



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Výskyt *Helicobacter pylori* v koncrementech ze slinných žláz

Incidence of *Helicobacter pylori* in Concrements from Salivary Glands

Bakalářská práce

Studijní program: B5345 Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Emil Pavlík, CSc

Gabriela Kodetová

Kladno, 2018

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Gabriela Kodetová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Výskyt *Helicobacter pylori* v konkrementech ze slinných žláz**
Téma anglicky: Incidence of *Helicobacter Pylori* in Concrements from Salivary Glands

Zásady pro vypracování:

Helicobacter pylori je zvláštní pohyblivá mikroerofilní bakterie, vyskytující se převážně ve tkáni GIT, zejména žaludku, kde způsobuje vznik zánětu a žaludečních vředů. Známý je i její onkogenní potenciál, a to nejen v GIT nýbrž i lymfatické tkáni orofaryngu. Tato bakalářská práce je zaměřena na úzký dílčí úkol plánu výzkumu chování této bakterie. Cílem je zjistit, zda se HP podílí i na patogenních procesech v oblasti slinných žláz. V praktické části bude zkoumána přítomnost bakterií v konkrementech, operačně vyňatých ze slinných žláz a prováděna jejich genotypová identifikace pomocí molekulárně biologických technik hybridizace se značenými sondami. V případě pozitivního nálezu bude provedeno statistické vyhodnocení.

Seznam odborné literatury:

- [1] SCHINDLER, Jiří, Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada, 2009, 248 s., ISBN 978-80-247-3170-4
- [2] YAMAOKA, Y., *Helicobacter pylori* Molecular Genetics and Cellular Biology , Caister Academic Press Norfolk UK, 2008, ISBN 978-1-904455-31-8
- [3] REISCHL, U., WITTWER, C., COCKERILL, F., Rapid Cycle Real-Time PCR Methods and Applications, Springer Verlag Berlin , 2002, ISBN 3-540-41881-4

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: MUDr. Emil Pavlík, CSc.

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem *Výskyt Helicobacter pylori* v konkrémentech ze slinných žláz vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 18.05.2018

.....
podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce MUDr. Emilu Pavlíkovi, CSc. za jeho odborné vedení, metodickou pomoc a cenné rady, které mi poskytl při jejím vypracování.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou onemocnění způsobených bakterií *Helicobacter pylori*, bude zkoumán její výskyt v oropharyngu. V teoretické části jsou dále zkoumány možnosti diagnostiky a léčby. Čtenáři budou představeny informace, z již provedených studií.

Na teoretickou část navazuje část praktická zkoumající přítomnost Hp ve vzorcích pacientů s onemocněním slinných žláz.

Klíčová slova

Helicobacter pylori; slinné žlázy; real-time PCR; výzkum.

Abstract

This Bachelor thesis deals with the problem of diseases caused by *Helicobacter pylori* and its occurrence in oropharynx is the subject of the investigation.

The theoretical part is subsequently applied to possibilities of diagnostics and treatment. Readers are provided with the information of studies which had already been done. The practical part follows the theoretical part and examines the presence of Hp within the sample of patients with salivary gland disease.

Keywords

Helicobacter pylori; salivary glands; real - time PCR; research.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav.....	10
2.1	Vymezení pojmu bakterie a její typizace	10
2.2	Taxonomie.....	10
2.2.1	Stavba bakteriální buňky	12
2.2.2	Gramovo barvení.....	16
2.3	Helicobacter pylori	18
2.3.1	Výskyt	19
2.3.2	Genotypy Hp a jejich patogenita	20
2.3.3	Diagnostika.....	20
2.3.4	Léčba.....	23
2.3.5	Současné trendy výzkumu Hp.....	24
2.4	Slinné žlázy	30
2.4.1	Onemocnění slinných žláz	31
3	Cíl práce.....	38
4	Metodika.....	39
4.1	Hypotéza.....	39
4.2	Odběr materiálu	39
4.3	Izolace DNA a RNA	39
4.4	Real-time PCR	44
4.4.1	Přístroje pro real-time PCR.....	46
4.5	Postup.....	48
4.5.1	Izolace DNA.....	48

4.5.2	Princip izolace MagNAPure Compact.....	51
4.5.3	RIDA GENE Helicobacter pylori (Real-time PCR Test)	51
4.5.4	Genotypizace Helicobacter pylori	52
5	Výsledky	53
6	Diskuze	57
7	Závěr	60
8	Seznam použitých zkratk.....	61
9	Seznam použité literatury.....	62
10	Seznam použitých obrázků	66
11	Seznamu použitých tabulek	67

1 ÚVOD

V dnešní době se výrazně zvyšuje počet nádorových onemocnění. Nejčastěji napadanými oblastmi jsou oblasti tlustého střeva, plic a u žen prsu. Z tohoto důvodu je důležité, zaměřit se na tento typ onemocnění a zjistit o něm co nejvíce informací. V souvislosti s tím se nyní objevují nové poznatky o aerofilní bakterii *Helicobacter pylori*, jejíž onkogenní potenciál je známý. Mnoho specialistů na gastrointestinální trakt je nuceno řešit obtíže pacientů způsobené touto bakterií. Existují studie, které podávají hypotézu, zda by Hp nemohl způsobovat onemocnění i v jiných částech těla, zejména ve slinných žlázách. Toto téma je v současnosti velmi aktuální a zajímavé pro širokou škálu odborníků z oblasti lékařství. Hp je i přes to pro mnohé neznámým pojmem. Tato bakalářská práce se proto zabývá seznámením s Hp. Přináší informace o jejím výskytu, potížích, které způsobuje. Nabízí varianty diagnostiky a léčby. Zmiňované zdroje navíc může čtenář využít k hlubšímu studiu pro něj zajímavých pasáží.

V praktické části byla stanovena hypotéza, zda se může Hp vyskytovat kromě GIT i ve slinných žlázách. Výzkum proto zpracovává reálné vzorky pacientů s onemocněním slinných žláz a testuje je na přítomnost Hp. Výsledky předává čtenáři v přehledných grafech a tabulkách.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Vymezení pojmu bakterie a její typizace

Mezi základní předměty studia oboru mikrobiologie patří jednobuněčné organismy s prokaryotickou buňkou – bakterie. S ohledem na téma této práce nás bude zajímat skupina choroboplodných bakterií, na kterou se zaměříme detailněji. Domníváme se, že celkové množství druhů bakterií na světě může dosahovat až jednoho milionu, zdokumentovány však byly jen asi tři tisíce druhů. Adaptace těchto mikrobů s poměrně primitivními buňkami probíhala již od počátku vzniku Země díky změnám prostředí a životních podmínek. Některé z nich ztratily schopnost osídlení libovolného hostitele z důvodu snížené schopnosti vytvořit své tělo pouze z anorganických látek. Nastala potřeba aminokyselin, cukrů a bílkovin. Za několik milionů let vývoje se bakteriím změnila nejen vlastnosti, ale i tvar a velikost, která se zpravidla pohybuje kolem 1 μm. Místo výskytu a typ hostitele spolu s jeho životními podmínkami zásadně ovlivňují chování bakterií [1].

2.2 Taxonomie

Taxonomie se zabývá klasifikací, nomenklaturou a identifikací organismů. Bakterie byly dříve řazeny do skupiny nejjednodušších rostlin. Jejich prokaryotická buňka s tzv. nepravým jádrem se zásadně liší od vyspělejších, eukaryotických organismů především velikostí a nepřítomností membránových organel. Bakterie důležité pro lékařskou mikrobiologii patří mezi pravé bakterie, eubakterie [2].

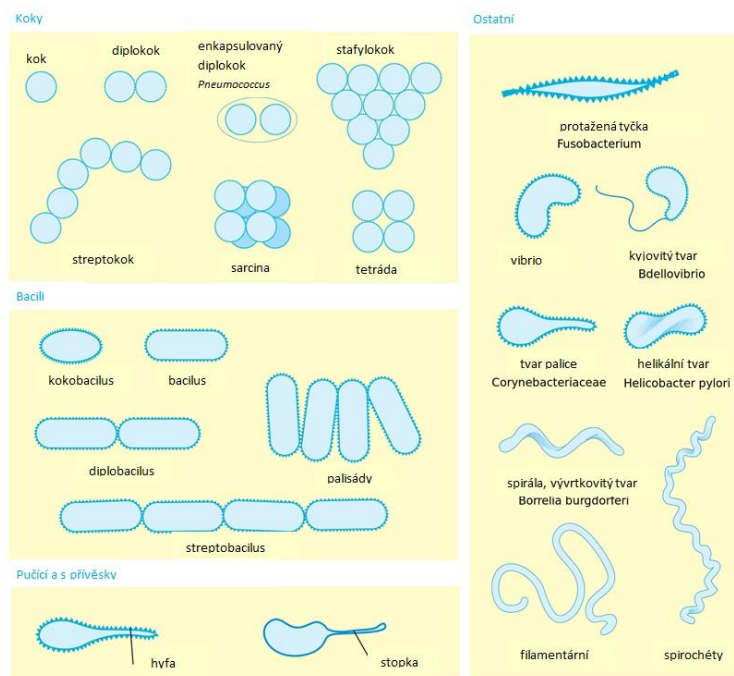
Taxonomickou skupinou je druh, seskupující bakteriální kmeny s podobnými vlastnostmi. Kmen je označením pro populaci stvořenou z jedné mikrobiální buňky. Některé druhy mohou být děleny na poddruhy [2].

Kritéria taxonomického dělení jsou molekulární, genetická, chemická, morfologická, fyziologická, metabolická a ekologická. Pro nomenklaturu jsou dána mezinárodní pravidla. Rodové jméno se píše s počátečním velkým písmenem, druhové s malým. V odborných textech se názvy bakterií píše kurzívou. Důvodem vytvoření mezinárodního pojmenování je především kontinuita a jednoznačnost. Identifikací se rozumí zjištění, zda druh bakterie patří do již vytvořeného taxonu, nebo jde o neznámý organismus, který je nutno zařadit a přidělit mu jméno dle mezinárodní nomenklatury [2].

Na základě tvaru můžeme rozdělit bakterie na kulovité koky nebo protáhlejší tyčinky (např. *Mycobacterium tuberculosis*). Tyčinky můžeme poté specificky rozlišit na základě jejich délky na krátké kokobacily (*Francisella*) a dlouhá (*Listeria*). Dále se využívá dělení podle zakřivení na vibria protáhlého tvaru, spirálovité *spirochéty* nebo kyjovitá korynebakteria. Ve výjimečných případech dochází i k větvení dlouhých vláken (*Actinomyces*) [2].

Při dělení bakterií často dochází z důvodu binárního dělení v různých rovinách k nejrůznějším uspořádáním, která můžeme nejlépe pozorovat u koků tvořících buď tzv. řetízky (*Streptococcus*), nebo útvary podobné hroznům. Spojení dvou koků nazýváme diplokokem (např. *Streptococcus pneumoniae*). Zatímco koky vidáme v útvarech často, tyčinky se většinou vyskytují samostatně, ojedinele se mohou objevovat ve dvojicích (diplobacily), někdy tvoří řetízky (streptobacily). U některých tyčinek můžeme pozorovat pod mikroskopem i podélné dělení, při němž vzniká palisádovité uspořádání. Jejich typickým příkladem je původce

záškrtu (*Corynebacterium diphtheriae*). V některých případech se setkáváme s pleomorfií. Tento pojem označuje výskyt různých morfologických typů u zástupců jednoho kmene či druhu. S mnohotvárností se můžeme setkat u *Haemophilus influenzae*, který se např. ve sputu vyskytuje ve formě kokobacilů. V případě naočkování na plotnu však můžeme očekávat tyčinky s různou délkou v řetězcích. U druhu *Rhodococcus equi* dochází k viditelné změně tvaru až po několika hodinách, kdy původní tvar koka postupně přechází v kyjovité tyčinky s možností rozpadu v řetězky koků [2].



Obrázek 1 Tvary bakteriálních buněk [3]

2.2.1 Stavba bakteriální buňky

Stavbou bakteriální buňky se zabývá velké množství publikací. Následující informace jsou čerpány z textů *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů* [1] a *Lékařská mikrobiologie obecná* [2]. Vnější ochranou proti vlivům okolí, které mohou vést k prasknutí bakteriální buňky, je pevná buněčná

stěna, která utváří vzhled, a především tvar bakterie. Buněčná stěna je velmi pevná, tuhá a částečně pružná kvůli potřebě průchodu malých molekul do buňky a z ní. Silnější je stěna u Gram-pozitivních bakterií. Tvoří ji pět vrstev peptidoglykanu propojených oligopeptidy, přítomna je i kyselina teichová. Gram-negativní bakterie mají ve stěně jen jednu vrstvu peptidoglykanu nad níž je vnější membrána, tvořená polysacharidy a lipidy. Propustnosti pro vodu a některé látky s malou molekulovou hmotností zajišťují poriny. Mezi buněčnou stěnou a vnější membránou je tzv. periplazmový prostor obsahující enzymy důležité pro zajištění transportu, pohybu a napomáhání přežití buňky deaktivací betalaktamových antibiotik. Do skupiny enzymů s touto schopností řadíme β -laktamázy. Některé bakterie mají navíc pouzdro pro ochranu bakterie před mechanismy imunitního systému, zejména před fagocytózou. Jeho složení může být různé, nejčastěji se setkáváme s polysacharidovým nebo polypeptidovým pouzdrem, výjimkou není ani účast kyseliny hyaluronové. Pouzdro každého mikroba má určitou specifitu, proto i účinnost protilátek je často omezena. Proto se v případě očkování proti pneumokokovým infekcím se vpravuje do těla vakcína obsahující soubor antigenních typů, které jsou nejčastějšími vyvolávači onemocnění. Pro schopnost parazitismu bakterií je důležitý glykokalyx, se kterým se můžeme setkat ve formě hlenové vrstvy, usnadňující přilnutí bakterie na sliznici nebo jiný pevný povrch, až pouzdra [1; 2].

Bičíky určené k pohybu můžeme sledovat v optickém mikroskopu pouze po impregnaci stříbrem. Vyskytují se v různém množství. Od jednoho, položeného na pólu buňky, po několik rozprostřených po celé ploše bakterie (*Salmonella*). Při pohybu dochází ke šroubovitě rotaci, která v čase mění směr. Celý proces je řízen chemotakticky, slouží k úniku před toxickými látkami a k dosažení živin. Pro přilnutí na povrch sliznice slouží bakteriím bílkovinné

struktury kartáčovitého vzhledu - tzv. fimbrie. Zatímco fimbrie 1. typu se vyskytují u enterobakterií a navazují se pouze na buňky sliznice, fimbrie 4. typu - tzv. sex-specifické – můžeme pozorovat pouze u samčích buněk, které jsou schopny přenosu DNA na cizí buňku. Tento typ fimbrií je o poznání delší a má možnost přitahu buňky, se kterou chce komunikovat. V nepříznivých podmínkách (vysoká teplota, organická rozpouštědla, desinfekce) jsou některé rody grampozitivních bakterií schopné sporulace. Jedná se především o rody *Bacillus* a *Clostridium*. Jejich spory jsou někdy označovány jako endospory, jelikož vznikají uvnitř buňky na rozdíl od spor rodu *Streptomyces*. Ty se tvoří přeměnou zvláštních vícejaderných vláken. Pomocí endospor jsou bakterie schopny odolávat nepříznivým vlivům i stovky let [1; 2].

Pod mikroskopem můžeme sledovat spory jako vysoce světlolomné útvary, které nepřijímají Gramovo barvivo. Je možné je násilně obarvit například barvením za horka, pak ale vzdorují odbarvení prakticky jakýmikoli odbarvovacími roztoky typu kyselého alkoholu (směs HCl s etanolem). Spory nám mohou sloužit i k identifikaci bakterií, jelikož jejich tvar, velikost či uložení svědčí o určitém druhu. Spory mohou mít kulatý (*Clostridium tetani*) či oválný (*Bacillus anthracis*) tvar. Dále je můžeme rozlišovat na základě toho, zda tyčinku „bubří“ či „nebubří“ Pozorujeme tedy, zda je průměr spory větší než tloušťka vegetativní buňky. Pokud ano, jedná se o sporu „bubřící“ (*Clostridium tetani*), není – li buňka v místě spory zvětšená, jedná se o sporu, která tyčinku nebubří (*Bacillus anthracis*). Dále sledujeme uložení spory v buňce. Pokud nalezneme sporu na konci tyčinky, je uložena terminálně (*Clostridium tetani*). Je-li uprostřed buňky, říkáme, že je uložena centrálně (*Clostridium histolyticum*). Nejčastěji se však můžeme setkat se sporou uloženou mezi středem a polem buňky, tu nazýváme jako subterminální, či paracentrální (*Clostridium botulinum*, *Clostridium septicum*) [1; 2].

Celý proces vzniku spor zahajuje replikace DNA a rozbalení bakteriálního chromozomu. Vchlípením cytoplazmatické membrány se vytvoří septum. To má za úkol rozdělit buňku a DNA na dvě nestejně části. Menší z částí, tzv. prespora se začne obalovat septem, má tedy dvojitou membránu a je uložena uvnitř mateřské buňky. Mezi oběma membránami se začne tvořit peptidoglykanový kortex. V endospoře se začne ukládat velké množství kalcia, ze kterého se vytváří kyselina dipikolinová. Další vrstva peptidoglykanu se vytvoří pod kortexem a celý útvar je kryt obaly bohatými na cystein. Mateřská buňka zaniká a spora je uvolněna. V nepříznivých podmínkách spora klíčí (germinuje). Tento proces je velmi rychlý, začíná aktivací spory. Aktivace je většinou spontánní, laboratorně jí však lze dosáhnout zahřátím v přítomnosti vody. Tamto aktivovaná spora začne přijímat vodu a ztrácí svou rezistenci. Následně dochází k syntéze nových proteinů, jelikož původní, jejichž úkolem byla stabilizace, byly rozloženy. Morfologicky dojde k puknutí obalů spory a vzniku nové buňky [2].

Spory odolávají nepříznivým podmínkám díky stabilizaci makromolekul za pomoci nově vytvořených proteinů, ztrátě vody a jejímu nahrazení vápníkem. Odolnost spor je u jednotlivých druhů odlišná. Za jedny z nejodolnějších jsou považovány spory *Clostridium botulinum*. Ty můžeme zničit pouze autoklávováním, tedy působením vodní páry za zvýšeného tlaku. Minimální expoziční doba je 20 minut při tlaku 240 kPa a teplotě 121 °C [2].

V cytoplazmě se dále vyskytuje chromozom složený z dvoušroubovice DNA, která je spolu s malým množstvím RNA a bílkovinou nepravidelně uspořádána do útvaru zvaný nukleoid. Soubor veškeré genetické informace uložené v DNA nazýváme genomem [1].

Bakteriální chromozom může mít různou délku, například u *E.coli* má přibližně 4500 kB a obsahuje 4405 genů. Proces dělení je složitým procesem, který je přesto velmi dobře prozkoumaný v každé učebnici mikrobiologie. Cytoplazma prokaryotické buňky neobsahuje žádné membránové orgány, součástí buňky jsou však ribozomy důležité pro tvorbu bílkovin. Jsou složeny z velké a malé podjednotky a jsou uloženy v cytoplasmě [1].

2.2.2 Gramovo barvení

Již Robert Koch používal pro sledování bakterií obarvené a fixované preparáty. Přes velké množství moderních barvicích technik je barvení dle Grama stále velmi používané. Jeho název je odvozen od dánského lékaře Hanse Christiana Joachima Grama (1853-1938), jehož zjištění o možném rozdělení bakterií do tří skupin na základě schopnosti udržet v barvených buňkách barvivo při styku s alkoholem či acetonem vešlo do historie mikrobiologie. Při tomto procesu je prvním bodem barvení fixovaného preparátu krystalovou violetí. Jejím úkolem je obarvení bakteriálních buněk tmavomodře až modrofialově. Poté přidáváme Lugolův roztok významný pro vznik komplexu barviva s jodem. Dalším krokem je kontakt s 96% etanolem či acetonem. Ten je zásadní pro zařazení bakterie do jedné ze skupin. Tzv. Gram-pozitivní bakterie udrží vzniklý komplex jodu s barvivem, naopak u Gram-negativních se barvivo rychle vymývá. Z tohoto důvodu je potřeba druhou skupinu bakterií dobarvovat. Pro tento krok nejčastěji používáme safranin či zředěný karbolfuchsin. Po dobarvení jsou Gram-negativní bakterie červené, zatímco u Gram-pozitivních nedochází ke změně modrofialového zbarvení. Další, méně početnou skupinou, jsou bakterie acidorezistentní. Jedná se v podstatě o Gram-pozitivní bakterie, přesto se nedají běžným postupem dle

Gramova obarvit. Důvodem je přítomnost voskovitých látek v buněčné stěně, které barvivo nejsou schopny přijmout [2].

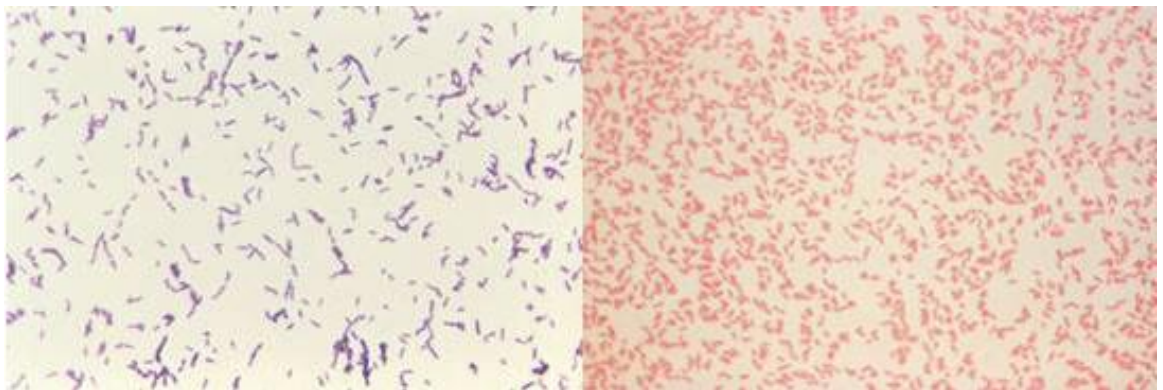
Výsledek Gramova barvení je velmi cennou informací pro lékaře. Vytváří vodítko pro podstatně rychlejší určení antibiotické léčby než při kultivaci [2].

Vybrané příklady Gram-pozitivních bakterií: *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Lactobacillus* [2]

Vybrané příklady Gram-negativních bakterií: *Escherichia*, *Proteus*, *Vibrio*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Bordetella* [2]

Vybrané příklady acidorezistentních bakterií: *Mycobacterium* [2]

Zástupci částečně acidorezistentních bakterií: bakteriální spory, spory a konidie kvasinek a plísní. [2]



Obrázek 2 Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie [4]

2.3 *Helicobacter pylori*

I přestože novodobé objevování intragastrických bakterií započalo přibližně před 25 lety, prvotní výzkumy o spirálních gastrických bakteriích byly publikovány již před více než sto lety. Poprvé byl gastrický *Helicobacter* dobře prostudovaný Bizzozzerem v roce 1893 [5].

Objevení bakterie *Helicobacter pylori* (dále jen Hp) popřelo teorii, podle níž pro přítomnost velmi kyselých šťáv v žaludku není možné osídlení sliznice žádnými bakteriemi. Australský mikrobiolog Marschall pomocí testů na svém těle potvrdil hypotézu možnosti vzniku peptických vředů infekčním původcem. Tak byl objeven *Helicobacter pylori*, spirálovitá, Gram-negativní bakterie s trsy bičíků a neobvyklými vlastnostmi. [1] Vzorky žaludeční sliznice, ze kterých byly první bakterie v roce 1983 izolovány, pocházely od pacienta s gastritidou. Původně byl mikrob označen jako *Campylobacter pylori*. Později vznikl rod *Helicobacter* na podkladě molekulárně genetických studií, kdy byl zjištěn odlišný poměr párových nukleotidů G-C/A-T v DNA a další odchylky sekvencí bází ribozomální RNA [6].

Pouze speciální půdy umožňují kultivaci tohoto mikroba s velmi dlouhou kultivační dobou. Hp produkuje oxidázu, katalázu a velmi aktivní ureázu. Díky svým schopnostem štěpí močovinu žaludeční šťávy na oxid uhličitý a amoniak, který zneutralizuje pH kyseliny chlorovodíkové v okolí bakterií. Ty pronikají do sliznice (hyaluronidáza, fosfolipázy), kde se množí a vytvářejí prominující val, z něhož se nejčastěji působením žaludeční kyseliny vytvoří peptický vřed, zatímco bakterie jsou chráněny hlenem před imunitním systémem (zejména před fagocyty). Zdrojem výživy jsou pro bakterie odumřelá těla leukocytů [1].

Hp se vyskytuje i v kokoidní formě. Ta je infekční, odolná vůči okolnímu prostředí a přenosná vzduchem. Tento mikrob je obdařen i dalšími významnými faktory patogenity. Kromě stěnového lipopolysacharidu a adhezínů, které jsou vázány na buňku, produkuje celou řadu extracelulárních substancí. Mimo již zmíněnou oxidázu, katalázu a ureázu je zaznamenána tvorba hyaluronidázy, fosfolipáz, glukofosfatáz, proteáz, hemolysinů či proteinů zastavujících tvorbu kyseliny chlorovodíkové. Jeho další vynikající schopností je ovlivnění indukce leukotrienů, některých destičkových faktorů, prokoagulační aktivity interleukinů či autoimunitních reakcí. Na konečném procesu proniknutí do epitelu se podílejí především fosfolipázy, které útočí na fosfolipidy v buněčných membránách spolu s amoniakem, jehož úkolem je degradace lecitinu na toxický lysolecitin. Vliv mají i faktory vznikající v hostitelském organismu jako důsledek přítomnosti mikroba [6].

2.3.1 Výskyt

V některých geografických oblastech (se špatnými životními podmínkami) je výskyt Hp vysoký, jedná se téměř o polovinu populace včetně dětí [1]. Prevalence onemocnění se uvádí v rozmezí 30-55 %. Seifert s Charvátovou se domnívají, že prevalence infekce roste s věkem populace z důvodu horších sociálních podmínek v dětství. Získání infekce je možné i v dospělosti, těchto případů však nalézáme méně. Klinické příznaky jsou dobře zdokumentovány, mnozí nositelé však mohou být až několik let asymptomaticí. Nejpravděpodobnějším přenosem je oro-fekální cesta, či přenos z člověka na člověka cestou oro-orální [7].

2.3.2 Genotypy Hp a jejich patogenita

Bylo prozkoumáno a zaznamenáno dvacet druhů Hp, většina z nich je úzce orientována na jednoho hostitele, jedná se často o fretky, kočky či psy [1].

Z lidských vzorků byly doposud izolovány čtyři druhy Hp. Prvním z nich je *Helicobacter cinaedi*, který známe z případů bakteriémie u pacientů nakažených HIV a tuberkulózou, *Helicobacter fennelliae* izolovaný z výtěrů rekta homosexuálních mužů, dále *Helicobacter pylori*, u něhož je prokázána spoluúčast na vzniku vředu žaludku a duodena. Posledním typem je *Helicobakter helimanii*, původně nazývaný *Gastrospirillum hominis*. U tohoto mikroba však dosud nebyl potvrzen patogenní vliv na člověka [6]. Kmeny Hp s genem *cagA* mají vliv i na vznik nádorových onemocnění žaludku [1]. HP se podílí na vzniku gastritidy s možností přechodu v atrofii, která představuje již zmíněný prekancerózní stav [6]. Hp je proto řazen mezi kancerogeny 1. třídy. Zároveň je zkoumán vztah Hp k ischemické chorobě srdeční, nedostatku železa, chorobám jater a žlučových cest a k některým kožním chorobám [7].

2.3.3 Diagnostika

Výběr testu na přítomnost Hp závisí na mnoha faktorech, a to nejen na klinických, nýbrž i na dostupnosti těchto testů pro praktické lékaře, ke kterým pacient často přichází s příznaky nemoci. Na základě rozlišení, zda se jedná o screening, diagnostiku Hp či potvrzení účinné léčby, lékař určuje diagnostický test. Ty lze dělit na neinvazivní a fokální invazivní, které vyžadují endoskopii. Mezi fokální invazivní řadíme [8]:

Gastroskopii s následnou biopsií žaludku a dvanáctníku pro histologické vyšetření Hp lze prokázat vyšetřením bioptického vzorku.

Pro diagnostiku je toto vyšetření velmi výhodné zejména díky možnosti zjištění denzity kolonizace Hp či dalších histopatologických nálezů. Vzorek můžeme barvit několika způsoby, nejčastěji používáme barvení hematoxylin – eosinem. Další možností je stříbření, či barvení dle Giemsky. Senzitivita tohoto dosahuje 95 %, specifita je až 100 % [8].

Rychlý ureázový test na bioptickém vzorku. Prokázat Hp lze též na základě změny pH. Enzym ureáza tvořený Hp katalyzuje přeměnu močoviny na amoniak a bikarbonáty. Následkem je přechod pH do alkalických hodnot se spojením změny barvy indikátoru ze žluté na červenofialovou. Odečet provádíme po hodině a následně po čtyřadvaceti hodinách. Specifita a senzitivita je kolem 90 % procent [8].

Bakteriologické vyšetření – kultivace Hp. Kultivaci Hp považujeme za velmi důležité vyšetření, zejména z důvodu možnosti zjištění citlivosti vůči antibiotikům v případě pozitivního nálezu. Senzitivita se zde pohybuje kolem 80 %, specifita 100 % [8].

Mezi neinvazivní testy řadíme:

Laboratorní sérologické vyšetření protilátek proti Hp metodou ELISA. Sérologické vyšetření můžeme provádět ze séra (IgG a IgA), ze slin (IgG) či z moči (IgG). Tento test však není příliš spolehlivý (s výjimkou MALT lymfomu). Důvodem je především velké procento falešně pozitivních či falešně negativních testů. Protilátky se mohou objevovat i pět let po již zaléčeném onemocnění, naopak u pěti až deseti procent pacientů se systémová protilátková odpověď nikdy nevyvine [8].

Dechový test s ureou značenou izotopem uhlíku ^{13}C či ^{14}C . Tento test provádíme nalačno. Prvním krokem získáváme dva bazální vzorky vydechnutého vzduchu. Pacient požije močovinu (75 mg či 100 mg) označenou ^{13}C či ^{14}C , kterou Hp metabolizuje, dále je produkován značený oxid uhličitý, který je ve vydechovaném vzduchu detekován. Pro zajištění dostatečně dlouhé retence podáváme pacientovi testovací nápoj, často se využívá neslazený pomerančový džus nebo roztok kyseliny citronové. Dvacet až třicet minut po požití odebíráme další dva vzorky vydechnutého vzduchu, které dále analyzujeme hmotnostní spektrofotometrií. Za pozitivní považujeme test se změnou poměru $^{13}\text{CO}_2$: $^{12}\text{CO}_2$ větší než 5 promile v čase 0 a T 30 [8].

Test vyšetření antigenu ve stolici. Tato metoda má slibné výsledky specifity i senzitivity, považujeme ji za stejně přesnou jako dechový test. Testování provádíme enzymovou imunoanalýzou za pomoci monoklonálních či polyklonálních protilátek proti Hp. U obou typů protilátek označujeme specifitu za 95 %, senzitivitu kolem 90 % [8]. Dechový test a test antigenu ve stolici jsou vhodné pro kontrolu eradikace Hp. Kontrolu eradikace provádíme dechovým testem či testem na přítomnost antigenu ve stolici. Pacient by 4 týdny před testy neměl dostávat žádná antibiotika, dva týdny před žádný inhibitor protonové pumpy [9]. Při selhání léčby je třeba odebrat bioptické vzorky, provést kultivaci a stanovit citlivost Hp k antibiotikům. Rezistence bakteriálních kmenů vůči antibiotikům za poslední léta narůstá. V případě Hp se rezistence vůči klaritromycinu pohybuje kolem 30 %, u metronidazolu dosahuje až 40 %. Rezistence se však týká především pacientů s prvním selháním léčby [8].

2.3.4 Léčba

Optimální léčba by měla být zvolena na základě několika kritérií. Měla by být jednoduchá, účinná, dobře tolerovaná pacientem a ekonomicky snesitelná. Je známo přes tisíc schémat pro eradikaci Hp, téměř žádná však není 100 % účinná. Je proto třeba vyžívat metody, které dosahují alespoň 80 % spolehlivosti. Dalším důležitým krokem je poučení pacienta a jeho motivace k léčbě. První volbou pro léčbu bývá kombinace protonového inhibitoru (omeprazol, pantoprazol, esomeprazol) se dvěma typy antibiotik – ampicilinem (2krát denně 1000 mg) a clarithromycinem (2krát denně 500 mg) či metronidazolem (2krát denně 500 mg) po dobu jednoho týdne. V zahraničí je alternativním postupem ranitidin – vismut – citrát v kombinaci s clarithromycinem (2krát denně 500 mg) a tetracyklinem (4krát denně 500 mg). Léčba trvá dva týdny. V České republice není prozatím tato možnost využívána z důvodu nedostupnosti ranitidin – vismut citrátu [8].

Pokud není pacient alergický na penicilinová antibiotika, první volbou je nejčastěji ampicilin, jelikož citlivost Hp k ampicilinu je téměř stoprocentní. Předchozí léčba protonovými inhibitory nesnižuje účinnost eradikace [8].

V případě selhání léčby je možné využít terapeutického postupu druhé volby. Nejvhodnějším řešením je podání dvojkombinace ampicilinu (2krát denně 1000 mg) s inhibitorem protonové pumpy (dvojnásobná dávka) po dobu dvou týdnů. Pracoviště v zahraničí užívají řadu dalších postupů, například čtyřkombinaci inhibitoru protonové pumpy s koloidním vismutem, tetracyklinem a metronidazolem po dobu dvou měsíců [8].

Sekvenční terapie

V poslední době je za nejideálnější variantu léčby považována sekvenční terapie – je vhodná pro všechny pacienty s výjimkou pacientů alergických na některá z léčiv. V první fázi se pacientovi podává inhibitor protonové pumpy s ampicilinem po dobu pěti dnů. Na první fázi bezprostředně navazuje podávání inhibitoru protonové pumpy s dalšími dvěma typy antibiotik (makrolidová, nitroimidazol), které trvá dalších pět dní. Cílem první fáze sekvenční terapie je snížení denzity bakterií v žaludečním hlenu, což zvyšuje účinnost fáze druhé. Léčba přitom musí působit nejen na bakterie žijící v nízkém i neutrálním pH, ale i na pomalu rostoucí bakterie, které jsou více odolné vůči amoxicilinu. První fáze léčby také snižuje rizika vzniku mutací, které vedou k rezistenci vůči antibiotikům, především vůči klaritromycinu a metronidazolu [8].

Tento typ léčby je účinnější o 10-20 % oproti léčbě klasické. Náklady na léčbu jsou cenově srovnatelné, celý léčebný proces je však u sekvenční terapie ekonomicky výhodnější. Obecně přijatou zásadou je provádět eradikaci pouze u těch pacientů, u nichž byl prokázán CagA+ Hp. U pacientů kolonizovaných CagA – kmeny Hp se eradikace běžně neprovádí, neboť tento typ není považován za patogenní a kancerogenní [8].

2.3.5 Současné trendy výzkumu Hp

Původně byl Hp izolován především ze vzorků pacientů s gastritidou či peptidickými vředy. Nové výzkumy se však zaměřují na jeho vliv při nádorových onemocněních v oblasti oropharyngu. Bylo prokázáno, že bakterie Hp může prostřednictvím lymfatické tkáně kolonizovat oblast hltanu. U biopsií pacientů se současně probíhajícím onemocněním gastrointestinálního traktu

a oropharyngu byla v obou lokalizacích prokázána přítomnost Hp, z poloviny však v odlišných genotypch [10]. Výsledky průkazu Hp v peroperačních biopsiích nádorů a materiálu ze zánětů v této oblasti zakládající hypotézu o vlivu tohoto prokázaného kancerogenu na rozvoj malignit v této oblasti bývají v poslední zpochybňovány detekcí jiných prokázaných kancerogenů jako je např. *Human Papillomavirus* (dále jen HPV). HPV jsou považovány za prokázané původce rakoviny děložního čípku [9].

Ve studii Pavlíka a spol. (*Detection of Helicobacter pylori and Human Papillomavirus in Peroperative Tissues Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area*) bylo zkoumáno 70 vzorků z tumorů v hltanu a okolí, které byly odebrány v pražských fakultních nemocnicích a jedné krajské nemocnici ve středních Čechách. Z celkových 70 vzorků bylo 41 od pacientů s rakovinou tonsil, 18 z tumoru v hrtanu, 7 z laryngu a 4 z jazyka. Hp potvrzen v 60 vzorcích (85,71 %), HPV ve 42 (60 %). Ve většině studií byl popsán jako hlavní induktor rakoviny HPV typ 16, řazený do skupiny A9. V této studii bylo na typ 16 pozitivních 34 vzorků ze 42 HPV pozitivních. Ve zbylých 8 vzorcích byl detekován HPV skupiny A5/6 (HPV 51 a 56).

Na základě výsledků můžeme vyvodit, že Hp je dlouhotrvajícím rezidentem v hltanu a uzlinách, má vliv na imunitní systém a může pomoci vzniku nádorových onemocnění [9].

Další studií, která se zabývá touto problematikou je *Helicobacter pylori – Not only a Gastric Pathogene*. V současné době je prokázáno, že Hp je hlavní příčinou chronické gastritidy, a dalších onemocnění trávicího traktu, především peptidických vředů, žaludečního lymfomu, či nádoru žaludku. Prevalence je odhadována od 40 % do 80 % v závislosti na zeměpisné oblasti, věku či rase.

Většina populace však nemá klinický projev, ten se vyskytuje pouze u 10–15 %. Příčinou je různá odpověď imunitního systému a odlišná virulence u jednotlivých kmenů Hp. V současné době byl Hp objeven i v jiných oblastech – v zubním plaku, slinách či v oropharyngeální lymfatické tkáni. Toto zjištění má význam především díky kancerogennímu potenciálu Hp. Ten byl prohlášen za kancerogen 1. typu. Zatím však nebyl prokázán vliv Hp na orální a oropharyngeální onemocnění [10].

Hp má několik obranných mechanismů vůči imunitnímu systému hostitele. Je schopen přežít v kyselém prostředí žaludku, produkuje enzym ureázu, který metabolizuje močovinu a oxid uhličitý na amoniak. Hp se pohybuje hlenem žaludku a následně se připojuje na epitel pomocí adhezinů. Dochází k vyvolání silné imunitní odpovědi, která však nezamezí působení bakterie a vyvolá chronický zánět. Produkty Hp přitahují buňky imunitního systému do vrstvy slizničního vaziva a mohou vyvolávat dozrávání a aktivaci monocytů. Infekce Hp je dále spojena i s produkcí zánětlivých a imunomodulačních cytokinů. Odpověď buněk hostitele závisí na produkci faktorů virulence Hp. Mezi nejdůležitější faktory virulence spojené s onemocněním gastrointestinálního traktu patří CagA a VacA. Hp je sice zařazen mezi kancerogeny 1. třídy, přesto zatím není podložen způsob účinku [10].

Existují 3 předpokládané způsoby. Prvním z nich je možnost, že Hp působí jako přímý mutagen. Druhou možností je způsobení imunosuprese blokováním proliferace T – lymfocytů. Třetí možností je, že Hp vyvolává proliferaci buněk na základě zvýšení hladiny několika cytokinů, které mají vliv na vznik nádorů a přeměnu buněk. Několik studií se zabývalo zjištěním přítomnosti Hp v tonzilární a adenoidní tkáni, výsledky však byly v rozporu především z důvodu různě zvolených typů detekce. Některé metody se ukázaly

jako nevhodné. V současné době je nejcennější metodou k detekci Hp z pharyngu PCR. Právě pomocí genotypizace PCR došlo ke srovnání žaludečních a perorálních kmenů Hp. Publikované práce, které se zabývaly detekcí Hp v oropharyngeální oblasti přinesly informace, které nejsou ve shodě. Detekce byla zjištěna od 0–90 %. Nelze tedy dojít ke stoprocentním závěrům. Bylo zjištěno, že některé typy testů (CLO, RUT) nejsou pro detekci Hp vhodné zejména z důvodu možnosti falešné positivity. Kultivace je možná, je však složitá a není příliš odolná vůči vnějším vlivům, které mohou způsobit neúspěšnou detekci. Nejvhodnější se tedy zdá metoda PCR, která navíc nabízí genotypizaci kmenů ve tkáni. Nevýhodou PCR je neschopnost zjistit, zda je zachycená DNA z mrtvých či živých patogenů [10].

Ze srovnání Hp v oropharyngu a žaludku můžeme usoudit, že u hostitele můžeme nalézt různé typy Hp na několika místech. Rozdíly byly zjištěny v přítomnosti genu *cagA* a ve struktuře genu *vacA*. Vliv Hp na vzniku malignity v oropharyngu prozatím nebyla potvrzena [10].

Studie *Comparision of Oropharyngeal and Gastric Helicobacter pylori genotypes in same individuals* (Lukeš a spol.) se zabývala srovnáním Hp kmenů v gastrointestinálním traktu s kmeny pocházejícími z tonsil a nádorových onemocnění pomocí real-time PCR. Vzorky byly odebrány z obou míst stejného pacienta [11].

Pro testování UBT testem pro přítomnost Hp v žaludku bylo zvoleno 20 pacientů, u kterých byla již dříve prokázána přítomnost Hp v oropharyngeální oblasti. Odebrané vzorky byly testovány na přítomnost Hp. Indikací pro zákrok byla rakovina mandlí (9 pacientů), syndrom spánkové apnoe (5 pacientů) či chronická tonzilitida (6 pacientů). Tkáňové vzorky rakoviny mandlí byly

odebrány za použití sterilního nástroje na začátku operace, bezprostředně po vložení endotracheální trubice před aplikací lokálních anestetik a dezinfekčních složek ústní dutiny. Výsledky biopsie byly ponořeny do transportního media a transportovány do laboratoře pro real-time PCR. Po získání pozitivních výsledků na výskyt Hp v mandlích byla potvrzena infekce v GIT pomocí UBT. U 8 pacientů byl pomocí UBT potvrzen Hp v žaludku. 6 z nich (3 s rakovinou, 2 se syndromem spánkové apnoe a 1 s chronickou tonzilitidou) dalo souhlas s endoskopií horní části zažívacího traktu. Vzorky žaludeční sliznice byly odebrány z antra a těla žaludku. Následně byly ponořeny do transportního média pro real-time PCR analýzu a do standardního media pro kultivaci. Byla provedena genotypizace gastrických kmenů. Gastrické genotypy byly porovnány s oropharyngeálními genotypy u stejných pacientů [11].

Pouze u 8 pacientů z 20 s potvrzenou přítomností oropharyngeálního Hp byla zjištěna gastrická infekce pomocí UBT. Při gastrické biopsii byla potvrzena přítomnost Hp u všech 6 pacientů, kteří podstoupili endoskopii. U 4 z nich se endoskopicky ukázaly příznaky zánětu žaludku, který byl klinicky neaktivní. Nikdo z pacientů nevykazoval žádné gastroduodenální potíže. Dva pacienti byli pozitivní na identické kmene Hp v oropharyngu a žaludku. U ostatních pacientů byly prokázány genotypové odlišnosti. Třem jedincům byl prokázán CagA+ Hp kmen v žaludku a CagA- v dutině ústní. U dvou z nich se také prokázaly odlišnosti v S oblasti a vacA genu. Jeden pacient vykazoval odlišnosti výhradně v S oblasti. Zmiňovaná práce je první, která porovnávala genotypy Hp mezi žaludkem a dutinou ústní za pomoci biopsie mandlí [11].

První studie, která porovnávala genotypy Hp žaludku a dutiny ústní, byla publikována Wang et al. Autoři použili sliny pro genotypizaci

oropharyngeálního Hp. Prokázali, že může existovat více než jeden Hp kmen ve slinách a v žaludku u stejného jedince [11].

Pouze několik dalších studií se zaměřovalo na porovnání Hp kmenů v žaludku a v dutině ústní. Zhang et al. Khandaker et al. a Shames et al. podali důkaz, že obě oblasti byly infikovány stejným Hp kmenem. Tito autoři použili metodu DNA fingerprinting a PCR Burgers et al. Prokázali, že Hp může být přítomný v dutině ústní nezávisle na žaludeční kolonizaci [11].

Studie tureckých autorek *The effect of Hp on neutrophil chemotaxis is independent of cagA* zkoumala 16 kmenů, aby se zjistila jejich chemotaktická aktivita u neutrofilů a souvislost s přítomností genu *cagA*. Patogeneze poškození tkáně u chronické gastritidy a peptického vředu není známa, ale svou roli mohou hrát toxické oxidační metabolity z neutrofilů. Neutrofily jsou přitahovány různými stimuly vyvolávajícími chemotaktickou odpověď, která hraje důležitou roli v imunopatologii spojené s gastroduodenální infekcí Hp. Bylo prokázáno, že kmeny *cagA* jsou virulentnější, ale není známo, zda to vede ke zvýšení chemotaxe [12].

V této studii figurovalo 8 pacientů *cagA*+ z celkových 16. U pěti z nich byl endoskopicky diagnostikován duodenální vřed a tři trpěli gastritidou. Pozitivita *cagA* byla vyšší u skupiny s duodenálním vředem, která byla podobná předcházejícím výsledkům [12].

Všech 16 kmenů Hp izolovaných od pacientů a referenční kmen vykazovaly chemotaktickou aktivitu proti PMNL. Hodnoty chemotaktického indexu pro všech 16 kmenů byly odlišné, což ukazuje, že neutrofilová aktivita

byla odlišná pro každý kmen. CagA může být použit jako virulentní marker, nemá však žádnou souvislost s neutrofilovou chemotaxí [12].

2.4 Slinné žlázy

Slinné žlázy se mohou vyskytovat v podslizničním vazivu ústní dutiny, předsíně, tváře či patra. Jejich úkolem je neustálá produkce malého množství slin, které zvlhčují sliznici. Velké žlázy jsou párové, uložené mimo ústní dutinu. Jejich propojení s předsíní a ústy zajišťují trubicovité vývody. Ty naopak vyměšují sliny na základě vnějších podnětů, například na množství přijaté potravy. Během jednoho dne žlázy vyprodukují 1 – 1,5 litru slin [13].

Největší žlázou, která je uložena před ušním boltcem a zároveň kryje horní část ramene dolní čelisti, je příušní žláza (*glandulae parotis*). Její vývod se nachází pod jařmovým obloukem a ústí v předsíni dutiny ústní. Pod obloukem dolní čelisti se nachází podčelistní žláza (*glandulae submandibularis*), na spodině dutiny ústní žláza o něco menší, podjazyková (*glandulae sublingualis*). Tyto dvě žlázy ústí na slinné bradavce, která je uložena na slizniční řase pod jazykem [13].

Slinné žlázy můžeme dělit na základě povahy sekretu. Prvním typem jsou žlázy serózní. Ty produkují řídký sekret složený převážně z vody a malého množství organických a anorganických látek. Obsahuje slinnou amylázu, jejímž úkolem je rozštěpení nerozpustných polysacharidů na rozpustnou maltózu. Další součástí slin je lysozym, který chrání před bakteriemi a choroboplodnými zárodky. Mucinózní žlázy produkují hlenovitý sekret. Ten napomáhá polykání a posunu potravy do dalších částí trávicího traktu. Posledním typem jsou žlázy smíšené (seromucinózní) [14].

2.4.1 Onemocnění slinných žláz

Onemocnění slinných žláz, ať už se jedná o záněty, tumory či vývojové vady, vždy ovlivní fyziologické prostředí ústní dutiny. Nejčastěji dochází ke snížení sekrece žlázy, jehož následkem jsou časté změny na sliznicích či na tvrdých zubních tkáních. Slinné žlázy a slinovody přestávají plnit svoji funkci na základě různých postižení. Může se jednat o vývojové anomálie, regresivní změny, záněty slinných žláz, poruchy slinovodů, systémová onemocnění postihující slinné žlázy, cysty, nádory slinných žláz a různá poranění [15].

- **Vývojové anomálie**

S vývojovými anomáliemi se setkáme jen velmi zřídka. Je však známo několik případů s nevyvinutými žlázami (tzv. aplazií), či naopak vyvinutí přídavných žlázek, nejčastěji v oblasti vyústění příušní žlázy. Pokud dochází ke zvětšení některé z uzlin, mluvíme o hyperplazii. Hyperplastický stav je v současnosti považován za nejčastější vývojovou anomálii. Vývojové anomálie mohou vyskytovat i u slinovodů [15].

- **Regresivní změny**

Mezi nejčastější regresivní změny patří atrofie. Jedná se o zmenšení či zúžení orgánu, při němž dochází k úbytku živé tkáně. Atrofie může postihovat orgán jako celek i jednotlivé typy buněk. Zvyšuje se vazivová část orgánu, ten tedy působí jako více tuhý oproti orgánu zdravému. Tyto změny můžeme pozorovat převážně u starších pacientů. U lidí starších 60 let může dojít ke zmenšení příušní žlázy až na polovinu své původní velikosti. Tvorba slin je zřetelně nižší zhruba u 16 % sedmdesátiletých pacientů s takto zmenšenou žlázou [15].

- **Sialolithiáza**

Sialolithiáza je onemocnění, při kterém se z důvodu tvorby koncrementů ve vývodech slinných žláz zastavuje tok slin. Konkrementy nazýváme sialolity. Tyto slinné kamínky jsou tvořeny z anorganických látek, které jsou součástí slin. Látky se usazují v jádře žlázy, která se proti cizímu tělesu začne bránit vznikem zánětu, vzniká tzv. sialodochitis. Sialolity mohou mít různý vzhled, nejčastěji se však setkáváme s větvenovitým tvarem uvnitř vývodu, konkrementy tvořené uvnitř žlázy jsou kulaté a drsné. Jejich velikost může dosahovat až velikosti fazole. Mezi projevy sialolithiázy patří především bolest po jídle, zánět či hnis. Sialolithiázu je možno diagnostikovat na základě RTG snímku. V případě, že je koncrement pro viditelnost na snímku příliš malý anebo málo mineralizovaný, je nutné provést sialografii. Tato metoda a se využívá také k diagnostice zhoubných a nezhojných novotvarů, cyst, chronických zánětlivých onemocnění a regresivních změn slinných žláz. Jedná se o rentgenové vyšetření velkých slinných žláz za pomoci nástřiku žlázy olejovou kontrastní látkou. Na rentgenových snímcích se zobrazí větvení vývodu žlázy i jeho průchodnost. Léčba je u lehkých případů konzervativní, dále se přistupuje k chirurgickému odstranění sololitu či celé žlázy [15; 16].

- **Záněty slinných žláz – sialodenitis**

Záněty slinných žláz postihují především žlázy příušní a podčelistní. Mohou vznikat jako první chorobná změna, kdy mluvíme o zánětu primárním, nebo je další komplikací zánětů dutiny ústní či probíhané celkové infekce. V tomto případě se jedná o zánět sekundární. Záněty jsou vyvolány patogeny. Mohou to být bakterie, viry i plísňe. Hlavními příznaky zánětu jsou otok, bolestivost, snížená tvorba či změna kvality sliny, častá je také přítomnost hnisu. Bolestivost je způsobena především tlakem exsudátu a drážděním toxickými

produkty mikrobů. Záněty můžeme dále dělit na akutní (sialodenitis acuta) a chronické (sialodenitis chronica) [15].

- **Sialodenitis acuta**

Zduřené uzliny, nádor nebo onemocnění, která ovlivňují funkci slinných žláz, mohou způsobovat zpomalení toku slin, čímž vzniká akutní zánět. Při normální slinné sekreci zánět většinou nevzniká, jelikož bakterie hromadí se u vývodu slinných žláz jsou odplaveny a inhibovány slinou. Léčba probíhá podáváním antibiotik. Akutní záněty postihují především příušní žlázu. Můžeme je dělit na parotis postoperativa, parotis postanesthetica, parotis neonatorum, hematogenní hnisavá parotis, odontogenní parotis a parotis recidivans. Parotis postoperativa se vyskytuje u starších lidí po operacích, postanesthetica vzniká několik hodin až dní po operaci, neonatorum se může objevit po porodu z důvodu infikování dutiny ústní smíšenou flórou, hematogenní hnisavá parotis vzniká při bakteriemiích, odontogenní parotis je následkem infekce šířící se do zubu, recidivans postihuje děti [15].

- **Sialodenitis chronica**

Sialodenitis chronica nejčastěji vzniká zpomalením či zastavením slinné sekrece. Příčiny můžeme dělit na celkové a místní. Mezi celkové patří diabetes mellitus či Sjögrenův syndrom. Při místních dochází ke stlačení vývodů s následkem zastavení toku slin. Může se jednat o poruchy v extraglandulární části slinovodu nebo probíhající nezápětivé chorobné procesy ve žláze. Výsledkem je zduření a zatvrdnutí žlázy. Whartonův vývod (vývod submandibulární žlázy) se postupně zvětšuje, jelikož ztrácí svou elasticitu. U pacienta můžeme vidět zvětšení žlázy či začervnění před ušním boltcem, které je doprovázeno lehkou bolestí. Diagnostika se provádí sialografií. Léčba

začíná podání antibiotik a pitnou kúrou. Při trvání obtíží se přistupuje k parotidektomii [15].

- **Pooperační parotitida**

Pooperační parotitida postihuje pacienty po abdominálních operacích a postihuje zpravidla pouze jednu žlázu. Pooperační dehydratace a suchost sliznic přispívají ke snížení nebo úplnému zastavení sekrece slin. V dutině ústní dochází k pomnožení bakterií, které se následně dostávají do příušní žlázy. Příznaky pooperační parotidy se objevují několik dní po operaci. Patří mezi ně teplota, bolest při polykání a ztížené otevírání úst. Prevencí je podpora dehydratace po operaci [15].

- **Parotitis epidemica (příušnice)**

Parotitis epidemica je považována za nejčastější onemocnění příušní slinné žlázy. Jedná se o zánět vyvolaný virem skupiny paramyxovirů (paramyxovirus parotitidis). Mezi postižované pacienty patří především děti kolem 6. roku. Mezi příznaky se řadí bolest a sucho v ústní dutině, teplota, či otok, který postupně přechází z jedné příušní žlázy na druhou. Onemocnění je přenášeno kapénkovou infekcí nebo slinami. Doporučenou léčbou je klid na lůžku, vlhké obklady na postižené žlázy, výplachy úst heřmánkovým odvarem a podávání analgetik [15].

- **Postižení slinných žláz při systémovém onemocnění**

Mezi systémová onemocnění, která mají vliv na slinné žlázy, patří Sjögrenův syndrom, Mikuliczova choroba a Mikuliczův syndrom, Heerfordtův syndrom, systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, sklerodermie, diabetes mellitus, poruchy funkce štítné žlázy, hypofýzy a nadledvin. Jedná se o soubor onemocnění, která způsobují chronické nebo recidivující symetrické

zduřením velkých slinných žláz. Tato onemocnění mohou výjimečně ovlivňovat i malé slinné žlázy. Dochází ke zpomalení nebo úplnému zastavení slinné sekrece. Vytvoří se tak podmínky pro snadný přenos bakterií z ústní dutiny do žlázy. Mezi příznaky řadíme bolest či vznik hnisu. Může docházet také ke změnám kvality a složení slin [15].

- **Sjögrenův syndrom**

Sjögrenův syndrom patří mezi generalizované autoimunitní onemocnění. Název onemocnění pochází od švédského oftalmologa Henrika Samuela Conrada Sjögrena, který se o onemocnění jako první zmínil ve 30. letech minulého století.

V současné době je Sjögrenův syndrom považován společně s revmatoidní artritidou za nejčastější autoimunitní onemocnění. Postiženými pacienty jsou nejčastěji ženy ve věku nad 55 let. Ve velmi výjimečných případech onemocnění postihuje také muže a děti. Příčina nemoci není dosud známa. Pravděpodobně vychází z imunopatologie organismu, která může být prvotně spuštěna virovou infekcí (herpesviry, adenoviry, retroviry). Svou roli sehrává také porucha apoptózy – programované buněčné smrti. Tělo si tvoří obranné látky, které působí proti vlastním orgánům či tkáním. Jedná se o tzv. autoagresi. Onemocnění postihuje především exokrinní žlázy, často se jedná i o velké a malé žlázy kožního, urogenitálního, respiračního nebo trávicího traktu. Mezi příznaky pacientů patří nejčastěji nedostatek slin či slz (syndrom suchého oka). Může docházet také k únavě či psychickým obtížím. Sjögrenův syndrom můžeme dále rozlišovat na primární a sekundární. O primárním syndromu hovoříme tehdy, jedná-li se pouze o hypofunkci či afunkci exokrinních žláz. Pokud se Sjögrenův syndrom vyskytuje spolu s dalším autoimunitním onemocněním, mluvíme o syndromu sekundárním. Mezi nejčastější choroby spojované se Sjögrenovým

syndromem patří: revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses, systémová skleróza, polymyozitida, smíšená choroba pojiv a primární biliární cirhóza. U pacientů se Sjögrenovým syndromem postupně ubývá nebo úplně zaniká žlázo­vý parenchym velkých i malých slinných žláz. Snižuje se produkce slin, která způsobuje problémy s rozmělněním potravy. Pro pacienta je obtížné přijímání potravy bez zapití vody. Často dochází k rozvoji malnutrice spojené s nedostatkem železa a vitamínů B komplexu. Na základě tvorby hnisavého zánětu, který se tvoří při nedostatku slin, se postupně zbytnují především příušní žlázy. U pacientů se Sjögrenovým syndromem je také zvýšeno riziko výskytu maligních lymfomů [15].

Diagnostika tohoto onemocnění zahrnuje soubor několika vyšetření. Jedná se o subjektivní pocity obtíží pacienta, Schirmerův test sloužící k měření produkce slz, průkaz autoproti­látek či sialometrické testy pro průkaz postižení slinných žláz. Léčba tohoto onemocnění se může výrazně lišit na základě odlišných symptomů pacientů. Celkovou terapii vede imunolog či revmatolog a je založena především na podávání léků s protizánětlivými účinky. Při postižení jiných oblastí se na léčbě podílejí i specialisté z různých oddělení. Ve všech případech je důležitý přísun tekutin a klid na lůžku [15].

- **Diabetes mellitus**

Snížená produkce slin byla prokázána u 10–30 % diabetiků, někteří autoři však uvádějí, že pocit sucha v ústní dutině pocí­fuje až 60 % pacientů. Příčina není zcela jasná, podíl mohou mít vedlejší účinky některých léčiv, pravděpodobně má však největší vliv polyurie, poškození bazálních membrán žlázo­vého epitelu a poruchy mikrocirkulace. Diabetici jsou dále ohroženi asymptomatickým oboustranným zduřením příušních slinných žláz, ke kterému dochází při poruše autonomní inervace. Následkem je porušená syntéza či sekrece proteinů [15].

- **Nádory**

Nádory slinných žláz tvoří přibližně 3 % nádorových onemocnění hlavy a krku, podíl ke všem nádorům je méně než 1 %. Pouze 15 % nádorů slinných žláz je maligních [18]. Mohou primárně zasahovat slinné žlázy nebo se jedná metastázy. Postihují především příušní žlázy, výjimečně také hlenové žlázy na rozhraní tvrdého a měkkého patra. Mezi maligní nádory patří například myxochondorepителиom, cylindrom či karcinomy. Nejčastějším nádorem je však nádor benigní, pleomorfní adenom. U onkologických pacientů má na slinné žlázy negativní vliv radiace. Dochází ke vzniku postradiační xerostomie, která je přechodná pouze u 10 % pacientů. Míra poškození je závislá na dávce ozáření, velikosti ozářené tkáně či době, po kterou je dávka podávána [15].

3 CÍL PRÁCE

Helicobacter pylori (*Hp*) je zvláštní pohyblivá mikroaerofilní bakterie vyskytující se převážně ve tkáni GIT, zejména žaludku, kde způsobuje vznik zánětů a žaludečních vředů. Známy je i její onkogenní potenciál, a to nejen v GIT, nýbrž i v lymfatické tkáni oropharyngu. Cílem praktické části je zjistit, zda se *Hp* podílí i na patogenních procesech v oblasti slinných žláz. Bude zkoumána přítomnost bakterií v konkrémentech operačně vyňatých ze slinných žláz a prováděna jejich genotypová identifikace pomocí molekulárně biologických technik hybridizace se značenými sondami. V případě nálezu bude provedeno statistické vyhodnocení.

4 METODIKA

4.1 Hypotéza

U některých pacientů s výskytem *Helicobacter pylori* v gastrointestinálním traktu byla tato bakterie prokázána také v oropharyngu a ve slinách. V takovém případě se nabízí hypotéza, že *Helicobacter pylori* je obsažen i v konkrementech slinných žláz.

4.2 Odběr materiálu

Bylo zkoumáno 32 vzorků. Konkrementy byly vyňaty v průběhu operace v Ústřední vojenské nemocnici v Praze od pacientů s onemocněním slinných žláz. Velká pozornost byla věnována aseptickému odběru vzorků, aby nedošlo ke kontaminaci konkrementů. Vzorky byly odebrány do odběrové soupravy Remel–micro test M4RP. Toto transportní medium je velmi stabilní, používá se mimo jiné pro odběr a transport vzorků obsahujících viry či chlamydie. Vzorky byly označeny a odeslány do laboratoře sérologie Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. V této laboratoři byl prováděn vlastní výzkum. Bylo zde využito některých přístrojů, které jsou součástí vybavení laboratoře:

- MagNa PureCompact (Roche Diagnostics) – izolace DNA

4.3 Izolace DNA a RNA

Genomovou DNA či RNA můžeme izolovat ze všech jaderných buněk organismu oddělením nukleové kyseliny z komplexu s proteiny a její následnou purifikací. RNA je méně stabilní díky všudypřítomným RNázám, které ji štěpí.

Pro snížení rizika kontaminace jsou nároky na celý proces izolace RNA přísnější, především v pečlivosti a zachování sterilních podmínek. Proto je nutné RNA skladovat při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo přidávat inhibitor RNáz. Při izolaci nukleových kyselin z pevné tkáně musíme tkáň nejdříve homogenizovat. Musí dojít k lýze buňky, dále se rozruší buněčná membrána, denaturují se bílkoviny a uvolní se jádro buňky, jehož součástí jsou DNA a RNA, lipidy, sacharidy a další organické sloučeniny. Buňku lyzujeme lyzačním roztokem. Jeho součástí je detergent a chelatační činidlo EDTA, jehož úkolem je navázat ionty vápníku, které jsou kofaktory nukleáz. Pro částečné předčištění lyzátu se využívají proteolytické enzymy. Degradují enzymy štěpící nukleové kyseliny i buněčné proteiny, které tvoří s DNA komplexy. Dalším krokem je precipitace DNA alkoholem. Následuje několikeré promytí, po čemž dojde k rozpuštění nukleové kyseliny ve vodě nebo vhodném pufru. Pro zjištění čistoty a koncentrace nukleové kyseliny využíváme spektrofotometrické metody. Nejvyšší absorbance nukleových kyselin je při vlnové délce 260 nm, u proteinů 280 nm. Stupeň čistoty dále určujeme z poměru absorbance při 260 a 280 nm. Ideálním poměrem je hodnota 1,8. Kvalitu a míru degradace můžeme také ověřit elektroforézou [17].

Adsorbce na silikát

Tato metoda funguje na principu adsorpce nukleových kyselin na membránu ze silikátového materiálu za přítomnosti chaotropních solí o vysoké koncentraci. Jedná se o účinnější systém než v případě srážecích metod. Výhodou použití optimalizovaných pufrů při lýze buňky je jistota, že se na silikát naváže pouze nukleová kyselina. Proteiny a další molekuly zůstanou ve vodném roztoku, z něhož jsou později vyplaveny. Ze silikagelu získáme DNA pomocí pufru s nízkou koncentrací soli. Nejprve se přidají chaotropní soli spolu se silikátovými částicemi do zkumavky s lyzovanými buňkami.

Při protřepání se postupně DNA navazuje na silikátové částice. Roztok se zbylými částicemi je po centrifugaci možné odsát, zatímco DNA zůstává usazena na dně zkumavky. Po přidání dalšího množství pufru s chaotropní solí se celý proces opakuje. DNA z povrchu částic odebereme přidáním vody či pufru bez chaotropních solí. Po centrifugaci zůstávají silikátové částice usazeny na dně, čistá DNA zůstává ve vodném roztoku. Silikátové částice se připravují zahřátím oxidu křemičitého v roztoku hydroxidu sodného po dobu 48 hodin. K navázání DNA je zapotřebí vysoká afinita mezi DNA, která je záporně nabitá a silikagelem s kladným nábojem. Nitrocelulóзовé a polyamidové membrány se příliš nepoužívají díky nízké specifitě [18].

Fenol-chloroformová extrakce

Fenol-chloroformová extrakce je nejstarší metoda izolace nukleových kyselin, v dnešní době se využívá zejména v případě výzkumné separace DNA, RNA a proteinů. Fenol jako organické rozpouštědlo odděluje proteiny od nukleových kyselin, chloroform proteiny denaturuje, rozpouští tuky a podílí se na oddělení jednotlivých fází. Celý proces je založen na extrakci z kapaliny do kapaliny, při které přechází rozpuštěná látka z jedné kapalně fáze do druhé. Používají se dva typy fází – voda nebo vodný roztok a organické, vodou nemísitelné, rozpouštědlo. Na základě odlišné rozpustnosti se molekuly rozdělí mezi tyto dvě fáze. Celý proces začíná v momentě přidání fenolchloroformu do zkumavky s lyzovanými buňkami. Poté se roztok dobře promíchá. Na základě nemísitelnosti fenolchloroformu s vodou dojde k vytvoření dvou odlišných fází, spodní organické a horní vodnaté. Po důkladném promíchání dochází k vysrážení denaturovaných proteinů. Následnou centrifugací vzniká na fázovém rozhraní těchto dvou fází prstenec vysrážených proteinů. Při použití neutrálního, či alkalického pufru zůstávají nukleové kyseliny (RNA i DNA)

ve vodné fázi, naopak při použití kyselého fenolu přechází DNA do organické fáze, zatímco RNA zůstává ve fázi vodné (tohoto jevu můžeme využít při izolaci RNA). DNA poté získáme vysrážením etanolem a následným rozpuštěním ve vodě. Směs fenolu a chloroformu se využívá především z důvodu větší účinnosti než fenolu samotného. Nejčastěji používaný poměr fenolu a chloroformu je 1:1, či 1:5. Do směsi se ještě může přidat z důvodu zabránění tvorby pěny isoamylalkohol v poměru 24 dílů chloroformu k 1 dílu isoamylalkoholu. K redukci účinku nukleáz dále využíváme guanidinových solí. Izolace fenolchloroformem nabízí vysoký výnos nukleové kyseliny o vysoké kvalitě a čistotě. V rutinní diagnostice se nepoužívá, neboť její nevýhodou je velká časová náročnost a práce s nebezpečnými chemikáliemi [18].

Vysolování a vsolování

Tato metoda je jednou z nejjednodušších metod izolace DNA. Je založena na změnách rozpustnosti molekul DNA a jejich závislosti na změně v koncentraci iontů v roztoku. S rostoucí koncentrací iontů se rozpustnost DNA zvyšuje, po dosažení maxima rozpustnost DNA klesá. Nejvhodnější je použití síranu amonného díky jeho schopnosti dobře se rozpouštět bez teplotního omezení. Používá se 30 % množství, které je potřeba k vytvoření nasyceného roztoku. Při vysokém množství síranu dochází ke srážení většiny proteinů. Metoda vsolování a vysolování je snadná, rychlá, levná a poskytuje kvalitní DNA [18].

Srážení organickými rozpouštědly

Metoda srážení organickými rozpouštědly je starší a vzhledem k dostupnosti modernějších technik i zřídka používaná. Při snížení dielektrické konstanty prostředí se snižuje i rozpustnost a dochází k vysrážení biopolymeru.

Využívají se nepolární, vodou nemísitelná organická rozpouštědla. Nejčastěji jde o etanol, ale používá se i aceton, isopropanol, metanol, propanol nebo diethylether. Aby nedošlo k vysrážení proteinů, musí být zajištěna teplota kolem 0 °C [18].

Izolace nukleových kyselin pomocí magnetických částic

Izolace nukleových kyselin pomocí magnetických částic patří mezi další technologie mezi odbornou veřejností velmi rozšířené, je založená na magnetických částicích (nebo také paramagnetické částice). Je využívána v řadě biomedicínských a biotechnologických oborů, například k zobrazování pomocí magnetické rezonance, pro cílený transport léčiv, k reparaci tkání, magnetickému značení buněk a také k izolaci biomolekul. V lékařství je také důležitá pro separaci kmenových a nádorových buněk, detekci mikrobiálních patogenů nebo pro imunomagnetické stanovení významných analytů. Magnetické částice mají kovové jádro, které je běžně tvořeno oxidy železa nebo například zlatem. Toto jádro je obaleno vrstvou se specifickým povrchem, který je možné upravit podle charakteru izolované molekuly. Částice o velikosti 5–50 nm se používají při izolaci proteinů, 20–450 nm k izolaci nukleových kyselin a virů a velikost 10-100 μm slouží k izolaci buněk. Tato metoda je oblíbená zejména pro nižší náročnost při úpravě vzorků. Celý proces je tedy rychlejší, díky čemuž se snižuje riziko případného poškození. Separace biomolekul tímto způsobem je kromě rychlosti také velmi citlivá a tím tedy spolehlivější než jiné metody. V současné době je tato metoda nejčastěji využívána v automatizaci, splňuje totiž vysoké požadavky dostatečného množství, čistoty a kvality vzorků pro další použití v PCR, minimalizuje tím potřebu manuální práce. V dnešní době společnosti nabízejí několik přístrojů. Některé kombinují funkci izolace

biomolekul s jejich detekcí na základě jejich kvantifikace nebo interakce s jinými biomolekulami [18].

4.4 Real-time PCR

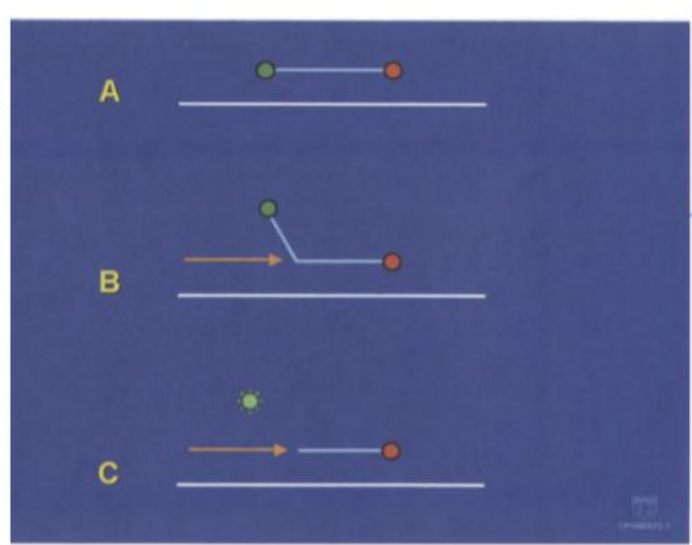
Real-time PCR řadíme mezi varianty PCR. Název Real-time PCR vznikl z důvodu možnosti přímé kvantifikace produktu během reakce, která se často využívá k diagnostice infekčních agens či studiu genové exprese. Tato metoda je výjimečná, jelikož zahrnuje amplifikaci i analýzu bez další manipulace se vzorkem, použití gelu nebo radioaktivity. Real-time PCR kvantifikuje produkty bezprostředně po jejich vzniku v každém cyklu, detekce probíhá na základě změny intenzity fluorescenčního záření v průběhu amplifikace [19].

Detekce produktu v průběhu PCR

Detekce produktu v průběhu PCR je založena na použití [19]:

- 1) fluorescenčně značených primerů
- 2) fluorescenčně značených sond, jež se váží na střední část amplifikovaného produktu
- 3) interkalačního barviva, které se váže na DNA

Značení hybridizačních sond či primerů je založeno na molekulách flouoroforů, které po absorpci světla o určité vlnové délce emitují světlo o vlnové délce druhé. Absorbovaná vlnová délka je vždy nižší než vyzářená. Dvojitě značené sondy obsahují kromě molekul fluoroforu také tzv. zhášeč. Jedná se o molekulu, která ve formě světla či tepla rozptýlí světelnou energii přijatou z fluorochromu. Důležitým požadavkem je, aby se absorpční spektrum zhášeče překrývalo s emisním fluoroforu [19].



Obrázek 3 Průběh Real – time PCR [20]

Sondy v real-time PCR

Sonda by měla být vždy vhodně zvolená na základě požadovaného PCR ampliconu. Můžeme je dělit na [19]:

Nespecifické – jedná se především o sondy interkalační:

- Ethidium bromid
- SYBR Green I
- LC Green
- Eva Green

Specifické – oligonukleotid hybridizující s ampliconem:

- Hydrolyzační sondy (TaqMan)
- Hybridizační sondy FRET
- Molecular Beacons
- Scorpions

Pro detekci PCR produktu se často využívá kyanidové barvivo SYBR green, jehož fluorescenční signál se několikanásobně zvýší po navázání na malý žlábek dsDNA. Fluorescenční signál se měří v průběhu, či na konci elongace. Zvyšuje se s přibývajícím množstvím produktu [19].

Sondy TaqMan

Tyto oligonukleotidy obsahují fluorescenční značku na 5'-konci a zhášec na 3'-konci. Sonda se naváže na vnitřní část sekvence. Při vytvoření homoduplexu se rozloží exonukleázovou aktivitou Taq DNA-polymerázy. Dojde k ukončení zhášení a k emisi fluorescence. Tato hybridizační metoda se často využívá pro detekci bodových mutací DNA [19].

Stabilita oligonukleotidů

Oligonukleotidy jsou velmi stabilní látky, při teplotách skladování -20 °C jsou účinné i několik let. Při několikanásobném zmrazení a rozmrazení může docházet ke snížení funkce. Proto je doporučeno uchovávat je v alikvotech [19].

4.4.1 Přístroje pro real-time PCR

Na světovém trhu je již celá řada výrobců kvalitních přístrojů pro real-time PCR. Mezi nejčastěji využívané patří přístroje firem Applied Biosystems a Roche [19].

ABI Prism Systems

Tato firma byla první, která začala přístroje pro real-time PCR používat a stále je jedním z předních výrobců. Tyto přístroje využívají chemické látky TaqMan a SYBR Green [19].

ABI 7500 je mnohem pokročilejší přístroj než typ předchozí, ABI 7300, kde se místo 5 excitačních filtrů využíval pouze 1. Tento posun je důvodem větší citlivosti a přesnosti přístroje. Emisních filtrů je taktéž 5. Zdroj excitačního záření zůstal stejný, detektor ve formě CCD kamery také. Jedná se o halogenovou žárovku [19].

ABI Prism 7900, jedná se o jeden z nejvýkonnějších detekčních systému pro real-time PCR. Obsahuje 384 jamkovou titrační destičku, takže množství zpracovaných vzorků přesahuje 5000. Zdroj excitačního záření je laser, detekční zařízení obsahuje spektrograf a chlazenou CCD kameru [19].

Roche Applied Science

Firma F. Hoffmann-La Roche AG je vedoucím dodavatelem na trhu s potřebami pro PCR. Její divize Roche Applied Science v současné době nabízí celé spektrum termocyklérů [19].

Mezi její přístroje v českých laboratořích patří např. [19]:

- LighCycler 1.5 (1.2) instrument
- LighCycler 2.0 instrument
- LighCycler 480

LightCycler v. 1.2 a 1.5. Tento termocyklér patří mezi nejrychlejší ohřívané termocykléry. Jeho rychlost mu však nijak neubírá na citlivosti a přesnosti. Obsahuje mikroobjemový fluorimetr využívaný pro detekci a kvantifikaci PCR produktů. Detekce ampliconů hromadících se ve skleněných kapilárách probíhá za pomoci fluorescenčního barviva, které se váže na dsDNA či fluorescenční sondy. Přístroj obsahuje kruhový karusel určený pro 32 vzorků. Otáčí se nad LED

diodou. Záření, které vzorek emituje, prochází dichroickým zrcadlem a dopadá na fotodetekční diody s filtry (530 nm, 640 nm a 710 nm) [19].

LightCycler 2.0. Jedná se o novější typ, který se liší od LightCycleru 1.0 a 1.5 šestikanálovým fotometrem, díky kterému můžeme sledovat záření o 6 různých vlnových délkách. (530 nm, 555 nm, 610 nm, 640 nm, 670 nm a 705 nm). Výsledky jsou vyhodnocovány ve fotohybridu. Lze využívat objemy vzorků 20 μ l a 100 μ l. Jedná se opět o velmi rychlou analýzu, která trvá přibližně 45 minut, při délce amplifikačního cyklu 30 až 60 sekund [19].

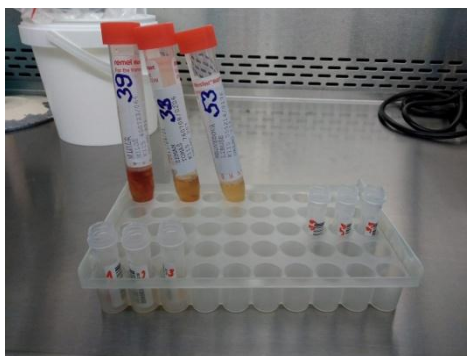
LightCycler 480. Jedná se o nový systém, který umožňuje kombinaci real-time PCR s rychlým cyklováním. Je určen pro zpracování 96, nebo 384 vzorků na základě termobloku. Umožňuje sekvenčně specifickou detekci s různými typy sond. Analýza křivky teplot tání umožňuje genotypizaci za pomoci sond, či SYBRGreen I barvy [19].

4.5 Postup

4.5.1 Izolace DNA

Každý vzorek v odběrové zkumavce byl důkladně protřepán na vortexové třepačce. Do zkumavky Eppendorf o objemu 2 ml označené čárovým kódem pro identifikaci unikátního vzorku bylo napipetováno 400 μ l z odběrové zkumavky. Osm zkumavek se vzorky bylo umístěno do zásobníku automatického izolátoru. Systém byl iniciován, aby bylo možno otevřít pracovní prostor. Čtečkou čárového kódu byly načteny unikátní kódy z 8 zkumavek s připravenými vzorky v pozicích stojánku. Dále byly vloženy uzavřené reagenční kazety do každé z 8 pozic a načteny jejich unikátní kódy. Do stojánku bylo vloženo dalších osm zkumavek pro eluované vzorky s izolovanou

nukleovou kyselinou. Do pozic v analyzátoru byly vloženy kazety s pipetovacími špičkami s filtrem a perforačním trnem pro aluminiový uzávěr kazety s reagensii. Byl vložen lapač kapek a zásobník se vzorky a elučními zkumavkami. Na dotykovém displeji přístroje byl zadán zvolený izolační program (množství vzorku 400 μ l, množství elučního činidla 100 μ l, typ materiálu – ostatní). Pracovní prostor byl uzavřen a přístroj byl spuštěn. Po 29 minutách byla ukončena izolace, systém vytiskl protokol a odblokoval uzávěr pracovního prostoru. Zkumavky s eluovanými izoláty nukleových kyselin byly uzavřeny šroubovacími víčky, vyňaty a umístěny k dalšímu zpracování. Všechny další použité prvky byly vyňaty a odloženy do infekčního odpadu.



Obrázek 4 Vzorky připravené k izolaci [obrázek autor]



Obrázek 5 Automat pro izolaci nukleových kyselin MagNa PureCompact (Roche Diagnostics) [obrázek autor]



Obrázek 6 Kazeta s reagensiiemi pro izolaci nukleových kyselin z 1 vzorku [obrázek autor]



Obrázek 7 Hotové izolace [obrázek autor]

Results

Operator: _____
 Instrument: MagNA Pure Compact
 Instrument S/N: MPC81212 (SW 1.1.2)
 Run ID: 212003443
 Date of Run: Apr 19, 2018 13:38 h

Sample Material: _____
 Isolation Kit: _____
 Protocol: _____
 Sample Volume: _____
 Elution Volume: _____
 Internal Control Volume: _____
 Signature: _____

Others: Nucleic Acid Isolation Kit 1, ZPU K100 / A - 2018
 Total_NA_Phasma_100_40L_V (Version MPC3.2)

No.	Sample ID	Comment	Cartridge	Internal Control	Elution Tube	Result
1	37	Hp	A1018284861 0003899		20547153	PASS
2	32	++	A1018284861 0003893		20525842	PASS
3	38	++	A1018284861 0003895		20525976	PASS
4	30	++	A1018284861 0003895		20541831	PASS
5	40	++	A1018284861 0003892		20553997	PASS
6	45	++	A1018284861 0003882		20837729	PASS
7	46	++	A1018284861 0003883		20546092	PASS
8	41	++	A1018284861 0003884		20550880	PASS

page 1 of 1

Obrázek 8 Vytisknutý izolační protokol [obrázek autor]

4.5.2 Princip izolace MagNAPure Compact

Automatický izolátor nukleových kyselin MagNA Pure Compact, výrobce F. Hoffmann – La Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Švýcarsko, pracuje na principu adsorpce DNA/RNA na skleněné mikrokuličky s magnetickým jádrem. Veškeré reagenty jsou zde umístěny v uzavřených reagenčních kazetách pro zpracování jednoho vzorku. Před pipetováním je na každé pozici aluminiový uzávěr proražen perforačním trnem, teprve poté vstoupí pipetovací špička. Přístroj zpracovává současně 1 až 8 vzorků a je tedy určen pro malé až střední laboratoře. Postup izolace je tento: 1 · 400 µl vzorku je napipetováno ke 100 µl lyzačního roztoku. Po inkubaci jsou přidány mikrokuličky s magnetickým jádrem a probíhá adsorpce nukleových kyselin. Po jejím ukončení dochází k několikanásobnému promytí, kdy mikrokuličky jsou udržovány v pracovní zkumavce díky působení magnetu na jejich magnetické jádro. Veškerý odpad vzniklý při cytolýze je odmyt a postupně odpipetován. V konečné fázi je pomocí elučního roztoku uvolněna DNA/RNA z povrchu mikrokuliček a v objemu určeném programem napipetována do připravené eluční zkumavky. V závislosti na programu dojde buď ke dvojnásobnému, nebo čtyřnásobnému zkoncentrování. My jsme použili program se čtyřnásobným zkoncentrováním.

4.5.3 RIDA GENE Helicobacter pylori (Real-time PCR Test)

Použili jsme komerční test německé firmy R-biopharm AG, Darmstadt, RIDA GENE pro detekci Helicobacter pylori na systému Corbett/Qiagen Rotorgene 6000, pro nějž je tento test optimalizován. Postupovali jsme podle návodu výrobce, včetně nastavení vyhodnocovacího softwaru.

4.5.4 Genotypizace *Helicobacter pylori*

Základem tří assayí pro genotypizaci *Helicobacter pylori* je komerční souprava Light Cycler TaqMan Master od firmy Roche. Primery a sondy (sekvence dle van Doorna a spol. 1997) byly vytvořeny na zakázku společností TIB Molbiol Berlín, a to pro *cagA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *VacAs2*, *vacAM1* a *vacAM2*. Pracovní postup byl prováděn dle návodu s úpravou amplifikačního profilu dle doporučení výrobce sond. Testy byly prováděny na přístroji Light.Cycler 2.0 se software 4.1 v programech Absolute quantification a NA quantification. Následně byly odečítány amplifikační křivky jednotlivých vzorků naměřené při vlnových délkách odpovídajících emisnímu spektru fluorescenčního reportéru příslušné TaqMan sondy.

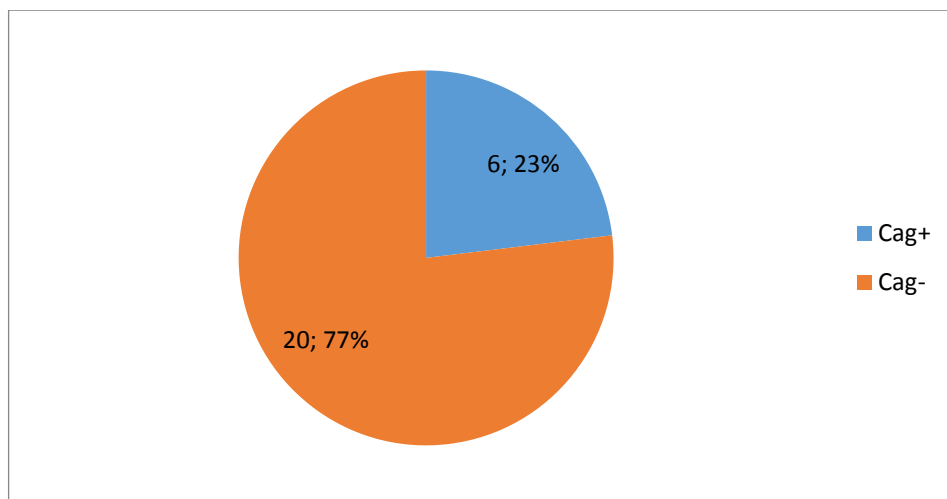
5 VÝSLEDKY

Tabulka 1 Záchyt Hp ve vzorcích pacientů

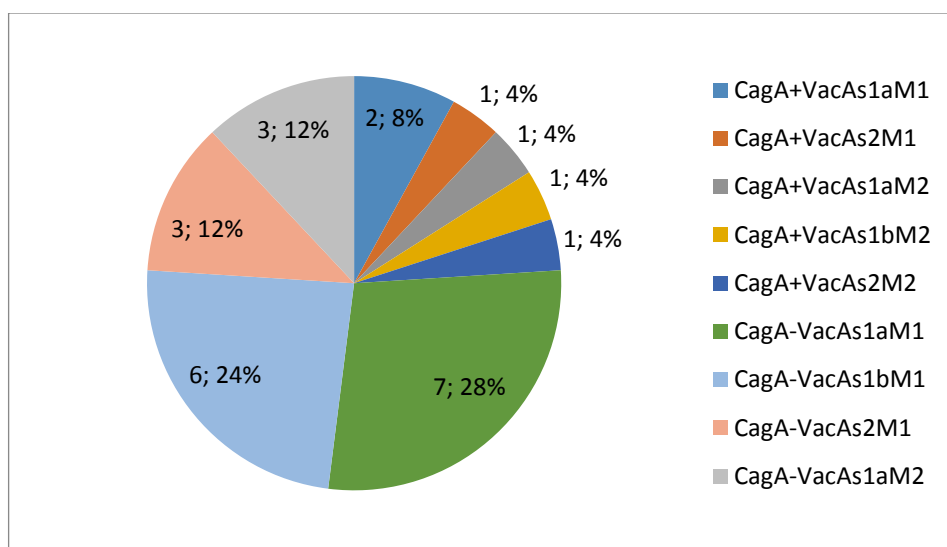
Číslo	Záchyt Hp
1	ANO
2	ANO
3	ANO
4	ANO
5	ANO
6	ANO
7	ANO
8	ANO
9	NE
10	NE
11	ANO
12	ANO
13	ANO
14	NE
15	NE
16	NE
17	ANO
18	ANO
19	ANO
20	ANO
21	ANO
22	ANO
23	ANO
24	ANO
25	ANO
26	ANO
27	ANO
28	ANO
29	ANO
30	NE
31	ANO
32	ANO

Tabulka 2 Výsledky výskytu CagA ve vzorcích pozitivních na Hp

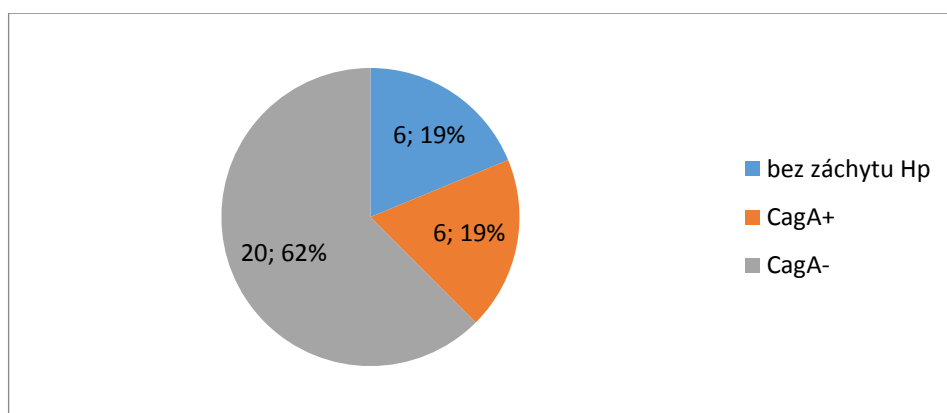
Číslo	CagA
1	Negativní
2	Negativní
3	Negativní
4	Pozitivní
5	Negativní
6	Pozitivní
7	Negativní
8	Pozitivní
9	Negativní
10	Negativní
11	Negativní
12	Negativní
13	Negativní
14	Negativní
15	Negativní
16	Pozitivní
17	Pozitivní
18	Negativní
19	Negativní
20	Negativní
21	Negativní
22	Negativní
23	Negativní
24	Pozitivní
25	Negativní
26	Negativní



Obrázek 9 Poměr vzorků pozitivních a negativních na Cag



Obrázek 10 Poměrné a procentuální zastoupení vzorků se stejnými genotypy



Obrázek 11 Poměr vzorků bez záchytu, s CagA+ a CagA-

Tabulka 3 Souhrnný přehled výsledků genotypizačních assayí pro *cagA*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs2*, *vacAm1* a *vacAm2*

Číslo	Cag A	VacAs1a	VacAs1b	VacAs2	VacAM1	VacAM2
1	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní	Pozitivní	Negat.
2	Negat	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
3	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní
4	Pozitivní.	Pozitivní	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní.
5	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
6	Pozitivní.	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
7	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní.
8	Pozitivní	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
11	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
12	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
13	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Pozitivní.	Negat.
17	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní	Pozitivní.	Negat.
18	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní.
19	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Pozitivní	Negat.
20	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.
21	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Pozitivní
22	Pozitivní.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.
23	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.
24	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.	Pozitivní	Negat.
25	Negat.	Pozitivní	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní
26	Negat.	Pozitivní.	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.
27	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.	Pozitivní	Negat.
28	Negat.	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.
29	Pozitivní.	Negat.	Pozitivní	Negat.	Negat.	Pozitivní
31	Negat.	Negat.	Pozitivní	Negat.	Pozitivní	Negat.
32	Negat.	Negat.	Negat.	Pozitivní.	Pozitivní	Negat.

Poznámka: Vzoroký č. 9, 10, 14, 15, 16 a 30, ve kterých nebyl *Helicobacter pylori* prokázán, nejsou uvedeny v tabulce, jelikož u nich nebyla genotypizace z pochopitelných důvodů prováděna.

6 DISKUZE

V minulosti byl *Helicobacter pylori* izolován převážně ze vzorků pacientů s gastritidou či jiným onemocněním GIT. Současné výzkumy se však zaměřují na jeho vliv v oblasti hltanu. Bylo prokázáno, že tato bakterie může kolonizovat lymfatickou tkáň v oblasti oropharyngu. Jeho výskyt ve slinách je všeobecně znám. Byl prokázán v tonsilách pacientů s chronickou tonsilitidou i v nádorech slinných žláz. Tyto literární výsledky u patologií slinných žláz nás vedly k položení hypotézy, zda se Hp může vyskytovat v konkrémentech slinných žláz.

Infekce *H. pylori* zpravidla vykazuje vysokou incidenci v rozvojových zemích a nízkou míru v zemích rozvinutých. Míra infekce je vysoká především na území, která nemají odpovídající služby v oblasti vody a kanalizace, nebo mají špatné hygienické prostředí. Tato zjištění poskytují důkazy o úzkém vztahu mezi sociálním prostředím, včetně sanitace, a mírou infekce *H. pylori*.

Na tento fakt upozorňuje studie Ueda, J. a spol. která tvrdí, že pravděpodobnou cestou přenosu Hp do slin a zubního plaku je požití kontaminované vody. Autoři dále uvádějí, že bylo provedeno několik málo detailních studií o době počáteční infekce *H. pylori* a o dalších pravděpodobných možnostech přenosu – především z rodičů na dítě. Vzorky slin byly odebrány prostřednictvím sterilního bavlněného válce a vyšetřeny metodou TaqMan. Hypotéza toho typu přenosu byla potvrzena, jelikož všech 25 dětí s pozitivním testem na Hp mělo alespoň jednoho nakaženého rodiče. Identifikace přenosové cesty *H. pylori* je v současné době zásadní pro rozvoj účinného plánu dohledu při hledání nových prostředků pro zvládnání chorob. Studie přináší také informace o tom, že *H. pylori* ze žaludku a z úst má stejný genotyp na molekulární biologické úrovni, což vyvrací další uvedená studie Lukeše a spol [21]. Ta byla první prací, která se zaměřovala na srovnání Hp kmenů v gastrointestinálním traktu s kmeny pocházejícími z tonsil a nádorových onemocnění oblasti oropharyngu pomocí

real-time PCR a UBT. Z celkově zkoumaných 20 pacientů s prokázanou pozitivitou Hp v oropharyngu mělo 8 také gastrickou infekci. U 6 byly prokázány neidentické kmeny. Třem jedincům byl prokázán CagA+ Hp kmen v žaludku a CagA- v dutině ústní. U dvou z nich se také prokázaly odlišnosti v S oblasti a *vacA* genu. Jeden pacient vykazoval odlišnosti výhradně v S oblasti [10].

Další studie autorů Cellini L. a spol. měla za cíl ověřit přítomnost *H. pylori* v jícnu a slinách. Vzorky slin, biopsie sliznice z jícnu a žaludku byly odebírány od 19 pacientů s pozitivním močovinným dechovým testem (UBT). Žaludeční biopsie byly použity pro vyšetření kolitidy *H. pylori* a antimikrobiální citlivosti, zatímco vzorky slin byly shromážděny a vyšetřeny molekulární analýzou a imunohistochemickým barvením. *Helicobacter pylori* se podařilo izolovat u 18 pacientů, u nichž se potvrdil výskyt HP v žaludku. Molekulární analýza poskytla pozitivní výsledky ve všech vzorcích slin a jícnu. Imunohistochemie odhalila přítomnost *H. pylori* u 15,8 % (3/19) vzorků jícnu. Údaje naznačují, že sliny a jícn lze považovat za rezervoáry pro *H. pylori* a zdůrazňují potřebu použití více citlivých technik pro detekci *H. pylori* [22]. Zejména u metod kultivace docházelo k falešně negativním výsledkům, především díky náročnosti kultivace Hp. Zlepšením transportních medií a použitím real-time PCR je v současnosti možné vynechat krok kultivace a testovat vzorky přímo, což přináší velkou časovou úsporu. Doposud bylo vyvinuto pro detekci *H. pylori* v ústní dutině mnoho PCR testů. Metoda real-time PCR byla využita i v naší studii. 32 konkrementů slinných žláz bylo operativně odebráno od pacientů v Ústřední vojenské nemocnici v Praze. U 26 z celkových 32, tedy u 81,25 % pacientů byl prokázán záchyt Hp. Jejich genotypy se lišily. CagA pozitivních bylo 5 vzorků (15,63 %), Nejčastěji byly zastoupeny genotypy cagAneg.vacAs1aM1 – 6x (23.07%) a cagAnegvacAs1bM1 – rovněž 6x (23.07%). Dále pak cagA+vacAs1aM1 – 3x (11.5%) a cagAnegvacAs1aM2 – rovněž 3x (11.5 %), cagAnegvacAs1aM2 – 2x (7.69%). Po 1 byly zachyceny tyto genotypy: cagA+vacAs2M1, cagA+vacAs1aM2, cagA+s1aM2, cagA+vacAs2M2, cagAnegvacAs2M2 a cagAnegvacAs1bM2 (po 3.84%).

Tyto výsledky potvrdily stanovenou hypotézu. Konkrementy slinných žláz patří mezi další oblasti výskytu Hp. Pro udržení co nejširšího povědomí o pokrocích zkoumání je zapotřebí sledovat výsledky nových studií, jimiž se zabývají odborníci z různých částí světa. Rozmanitost studovaných zeměpisných oblastí může vzhledem k diverzitě vzorků také přinést nové objevy. Jednou z vhodných geografických území je Čína, která díky velkému počtu obyvatelstva poskytuje možnost sběru rozmanitých vzorků. Prozatím byly ke studiu využity např. oblasti rozvojových zemí, Japonska, Turecka a České republiky.

Prokazujeme přítomnost Hp v konkrementech. Otázkou však zůstává, jak se tam dostal. Zda primárně jako ko-faktor tvorby těchto konkrementů, nebo sekundárně kontaminací hotových konkrementů ze slin. To bude předmětem dalšího výzkumu.

7 ZÁVĚR

Studium *Helicobacter pylori* je velmi důležité, pomáhá totiž ve zdokonalování nejen diagnostiky, ale i léčby onemocnění způsobovaných tímto mikroblem.

Práce na praktické části s sebou přinesla možnost zkoumat slinné konkrementy, s nimiž se studenti lékařských oborů nemají vždy možnost setkat. Velmi zajímavé bylo také seznámení s finančně náročnějšími položkami laboratoří (např. kit a sondy pro real-time PCR).

Řada dřívějších studií prokázala *Helicobacter pylori* ve slinách různých souborů populace. Výzkum prováděný v rámci této práce prokázal výskyt *Helicobacter pylori* v konkrementech slinných žláz v 78 %, tedy u 27 vzorků ze zkoumaných 32. Zda jsou v nich primárně, a tím se podílejí na tvorbě konkrementů, nebo je kontaminují sekundárně, bude předmětem dalších výzkumů.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CCD – Charge-coupled device
CLO – Campylobacter-like organism test
DNA – deoxyribonukleová kyselina
dsDNA – dvouvláknová DNA
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GIT – gastrointestinální trakt
HCl – kyselina chlorovodíková
Hp – Helicobacter pylori
HPV – lidský papilomavirus
LED – dioda - Light-Emitting Diode
PCR – polymerázová řetězová reakce
pH – potential of hydrogen
RNA – ribonukleová kyselina
RNáza – ribonukleáza
RTG – rentgen
RUT – rychlý ureázový test
ssDNA – jednovláknová DNA
UBT – Urea breath test
ml – mililitr
nm – nanometr
μl – mikrolitr
μm – mikrometr

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
- [2] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-868-5000-5.
- [3] *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií: Makroskopické a mikroskopické pozorování mikroorganismů, Gramovo barvení* [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2017 [cit. 2017-11-28]. ISSN ISSN 1802-128X. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/pozorovani_mikroorganizmu.html
- [4] Gram-negative Bacteria. In: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* [online]. NIAID, 2016 [cit. 2017-11-28]. Dostupné z: <https://www.niaid.nih.gov/research/gram-negative-bacteria>
- [5] YAMAOKA, YOSHIO. *Helicobacter pylori: Molecular genetics and cellular Biology* [online]. Norfolk,UK, 2008 [cit. 2018-05-04]. ISBN 978-1-904455-31-8.
- [6] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.

- [7] SEIFERT, Bohumil a Eva CHARVÁTOVÁ. *Doporučené postupy pro praktické lékaře: Infekce Helicobacter pylori* [online]. Praha: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2001, s. 1-7 [cit. 2017-11-28].
- [8] KOPÁČOVÁ, M. a B. SEIFERT. Co je nového v léčbě infekce Helicobacter pylori?. *Medicína po promoci* [online]. Medical Tribune CZ, 2015, 16(4), 276 [cit. 2018-05-16]. ISSN 1212-9445. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/clanek/38097-co-je-noveho-v-lecbe-infekce-helicobacter-pylori>
- [9] TOROK, Estée., Fiona J. COOKE a Ed. MORAN. *Oxford handbook of infectious diseases and microbiology*. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2009. ISBN 0198569254.
- [10] PAVLÍK, Emil et al. Detection of Helicobacter pylori and Human Papillomavirus in Peroperative Tissue Biopsies Collected from Malignancies in Oropharyngeal Area. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine* [online]. 2015, 3(6), 364-367 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.11648/j.ajcem.20150306.17. ISSN 2330-8133. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/717f/998183731c18361d00e35d56f760a3f4c0e5.pdf>
- [11] LUKEŠ, Petr, Jaromír ASTL a Emil PAVLÍK. Helicobacter pylori – Not Only a Gastric Pathogene?. *Peptic Ulcer Disease*. 2011. Rijeka, Croatia: InTech, 2011, s. 99-110. ISBN 978-953-307-976-9.
- [12] LUKEŠ, Petr at al. Comparison of Helicobacter Pylori Genotypes Obtained from the Oropharynx and Stomach of the Same Individuals – A Pilot Study. *Prague medical report* [online]. Praha, 2012, 113(3), 231-239 [cit.

2018-05-16]. ISSN 2336-2936. Dostupné z:
<http://pmr.cuni.cz/file/5633/PMR2012A0023.pdf>

- [13] AKYON, Yakut a Gulsen HASCELIK. The effect of *Helicobacter pylori* on neutrophil chemotaxis is independent of *cagA*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* [online]. 1999, 24(2), 209-213 [cit. 2018-05-16]. ISSN 1574-695X. Dostupné z:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01284.x>
- [14] DYLEVSKÝ, Ivan. *Somatologie*. Vyd. 2. (přeprac. a dopl.). Olomouc: Epava, 2000. ISBN 80-862-9705-5.
- [15] HANZLOVÁ, Jitka a Jan HEMZA. Hlavová část. *Základy anatomie: Soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní* [online]. Fakulta sportovních studií, Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2018-02-02].
- [16] ZEMKOVÁ, Andrea. *HYPOSALIVACE A XEROSTOMIE*. Brno, 2016. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Hana Poskerová.
- [17] MAZÁNEK, Jiří. *Zubní lékařství: propedeutika*. 1. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-3534-4.
- [18] LUKÁŠ, Jiří. Nádory slinných žláz. *Postgraduální medicína* [online]. Univerzita Karlova v Praze, 1. LF a FN Motol, 2002 [cit. 2018-02-02].
- [19] PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-802-4734-590.

- [20] DRATVOVÁ, Lenka. *Metody izolace a archivace DNA z živočišných tkání*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.
- [21] LYSKOVÁ, Lucie. *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně - Lékařská fakulta. Vedoucí práce Iveta Valášková.
- [22] REISCHL, U., C. WITTEWER a F. COCKERILL. *Rapid cycle real-time pcr: methods and applications*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002. ISBN 3-540-41881-4.
- [23] UEDA, Jun, Akira YAMAGUCHI a Kohichi SHIBASAKI. Occurrence of *Helicobacter pylori* in saliva from preschool-age children. *Oral Science International* [online]. 2015, **12**(1), 5-8 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1016/S1348-8643(14)00028-7. ISSN 13488643. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1348864314000287>
- [24] CELLINI, Luigina et al. Detection of *Helicobacter pylori* in saliva and esophagus. *New Microbiologica* [online]. 2010, **33**(4), 351-357 [cit. 2018-05-16]. ISSN 1121-7138. Dostupné z:
http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2010/4/351.pdf

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Tvary bakteriálních buněk [3]	12
Obrázek 2 Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie [4].....	17
Obrázek 3 Průběh Real – time PCR [20]	45
Obrázek 4 Vzorky připravené k izolaci [obrázek autor]	49
Obrázek 5 Automat pro izolaci nukleových kyselin MagNa PureCompact (Roche Diagnostics) [obrázek autor]	49
Obrázek 6 Kazeta s reagensii pro izolaci nukleových kyselin z 1 vzorku [obrázek autor]	50
Obrázek 7 Hotové izolace [obrázek autor].....	50
Obrázek 8 Vytisknutý izolační protokol [obrázek autor].....	50
Obrázek 9 Poměr vzorků pozitivních a negativních na Cag.....	55
Obrázek 10 Poměrné a procentuální zastoupení vzorků se stejnými genotypy ..	55
Obrázek 11 Poměr vzorků bez záchytu, s CagA+ a CagA-	55

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Záchyt Hp ve vzorcích pacientů.....	53
Tabulka 2 Výsledky výskytu CagA ve vzorcích pozitivních na Hp	54
Tabulka 3 Souhrnný přehled výsledků genotypizačních assayí pro cagA, vacAs1a, vacAs1b, vacAs2, vacAm1 a vacAm2.....	56