidazová reakce a v neposlední řadě citlivost k cefalotinu a rezistence k nalidixové kyselině.

Votava (35), Fonseca (12)

### **2.5.1.3 Biopsie a test na ureázu**

Jelikož je pro *Helicobacter pylori* typická mohutná produkce ureázy, lze ji prokázat i v bioptickém materiálu a to bez potřeby předchozí kultivace. Ureázový test probíhá následovně. Martínek (26) Do připraveného roztoku močoviny, v kterém je přítomný indikátor, se vloží odebraný kus bioptické tkáně. Při přítomnosti bakterie změní uvolněný amoniak barvu indikátoru. Proces probíhá několik minut až dvě hodiny. Výhodou tohoto testu je možnost jeho provedení přímo při odběru materiálu.

Votava (36), Kazemi at al. (18)



### 2.5.3 Neinvazivní metody

#### 2.5.3.1 Dechový test

Dechový test se v běžné praxi příliš nevyužívá. Má sice výhodu ve své neinvazivnosti, ale naopak velmi velkou nevýhodu v tom, že je do těla člověka vpravován radioaktivní izotop uhlíku  $^{14}\text{C}$ . Tekin et al. (34) Tato metoda probíhá následovně. Pacientovi je připraven k vypití roztok urey značené aktivním uhlíkem  $^{14}\text{C}$  nebo  $^{13}\text{C}$ . Uhlík  $^{13}\text{C}$  má výhodu v tom, že není reaktivní, ale na druhou stranu se k jeho měření dá použít pouze velmi nákladný spektrometr. Ten vlastní jen malé množství laboratoří. Po vypití roztoku se měří emise izotopu  $\text{CO}_2$  vydechovaného vzduchu. Pacienti, kteří jsou infikováni, mají při výdechu v dechu velmi vysoký obsah izotopu  $^{14}\text{C}$  nebo  $^{13}\text{C}$ . To je způsobeno ureázou, která je schopna štěpit značenou ureu na  $\text{CO}_2$  a amoniak. Kopáčková (20), Kazemi et al. (18),

#### 2.5.3.2 Stanovení protilátek *H. pylori*

Pro sérologické vyšetření je nejčastěji používána metoda ELISA. Vyšetřuje krevní sérum pacienta podezřelého na infekci. Stanovuje specifické IgG a IgA protilátky proti antigenům CagA a VacA. Test je jednoduchý, rychlý a levný. Hladina protilátek dobře koreluje s kolonizací. Po eradikaci infekce lze protilátky detekovat ještě několik měsíců, protože jejich titry klesají velmi pomalu. Mezi laboratořemi je tento průkaz mikroba méně využíván než průkaz antigenu ve stolici. A to právě z důvodu pomalého klesání titrů protilátek, stanovení těchto protilátek neurčuje aktuální stav infekce. Není tedy možné takto sledovat úspěšnost a posuzovat kvalitu předepsané léčby. Je také prokázán výskyt falešně negativních testů u dětí a imunodeficitních osob. Z tohoto důvodu se zmíněné vyšetření používá především pro epidemiologické studie. Protilátky lze detekovat i celou řadou jiných imunologických a sérologických technik. Mezi ně patří například imunobloting, imunofluorescence, hemaglutinace, fixace

komplementu, latexové testy. Vyšetření lze provádět i z jiného materiálu než pouze z krevního séra. Vyšetřovat lze moč a sliny. Bartůňková a kol. (3), Šachlová (32)

V Londýně byla provedena studie založená na analýze IgG protilátek ze slin pacienta. Díky níž byla tato metoda prokázána jako velmi užitečná k diagnostice *H. pylori*. Ballam et al. (1)

### 2.5.3.3 Průkaz antigenu ve stolici

Průkaz antigenu *H. pylori* – zkráceně HpsAg se stanovuje ve vzorku stolice pomocí imunochromatických metod, nebo metody ELISA (enzym-linked immunosorbent assay). Podstatou využití imunochromatických metod je využití monoklonálních protilátek, které jsou značeny. Jedná se o monoklonální protilátky proti antigenu *Helicobacter pylori*. Vyšetření probíhá na membránové destičce, na kterou se nanese zkoumaný vzorek, značené protilátky se postupně navazují na antigen. Dále pak společně za pomoci kapilárního vztlínání proniknou membránou v destičce. Prochází dál a zachycují se prostřednictvím jiné specifické protilátky v místě zvaném testovací linie. Pokud se přítomnost mikroba prokáže a test je tedy zaznamenán jako pozitivní, objeví se v zóně testovací linie zbarvení – jedná se většinou o červený pruh. Membránová destička obsahuje dvě zóny testovací a kontrolní, ta se pro kontrolu správné funkčnosti destičky zbarví vždy. V případě positivity je tedy třeba na destičce zpozorovat zbarvené pruhy dva. Výhodou tohoto vyšetření je jeho rychlost, snadnost a hlavně téměř žádná zátěž pro vyšetřovaného pacienta. Vyznačuje se také velmi vysokou senzitivitou a to až 92 %. *H. pylori* – současný stav (15), Seifert et al. (29)

Další metodou, kterou se dá prokázat antigen ve stolici, je metoda ELISA. Zde jsou základem také monoklonální protilátky specifické pro antigen *H. pylori*. Vyšetření probíhá na stejném základě. Jediným rozdílem je použití mikrotitrační destičky namísto membránové destičky. Má i stejné podmínky zatížení pacienta – tedy žádné. Test se dá svou senzitivitou srovnat s dechovým testem (94 %). Specifická testu je přibližně 91 %. Výhodou před dechovým testem je jeho menší finanční náročnost. Využívá

se především při kontrole eradikační léčby infekce jak u dospělých, tak u malých dětí. Vždy je nutné provádět vyšetření přibližně 4-6 týdnů po ukončení léčby. Z důvodu možného zkreslení výsledků.

Vzorky stolice se dají uchovávat při teplotě 2-8 °C po maximální dobu tří dnů.  
*H. pylori* – současný stav (15)

## 2.6 Onemocnění způsobená *H. pylori*

Kolonizace těla pacienta *H. pylori* je dnes velmi častá, postihuje až polovinu populace. Ale pouze u její části propukne kolonizace ve vznik akutní gastritidy. Je zřejmé, že k jejímu vzniku nestačí pouze kolonizace, ale jsou ve hře i jiné faktory spouštějící infekci. Akutní gastritida postupně přechází v gastritidu chronickou. Ta může mít i asymptomatický průběh. Bakterie jsou vždy nerovnoměrně rozmístěny v žaludečním hlenu. Zelenková (39) Nelze pochybovat o vlivu *H. pylori* na výskyt gastritidy. Při infekci je patrný výskyt polymorfonukleárů - PNM, které patří mezi typický znak gastritidy. Mezi příznaky gastritidy patří nauzea, bolest břicha a flatulence. Greenwood (14)

Dalším patogenním stavem při působení *H. pylori* na organismus je gastroduodenální vřed. Ten se rozvíjí v závislosti na gastritidě. Vlivem zánětu na žaludeční sliznici dochází postupně ke snížené aciditě žaludeční šťávy. Snížením obranných mechanismů se vytvoří předpoklad pro vznik vředu. U pacientů s duodenálními vředy byl prokázán výskyt mikroba v těle téměř u 99 % případů. Zelenková (39)

Horší prognózu mají případy, kdy poškození vlivem rozvíjející se gastritidy, přechází v maligní transformace. Působení bakterie *H. pylori* v organismu může vést až ke vzniku adenokarcinomu žaludku. *Helicobacter pylori* je považován za karcinogen 1. třídy. Beneš (4), Imrie et al. (17)

Je prokázána také souvislost jeho výskytu se vznikem MALT lymfomu (*mucosa-associated lymphoid tissue*). Krejsek (21)

## 2.7 Průběh infekce

O počáteční fázi průběhu infekce toho není známo mnoho. Inkubační dobou se rozumí čas od proniknutí mikroba do organismu až po vyvolání prvních klinických příznaků. Pro tuto infekci je inkubační doba několik dní. Po jejím uplynutí postihne pacienta akutní gastritida doprovázená bolestmi břicha, nevolností, flatulencí a zápachem z úst. Individuálně zasahují každého nakaženého jedince a mohou zmizet společně s vymizením *H. pylori* z lidského organismu. Greenwood (14) To se však stává jen zřídka, většinou mikrob částečně nebo úplně přetrvá a způsobuje tak chronickou gastritidu. Při aktivní formě této gastritidy mají pacienti snížený obsah chloru v těle a to po dobu až 12 měsíců. Nejdéle po uplynutí doby jednoho roku se acidita v žaludku vrací k normě.

Ještě nebylo dle žádných výzkumů přesně stanoveno, zda infekce v těle přetrvá navždy, zda se sama vyléčí a vymizí. Votava a kol. (35)

## 2.8 Léčba

V dřívější době byly k léčbě *H. pylori* používány bizmutové soli – tedy bizmutsubcitrát nebo subsalicylát. Při jejich použití se jednalo přímo o eradikaci mikroba. Spolu s bizmutovými solemi se pacientům podávaly antibiotika a to například metronidazol, amoxicilin nebo tetracyklin. Doba podávání byla vždy dva týdny. Léčba měla jisté nevýhody, kvůli kterým se později zrušila. První z nich bylo velmi pozdní vymizení bolesti, nástup účinku byl velmi zdlouhavý. Dalším bylo tmavé zbarvení jazyka a stolice. Dnes není žádná možnost preparáty, které obsahují bizmutové soli, na českém trhu sehnat. Kohout (19)

V dnešní době je prvotní léčbou tzv. trojkombinace. Využívá se kombinace inhibitoru protonové pumpy (IPP) klaritromycinu a amoxicilinu – ten se dá zaměnit s nitromidazolem. Léčba trojkombinací probíhá po dobu sedmi dnů. Pokud se u pacienta prokáže rezistence na klaritromycinu, využívá se jako náhrada azitromycin. Ten se předepisuje na dobu pěti dnů. Malfertheimer et al. (27) Další možnou variantou je kombinace IPP s amoxicilem a ciprofloxacinem. Tuto kombinaci užívá pacient 7 dní, má také vysokou úspěšnost. Amoxicilin má výhodu v tom, že se nejedná o medikament s vysokou náchylností k rezistenci. Trojkombinace je velmi hojně využívaná léčbou. Její předností je vysoká schopnost eradikace a malá náchylnost k rezistenci. Je také šetrná pro pacienta. Jedinou nevýhodou je to, že její použití je možné pouze v případě, když není pacient alergický na léky s obsahem penicilinu. Ve většině případů bývá léčba účinná. Za selhání je nejčastěji považována chyba pacienta, v momentě kdy nedodrží léčebný postup. Dále pak vzniklá rezistence mikroba na penicilinová antibiotika. Při takovémto selhání léčby je nutné léky vysadit a přibližně za 8 týdnů postupy zopakovat. Švestka (33) K ověření účinnosti léčby se nejčastěji využívá stanovení antigenu *H. pylori* ve vzorku stolice. Bureš (8)

Výjimkou jsou pacienti trpící MALT lymfomem. U lehčích forem nemoci je problém v tom, že pokud je jim nasazena antimikrobiální léčba, může vést až k znovuvytvoření tumoru v jeho počáteční fázi. Naopak u pacientů s pokročilejším stádiem onemocnění je víceméně tato léčba zbytečná, protože k úplnému vyléčení nestačí. Beneš (4)

## 2.9 Epidemiologie

Infekce *Helicobacter pylori* patří mezi antropozózy, tedy zdrojem i rezervoárem infekce je člověk. Byla zkoumána možnost přenosu infekce ze zvířete na člověka, ta zatím však nebyla úplně prokázána. A to i přes to, že *H. pylori* byl izolován ze žaludku primátů a koček. U koček byla prokázána perzistující gastritida. Z tohoto důvodu je tedy

přenos infekce ze zvířete na člověka možný. Nelze ho nijak přímo vyloučit. Bednář a kol. (5)

Bakterie je vylučována stolicí. Její přenos je dvojího způsobu, tedy orálně – orální, který probíhá přímým kontaktem s infikovanou osobou. Druhým způsobem je fekálně – orální přenos, spočívající v požití kontaminované vody. Při nedostatku hygieny lze vodu kontaminovat. Votava a kol. (35)

Bylo zjištěno, že větší výskyt infekce byl vyzorován ve větších kolektivech, v rodinách lékařů zejména gastroenterologů, nebo u zdravotnických pracovníků, kteří mají možnost kontaktu s infikovaným histologickým materiálem. Kyžeková (22)

Výskyt infekce mikrobem *H. pylori* je zvyšován úměrně s věkem populace. Ve vyspělých zemích je nižší výskyt u dětí na rozdíl od dospělých a starších osob. Víceméně polovina populace lidí v důchodovém věku je kolonizována. Prevalence infekcí se zde pohybuje okolo 40 – 50 %. Přímo v České Republice je infekce prokázána přibližně u 42 % vyšetřovaných pacientů. Bureš (7), Bureš (8)

Naopak v rozvojových zemích dochází nejčastěji k nákaze již v dětském věku. Důvodem toho je v největší míře špatná hygiena a extrémní chudoba. V těchto zemích je infekce rozšířena v neúnosné míře a to přibližně u 80 % populace. Beneš (4), Zelenková (39)

## 2.10 Kalprotektin obecná charakteristika

Kalprotektin je cytosolový protein jehož molekulární hmotnost je 36,5 kDa. Uvolňuje se postupně z leukocytů po jejich aktivaci nebo naopak po lýze – rozpadu. Je typický svou antimikrobiální aktivitou a vazbou na kalcium. Je složen ze dvou těžkých a jednoho lehkého řetězce a tvoří ho zejména monocyty a neutrofilové. Díky jeho rezistenci k enzymatické degradaci, lze tento protein stanovovat v sekretech. Koncentrace kalprotektinu ve vyšetřovaném vzorku stolice odpovídá množství leukocytů vyloučených do střevního lumen. Toto zjištění umožňuje lékařům dle stanovení hodnot kalprotektinu odhadnout stupeň infiltrace střevní sliznice leukocyty. Bargerón et al. (2), Fagerhol (11)

Kalprotektin je svou vysokou citlivostí k přítomnosti střevních zánětů velmi vhodným ukazatelem při diagnostice tzv. nespecifických střevních zánětů. Jeho průkaz by měl hrát roli v urychlení indikace provedení endoskopie. U léčených pacientů se také sleduje hladina kalprotektinu ve stolici při kontrole úspěšnosti léčby.

Karášková et Prošková (31)

Vyšetření má mezi odborníky velkou oblibu díky jeho nenáročnosti a nezatěžování organismu. Patří mezi neinvazivní metody, je tedy přínosné zejména u malých dětí. Karášková et Prošková (31)

Za nespecifické střevní záněty je považována skupina chronických onemocnění, které postihují zejména trávicí ústrojí. Čím dál častěji se ale u těchto onemocnění vyskytují i mimostřevní projevy, nejedná se tedy o izolované nezápřetlivé střevní onemocnění. Z toho důvodu se dnes hovoří spíše o orgánových systémových onemocněních organismu. Spadají sem především Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida. Další onemocnění, s kterým má kalprotektin souvislost, je syndrom dráždivého tračníku patřící mezi funkční onemocnění. Zádorová (37)

## **2.11 Orgánová onemocnění**

### **2.11.1 Crohnova choroba**

Crohnova choroba je granulomatózní transmurální zánět postihující kteroukoli část trávicího traktu od jícnu až po konečník. Nejčastěji však postihuje tenké a tlusté střevo. Zánět zasahuje všechny tři vrstvy stěny trávicího ústrojí typickým segmentálním nebo plurisegmentálním charakterem. V literatuře se o Crohnově choroně mluví také jako o regionální enteritidě či terminální ileitidě. U téměř 100 % případů probíhá chronicky s relapsy – období zhoršení stavu, následovanými obdobími klidu.

Onemocnění nejčastěji vzniká již v mladém věku a to mezi 15. – 30. rokem života. Dnes se čím dál častěji začíná diskutovat o vyšším výskytu onemocnění u žen než u mužů, toho tvrzení však prozatím nikdo vědecky nepodložil. Zánět vzniká na základě imunitních procesů a genetické predispozice. Výzkumy prokázaly, že k jeho spuštění může v některých případech stačit i pouhá bakteriální či virová infekce a to v případě velkého oslabení organismu. Zádorová (37)

V České Republice trpí touto chorobou přibližně 18 000 osob. Každý rok je nově registrováno 400 – 600 případů. Výskyt choroby vykazuje značné geografické rozdíly. Především ve vyspělých zemích severní části polokoule je výskyt Crohnovy choroby znatelně častější. Lukáš et al. (24)

#### **Příznaky**

Crohnova choroba postihuje kteroukoli část trávicího traktu. Každá postihnutá část má své specifické příznaky. Společné pro všechny části jsou definovány nespecifické příznaky jako úbytek na váze, zvýšená teplota a anémie.

Pro postižení oblasti ilea jsou typické projevy jako bolesti břicha, silné průjmy a neurčité trávicí obtíže. Bolest břicha je nejdříve spíše pocitem velkého tlaku v pravém podbříšku. Je možné si bolest představit jako při akutní apendicitidě. Později rozvojem



zánětu bolest sílí a přechází v křeče kolem pupku s vystupňovanými střevními zvuky, nadýmáním, meteorismem a říháním. Frič et Jirásek (13)

V žaludku převažují příznaky způsobené porušeným vyprazdňováním s pocitem plnosti a bolesti po jídle, nauzeou a zvracením nestráveného obsahu.

V tenkém střevě se zánět projeví dyspeptickým syndromem doprovázeným nechutenstvím, nadýmáním, říháním a zvýšenou plynatostí. Bolesti jsou přechodné. V důsledku nevstřebávání živin z potravy dochází k úbytku svalové hmoty, bledosti a únavě. Při postižení tenkého střeva může dojít až jeho ucpání a vzniku ulcerózního stavu. Bargerón et al. (2)

V oblasti tlustého střeva se jedná o příznaky v podobě masivních průjmů a křečovitých bolestí břicha v oblasti kolem pupku. Možným příznakem je také krvácení z konečníku. Lokalizace zánětu pouze v konečníku je považována spíše za vzácnou. Častěji se jedná o současné postižení více částí najednou. Zde je typickým příznakem vznik prasklinek a vředů kolem konečníku. Dále pak vznik abscesů a píštělí, jež provází vysoké horečky. Choroba s touto lokalizací probíhá většinou vlekle a nepříznivě.

U některých pacientů se mohou vyskytnout projevy v jiných oblastech těla. Například bolesti kloubů, ledvinné a žlučové kameny, zánět duhovky, nebo kožní onemocnění erythema nodosum. Ehrmann et Konečný (10)

### **Léčba Crohnovy choroby**

V dnešní době zatím není známa kauzální léčba, onemocnění je chirurgicky nevyléčitelné. Obecným doporučením je šetřící režim pacienta, žádná vysoká námaha a stres. Pacient musí dle svého uvážení a toho jak se cítí rozpoznat sám, co si může dovolit. Dále pak vhodné stravování se zastoupením všech potřebných nutričních složek. Pokud má pacient těžkou formu nemoci, podává se mu chemicky definovaná potrava sondou přímo do tenkého střeva. To zamezuje zátěži organismu při mechanickém zpracování. Existuje ještě jedna možnost výživy, ale ta je považována

pouze za tu úplně krajní. Jedná se o parenterální výživu. Při té se trávicí trakt úplně obchází, pacient dostává potřebné živiny, vitaminy a minerály přímo do žilního řečiště.

Jako medikament je postiženým předepisován mesalazin – kyselina 5-aminosalicylová. Chorobu nevyléčí, ale má alespoň protizánětlivý účinek a působí přímo lokálně tam, kde se nachází zánětlivý proces. U pacientů s těžším průběhem nemoci lékař předepisuje pro začátek léčby léky s obsahem kortikoidů. Vzhledem k širokému spektru vedlejších nežádoucích účinků nejsou vhodné k udržovací léčbě. Lukáš et al. (24)

Při vzniku komplikací je indikována operace, kdy lékař odstraní postiženou část střeva. Pokud je nutné odstranění větší části střeva, zavádí se pacientům stomie. Mezi komplikace lze zařadit ucpání střeva, nebo přechod zánětu do dalších orgánů. Operace je časem nevyhnutelná téměř pro polovinu případů. Není však řešením, které by pacienty úplně uzdravilo.

Prognózu Crohnovy nemoci nelze přímo definovat, je velmi individuální. Je možné jeho úplné uzdravení, ale to pouze u malého procenta případů. Onemocnění se může také během let zhoršovat, nebo zůstává stabilní s mírnou aktivitou. Není vyloučena ani jeho regrese. Karásková et Prošková (31)

### **2.11.2 Ulcerózní kolitida**

Ulcerózní kolitida je hemoragicko – katarální zánět sliznice tlustého střeva. Onemocnění vždy začíná zánětem konečníku, postupně se šíří dál a postihuje část nebo i celé tlusté střevo. Charakteristická je tvorba různě velkých ulcerací – vředů. Ve velmi malém procentu případů může zánět postihnout i terminální ileum, ale to je spíše výjimečný stav. Onemocnění probíhá chronicky, jsou pro něj opět typické období remise a relapsu. Hrodek et Vavřinec (16)

Studie ukázaly, že 20 % všech diagnostikovaných případů jsou pacienti před dvacátým rokem života a větší výskyt onemocnění byl prokázán u žen.

Ehrmann et Konečný (10), Lukáš et al. (24)

#### **Příčiny vzniku**

Prozatím nebyla prokázána žádná vědecky podložená hypotéza, která by vysvětlovala příčinu vzniku ulcerózní kolitidy. Avšak aby onemocnění vůbec vzniklo, je nezbytná genetická predispozice. Ta určí, jak se bude imunitní systém chovat. Podobně jako u Crohnovy choroby je k propuknutí nemoci nutný tzv. spouštěcí faktor. Může jím být například změna životního stylu – ukončení kouření nebo kouření samotné, cestování či změna stravování. Dále pak střevní nebo celková infekce, dlouhodobý vysoký stres. Působit může i dlouhodobá léčba pomocí antimikrobiálních látek a tím celkové oslabení organismu. Za další negativní faktor lze považovat užívání hormonální antikoncepce, to je však velice individuální. Hlavním důsledkem vzniku chronického zánětu tohoto typu v těle je autoimunitní reakce, kdy abnormálně organismus reaguje na vlastní bakteriální flóru ve střevě.

Karásková et Prošková (31), Lukáš et al. (24)

#### **Příznaky**

Typickým příznakem je velmi bolestivé a přetrvávající nucení na stolicí. Je vyprazdňována stolice s příměsí hlenu, krve a hnisu. Příznaky lze rozdělit na střevní a

mimostřevní. Střevní příznaky mají pozměněný charakter v závislosti na lokalizaci zánětu. Pokud zánět postihne poslední úsek střeva nebo rektum, neodchází při vyprazdňování z těla přímo formovaná stolice, ale spíše jen hlen s příměsí krve a hnisu. Při postižení sestupného tračníku je při nutkavých defekacích stolice přítomna vždy. Charakter má spíše kašovité až vodnaté s příměsí opět hlenu a krve. Při lokalizaci zánětu v celém střevě nebo v jeho většině je typická navíc vysoká horečka doprovázená křečovitými bolestmi břicha, malnutrice a chudokrevnost. Mimostřevní příznaky nepostihují všechny pacienty s diagnostikovanou ulcerózní kolitidou. Do této skupiny lze zahrnout například postižení kloubů, žlučových cest, oka a jeho částí, nebo například kožní vyrážky. Povědomí o nich je důležité zejména z toho důvodu, že u některých případů ulcerózní kolitidy se vyskytnou ještě dříve než pro ni příznaky typické. Ehrmann et Konečný (10), Hrodek et Vavřinec (16)

## **Léčba**

Terapie nemoci je během na dlouhou trať. Základem úspěchu je především seznámení se s nemocí a dodržování dietních a režimových opatření. Terapie probíhá ambulantně, pokud tedy není pacient ve stavu těžkého vzplanutí nemoci, v té době je hospitalizace nutná. Dodnes není známa žádná kauzální léčba. Neexistují ani žádné medikamenty, které by nemoc úplně vyléčily. Podávají se pouze léky protizánětlivé povahy – aminosalicyláty, které mají také příznivý vliv na imunitní systém. U těžších forem lékař nasazuje ještě kortikoidy. Další možností je léčba chirurgická. Jedná se o proktokolektomii, ta vede k úplnému odstranění nemoci. Toto řešení je ale až krajní variantou, protože při něm pacient přijde o celé tlusté střevo. K operaci se přistupuje pouze v případě možné přednádorové aktivity, nebo v případě negativní reakce na léčbu medikamenty. Výsledkem je vývod z tenkého střeva. Lukáš et al. (24), Zádorová (37)

## **Biologická léčba**

Od roku 2006 se u pacientů trpících ulcerózní kolitidou začal úspěšně uplatňovat další způsob léčby. Jde o léčbu biologickou, jejíž podstatou je podávání protilátek proti cytokinům (převážně TNF  $\alpha$ ). Protilátky se snaží zasáhnout do patologických

imunitních mechanismů a potlačit jejich aktivitu. Zjednodušeně lze říci, že fungují jako imunosupresivní terapie. Tento typ léčby se uplatňuje u pacientů s těžkou formou choroby, kterým hrozí proktokolektomie, nebo v těch případech, kdy pacient nereaguje na léčbu imunosupresivy a kortikoidy. Ehrmann et Konečný (10)

## **2.12 Funkční onemocnění**

### **2.12.1 Syndrom dráždivého tračníku**

Funkční trávicí poruchy jsou patologické stavy, které se projevují trávicími obtížemi bez prokazatelné morfologické nebo biochemické příčiny. Závada (38)

Syndrom dráždivého tračníku se též označuje jako dolní funkční dyspepsie. Symptomy syndromu dráždivého tračníku lze definovat jako alespoň 12 týdnů (ne nutně v kuse) trvající pocity tlaku a plnosti v dolní polovině břicha. Tyto tlaky jsou zmírněny nebo mohou úplně vymizet při defekaci. Jejich vznik je možné spojit se změnou frekvence a charakteru stolice. Typické je střídání zácpy s průjmem. Dále pak pocity nutkání k defekaci, pocit plnosti a nedokonalého vyprázdnění spojené křečemi v břiše, meteorismus, flatulence, bolesti břicha – nejčastější příznak.

Spouštěcím mechanismem rozvoje potíží může být stressová situace. Dále je výskyt obtíží spíše individuální. Mohou se vyskytnout v závislosti na ročním období nebo se závislostí na příjmu potravy či jiné specifické činnosti. Svými příznaky mohou imitovat celou řadu závažných organických onemocnění. Mezi alarmující příznaky vzniku patří nástup obtíží ve věku nad 50 let, jejich setrvalá progresse, teplota, váhový úbytek, příměs krve či hnisu na stolici či dehydratace. Lukáš (25)

Diagnostika syndromu dráždivého tračníku je vzhledem k pestré symptomatologii širokým diferenciativním diagnostickým problémem. Dle příznaků je možné syndrom nesprávně identifikovat jako kolorektální karcinom, onemocnění

tlustého střeva, idiopatické střevní záněty a celé spektrum infekčních onemocnění. Z tohoto důvodu má diagnostická strategie funkčních poruch dvě složky. Tou první je shrnutí charakteristických projevů onemocnění. Druhou strategií je pomocí vyšetřovacích postupů vyloučit zmíněná organická onemocnění. Závada (38)

Léčba syndromu dráždivého tračníku je dlouhodobá, obtížná a často bez úspěchu. Patří k ní důkladné seznámení pacienta s onemocněním, vyvarování se spouštěcímu faktoru, zlepšení životosprávy, individuální dietní režim. Dále se léčba dělí vzhledem k charakteru stolice. Při dominanci průjmu se provádí test s vyloučením laktózy v potravě, mohou se podat antidiarotika a potravě se přidává vláknina. Při dominanci zácpy se zavádějí režimová opatření. Do těch lze zařadit dostatečnou hydrataci, vlákninu v potravě, u těžkých forem je nutné podání laxativa. Při velkých bolestech břicha až křečích se doporučuje podání spasmolytik. Lukáš (25)

### 2.13 Metody stanovení

Ke stanovení fekálního kalprotektinu lze v dnešní době využít řadu komerčně vyráběných testů. Pro kvalitativní stanovení jsou na trhu rychlé imunochromatické testy a stanovení kvantitativní jsou dostupné soupravy ELISA. Dále pak také testy na principu sendvičové imunoanalýzy na testovacích kazetkách vyznačující se svou rychlostí. Metody pro kvantitativní stanovení umožňují selektivní stanovení kalprotektinu díky jeho reakci s vysoce specifickou protilátkou. Test probíhá na mikrotitrační destičce, kterou je tato specifická protilátka potažena. Po kontaktu vzniká sendvičový komplex, do kterého tedy spadá navázaná protilátka na pevné fázi, antigen a protilátka značená enzymem. Na destičku je přidán substrát, který umožní spuštění enzymové reakce. Na konci reakce je změřena absorbance produktu. Měří se z důvodu přímé úměry měřené absorbance produktu s množstvím kalprotektinu ve vzorku. Vyšetření pomocí ELISA testů je finančně výhodné, tedy alespoň pro laboratoře, které mají dostatečný počet vzorků. Více využívané jsou testy na kazetkách. Jsou sice dražší, ale výhodu mají ve své rychlosti. Rychlá dispozice výsledku umožňuje jejich použití i v režimu statim. BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites (6), Karásková et Prošková (31)

Vzorky se odebírají do čistých zkumavek a skladují se v chladničce za teploty 2 – 8 °C. Maximální doba uložení v chladničce je 7 dní. Vzorek lze skladovat i delší dobu, ale je potřeba ho zmrazit při teplotě < - 20 °C. Vzorky vydrží stabilní po dobu třech měsíců. Velmi důležité je odebrání vzorku bez chemických nebo biologických přísad. Karásková et Prošková (31), Fagerhol (11)

### **3 Praktická část**

#### **3.1 Cíle práce**

Cílem mé práce bylo osvojení si identifikačních metod *H. pylori* a kalprotektinu využívajících se v dnešní době v rámci laboratorní praxe. Dalším mým cílem bylo osvojení si základní interpretace výsledků těchto metod.

#### **3.2 Hypotéza a výzkumná otázka**

Hypotéza: Výskyt *H. pylori* bude závislý na ročním období.

Výzkumná otázka: Jak častá je frekvence výskytu pozitivních hodnot hladiny kalprotektinu ve stolici za rok 2014?

#### **3.3 Charakteristika zkoumaného souboru**

Vyšetření na průkaz *Helicobacter pylori* a stanovení hladiny kalprotektinu ve vzorcích stolice jsem prováděla v laboratoři Stafila spol s.r.o. Do laboratoře jsem docházela po dobu 3 měsíců, vždy když daný materiál přišel k vyšetření. Vzorky jsem tedy sbírala a zpracovávala od 7. 10. 2014 do 20. 12. 2014, dokud jsem nenasbírala od obou 25 vzorků. Vzorky pro vyšetření přítomnosti *H. pylori* jsem měla nasbírané dříve, chodily totiž s vyšší frekvencí než materiál na stanovení hladiny kalprotektinu. Nejčastěji jsem v obou případech vyšetřovala materiál od dětských pacientů, kdy vzorky k vyšetření posílali pediatři z jihočeského kraje. Nejvyšší procento vyšetřovaných vzorků bylo od pacientů z pediatrické ordinace v Třeboni od prof. MUDr. Velemínského, CSc., dr. h. c.

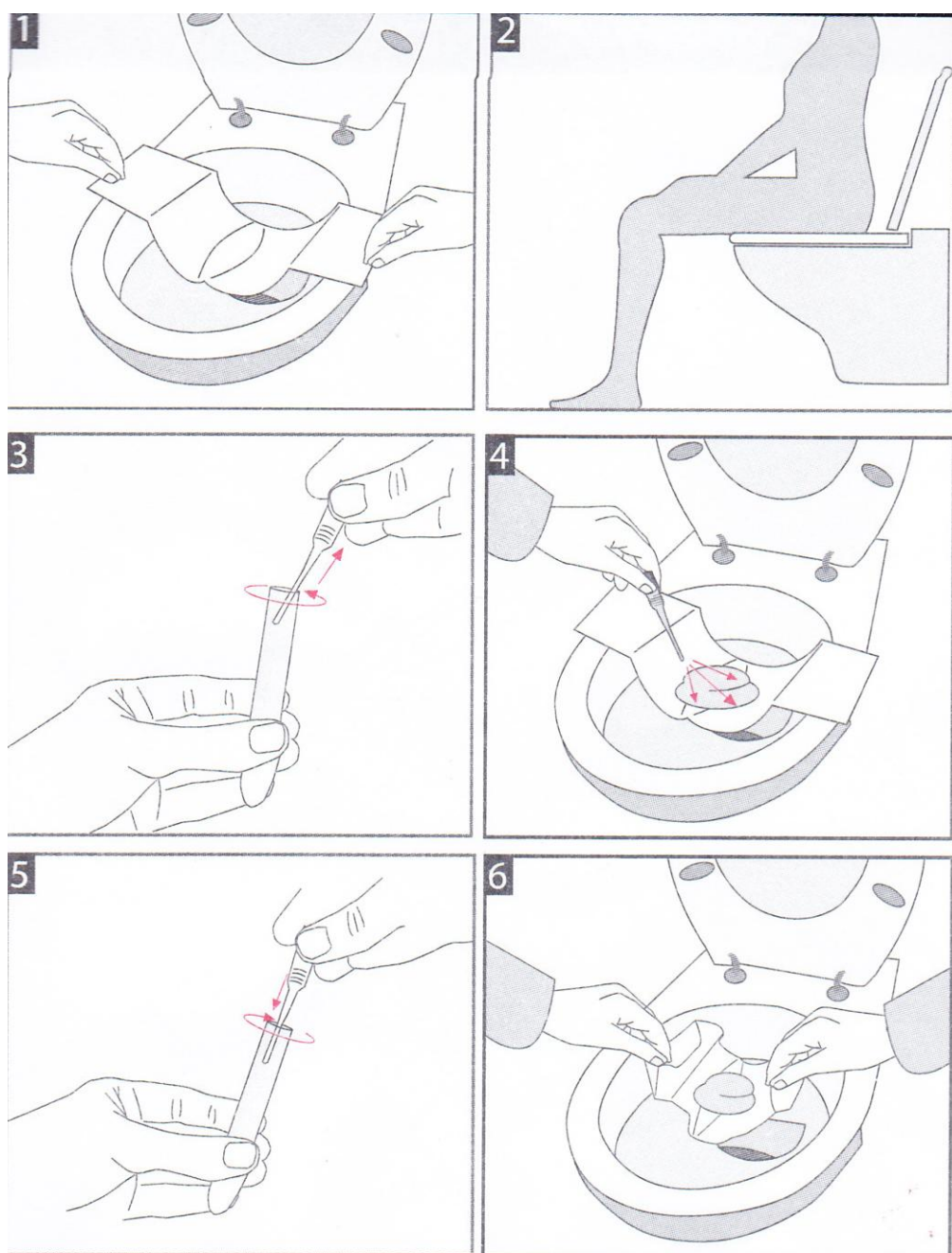


### 3.4 Odběr a transport vzorků

Odběr vzorku pro obě vyšetření provádí pacient sám, vždy je však předem lékařem poučen o správném odběru. Při odběru vzorku pro vyšetření přítomnosti *H. pylori* v organismu pacient sbírá náhodný vzorek stolice na čistý suchý pruh papíru nebo do čisté a suché nádoby. Důležité je, aby pacient vzorky nenaředil vodou z toalety. Dále pacient odšroubuje a vyjme odběrovou tyčinku z odběrové nádoby, tu získá od svého lékaře. Odběrová nádobka obsahuje roztok k uchování vzorku. Poté pacient odebere z několika míst stolice vzorek a odběrovou tyčinku zasune zpět do nádoby. Zde práce pacienta končí a vzorek se dostává do rukou kvalifikovaného zdravotnického personálu, který vzorek transportuje do laboratoře. Měl by být zpracován co nejdříve, maximální doba uložení je dva dny. Vzorek by měl být skladován a transportován ve vzduchotěsné nádobě při teplotě 2 – 8 °C. Krátkodobé vystavení teplotám do 30 °C vzorek neovlivní.

Při odběru vzorku pro stanovení hladiny kalprotektinu je postup stejný, jen pacient odebírá vzorek do odběrové lahvičky bez jakéhokoli roztoku.

Pokud není pacient schopný odběru stolice do sběrné nádoby sám, může donést vzorek stolice v čisté suché nádobě a vzorky do sběrné nádoby odebere personál ordinace nebo laboratoře.



Obr 1: Návod ke správnému odběru vzorku

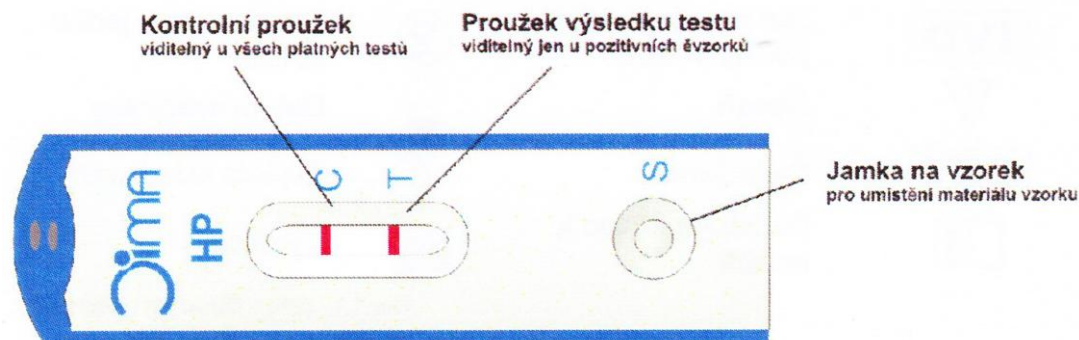
zdroj - DIMA *H. pylori* (9)

### 3.5 Použité metody a techniky

#### 3.5.1 DIMA *H. pylori* test

DIMA *H. pylori* test je rychlý kvalitativní test neinvazivního charakteru. Je založen na principu imunochromatografické metody a slouží k průkazu antigenu *Helicobacter pylori* ve vzorku stolice. Test probíhá na testovací destičce. Ta má na svém povrchu jamku pro aplikaci vzorku a reakční zónu s testovací – T a kontrolní zónou - C. Zmíněná reakční zóna je přímo na membráně, kde test probíhá. Při testování se využívá specifické monoklonální protilátky proti antigenu *H. pylori*. Jedna z protilátek je nanášena na membránu, tam tvoří linii. Druhá protilátka je konjugována s částicemi koloidního zlata, to způsobí její obarvení do červené barvy. Pokud je tedy ve vzorku přítomen antigen *H. pylori*, vytvoří komplex s červeně obarvenou protilátkou. Roztok poté pomocí vztlínání prochází membránou, kde je komplex zachycen protilátkou nanášenou na membráně. Následně se objeví červená linie v testovací zóně - T. Pokud se tedy objeví červená linie právě v této zóně, je test pozitivní – ve vzorku byl detekován antigen proti *H. pylori*. Kontrolní zóna – C je interní kontrolou kvality provedení testu. Na rozdíl od výsledkové linie v T – zóně se kontrolní linie vytvoří nezávisle na přítomnosti antigenu *H. pylori*. Vytvoření kontrolní linie ukazuje, že test byl proveden správně a došlo ke správnému vztlínání na membráně. Kontrolní linie se musí objevit při každém platném testu.

Testovací souprava musí být uložena v chladu při teplotě 2 – 8 °C nebo při laboratorní teplotě v maximech do 30 °C. Uložení probíhá v originálním obalu vždy jen po dobu skladovatelnosti.



Obr 2: Názorný popis detekční destičky

zdroj - DIMA *H. pylori* (9)

### 3.5.2 Postup analýzy

1. Před provedeným testem si celou testovací sadu vyndám z originálního obalu a nasadím si ochranné rukavice. Pro každého vyšetřovaného pacienta připravím a popíšu jednu testovací destičku, každý má své osobní číslo přidělené systémem LIS. V laboratoři Stafila jsou testovací kazety uchovávány při pokojové teplotě, proto není potřeba je před použitím temperovat.
2. Odběrovou nádobku označím stejně jako testovací destičku pacienta. Tu poté promíchávám tak dlouho, dokud se vzorek úplně nerozmělní v extračním roztoku.
3. Odšroubuji bílý uzávěr a odlomím špičku pod ním. Tu odlomuji směrem od sebe, aby nedošlo k potřísnění jejím obsahem.
4. Svisle nakapu tři kapky roztoku (přibližně 120  $\mu$ l) do aplikační jamky na testovací destičce.
5. Nakapaný roztok nechám vzlínat z aplikační jamky přes membránu do reakční zóny. Po 10 minutách odečtu výsledek. Silně pozitivní výsledek můžu odečíst už dříve. Nejpozději však mohu odečítat po 20 minutách.

Je možné, že během průběhu testu membrána v reakční zóně zežloutne. To v důsledku zabarvení stolice. Pokud zežloutnutí nebrání v odečítání výsledku, tak není na škodu.

### **3.5.3 Interpretace výsledků**

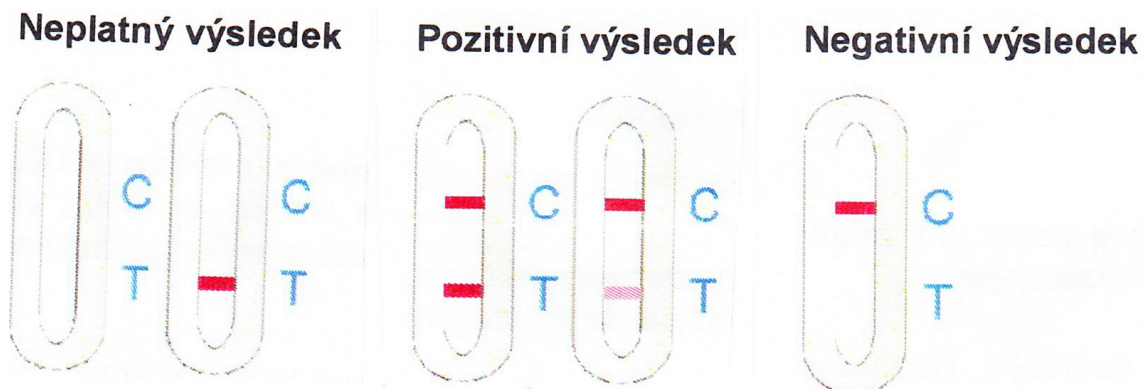
Pozitivní výsledek testu poznám dle dvou růžovočervených barevných zón. Z nichž jedna se objeví v kontrolní a druhá v testovací zóně. Barevná entenzita není vždy stejná, ve většině případů se v odstínech liší.

Negativní výsledek značí pouze jedna zobrazená růžovočervená linie v kontrolní zóně – C. V testovací zóně nesmí být přítomen ani slabě růžová linie.

Neplatný je test pokud se barevná linie neobjeví nikde, tedy ani v kontrolní zóně. V tom případě je nutné test opakovat.

Falešně negativní výsledek

Pokud před vyšetřením pacient užívá preparáty obsahující bizmut, může dojít ke zkreslení výsledku. Vychází falešně negativní výsledek a to z toho důvodu, že bizmut potlačuje *H. pylori*. V tomto případě je nutné provést test znovu nejméně dva týdny po ukončení terapie.



Obr 3: Zobrazení výsledků na detekční destičce

zdroj - DIMA *H. pylori* (9)



Obr 4: Detekční destička a nádobka s extrakčním roztokem

zdroj – DIMA *H. pylori* (9)

### **3.5.4 BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites**

Tento test byl vytvořen k selektivnímu měření antigenu kalprotektinu pomocí sendvičové imunoanalýzy. Testování probíhá na testovací destičce, ze které výsledek čte reader. Na destičce se nachází reakční oblast s membránou, která je potažena monoklonálními capture protilátkami (mAb). Tyto protilátky jsou vysoce specifické pro kalprotektin. Sekundární monoklonální detekční protilátky konjugované na částice koloidního zlata jsou naneseny na podložku uvolňující konjugát a uvolní se do reakčního systému po přidání extrahovaného a naředěného vzorku stolice. Zlatý konjugát kalprotektin/anti – kalprotektin se naváže na anti – kalprotektinové protilátky přítomné na testovací linii. Zbývající volný anti – kalprotektinový zlatý konjugát se naváže na kozí antimyší protilátky navázané na kontrolní linii. Intenzita signálu testovací linie a kontrolní linie je kvantitativně změřena pomocí BÜHLMANN Quantum Blue® readeru.

Reagencie používané při stanovení kalprotektinu jsou stabilní při teplotě 2 - 8 °C, uchovávají se tedy v chladničce maximálně po dobu expirace.

### **3.5.5 Postup analýzy**

1. Vyndám reagencie z chladničky a nechám je temperovat na pokojovou teplotu 18 – 28 °C.
2. Popíšu si extrakční nádobky a zkumavky na ředění číslem pacienta přiděleným od LISu. Detekční destičku prozatím nevyndávám z originálního obalu. Tu vyndám až těsně před jejím vložením do readeru. Mohlo by dojít k jejímu znehodnocení například navlhnutí.
3. Otevřu extrakční nádobku a štětinkou opatrně naberu z odběrové nádobky vzorky stolice, ty odebírám z více míst. Poté nádobku s extračním roztokem

- pečlivě uzavřu a promíchávám tak dlouho, dokud nejsou všechny částičky nabraného vzorku stolice ze štětinky opadány a rozmělněny v roztoku.
4. Nechám nádobku s obsahem odstát, dokud se nerozpuštěné částičky vzorku neusadí u dna.
  5. Pipetuji 20  $\mu$ l vzorku 300  $\mu$ l extrakčního pufru do připravených popsaných zkumavek. Nechám 10 minut odstát.
  6. Mezitím si nastavím dle návodu BÜHLMANN Quantum Blue® reader pro stanovení kalprotektinu. Nastavuji metodu s interním časovačem – <CAL 720 >. Přístroji chvíli trvá, než se nastaví a je připraven k použití.
  7. Vyndám testovací destičku z ochranného obalu a popíšu ji pacientovým číslem.
  8. Po uplynutí čekací doby nepipetuji 60  $\mu$ l vzorku ze zkumavky do aplikační jamky na testovací destičce.
  9. Počkám chvíli, až kapalina vzlíná alespoň ke kontrolní zóně a vložím destičku do přístroje.
  10. Poté už připravený a nastavený přístroj jen uzavřu a zapnu stávkem enter.
  11. Analýza trvá přesně 720 vteřin poté reader zpracuje výsledek a zobrazí ho na displeji.

### **3.5.6 Interpretace výsledků**

Pro platný výsledek testu, musí být v každém případě viditelná kontrolní řada - C. Ta je použita pouze jako funkční kontrola testu a nemůže být použita pro interpretaci výsledků testovací řady - T. Pokud není testovací řada - T detekovatelná po 12 minutách inkubace přítomná koncentrace kalprotektinu ve vzorcích stolice je pod detekčním limitem.

V případě že je testovací řada zjištělná po 12 minutách inkubace, koncentrace kalprotektinu přítomná ve vzorku je vypočítána readrem Quantum Blue® Reader.



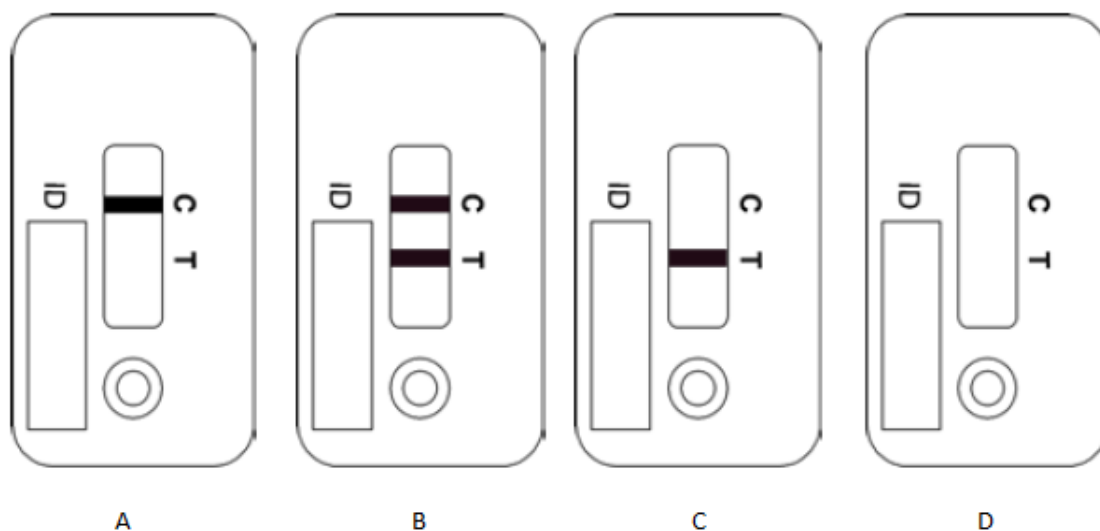
Pokud je po uběhlé době inkubace zjistitelná pouze testovací řada, výsledek testu je neplatný a test musí být opakován. Opakování testu platí i v případě nepřítomnosti pruhu zároveň ani v kontrolní ani v testovací řadě. Souběžně s testem výpočtu koncentrace přítomného kalprotektinu je provedena další kontrola platnosti kontrolní řady. Kdyby se stalo, že intenzita signálu kontrolní řady je pod šaržově specifickým prahem po 12 minutách inkubace, výsledek testu je také neplatný.

### **Výsledné hodnoty**

< 50 µg/g negativní výsledek

51 – 200 µg/g pozitivní výsledek

≥ 300 µg/g při těchto výsledcích je nutné dovyšetření zkoumaného vzorku, protože výsledek je příliš vysoký na to, aby byl změřen touto metodou. Vzorek se znovu ředí extrakčním pufrům v tomto případě 20 µl vzorku a 3000 µl extrakčního pufru. Na Quantum Blue® Readeru nastavujeme metodu BÜHLMANN Quantum Blue High Range calprotectin <CHR 900 > Po 10 minutách pipetujeme 80 µl do aplikační jamky na testovací destičce. Čekáme, až se na displeji po zpracování objeví výsledek.



Obr 5: Možné výsledky testu

zdroj - BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin (6)

#### Vysvětlivky:

Obrázek A - pokud není testovací řada (T) detekovatelná po 12 minutách inkubace, přítomná koncentrace kalprotektinu ve vzorcích je pod detekčním limitem.

Obrázek B - pokud je testovací řada (T) zjištělná po 12 minutách inkubace, koncentrace kalprotektinu přítomná ve vzorku je stanovena BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin readrem.

Obrázek C – v případě kdy je zjištělná pouze testovací řada (T) po 12 minutách inkubace, výsledek testu je považován za neplatný a test pro stanovení hladiny kalprotektinu je nutné opakovat pomocí další testovací kazety.

Obrázek D - pokud není po měřené době zjištělná ani kontrolní řada (C) ani testovací řada (T), výsledek testu je neplatný a test je nutno opakovat za použití nové testovací sady.

## 4 Výsledky

### 4.1 *Helicobacter pylori*

Za rok 2014 se v laboratoři Stafila spol s.r.o. vyšetřilo 147 vzorků metodou DIMA *H. pylori* test. Z toho 25 vzorků v období od 7. 10. 2014 do 10. 11. 2014 jsem vyšetřovala já sama. Vzhledem k velikosti laboratoře bylo vyšetřovaných vzorků méně než v jiných větších laboratořích. Za celý rok bylo zjištěno celkem 35 pozitivních vzorků.

Tabulka 1: Počet pozitivních a negativních nálezů ze souboru vzorků za rok 2014

<b>Měsíc</b>	<b>Pozitivní výsledky</b>	<b>Negativní výsledky</b>	<b>Výsledky celkem</b>
<b>Leden</b>	6	10	16
<b>Únor</b>	1	5	6
<b>Březen</b>	1	12	13
<b>Duben</b>	6	13	19
<b>Květen</b>	4	8	12
<b>Červen</b>	3	7	10
<b>Červenec</b>	2	4	6
<b>Srpen</b>	0	6	6
<b>Září</b>	1	14	15
<b>Říjen</b>	2	20	22
<b>Listopad</b>	6	10	16
<b>Prosinec</b>	3	3	6
<b>Celkový počet</b>	<b>35</b>	<b>112</b>	<b>147</b>

Tabulka 2: Mnou vyšetřované vzorky

Č. vzorku	Výsledek	Datum vyš.	Rok nar.	DG
1	neg	7.10.2014	2005	R10.4
2	neg	7.10.2014	2000	R10.1
3	neg	9.10.2014	2001	R10.4
4	neg	9.10.2014	2006	R10.3
5	neg	9.10.2014	2001	R10.4
6	neg	10.10.2014	1952	K25.9
7	poz	13.10.2014	2005	R10.4
8	neg	14.10.2014	1996	R10.1
9	neg	15.10.2014	2005	R10.1
10	neg	17.10.2014	1999	R10.4
11	neg	17.10.2014	2000	R10.4
12	neg	21.10.2014	1997	R10.1
13	neg	22.10.2014	1999	R10.4
14	neg	22.10.2014	2005	R10.4
15	neg	22.10.2014	2000	R10.4
16	neg	23.10.2014	2009	R10.4
17	poz	30.10.2014	1973	K299
18	neg	30.10.2014	1997	R10.4
19	neg	30.10.2014	2001	R10.4
20	neg	30.10.2014	1997	R10.4
21	neg	1.11.2014	2007	Z000
22	poz	5.11.2014	1962	Z038
23	poz	5.11.2014	2003	R10.4
24	neg	5.11.2014	2001	R10.4
25	neg	10.11.2014	1998	R10.4

Za dobu mého působení v laboratoři jsem vyšetřila 25 vzorků metodou DIMA *H. pylori* test. Z toho 4 vzorky jsem prokázala pozitivní, na obrázku jsou značeny červenou barvou.

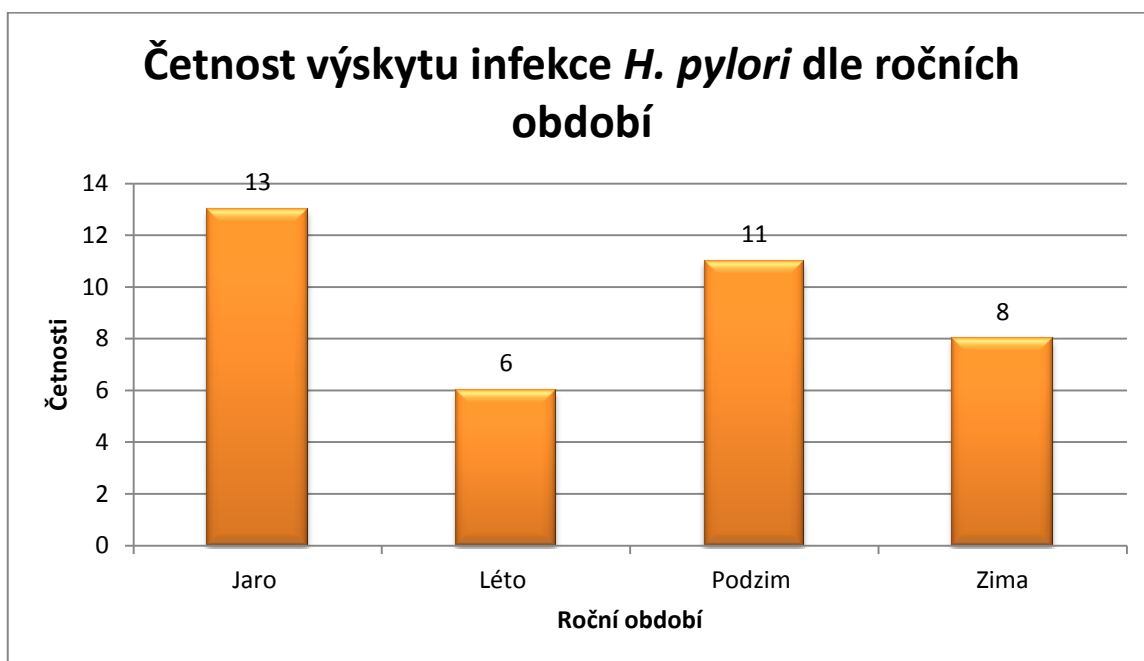
Tabulka 3: Vysvětlení zkratk diagnóz vyšetřovaných pacientů

R10.1	bolest umístěná v horní části břicha
R69	neznámá a neurčená příčina nemocnosti
R10.4	jiná a neurčitá břišní bolest
K25.9	žaludeční vřed
R10.3	bolest umístěná v dolní části břicha
R39	cystitida
K59.1	funkční průjem
K299	gastroduodenitida
Z000	celkové lékařské vyšetření
Z038	pozorování pro podezření na jiné onemocnění
K50.8	jiná Crohnova nemoc
A090	jiná nespecifická gastroenteritida
Z039	pozorování pro podezření na nemoc
K529	neinfekční gastroenteritida a kolitida
K30	Dyspepsie

Tyto diagnózy se vyskytovaly u všech testovaných pacientů na průkaz *Helicobacter pylori* ve vzorku stolice. Nejčastěji byla lékaři uváděna diagnóza R10.4 – tedy jiná a neurčitá břišní bolest. Při stanovování hladiny kalprotektinu byly u pacientů, kterým byly odebrány vzorky, zaznamenány stejné druhy diagnóz.

Za rok 2014 bylo v laboratoři mikrobiologie Stafila spol s.r.o. v Českých Budějovicích celkem 35 pozitivních vzorků testovaných na průkaz infekce *H. pylori*. Z tohoto celkového počtu se 13 případů infekce vyskytlo v jarních měsících, pouze 3 případy infekce v letních měsících, 11 případů infekce bylo prokázáno na podzim a 8 případů infekce se vyskytlo v zimních měsících. Jaro se tedy na celkovém počtu podílelo 37 %, léto pouze 9 %, podzim 31 % a zima 23 %.

Graf 1: Četnost výskytu infekce *H. pylori* dle ročních období



Nejvíce pozitivních výsledků výskytu infekce bylo zaznamenáno na jaře a na podzim.

## Stanovení hypotézy

Hypotéza: Výskyt *Helicobacter pylori* bude závislý na ročním období.

Vzhledem k nízkým četnostem v některých měsících jsem data seskupila do 4 ročních období a analyzovala tuto tabulku.

Tabulka 4: Analyzované výsledky

Období	Pozitivní výsledky	Negativní výsledky
<b>Zima</b> (21.12.2014 - 20.3.2014)	8	27
<b>Jaro</b> (20.3.2014 – 21.6.2014)	13	28
<b>Léto</b> (21.6.2014 – 23.9.2014)	3	24
<b>Podzim</b> (23.9.2014 – 21.12.2014)	11	33

Výsledek analýzy:

Chi-square (chi kvadrát test) = 3,862

P value (dosažená hladina významnosti) = 0,2768

$\alpha < 0.05$

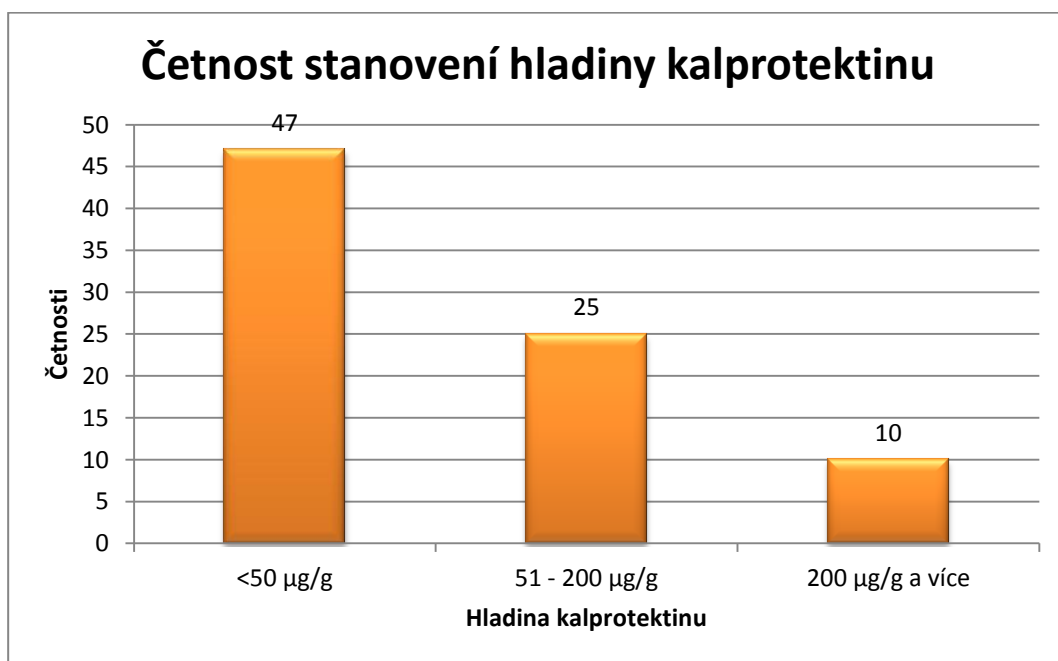
Výsledek statistické analýzy hypotézu vyvrátil. Aby byla potvrzena, musela by dosažená hladina významnosti být  $\alpha < 0.05$ . Výsledek mého testu je 0,2768.

Hypotéza tedy neplatí, je vyvrácena.

## 4.2 Stanovení hladiny fekálního kalprotektinu

Za rok 2014 bylo v laboratoři Stafila spol s.r.o. vyšetřeno celkem 82 vzorků ke stanovení hladiny kalprotektinu ve vzorku stolice. Vyšetření probíhalo pomocí metody BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites. Sama jsem se zúčastnila vyšetření celkem 25 vzorků v období 7. 10. 2014 do 20. 12. 2014. Hodnoty výsledků pro stanovení zánětlivého markeru jsou rozděleny do 3 skupin. První skupinou jsou výsledky, které BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin reader zhodnotil jako negativní, tedy hodnoty  $<50 \mu\text{g/g}$ . Těch je stanoveno z celkového počtu 47. Druhou skupinou jsou výsledky pozitivní – tedy od  $51 \mu\text{g/g}$  do  $200 \mu\text{g/g}$ , těch reader vyhodnotil za celý rok 25. Nejméně zastoupenou třetí skupinu tvoří výsledky silně pozitivní a to 10 diagnostikovaných vzorků. Negativní vzorky se tedy podílely 38 %, pozitivní 48 % a silně pozitivní 12 %.

Graf 2: Četnost stanovení hladiny kalprotektinu





Je nutné neopomenout podstatu prediktivní hodnoty negativního výsledku testu. Ten je velmi důležitý z důvodu výpovědi o tom, že se v těle pacienta nevyskytuje žádný zánět. Toho zjištění je podstatné pro stanovení dalšího léčebného postupu pacienta a uchrání ho například před invazivním kolposkopickým vyšetřením. Na druhou stranu pozitivní výsledek neznamena v každém případě výskyt IBD nebo Syndromu dráždivého tračnicku u pacienta, kterému byl vzorek odebrán. Může být ukazatelem jakéhokoli zánětu v těle, kolorektálního karcinomu nebo jiné patologie, která má souvislost se zvýšeným vylučováním leukocytů do střevního lumen. V každém případě musí lékař pozitivní hodnotu hladiny kalprotektinu řešit.

#### **Stanovení odpovědi na výzkumnou otázku:**

Jak častá je frekvence výskytu pozitivních hodnot hladiny kalprotektinu ve stolici za rok 2014?

Tabulka 5: Frekvence výskytu pozitivních hodnot kalprotektinu

Výsledek	Četnosti	Procentuelně	Frekvence výskytu poz. hodnot
Negativní	47	57,32 %	<b>42,68 %</b>
Pozitivní	25	30,49 %	
Velmi pozitivní	10	12,20 %	
Celkem	82	100 %	

Po analyzování této tabulky jsem došla k výsledku: Frekvence výskytu pozitivních hodnot hladiny kalprotektinu ve vzorku stolice za rok 2014 je **42,68 %**.

Tabulka 6: Mnou vyšetřované vzorky pro stanovení kalprotektinu

Kalprotektin	Datum vyš.	Rok nar.	DG
117 µg/g	7.10.2014	2013	R10.4
31 µg/g	7.10.2014	2005	R39
87 µg/g	17.10.2014	2010	R69
98 µg/g	22.10.2014	1999	R10.4
150 µg/g	22.10.2014	2001	K59.1
<30 µg/g	24.10.2014	2007	Z000
255 µg/g	30.10.2014	1973	K299
507 µg/g	4.11.2014	1947	K50.8
<30 µg/g	6.11.2014	2002	R10.1
<30 µg/g	7.11.2014	1995	R10.4
<30 µg/g	7.11.2014	1997	R10.4
<30 µg/g	7.11.2014	1995	Z000
<30 µg/g	10.11.2014	2004	R10.4
174 µg/g	12.11.2014	2006	R10.4
<30 µg/g	12.11.2014	2008	R10.4
<30 µg/g	24.11.2014	2003	R10.4
40 µg/g	24.11.2014	2002	R10.4
<30 µg/g	24.11.2014	1934	A090
150 µg/g	1.12.2014	1963	R10.4
<30 µg/g	1.12.2014	2012	R10.4
<30 µg/g	4.12.2014	2002	Z039
249 µg/g	4.12.2014	1995	R10.4
31 µg/g	11.12.2014	2011	K529
107 µg/g	16.12.2014	1997	R10.4
<30 µg/g	20.12.2014	2001	R10.4

Červeně označené hodnoty jsou vyhodnoceny jako pozitivní.

## 5 Diskuse

Cílem mé bakalářské práce bylo osvojení si základních identifikačních metod *Helicobacter pylori* a kalprotektinu v rámci laboratorní praxe. Druhým mým cílem bylo osvojení si základní interpretaci výsledků použitých metod. Těchto cílů jsem dosáhla praxí v laboratoři Stafila spol s.r.o. Do laboratoře jsem docházela pravidelně po dobu tří měsíců, pokaždé když přišel k vyšetření vzorek stolice na průkaz *H. pylori*, nebo stanovení hladiny fekálního kalprotektinu. Po dobu mého působení jsem vlastnoručně zpracovala 25 vzorků stolice na průkaz patogena i stanovení zánětlivého markeru. K vyšetření přítomnosti *H. pylori* ve vzorku stolice jsem používala metodu, pomocí které vyšetřují vzorky v této laboratoři. Jedná se o metodu DIMA *H. pylori* test. DIMA *H. pylori* (9) Ke stanovení hodnot kalprotektinu jsem používala metodu BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites. BÜHLMANN Quantum Blue (6) Vyšetření jsem vždy prováděla pod odborným dohledem MUDr. Cihlové a laborantek mikrobiologického pracoviště.

Na začátku zpracování mé bakalářské práce jsem stanovila jednu hypotézu - Výskyt *Helicobacter pylori* je závislý na ročním období. Stanovenou hypotézu jsem však vyvrátila. V laboratoři Stafila spol s.r.o. jsem seskupila výsledky všech stanovovaných vzorků vyšetřením DIMA *H. pylori* test za rok 2014. DIMA *H. pylori* (9) Vzorků se za celý rok 2014 vyšetřilo 142. Z toho 35 vzorků bylo stanoveno pozitivními. Rozdělila jsem si vyšetřované vzorky dle ročních období. A z celkového počtu všech pozitivních výsledků jsem pomocí statistických metod vytvořila četnost výskytu *H. pylori* v různých ročních obdobích. Z celku 35 pozitivních výsledků se 13 případů infekce vyskytlo v jarních měsících, pouze 3 případy infekce v letních měsících, 11 případů infekce bylo prokázáno na podzim a 8 případů infekce se vyskytlo v zimních měsících. Jaro se tedy na celkovém počtu podílelo 37 %, léto pouze 9 %, podzim 31 % a zima 23 %. Analyzovala jsem tabulku pomocí chi – kvadrát testu s výsledkem 3,862. Dosažená hladina významnosti vyšla 0,2768. K potvrzení hypotézy by muselo být dodrženo pravidlo  $\alpha < 0,05$ . ( $\alpha$  – dosažená hladina významnosti). Na základě tohoto výsledku

můžu říci, že je hypotéza vyvrácena. V literatuře je uvedeno, že obtíže u vředové choroby způsobené patogenem *H. pylori* přicházejí obvykle ve dvou obdobích v roce (přibližně na jaře a na podzim). U nejčastěji se vyskytujících sekundárních vředů po nesteroidních antirevmaticích sezonní závislost nebývá vyznačena. Frič et Jirásek (13) Vyvrácením mé hypotézy jsem se tedy shodla s názory publikovanými v odborné práci. Frič et Jirásek (13) Nemohu však tvrdit, že mé statistické zpracování pomocí  $\chi^2$  – kvadrát testu bylo přesné. Důvodem je velmi malý počet analyzovaných dat.

Stanovila jsem si také jednu výzkumnou otázku. Jak častá je frekvence výskytu pozitivních hodnot kalprotektinu ve vzorku stolice za rok 2014? Za rok 2014 bylo v laboratoři Stafila spol s.r.o. vyšetřeno celkem 82 vzorků na stanovení hladiny kalprotektinu ve vzorku stolice. Vyšetření probíhalo pomocí metody BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites. BÜHLMANN Quantum Blue (6) Hodnoty výsledků pro stanovení zánětlivého markeru jsou rozděleny do 3 skupin. První skupinou jsou výsledky, které BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin reader BÜHLMANN Quantum Blue (6) zhodnotil jako negativní, tedy hodnoty  $<50 \mu\text{g/g}$ . Těch je stanoveno z celkového počtu 47. Druhou skupinou jsou výsledky pozitivní – tedy od  $51 \mu\text{g/g}$  do  $200 \mu\text{g/g}$ , těch bylo vyhodnoceno za celý rok 25. Nejméně zastoupenou třetí skupinu tvoří výsledky silně pozitivní a to 10 diagnostikovaných vzorků. Negativní vzorky se tedy podílely 57,32 %, pozitivní 30,49 % a silně pozitivní 12,20 %. Na základě těchto výsledků mohu odpovědět na výzkumnou otázku. Frekvence výskytu všech pozitivních hodnot kalprotektinu ve vzorku je 42,68 %. Výsledek jsem vypočetla pomocí statistické metody výpočtu četnosti stanovení hladiny kalprotektinu. Dále jsem statisticky vypočetla medián naměřených hodnot. Ten byl vzhledem ke všem výsledkům za celý rok 2014 38,5. Výsledek vypočteného mediánu mohu porovnat s výsledky průzkumu prováděného v gastroenterologické ambulanci dětské kliniky FN Olomouc. Prošková et Karásková (31) Ty uvádí, že od prosince roku 2012 do června roku 2013 bylo na oddělení gastroenterologické ambulance vyšetřeno 40 dětských pacientů. Medián změřených hodnot fekálního kalprotektinu byl  $134 \mu\text{g/g}$ . Prošková et Karásková (31) Rozdíl mezi mediány je poměrně velký. Příčinou rozdílu bude nejspíše fakt, že do laboratoře Stafila spol s.r.o. chodí vzorky od pacientů s různých oddělení s různými

potížemi a diagnózami. Srovnávaný výzkum zahrnuje pouze pacienty gastroenterologické ambulance, kteří mají větší předpoklad výskytu zánětu způsobující zvýšenou hladinu kalprotektinu. Prošková et Karásková (31)

## 6 Závěr

V laboratoři Stafila spol s.r.o. bylo za rok 2014 vyšetřeno celkem 142 vzorků na stanovení přítomnosti *Helicobacteria pylori*. Z toho pozitivních vzorků bylo stanoveno 35. Největší procento výskytu patogenu bylo na jaře 37% a na podzim 31 %. Dle mých statistických výpočtů byla stanovená hypotéza vyvrácena a nebyla prokázána závislost výskytu *H. pylori* na ročním období.

Dalším vyšetřovaným byl zánětlivý marker kalprotektin. V roce 2014 v laboratoři Stafila spol s.r.o. bylo vyšetřeno celkem 82 vzorků na stanovení hladiny kalprotektinu ve vzorku stolice. První nejpočetnější tvoří výsledky, které jsou vyhodnoceny jako negativní, tedy hodnoty  $<50 \mu\text{g/g}$ . Stanoveno bylo z celkového počtu 47 negativních případů. Druhou skupinou jsou výsledky pozitivní – tedy od  $51 \mu\text{g/g}$  do  $200 \mu\text{g/g}$ , těch bylo za celý rok 2014 vyhodnoceno 25. Nejméně zastoupenou třetí skupinu tvoří výsledky silně pozitivní a to 10 diagnostikovaných vzorků. Negativní vzorky se tedy podílely 38 %, pozitivní 48 % a silně pozitivní 12 %. Frekvence výskytu pozitivních hodnot kalprotektinu za celý rok 2014 ve vzorcích stolice je 42,68 %.

V návazné diplomové práci by bylo zajímavé vyšetřit všechny vzorky pozitivní na *H. pylori* ještě na stanovení hladiny kalprotektinu a poté zhodnotit výsledky. Tento poznatek bych ráda dále rozvíjela v rámci svého magisterského studia.

## 7 Seznam použité literatury

1. BALLAM, L. D., MENDALL, M. A., ASANTE, M., MORRIS, J., STRACHAN, D. P., WHINCUP, P. H., COOK, D. G. Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol* [online]. 2000, 53(4) [cit. 2015-04-12]. ISSN 0002-9173. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1731175>
2. BARGERON, Leonce, Frederik SCHLINGEMANN, Rene M STULZ a Chad ZUTTER. Why do private acquirers pay so little compared to public acquirers? *Fecal calprotectin: can be used to distinguish between bacterial and viral gastroenteritis in children?* [online]. 2015, (7) [cit. 2015-08-07]. DOI: 13061. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26233616>
3. 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
4. BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. 1. vydání. Praha: Galén, 2009. s. 244-246 ISBN-13: 978-80-7262-644-1
5. BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. SCHINDLER, A. SOUČEK a J. VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praga: Marvill, 1996. ISBN 8594031505280
6. BÜHLMANN Quantum Blue® Calprotectin Ascites – návod k použití, 2013.
7. BUREŠ, J., KOPÁČOVÁ, M., KOUPIL, I., SEIFERT, B., ŠKODOVÁ FENDRICOVÁ, M., ŠPIRKOVÁ, J., VOŘÍŠEK, V., REJCHRT, S., DOUDA, T., KRÁL, N., TACHECÍ, I. Significant decrease in prevalence of *Helicobacter pylori* in the Czech Republic. *World J Gastroenterol* [online]. 2012, 18(32) [cit. 2015-04-29]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436059>

8. BUREŠ, J., KOPÁČOVÁ, M., KOUPII, I., VOŘÍŠEK, V., REJCHRT, S., BERÁNEK, M., SEIFERT, B., POZLER, O., ŽIVNÝ, P., DOUDA, T., KOLESÁROVÁ, M., PINTÉR, M., PALIČKA, V., HOLCÍK, J. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in the Czech Republic. *Helicobacter* [online]. 2006, 11(1) [cit. 2015-05-021]. ISSN 1083-4389. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423091>
9. DIMA H. *H. pylori* test – příbalová informace k testu, 2009
10. EHRMANN, J., KONEČNÝ, M., *Diagnostika a léčba idiopatických střevních zánětů*. Medicína pro praxi 2011; 10: 435–437.
11. FAGERHOL, MK *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet. 2000; 356: 1783-4
12. 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
13. FRIČ, P., JIRÁSEK, V. *Gastroduodenální peptický vřed: Doporučený postup České gastroenterologické společnosti ČSL JEP pro praktické lékaře* [online]. 2001 [cit. 2015-07-23]. Dostupné z: <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>
14. GREENWOOD, D., R. C. B. SLACK, J. F. PEUTHERER a KOLEKTIV. *Lékařská mikrobiologie: Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Praha: Grada Publishing, 1999. ISBN 80-7169-365-0.
15. *Helicobacter pylori* – současný stav 1. část. *Farmakoterapeutické informace*. 2010, č. 4, s.1-4. ISSN 1211-0647
16. HRODEK, O., VAVŘINEC, J., et al. *Pediatric. I.* vydání. Praha : Galén, 2002. ISBN 80-7262-178-5
17. IMRIE C, ROWLAND M, BOURKE B, et al. Is *Helicobacter pylori* infection in childhood a risk factor for gastric cancer? *Pediatrics* 2001;107:373-80.
18. KAZEMI, S., TAVAKKOLI, H., HABIZADEH, M. R., EMAMI, M. H. Diagnostic values of *Helicobacter pylori* diagnostic tests: stool antigen



- test, urea breath test, rapid urease test, serology and histology. *J Res Med Sci* [online]. 2011, 16(9) [cit. 2015-08-01]. ISSN 1735-1995. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22973378>
19. KOHOUT, Pavel. *Vředová choroba*. Praha: Maxdorf 2005. s. 53-54. ISBN 80-7345-077-1
20. KOPÁČKOVÁ, Marcela, VOŘÍŠEK, Viktor, BUREŠ, Jan. *Využití dechových testů v gastroenterologii. Jaká je teorie a jaké jsou možnosti praktického využití*. [online] 2003 [cit. 2015-07-05]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualnimedicina/vyuziti-dechovych-testu-v-gastroenterologii-jaka-je-teorie-a-jak-154756>
21. KREJSEK, Jan, KOPECKÝ, Otakar. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nukleus, 2004, s. 492-499. ISBN 80-86-225-50-X
22. KYZEKOVÁ, J. *Žaludeční dyspepsie a Helicobacter pylori*. 1. vyd. Praha: Grada, 1998. s. 144. ISBN 80-7169-621-8.
23. LEE, M. S., YEH, C. J., CHEN, H. Y., TSOU, Y. K., LIN, C. H., LIEN, J. M. Clinical utility of histological examination of gastric ulcer margin to diagnose Helicobacter pylori infection. *Chang Gung Med J* [online]. 2012, 35(3) [cit. 2015-07-01]. ISSN 2072-0939. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735055>
24. LUKÁŠ, K., a spol. Idiopatické střevní záněty. *Diagnostika a léčba pro praxi*. Triton, Praha, 2. vydání, 1999.
25. LUKÁŠ, Karel. Funkční dyspeptické poruchy. *Postgraduální medicína* [online]. 2012, (6) [cit. 2015-08-01]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/funkcni-dyspepticke-poruchy-466716>
26. 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.
27. MALFERTHEINER, P., MEGRAUD, F., O'MORAIN, C., BAZZOLI, F., EL-OMAR, E., GRAHAM, D., HUNT, R., ROKKAS, T., VAKIL,

- N., KUIPERS, E. J. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* [online]. 2007, 56(6) [cit. 2015-07-30]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17170018>
28. SEDLÁČKOVÁ, M. *Infekce Helicobacter pylori: vředová choroba, karcinom žaludku, dyspepsie*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 1996. s. 162. ISBN 80-85800-32-2.
29. SEIFERT, B., CHARVÁTOVÁ, E. *Infekce Helicobacter pylori: Doporučený postup České gastroenterologické společnosti ČSL JEP pro praktické lékaře* [online]. 2001 [cit. 2015-07-01]. Dostupné z: <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>
30. SCHINDLER, J. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. s. 248. ISBN 978-80-247-3170-4.
31. Stanovení kalprotektinu ve stolici. PROŠKOVÁ, J. a E. KARÁSKOVÁ. *Laboratorní technika* [online]. 2013 [cit. 2015-08-07]. Dostupné z: <http://web2.stapro.cz/bullfons/32013/lab01.pdf>
32. ŠACHLOVÁ, M., KOUKALOVÁ, H., KAPIČKOVÁ, M., ŠTĚPÁNIKOVÁ, O. Vliv *Helicobacter pylori* na žaludeční kancerogenezi. *Klin Onkol* [online]. 2004, 17(4) [cit. 2015-07-08]. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/hledani-clanku/skupina/a/zobrazit/ids/253/>
33. ŠVESTKA, T. Infekce *Helicobacter pylori*. *Med. Praxi* [online]. 2011, 8(3) [cit. 2015-07-08]. ISSN 1214-8687. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2011/03/06.pdf>
34. TEKIN, KARSLIGIL et al. Urea Breath test and specific IgA in *Helicobacter pylori* infection. *Nobel medicus*. 2010, vol. 6, iss.3, s. 45-50
35. VOTAVA, M., L. ČERNOHORSKÁ, V. HEROLDOVÁ, V. HOLÁ, L. MEJZLÍKOVÁ, P. ONDROVČÍK, F. RŮŽIČKA, M. DVOŘÁČKOVÁ, V. WOZNICOVÁ a O. ZAHRADNÍČEK. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2006. ISBN 80-902896-6-5.

36. VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
37. ZÁDOROVÁ, Zdena. *Česká gastroenterologická společnost: Nеспецифické střevní záněty* [online]. ©2007. Poslední revize 2009-01-23, [cit. 2015-07-04]. Dostupné z: <http://www.cgs-cls.cz/informace-pro-pacienty/nespecificke-strevni-zanety/>
38. ZÁVADA, F., *Funkční dyspepsie horní a dolní: Doporučený postup České gastroenterologické společnosti ČSL JEP pro praktické lékaře* [online]. 2002 [cit. 2015-07-15]. Dostupné z: <http://www.cls.cz/seznam-doporucenych-postupu>
39. ZELENKOVÁ, Jitka. *Helicobacter pylori. Causa subita*, 2006, roč. 9, č. 5, s. 177-178. ISSN 1212-0197