

Helicobacter pylori - laboratorní diagnostika

Helicobacter pylori (Best Practice, No. 154)

McNulty C. A. M. , Wyatt J. I.

J. Clin. Pathol. , Vol. 52, 1999, č. 5. , s. 338-344

Volně přeložil a zkrátil MUDr. Plesník

Od izolace *Helicobacter pylori* (dále jen Hp) Marshallem roku 1982 bylo získáno mnoho poznatků o významné úloze tohoto mikroba v patogenezi chronické gastritídy a peptického vředu. Proto bylo nutné revidovat dlouho platné představy o etiologii peptického vředu jako projevu acidity žaludeční šťávy. Dyspepsie je častým onemocněním. V Anglii přichází ke svému lékaři asi 1% populace s bolestmi břicha po jídle. Podle výsledků vyšetření trpí 1/3 peptickým vředem, další 1/3 je bez patrné abnormality a zbytek má řadu jiných nemocí, jako žlučnickové kameny, dráždivý tračník a podobně. Obecně se dnes uznává, že histologicky potvrzenou chronickou gastritídu a dvanácterníkový vřed vyvolává u více než 90 % nemocných Hp a že Hp je původcem nejméně poloviny žaludečních vředů. Komplikace v podobě krvácení, perforace a stenózy vznikají každoročně u 3% vředařů. Pokud není pacient trvale léčen antagonisty receptoru H_2 dochází do roka k relapsům vředu u 82 % pacientů. Po primární eradikaci Hp je však opětovný výskyt peptického vředu zjištěn jen u 0-15% osob, takže výhody eradikace Hp jsou u těchto pacientů očividné.

Proto se dnes doporučuje vyšetření pacientů s akutním či s dřív prožitým peptickým vředem na přítomnost Hp a léčení pacientů s pozitivním nálezem.

Úloha Hp u dyspepsií bez vředu je méně jasná: krátké sledování takových pacientů neprokázalo žádný prospěch z léčby. Ale po roce byl příznivý vliv terapie zřetelnější. Pacienti s neulcerosní dyspepsií a s Hp mají 20 x vyšší riziko rozvoje vředu duodena než neinfikovaní pacienti. Celoživotní riziko vzniku rakoviny žaludku je u nich až 6x vyšší než u neinfikovaných osob. I když v klinických studiích nebyla prokázána prospěšnost léčby infikovaných pacientů bez peptického vředu, je jim terapie stále častěji doporučována vzhledem k asi 15 % riziku následných komplikací a k větší informovanosti veřejnosti o této infekci.

Na podzim 1996 byla uveřejněna mezinárodně doporučená směrnice (Maastricht consensus report), podle níž má být vždy před zahájením specifické léčby ověřena infekce Hp, neboť různé dyspeptické projevy jen neurčitě svědčí o příčině dyspepsie, nebo o přítomnosti Hp.

Laboratorní diagnostika

Infekci vyvolanou Hp může diagnostikovat praktický lékař, nebo endoskopické pracoviště. K endoskopickým diagnostickým metodám patří ureázový test při biopsii, histopatologické vyšetření a kultivace. Nepřímé testy, nevyžadující endoskopii, zahrnují průkaz radioaktivně značeného uhlíku ^{13}C či ^{14}C ve vydechovaném vzduchu. Jsou velmi spolehlivé, ale vyžadují značné investice do přístrojů

pro hmotnostní spektrometrii nebo scintilaci v tekutinách. Dále zahrnují serologická vyšetření, což je pro praktického lékaře nejlevnější a nejjednodušší dostupná metoda. K potlačení růstu Hp lze užít mnoha antimikrobních preparátů,

- 2 -

vismutových sloučenin a inhibitorů protonové pumpy. Pokud byly pacientovi tyto léky předepsány, nevede žádná výše uvedená metoda (vyjma serologie) ke spolehlivým nálezům po dobu nejméně jednoho měsíce od poslední dávky preparátu. Nyní se ve veřejném zdravotnictví klade velký důraz na úspory. Vyžadují se diagnostické a terapeutické standardy, založené na porovnávání nákladnosti a diagnostického přínosu každého testu. Které testy by se měly využívat ?

Invazivní testy

Endoskopické vyšetření umožňuje získat vzorky tkání a fotodokumentaci nálezů v jícnu, žaludku a v duodenu. Nález aktivního peptického vředu, nebo jizev po vředu, svědčí o současné nebo dřívější zánětlivé reakci a o abnormálních fyziologických poměrech, často vyvolaných infekcí Hp. Bohužel většina infikovaných pacientů nemá makroskopické změny zjistitelné při endoskopii.

Protože Hp je jednou z nejvýznamnějších příčin onemocnění gastroduodena, měl by být u všech pacientů s dyspepsií rutinní součástí endoskopického vyšetření také odběr vzorků k průkazu Hp.

Zlatým diagnostickým standardem průkazu infekce Hp je kombinace histologického a kultivačního vyšetření. Ale podobně citlivý i specifický je rychlejší a levnější ureázový test s bioptátem. Výběr metody se řídí účelem vyšetření: korelace endoskopického nálezu s klinickými potížemi vyžaduje odběr bioptátu na histologické vyšetření, kdežto ke zjištění citlivosti na antibiotika je nutná jeho kultivace.

BIOPTICKÉ VZORKY

Přítomnost Hp v žaludeční mukóze může být jen lokální, proto je třeba, k dosažení co největší citlivosti všech metod založených na biopsii, odebírat více vzorků. U některých osob může být kolonizována jen sliznice žaludečního fundu nebo antra atd.

Také léčba omeprazolem snižuje výskyt Hp v antru. Bioptáty z fundu žaludku by měly být proto odebírány od pacientů starších 55-ti let, od osob léčených inhibitory protonové pumpy a od osob po skončené léčbě infekce Hp. Vzorky z fundu také usnadní nález *Helicobacter heilmannii* (dříve: *Gastrospirillum hominis*), ale jeho výskyt je mnohem méně častý než Hp. Zvýšené náklady na vyšetření jiných vzorků žaludeční sliznice nejsou za normálních okolností u všech pacientů zdůvodnitelné.

Aby nedošlo k přenosu infekce mezi pacienty a k falešně pozitivním nálezům (zvláště předpokládá-li se zařazení polymerázové řetězové reakce -PCR- do vyšetření), je nutné před sterilizací užít k dekontaminaci klíštěk endoskopu ultrazvuku, nebo dezinfikovat endoskop nejméně 20-timinutovým ponořením do roztoku aldehydu (např. glutaraldehydu). K odstranění rizika kontaminace klíštěk formalínem odebírají se vzorky k mikrobiologickému vyšetření jako první. Vzorky k histologickému vyšetření je nutné ihned vložit do běžně užívaného fixačního roztoku (např. 5 % formalínu). Vzorky k mikrobiologickému vyšetření se hned po odběru uloží do transportního média nebo do vlhké atmosféry (např. do malé kádinky s trochou sterilního fyziologu). Vzorek nemá být do

roztoku namočen. Uložení vzorku ve vlhké atmosféře vyhovuje pokud bude zpracován v laboratoři během 3 hodin a umožňuje udělat z něj stěr pro barvení podle Grama. Bude-li vzorek zpracován později, obvykle stačí jeho zalití normálním fyziologickým roztokem, ale přes noc má být uchován v lednici. Přídavek 20 % glycerolu do transportního média umožní zmražení vzorku.

- 3 -

UREÁZOVÝ TEST BIOPTÁTU

Je to nejrychlejší a nejlevnější způsob průkazu přítomnosti Hp ve vzorku získaném při biopsii. Nejspolehlivější výsledky dává při inokulaci vzorku již na endoskopickém pracovišti. Test je široce známý a umožňuje diagnostikovat a zahájit léčbu řady pacientů dříve, než odejdou z endoskopického oddělení. Princip je velmi jednoduchý: spočívá v průkazu ureázy, kterou Hp tvoří ve velkém množství. Ureáza štěpí močovinu na čpavek za současného vzestupu reakce pH. Ten prokáže indikátor pH, obvykle fenolová červeň, mění se do zlatové až růžové barvy. Tento test je 100% specifický. Pozitivní výsledek mohou dát i jiné mikroby ze žaludku, ale jejich nálezy bývají u endoskopovaných pacientů velmi řídké (0, 5%). Citlivost za 2 hodiny po inokulaci je asi 70%, ale při odečítání výsledku za 18-24 hodiny stoupá na 90%.

Kultivační vyšetření

STĚRY TKÁNÍ

umožňují získat výsledek rychle. Tamponem se otírá povrch vzorku získaného při biopsii a pak se tamponem provede nátěr na sklíčko. Charakteristický obraz Hp bývá ve vrstvě hlenu poměrně snadno prokazatelný. Při tomto vyšetření však vzorky nesmí být ukládány do transportního média, které mukos viscidin vysráží a nálezy Hp je pak obtížné. Nátěr se fixuje teplem, obarví podle Grama a dobarví karbolfuchsinem.

KULTIVACE

je obvykle vysoce specifická, ale její citlivost závisí na zkušenosti zpracovatele a zacházení se vzorkem během transportu. Největší výhodou kultivace je to, že umožňuje stanovení citlivosti mikroba a jeho typizaci. Vzorek hlenu se očkuje na selektivní i neselektivní půdy a nakonec se tampon vymačká do půdy s močovinou.

Nejlepších výsledků kultivace bylo dosaženo s čerstvě připraveným 10 % krevním agarem nebo s čokoládovým agarem. Často se vyplatí použít selektivní půdy, neboť v žaludečním hlenu mohou být i jiné mikroby, přerůstající pak Hp. Při nedostatku financí na vyšetření stačí užívat jen selektivní půdy s vankomycinem (inhibuje G+ mikroby), cefsulodinem (vůči G- mikrobům, včetně *Pseudomonas sp.*) a amfotericinem (k inhibici kvasinek).

Půdy po inokulaci mají být inkubovány co nejdříve. Hp není aerotolerantní, rychle vznikají kokoidní formy a jsou-li půdy ponechány mimo inkubátor déle než 30 min. kultivace je neúspěšná. Potřebné je mikroaerobní prostředí (6% O₂ a 10% CO₂). Větší kolonie Hp narůstají ve vlhké atmosféře.

Po 48 hodinách inkubace narostou jen velmi malé kolonie Hp. Ideální je její prodloužení na 3, 5 a 7 dnů. Mají podobu

vypouklých, průsvitných kapiček šedé barvy, které jsou ureáza pozitivní.

Většina kmenů Hp je rezistentních na imidazoly, ale stále častěji je popisována také rezistence na clarithomycin. Velmi vzácná je rezistence vůči amoxicilinu a tetracyklinu.

HISTOLOGICKÝ NÁLEZ

Největší výhodou tohoto vyšetření je fakt, že nejen prokáže přítomnost Hp, ale současně trvale zdokumentuje existenci gastritídy u pacienta. Další odběry tkáně z lokálních lézí mukózy jsou nutné k odhalení jejich možné malignity. Zahnuté nebo

- 4 -

esovitě prohnuté Hp bývají obvykle ve velkém počtu přítomny v těsné blízkosti povrchu sliznice a v ji pokrývajícím hlenu. Jejich přítomnost lze zvýraznit barvicími metodami. Nejčastěji se preparáty barví Giemsou.

Nepřímé metody

SEROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Chronicky aktivní gastritída, tak typická pro infekci Hp, vyvolává u infikované osoby lokální imunitní reakci. Také v séru jsou protilátky typu IgG a IgA. Ve velmi nízké koncentraci jsou u chronických infekcí přítomny protilátky typu IgM. Současné metody jsou mnohem dokonalejší než kdysi. Nejspolehlivější výsledek dá průkaz protilátek vůči Hp pomocí enzymatické imunoanalýzy (ELISA) v žilní krvi. K vyšetření lze však užít i kapilární krev nebo vzorky slin. Hladina protilátek po léčbě klesá jen pomalu, proto serologické vyšetření není vhodné ke kontrole úspěšnosti eradikace Hp. Starší osoby se mohou spontánně zbavit infekce a přesto protilátky u nich přetrvávají.

Nabízí se řada ELISA testů s rozdílnou citlivostí a specificitou. Požaduje se, aby záchytnost i specificita testu byla vyšší než 90%.

DECHOVÝ TEST

Po požití jídla s vyšším obsahem močoviny značené izotopem uhlíku ^{13}C nebo ^{14}C je urea štěpena ureázou Hp, přítomného v mukóze žaludku, na čpavek a oxid uhličitý ($^{13}\text{CO}_2$ nebo $^{14}\text{CO}_2$). Oxid proniká do krevních cest a je vydechován. Lze jej prokázat ve vzorcích dechu, odebíraných za 30 minut po jídle a porovnat jeho množství s hodnotou zjištěnou před jídlem.

U pacientů nepotřebujících endoskopické vyšetření je to při hodnocení úspěšnosti terapie test volby. Je však nutné vyšetření provést až za měsíc po skončení terapie, jinak se nevyhneme falešně negativním výsledkům. Test je však vyhrazen specializovaným pracovištím, neboť stanovení radioaktivně značeného izotopu uhlíku ^{13}C vyžaduje nákladnou spektrografickou aparaturu. Průkaz izotopu ^{14}C je levnější, neboť je možné užít počítač scintilace

REAKCE POLYMERÁZOVÉHO ŘETĚZENÍ

PCR není rutinním diagnostickým testem, není o moc citlivější než histologie či kultivace Hp. Potenciálně je užitečná tam, kde smíšená bakteriální flóra stěžuje průkaz Hp.

37 citací, kopie u překladatele