

Påvisning av *Helicobacter pylori*
hos nyfødte og spedbarn.
Hva er smitteveien og kan
bakterien være av betydning ved
krybbedød?

Prosjektoppgave ved Universitetet i Oslo, Medisinske Fakultet.
Veileder: Arne Stray-Pedersen.

Margrethe Svendsen
2008

Innholdsfortegnelse

ABSTRACT	3
FORORD	4
BAKGRUNN	4
Krybbedød	4
Definisjon	4
Epidemiologi	5
Hva dør barna av?	5
Fatale trekant	6
Helicobacter pylori.....	8
<i>H. pylori</i> og krybbedød.....	9
MÅLSETTING.....	9
METODE	10
Utvalg og prøvetaking.....	10
Analyser	11
Dyrkning.....	11
Antigenpåvisning.....	11
Genanalyse	12
Serologi	13
RESULTAT.....	13
Dyrkning	13
Antigenpåvisning.....	13
Kliniske resultater.....	13
Sammenligning av ulike ELISA testmetoder	15
Sensitivitet av ELISA metode	16
Genanalyse.....	18
Serologi.....	18
DISKUSJON	18
LITTERATURLISTE	21

Abstract

A recent study by the Institute of Forensic Medicine found that *H. pylori* antigen often can be showed in children's stool that dies in crib death. Among healthy Norwegian children the frequencies of *H. pylori* were low. However, the occurrence among newborn was significantly higher. To control these finding and learn more about bacteria in the intestine, we have completed a new study of healthy Norwegian children.

Methods: From a random sample of 78 newborn children it was secured specimens from the children's first stool (meconium). Repeated stool specimens were secured from 54 of 78 children by the age of 4 weeks. Stool specimens were also secured from 20 of the mothers during their stay at the delivering department. The specimens from the children were cultivated immediately. The specimens were tested for the presence of *H. pylori* antigen using the HpSTAR (ELISA). It is also planned to perform a PCR and a serologic-test of the blood account, which are secured from the mother during the pregnancy.

Results: The cultivation showed growth of intestinal bacteria in 75 % of the cases. *H. pylori* antigen in stool was detected in 13 of 73 newborn children. All cases with positive specimens have been through vaginal birth. In only 1 out of 20 specimens the mother tested positive while her child tested negative. By the age of 4 weeks all children tested negative.

Conclusions: The founding does confirm that a high rate of the newborn have *H. pylori* antigen in the stool. The reduction in occurrence from the previous study (53 %) to the current study (18 %) can be explained by a less sensitive method. Colonize with *H. pylori* do not seem to result in a permanent infection by healthy children.

Forord

Denne prosjektoppgaven er del av en større studie, der man ser på sammenhengen mellom *Helicobacter pylori* og krybbedød. Studien er ledet av Arne Stray-Pedersen og Torleiv Ole Rognum ved Rettsmedisinsk institutt og er blitt utført i samarbeid med Peter Gaustad ved Mikrobiologisk institutt ved Rikshospitalet, Kjetil Melby ved Mikrobiologisk avdeling ved Ullevål Universitetssykehus og Babill Stray-Pedersen ved Kvinneklinikken ved Rikshospitalet.

I denne studien har min rolle vært å delta i planleggingen av studien, å koordinere innsamlingen av avføringsprøver samt å foreta den mikrobiologiske dyrkningen.

Når alle prøvesvar foreligger, vil det bli utarbeidet en artikkel for publisering i et vitenskapelig tidsskrift.

I denne oppgaven vil jeg presentere bakgrunnen for studien med vekt på krybbedød og *Helicobacter pylori*. Jeg vil redegjøre for metodene som er brukt i studien, og kort presentere og diskutere de foreløpige resultatene.

Bakgrunn

Krybbedød

Å miste et barn i krybbedød er en stor sorg og tragedie. Det er beskrevet og forsøkt forklart i lang tid. Krybbedød beskrives allerede i Bibelens Gamle Testamente i 1. Kongebok 3,19; ”En natt døde gutten hennes, fordi hun kom til å ligge på ham”¹.

Definisjon

I 1969 arrangerte NICHD (the National Institute of Child Health and Human Development) en internasjonal konferanse der man ble enige om en definisjon av krybbedød – sudden infant death syndrome (SIDS)^{2,3}. Definisjonen ble sist revidert i

2004 og lyder: ”Plutselig uventet død hos spedbarn under 1 års alder, der den fatale episoden starter under søvn, som gjenstår uforklart etter en full gjennomgang, inkludert obduksjon, undersøkelse av omgivelsene og sykehistorien”⁴.

I de nordiske landene har det vært vanlig å klassifisere uforklarte dødsfall hos barn under 3 år som krybbedød⁵.

Krybbedød er altså en eksklusjonsdiagnose som forutsetter grundige undersøkelser – også dødsstedsundersøkelse, noe som i dag ikke rutinemessig gjøres i Norge.

Epidemiologi

Forekomsten av krybbedød var på over 100 dødsfall årlig på 1980-tallet, oppimot 2,5 ‰ av de levende fødte⁶. I 1989/90 ble det lansert en nasjonal kampanje med fokus på risikofaktorer for krybbedød, først og fremst risikoen ved mageleie⁷. Dette førte til et dramatisk fall i krybbedødsraten⁸. Tilsvarende reduksjon ble også sett internasjonalt⁹. De siste årene har forekomsten vært relativt stabil, med 15-25 dødsfall årlig, 0,25-0,45 ‰ av de levende fødte⁶.

Av krybbedødfrene er cirka 55-60 % gutter¹⁰. Krybbedød forekommer oftere om vinteren og har vært hyppigst mellom 2. og 4. levemåned¹⁰.

De viktigste kjente risikofaktorene for krybbedød er mageleie⁸, mor som røyker i svangerskapet¹¹ og overoppheting¹².

Etter fallet i krybbedød på starten av 90-tallet⁸, har de epidemiologiske fellestrekkene ved SIDS endret seg¹³. Over halvparten av SIDS-barna finnes fremdeles på magen¹³, men en økende andel blir funnet i seng sammen med foreldrene¹⁴. Over 50 % av mødrene har fortsatt røyket i svangerskapet¹³. Overhyppigheten av krybbedød i 2.-4. levemåned¹⁰ og i vintermånedene¹³ har blitt mindre markert.

Hva dør barna av?

Det har vært forsket mye på mulige årsaker til krybbedød. På slutten av 1800-tallet hadde man en teori om at en stor thymus klemte av luftveiene og gav kvelning¹⁵. På 1950-tallet

var hypogammaglobulin¹⁶ som årsak en av hypotesene. De siste årene har det blant annet vært fremstilt hypoteser om at autonome forstyrrelser^{17,18}, metabolsk sykdom¹⁹ og infeksjon^{20,21} kan være del av årsaken.

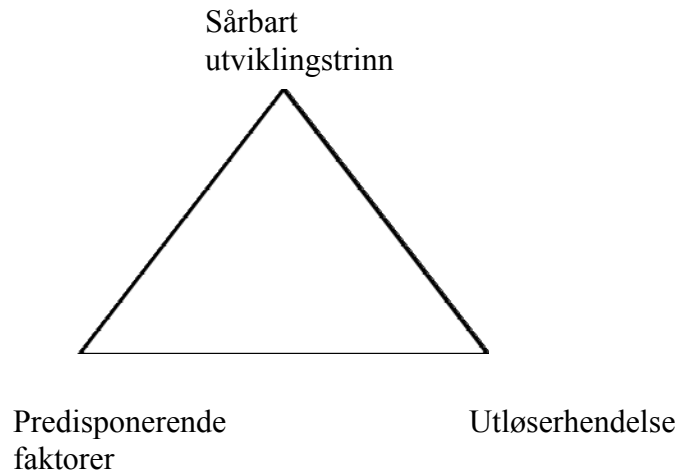
Schwartz kom i 1998 med en hypotese om at hjerterytmeforstyrrelser²² kunne være årsak til SIDS. Av 201 SIDS-barn undersøkt ved Rettsmedisinsk Institutt, fant Arnestad et al i 2007 at 9,5 % hadde genvarianter for LQTS (langt QT-syndrom)²³. De konkluderte med at plutselig død på grunn av arytni utgjør en viktig andel av de som har blitt diagnostisert som SIDS²³.

Trolig er det også et fåtall SIDS-tilfeller som i dag er feilklassifisert fordi døden skyldes hittil uoppdagete sykdommer som ikke gir påvisbare morfologiske forandringer med dagens metoder²⁴. Når disse årsakene identifiseres, vil man sitte igjen med de ”genuine” SIDS-tilfellene.

Fatale trekant

Risikofaktorene for SIDS kan ikke alene forklare dødsfallet siden de aller fleste barna som sover på magen overlever. Rognum og Saugstad postulerte en forklaringsmodell om at tre elementer må være tilstede²⁵:

- et sårbart utviklingstrinn
- predisponerende faktorer
- utløserhendelse.



Figur 1. "Fatale trekant" som kan føre til krybbedød²⁵.

Predisponerende faktorer kan være medfødte genfeil eller for eksempel polymorfismer i interleukin-10-genet²⁴ eller i mitokondrielt DNA^{24,26}, noe som kan lede til en sårbar fysiologisk situasjon i en stress-situasjon.

Barnet er sårbart det første leveåret blant annet fordi flere organer ikke er fullt utviklet. Immunsystemet er umodent i barnets første halvår²⁷ og CNS gjennomgår en eksplosiv utvikling fram til 6 måneders alder²⁵.

Mageleie, røyking og samsoving kan være eksempler på utløserhendelser. Det er vist at mageleie øker overflatetemperaturen i de øvre luftveiene, som forbedrer vekstforholdene for patogene bakterier som Stafylokokker og Neisseriae²⁸.

Infeksjoner, særlig i luftveiene, kan trolig alene være en utløserhendelse²¹. Før kampanjen der foreldre ble frarådet å legge spedbarna på magen⁷, hadde over halvparten av SIDS-ofrene hatt en mild infeksjon den siste uka forut for død¹⁰.

Trolig skyldes rundt 50 % av SIDS-tilfellene en immunologisk overreaksjon i møte med en mild infeksjon²⁹. Det har blitt vist økt immunstimulering i flere organer hos SIDS-ofre²⁹⁻³². Man antar at opphopning av SIDS kan knyttes sammen med epidemier med luftveis-virus^{33,34}. Lindgren et al viste en sammenheng mellom utbrudd av kikhoste ved *B. Pertussis*-infeksjon og hyppighet av SIDS³⁵.

Blant SIDS-barna ble det av Vege et al²⁹ funnet forhøyede nivåer av det pro-inflammatoriske cytokinet IL-6 i CSF, som tegn på sentral immunrespons. IL-6-nivåene var tilsvarende som hos barn som døde av infeksjoner som meningitt, sepsis og pneumoni²⁹.

Helicobacter pylori

Marshall og Warren beskrev i 1983 en bakterie som vokste i magesekkslimhinnen³⁶ – bakterien ble kort tid etter koblet til kronisk gastritt og peptisk ulcus³⁶ og ble kalt *Helicobacter* på grunn av dens spesielle spiral-form.

Helicobacter pylori er en Gramnegativ bakterie som vokser mikroaerobt³⁷. Bakterien er antagelig en del av normalfloraen hos de fleste³⁸. *H. pylori* er kun i sjeldne tilfeller isolert fra feces³⁷.

Gullstandarden for diagnostikk av infeksjon med *H. pylori* er gastroscopi med histologi og dyrkning av biopsiprøve³⁹. Andre diagnostiske metoder er serologisk antistoff-test, urease pusteprobe, *H. pylori*-antigentest i avføring og PCR³⁹.

Smitteveier for *H. pylori* er ikke fullstendig klarlagt, men det tyder på at det kan overføres mellom mennesker fecalt-oralt og oralt-oralt³⁷. Predisponerende faktorer er dårlig hygiene og lav sosioøkonomisk status⁴⁰.

Forekomsten hos barn i Norden er lav, 2-5 % i førskolealder^{41,42}.

Den antatte forekomsten av *H. pylori* hos norske kvinner i fertil alder er 10-20 %⁴³.

Sannsynligvis vil majoriteten ikke få symptomer av en kolonisering med *H. pylori*⁴⁴ og infeksjonen vedvarer uten noen klinisk betydning⁴⁴.

Infeksjon med *H. pylori* vil hos minoriteten initialt gi en akutt gastritt med magesmerter, kvalme og oppkast³⁷. Det vil hos de fleste gå over i en kronisk infeksjon³⁷. *H. pylori* er en selvstendig risikofaktor for utvikling av adenocarcinom i ventrikkelen og MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) B-celle lymfom³⁷.

Samtidig er *H. pylori* en beskyttelsesfaktor mot gastro-eosophageal reflux disease (GERD) og adenocarcinom i nedre øsofagus og cardia i ventrikkelen⁴⁰.

***H. pylori* og krybbedød**

I 1997 lanserte Marshall og Pattison en hypotese om sammenheng mellom *H. pylori* og SIDS⁴⁵. Tre år senere viste Kerr et al en høy-signifikant assosiasjon mellom funn av *H. pylori* DNA-sekvenser i ulike organer og SIDS⁴⁶. Denne studien har i midlertidig møtt massiv motstand og blitt kritisert for både metode og design⁴⁷.

Ved Rettsmedisinsk institutt har man undersøkt forekomst av *Helicobacter pylori* hos krybbedødfre og aldersmatchede friske barn⁴⁸. Studien er nylig sendt for publisering. Mens *H. pylori* antigen i avføringen bare ble påvist hos 8 % av kontrollene, var 25 % av krybbedødsfrene positive og hele 53 % av barna som var døde av infeksjon⁴⁸.

Helicobacter baciller ble også påvist i magesekkslimhinnen hos flere av krybbedødsfrene. Påvisning av *H. pylori* antigen i avføringen var assosiert med høye IL-6 nivåer i hjernevæsken. Dette kan tyde på at *H. pylori* infeksjon hos spedbarn kan være en del av utløsermekanismen for SIDS⁴⁸.

Forut for studien om *H. pylori*'s rolle ved krybbedød, ble det gjort en studie av hvor ofte *H. pylori* infeksjon forekommer hos friske norske barn⁴⁹. Bare 5 % av friske barn over 1 måneds alder hadde spor av *H. pylori* antigen i avføringen. Helt overraskende fant man at blant 52 % av nyfødte kunne *H. pylori* antigen påvises⁴⁹. Analysene var utført med en ELISA-teknikk som benyttet polyklonale antistoffer, slik at mulighet for at det dreide seg om falske positive test-resultater var tilstede. Det ble derfor planlagt en ny studie for å se nærmere på problemstillingen.

Målsetting

Målene med studien er

- med nye analysemetoder å kontrollere resultatene fra den første studien der det ble påvist at en høy andel av nyfødte har *H. pylori* antigen i avføringen.
- å undersøke smitteveien til *H. pylori*. Ved å undersøke avføringsprøver fra mor og barn kan man se om bakterien overføres fra mor til barn.

- å kunne si noe om i hvor lang tid etter fødsel at bakterien er påvisbar. Ved å samle inn nye avføringsprøver ved 4 ukers alder kan man fastslå om barna som er *H. pylori* positive etter fødsel kvitter seg med bakterien.
- å øke forståelsen av hvilken rolle *H. pylori* spiller ved krybbedød.

Metode

Utvalg og prøvetaking

Nybakte mødre ble spurt om å delta i studien på fødeavdelingen på Rikshospitalet i Oslo. Etter samtykke ble totalt 78 friske, nyfødte barn inkludert i studien ved at det ble sikret en avføringsprøve (meconium) fra barnet i løpet av de to første døgnene etter fødselen. Det ble også forsøkt sikret en avføringsprøve fra mor etter fødselen og det lyktes å samle inn prøver fra totalt 20 av mødrene under oppholdet på fødeavdelingen.

Avføringen ble sikret i rene prøveglass og lagt i -70 °C fryser for senere antigenpåvisning og PCR. En prøvepinne dyppet i avføringen ble lagt i Stuarts transportmedium og innen få timer sådd ut på dyrkningsskåler. Det var i mange tilfeller vanskelig å få tilstrekkelig mengde prøvemateriale og det lyktes derfor ikke å samle inn begge prøvene fra alle barna. Det lyktes å sikre prøve til antigenpåvisning og PCR fra 73 av 78 barn og til dyrkning fra 72 av 78 barn, altså med noe uoverensstemmelse.

Medisinske data om mor, fødselen og om barnet ble innhentet fra sykehusets journal.

I forbindelse med svangerskapskontroll hos fastlegen, hadde mødrene sendt blodprøve til screeningsundersøkelse ved mikrobiologisk avdeling på Ullevål sykehus. Etter samtykke fra deltagerne, kunne denne prøven benyttes med tanke på *H. pylori* serologi.

Fra 54 av 78 barn ble det sikret en ny avføringsprøve ved 4 ukers alder. Mødrene ble instruert i hvordan prøvene skulle sikres på et prøveglass som var utdelt under oppholdet på fødeavdelingen. Prøvene ble sendt i posten og ble ved mottak lagt i ultrafryser (-70°).

Studien ble tilrådet gjennomført av regional forskningsetisk komité og er godkjent av personvernombudet (Norsk samfunnsvitenskapelig datatjeneste).

Analyser

Dyrkning

Fra Stuarts transportmedium dyrket vi ut på to blodagarskåler med resistenslapper, etter retningslinjer for dyrkning av *H. pylori*⁵⁰. Blodagarskålene ble inkubert mikroaerobt i 35-37°C med 4-6 % O₂ og 5-10 % CO₂ i 7 døgn. I kolben med skålene ble det lagt en BBL CampyPak Plus Microaerophilic System (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA), tilsatt sterilt saltvann som gir rette inkuberingsforhold. I kolben ble også lagt en BBL CO₂ Indicators⁵¹ som slår om fra rosa til gul farge ved riktige forhold. Etter inkubering ble mulige *H. pylori*-kolonier identifisert som små, grålige og gjennomsiktige, tatt ut og dyrket i renkultur. Renkulturen sto så mikroaerobt i 5-7 dager før vi testet om den var positiv for katalase, oksidase og urease.

Katalasetest ble utført ved å ha kolonien på et dekkglass og deretter en dråpe ID-ASE oppå. Positiv test er tilstede når det dannes bobler som tegn på O₂-dannelse⁵².

Oksidasetest ble utført ved å dryppe noen dråper oksidasereagens på et filtrerpapir og så tilføre substratet til denne flekken. En positiv reaksjon er tilstede når massen blir mørk blå/svart innen 10 sekunder⁵².

Ureasetest ble utført ved å overføre to rendyrkede kulturer til et ureaserør. En positiv reaksjon er tilstede når det kommer fargeomslag fra gult til rosa-rødt⁵².

Stuarts medium som var fra barn ble i tillegg dyrket ut på en laktuloseskål og en anaerob skål (KV-skål). Laktuloseskålen ble satt aerobt i 3 dager og deretter lest av.

Den anaerobe skålen ble satt anaerobt i 7 dager og lest av. Sammen med de anaerobe skålene ble det satt en skål med *H. pylori* som positiv kontroll.

Antigenpåvisning

For påvisning av *Helicobacter pylori* brukte vi et kommersielt ELISA-kit; Amplified IDEIA HpSTAR (Oxoid, Cambridgeshire, UK), som bruker monoklonale antistoffer.

Etter produsentens bruksanvisning ble 500 µg avføring løst i 500 µl av fortynningsvæsken Sample Diluent. Etter sentrifugering ble 50 µl av supernatanten inkubert i mikrobrønner dekket med monoklonale antistoffer spesifikke for *H. pylori* antigen. Etter produsentens bruksanvisning ble det så etter vasking med buffer tilsatt substratløsning til hver brønn og deretter avlest med et spektrometer der optisk tetthet (OD) ble fastsatt ved 450 nm bølgelengde.

I følge produktveiledningen er verdiene for HpSTAR positive ved $\geq 0,190$ OD, negative verdier er $< 0,190$ OD.

Alle de kliniske prøvene er testet to ganger der hvor det har vært mulig ut ifra mengden prøvemateriale. Det ble for begge tester kjørt prøver av en positiv og en negativ kontroll parallelt.

For å undersøke sensitiviteten av HpSTAR i forhold til analysemetoden som ble benyttet i den forutgående studien, ble avføringsprøver testet i forrige studie hentet opp av ultrafryser for ytterligere analyse. Prøvene var blitt undersøkt med HpSA og var fra 26 barn døde av SIDS; 13 av prøvene hadde gitt positivt og 13 negativt testresultat. Det polyklonale kittet HpSA var ikke lenger å oppdrive, da produsenten hadde erstattet det med et monoklonalt kit - HpSA PLUS (Premier Platinum *Helicobacter pylori* stool antigen, Meridian, Ohio, USA). De 26 prøvene ble derfor undersøkt med både HpSA PLUS og med HpSTAR. For HpSA PLUS er positive verdier $\geq 0,140$ OD, negative verdier er $< 0,140$ OD.

Vi utførte en titreringsrekke to ganger, der vi fortynnet avføringsprøvene og testet med HpSTAR og HpSA PLUS for å se på forholdet mellom sensitivitet og spesifisitet ved de to testene. Fortynningen ble utført etter produsentens bruksanvisning.

Genanalyse

Denne oppgaven er del av en større studie der avføringsprøven blir testet ved PCR. Genomisk DNA blir ekstrahert ved bruk av QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden Germany). Denne tillater fjerning av DNA-ødeleggende substanser og PCR-

inhibitorer som er tilstede i avføringen. Som positiv kontroll brukes en *H. pylori*-sekvens fra en DNA *H. pylori*-kultur.

Helicobacter pylori - primere består av to spesifikke 16s RNA oligonukleotider; HPF (5'-AAG-CTT-TTA-GGG-GTG-TTA-GGG-GTT-T-3') og HPR (5'-AAG-CTT-ACT-TTC-TAA-CAC-TAA-CGC-3').

Serologi

Serologiske analyser av anti-*H. Pylori* IgG og IgM vil foretas ved mikrobiologisk avdeling Ullevål Universitetssykehus, men er ennå ikke utført.

Resultat

Dyrkning

Avføringsprøver fra nyfødte barn ble i løpet av få timer etter prøvetaking sådd ut på skåler for dyrkningsanalyser. Av i alt 72 utsådde laktuloseskåler dyrket opp under aerobe forhold, var det visuelt synlig bakterievekst på 54 (75 %). Av disse var det sparsom vekst på 19, moderat vekst på 14 og rikelig vekst på 21 skåler. Bakteriene som vokste, var blant annet *E. coli* og Gram positive bakterier.

Anaerob dyrkning ble utført i 57 av 78 tilfeller. Det ble påvist bakterievekst på 22 av 57 skåler (38 %). Av disse var det sparsom vekst på 10, moderat vekst på 8 og rikelig vekst på 4 skåler.

Det ble ikke påvist oppvekst av *H. pylori* på noen av skålene.

Antigenpåvisning

Kliniske resultater

Alle avføringsprøvene ble analysert med ELISA teknikk (HpSTAR). *H. pylori* antigen ble påvist i 13/73 (18 %) av avføringsprøvene fra nyfødte. Alle nyfødte som testet

positivt ved fødsel var blitt forløst vaginalt, mens ingen av de 12 barna som var forløst med keisersnitt avga positivt testresultat ($p = 0,08$ på grunn av lavt antall i hver gruppe).

Alle 54 barn som avga gjentatt avføringsprøve ved 4 ukers alder testet alle negativt. Av de 20 mødrene som avga avføringsprøve var 1 positiv. Hennes barn var forløst ved keisersnitt og testet negativt.

Sammenligning mellom påvisning av *H. pylori* antigen og faktorer som kjønn, vekt, forløsningsmetode, fødestilling osv. er angitt i tabell 1. Det var ingen sammenheng mellom oppvekst av bakterier under aerobe/anaerobe betingelser og påvisning av *H. pylori* antigen ved ELISA (tabell 1).

Tabell 1. Sammenheng mellom påvisning av *H. pylori* antigen (HpSTAR) hos nyfødte og ulike epidemiologiske variabler. Statistiske beregninger utført ved logistisk regresjon og Chi-kvadrat test.

	HpSTAR positive	HpSTAR negative	p-verdi
Kjønn % gutter	8/13 \approx 61,5 %	33/61 \approx 54,1 %	0,62
Mors vekt (kg)	76,5 (61-92)	84 (77-92)	0,44
Barnets vekt (g)	3489 (3264-3715)	3525 (3411-3639)	0,79
Amniotomi	3/13 \approx 23,1 %	23/49 \approx 46,9 %	0,054
Tid etter vannavgang (time)	6,3 (0-12,7)	4,1 (2,8-5,3)	0,13
Varighet av fødsel (time)	7,9 (4,9-10,8)	6,5 (5,1-7,8)	0,42
Liggende fødestilling	11/13 \approx 84,6 %	31/49 \approx 63,3 %	0,143
Mors blodtrykk \geq 140/90	1/11 \approx 9,1 %	6/40 = 15 %	0,61
Blødning etter fødsel (ml)	354 (292-416)	410 (347-474)	0,42
Placentas vekt (g)	681 (588-775)	734 (693-776)	0,28
Bakterieoppvekst laktuloseskål	4/12 \approx 33,3 %	14/57 \approx 24,6 %	0,529
Bakterieoppvekst anaerob skål	8/10 = 80 %	26/45 \approx 57,8 %	0,191

Sammenligning av ulike ELISA testmetoder

For å sammenligne ELISA-metoden som ble benyttet i den foregående studien⁴⁹, ble 26 avføringsprøver testet i den forrige studien (13 positive og 13 negative med HpSA polyklonalt kit) undersøkt med HpSTAR og med HpSA PLUS (monoklonale antistoffer med samme målantigen som HpSA). Analyseresultatene er angitt i tabell 2:

Tabell 2. Sammenheng mellom HpSA og HpSA PLUS, HpSA og HpSTAR og HpSA PLUS og HpSTAR.

		HpSA PLUS		
		Neg	Pos	Total
HpSA polyklonal	Neg	11	2	13
	Pos	2	11	13
	Total	13	13	26

P = 0,001.

		HpSTAR		
		Neg	Pos	Total
HpSA polyklonal	Neg	10	3	13
	Pos	5	8	13
	Total	15	11	26

P = 0,047.

		HpSTAR		
		Neg	Pos	Total
HpSA PLUS	Neg	11	2	13
	Pos	4	9	13
	Total	15	11	26

P = 0,005.

Sensitivitet av ELISA metode

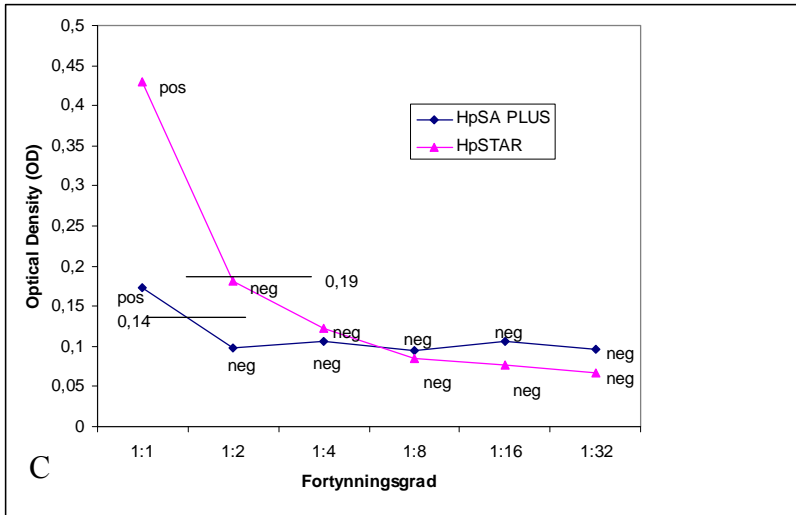
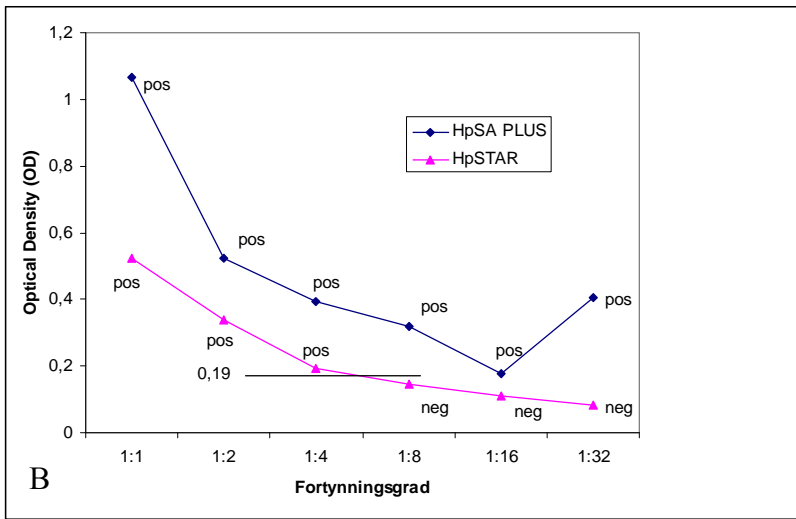
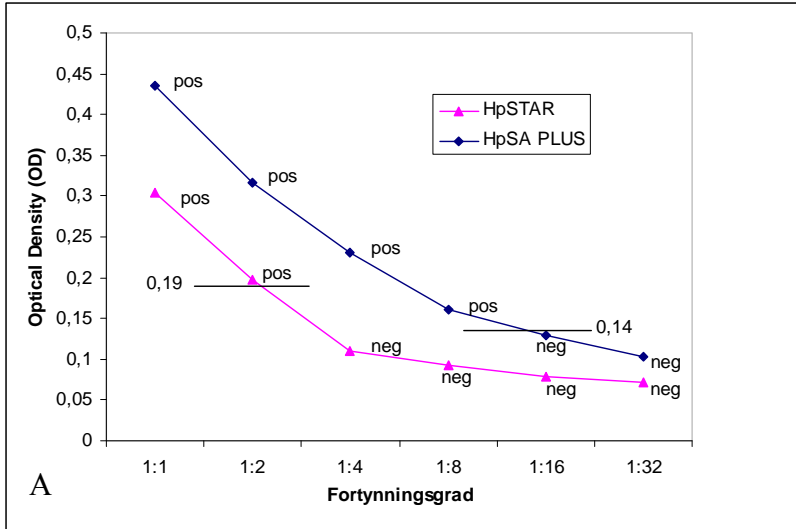
Tre avføringsprøver ble plukket ut for å vurdere hvordan ELISA metodene responderte på å fortynne prøvene. HpSTAR syntes å være mer sensitiv for fortynning enn HpSA PLUS (Figur 2).

Graf A viser at HpSA PLUS er positiv ved fortynningsgrad 1:1, 1:2, 1:4 og 1:8 og blir negativ først ved fortynningsgrad 1:16. HpSTAR er positiv ved 1:1 og 1:2, negativ ved større fortynninger.

Graf B viser at HpSA PLUS er positiv ved alle fortynninger. Målingsresultatet ved 1:32 kan muligens være et artefakt, da verdien stiger i forhold til de andre verdiene. HpSTAR er positiv ved fortynningsgrad 1:1, 1:2 og 1:4 og blir deretter negativ.

Graf C viser at begge testene er positive ved 1:1 og blir negative ved 1:2. Likevel ser det ut til at HpSTAR er særlig sensitiv for fortynning, da kurven faller brått.

Dette viser av HpSTAR syntes å være mer sensitiv for fortynning enn HpSA PLUS.



Figur 2. HpSA PLUS og HpSTAR testing av avføringsprøver ved ulike fortynninger. Grafen viser 3 ulike avføringsprøver. Blå streker viser HpSA PLUS, røde streker viser HpSTAR.

Genanalyse

PCR-testingen er ikke ferdig, men vil senere bli utført og inkludert i en vitenskapelig artikkel.

Serologi

Serologiske prøver er ikke ferdig, dette vil senere bli utført og inkludert i en vitenskapelig artikkel.

Diskusjon

Ved ferdigstilling av denne oppgaven er det fullført ELISA-analyse og bakteriologisk dyrkning av avføringsprøvene. Genanalyse av avføringsprøvene og serologiske tester av blodprøver fra mødrene er ikke ferdig analysert.

Ved ELISA-testing med HpSTAR fant vi at 18 % av de nyfødte barna var positive for *H. pylori*. Ved 4 ukers alder var ingen positive. Dette støtter at kolonisering med *Helicobacter pylori* kan forekomme i nyfødtperioden, men at koloniseringen ikke synes å resultere i varig infeksjon.

Alle de nyfødte som testet positivt var forløst vaginalt. Dette kan tyde på at smitten overføres fra mor til barn i forbindelse med veien gjennom forløsningskanalen. Sammenhengen mellom *H. pylori* antigen og forløsningsmetode (vaginalt/sectio) var ikke signifikant, fordi utvalget er lite ($p=0.08$). Vi ønsker derfor å samle inn prøver fra flere barn som er født med keisersnitt for å forsikre oss om at funnet er reelt. Det er interessant at det er en tendens til at bruk av amniotomi er omvendt assosiert med påvisning av *H. pylori* antigen ($p=0.054$). Det at fostervannet tas, forkorter varigheten av åpningsfasen under fødselen der livmorhalsen åpner seg og således blir eksponert for bakterier fra skjeden. Amniotomi kan altså bidra til at barnet i mindre grad utsettes for mors bakterieflora i fødselskanalen. Derimot fant vi ingen sammenheng mellom *H. pylori* antigen påvisning hos nyfødte og total varighet av fødsel eller varighet etter vannavgang.

I den forrige studien som ble utført ved Rettsmedisinsk institutt⁴⁹ ble det påvist *H. pylori* antigen hos 52 % av de nyfødte og hos 5 % av barn eldre enn 1 måned. Det ble da ikke foretatt repeterte tester av barna. Ett av 10 barn forløst med keisersnitt testet også positivt, men det var en signifikant assosiasjon mellom *H. pylori* påvisning og om det var foretatt vaginal forløsning eller sectio.

Som vist i titreringsrekken, synes HpSTAR å være mer sensitiv for fortykning enn HpSA PLUS syntes å være (Figur 2). Det at HpSTAR således er mer følsom for lave konsentrasjoner av bakterieprodukter enn HpSA testen, kan muligens forklare noe av forskjellen mellom resultatene i den forrige studien og denne. Dessverre var det ikke mulig å kjøre HpSA testing parallelt på dette nye materialet, siden produsenten har sluttet å markedsføre produktet og har erstattet det med et nytt monoklonalt produkt (HpSA PLUS).

Analyser av feces er vanskelig. Bakteriefordelingen er ikke homogen i avføringen og det er små mengder prøvemateriale (mikroliter). Dette gjør at det kan være vanskelig å påvise bakterier som er tilstede.

Hvis HpSA STAR testresultatene er riktige og representerer *H. pylori* infeksjon, er 18 % av de nyfødte smittet med *H. pylori*. Det er få mulige smittesikter, da barna kun har vært eksponert for miljøet på fødeavdelingen. Mest sannsynlig er bakterien derfor overført fra mor. Man kan tenke seg at bakterien overføres under en vaginal fødsel ved at barnet er i kontakt med morens skjede og anus og bakteriefloraen der. Denne teorien styrkes av at ingen av barna som var forløst med keisersnitt testet positivt.

Derimot har en annen studie⁵³ som utførte serologi-analyse av mors blod og navlestrengblod, konkludert med at vertikal bakterieoverføring under svangerskap er usannsynlig⁵³. Derfor vil vi også undersøke blodprøver fra mor tatt under svangerskapskontroll, men svaret på disse undersøkelsene foreligger ikke enda.

At bakterien overføres fra mor passer dårlig med det faktum at mødre som avga avføringsprøve i denne studien testet negativt. Den antatte prevalensen av *H. pylori* hos mødre er 10-20 %⁴³, slik at en skulle forvente at minst 2-4 av de 20 mødre testet positivt. Ut fra vår hypotese, vil man anta at de nyfødte barna som testet positivt har mødre som også har bakterien *H. pylori*. Det kan være ulike forklaringer på at disse allikevel tester negativt. Det kan være en så liten bakteriemengde at det ikke gir utslag på testene. De kan allikevel overføres til barnet under fødselen og bakterien får en oppvekst hos barnet.

Nylig er det vist at *H. pylori* kan finnes i en coccoid form – en ”dvale” tilstand med minimal aktivitet og der overflatestrukturene er innkapslet⁵⁴. Dersom bakterien kan finnes som del av tarmfloraen hos mor i en slik coccoid form, kan dette forklare at HpSTAR testen blir negativ ved at antigen målstrukturene på bakterienes overflate ikke er gjenkjennbare eller tilgjengelige for antistoffene.

HpSTAR er en test med monoklonale antistoffer som gjenkjenner spesifikke proteiner på overflaten av *Helicobacter pylori* bakterien. Muligheten for at det kan skje en uspesifikk binding til andre proteiner i prøvematerialet er tilstede. Derfor er det viktig å gjennomføre genanalyser ved PCR. Dette vil bli gjort senere og inkludert i den vitenskapelige artikkelen.

Ved bakteriologisk dyrkning fant vi oppvekst av bakterier hos 75 % av avføringsprøvene fra de nyfødte. Dette viser at de fleste etablerer sin tarmflora kort tid etter fødsel. Det er antatt at meconium i utgangspunktet skal være steril før fødselen. Det var ikke ventet at vi skulle klare å påvise *H. pylori* ved dyrkning, da avføring i utgangspunktet er et dårlig medium for å dyrke denne bakterien³⁹.

Tilstedeværelsen av andre bakterier opprettholder i midlertidig muligheten for at *H.pylori* også er tilstede, kun få timer etter fødsel.

Litteraturliste

- (1) Gamle Testamentet. Bibelen. Første Kongebok red. 2005.
- (2) Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG, eds. Sudden infant death syndrome. Seattle: University of Washington Press 1970; 17-18.
- (3) Beckwith JB. Discussion of terminology and definition of sudden infant death syndrome. In: Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG, eds. Sudden Infant Death Syndrome: Proceedings of the Second International Conference on Causes of Sudden Death in Infants. Seattle, WA: University of Washington Press, 1970; 18.
- (4) Kraus HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T et al. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 2004; 114(1): 234-238.
- (5) Gregersen M, Rajs J, Laursen H, Baandrup U, Frederiksen P, Gidlund E, Helweg-Larsen K, Hirvonen J, Isaksen CV, Kock K, Lundemose JB, Løberg EM, Rognum TO, Skullerud K, Vege Å. Pathologic criteria for the Nordic study of SIDS. In: Sudden Infant Death Syndrome. New Trends in the Nineties. Ed. TO Rognum. Scandinavian University Press 1995: pp 50-58.
- (6) www.ssb.no.
- (7) Markestad T. Sovestilling og krybbedød i Norge. *Tidsskr Nor Lægeforening* 1992; 112:1427-9.
- (8) Markestad T, Skadberg B, Hordvik E, Morild I, Irgens LM. Sleeping position and sudden infant death syndrome (SIDS): effect of an intervention programme to avoid prone sleeping. *Acta Paediatrica* 1995; 84(4): 375-8.
- (9) Golding J, Fleming P, Parkes J. Cot death and sleep position campaigns. *Lancet* 1992 Mar 21; 339(8795): 748-9.
- (10) Vege Å, Rognum TO, Opdal SH. SIDS – changes in the epidemiological pattern in Eastern Norway 1984-1996. *Forensic Science International* 1998; 155-166.
- (11) Mitchell EA. Smoking: The next major and modifiable risk factor. In: Rognum TO, editor. Sudden Infant Death Syndrome. New Trends in the Nineties. Oslo: Scandinavian University Press, 1995; 114-118.

- (12) Ponsonby AL, Dwyer T, Gibbons L, Cochrane JA, Wang YG. Factors potentiating the risk of sudden infant death syndrome associated with the prone position. *N Engl J Med* 1993 Aug 5; 329(6): 377-382.
- (13) Arnestad M, Andersen M, Vege Å, Rognum TO. Changes in the epidemiological pattern of sudden infant death syndrome in southeast Norway, 1984-1998: implications for future prevention and research. *Arch Dis Child* 2001; 85(2): 108-115.
- (14) Stray-Pedersen A, Arnestad M, Vege Å, Sveum L, Rognum TO. Samsoving og krybbedød. *Tidsskr Nor Lægeforening* nr.21, 2005; 125: 2919-21.
- (15) Paltauf A. Plötzlichen Thymustod. *Wien Klin Wochenschr* 1889; II: 877.
- (16) Spain DM, Bradess VA, Greenblatt IJ. Possible factor in sudden and unexpected death during infancy. *J Am Med Assoc* 1954; 156(3): 246-247.
- (17) Kaada B. Fear paralysis (tonic immobility): A potential cause of SIDS, reconsidered after eight years. In: *Sudden Infant Death Syndrome. New Trends in the Nineties*. Ed. TO Rognum. Scandinavian University Press 1995; pp 230-237.
- (18) Kahn A, Riazi J, Blum D. Oculocardiac reflex in near miss for sudden infant death syndrome infants. *Pediatrics* 1983; 71(1): 49-52.
- (19) Olpin SE. The metabolic investigation of sudden infant death. *Ann Clin Biochem* 2004 Jul; 41(Pt 4): 282-93.
- (20) Scott DJ, Gardner PS, McQuillin J, Stanton AN, Downham MA. Respiratory viruses and cot death. *Br Med J* 1978 Jul 1; 2(6129):12-3.
- (21) Werne J. Postmortem evidence of acute infections in unexpected death in infancy. *Am J Pathol* 1942; 18: 756-761.
- (22) Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A et al. Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *New Engl J Med* 1998; 338: 1709-1714.
- (23) Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege Å, Wang D, Rhodes T, George A, Schwartz P. Prevalence of Long-QT Syndrome Gene Variants in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation* 2007 Jan 23; 115 (3): 361-7.
- (24) Vege Å, Rognum TO. Sudden infant death syndrome, infection and inflammatory responses. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 42, 2004; 3-10.

- (25) Rognum TO, Saugstad OD. Biochemical and immunological studies in SIDS victims. Clues to understanding the death mechanism. *Acta Pædiatrica Suppl.* 1993; 389: 82-5.
- (26) Opdal SH, Vege Å, Egeland T, Musse MA, Rognum TO. Possible role of mtDNA mutations in sudden infant death. *Pediatr Neurol* 2002 Jul; 27(1): 23-9.
- (27) Rognum TO, Thrane S, Stoltenberg L, Vege Å, Brandtzaeg P. Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr Res.* 1992 Aug; 32(2): 145-9.
- (28) Molony N, Blackwell CC, Busuttill A. The effect of prone posture on nasal temperature in children in relation to induction of staphylococcal toxins implicated in sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999 Aug 1; 25(1-2): 109-113.
- (29) Vege Å, Rognum TO, Arnestad G. IL-6 cerebrospinal fluid levels are related to laryngeal IgA and epithelial HLA-DR response in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 1999 Jun; 45(6): 803-9.
- (30) Stoltenberg L, Saugstad OD, Rognum TO. Sudden infant death syndrome victims show local immunoglobulin M response in tracheal wall and immunoglobulin A response in duodenal mucosa. *Pediatr Res* 1992; 31(4 Pt 1):372-375.
- (31) Thrane PS, Rognum TO, Brandtzaeg P. Up-regulated expression of HLA-DR and secretory component in salivary glands: reflection of mucosal immunostimulation in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 1994; 35(5):625-628.
- (32) Stoltenberg L, Vege Å, Saugstad OD, Rognum TO. Changes in the concentration and distribution of immunoglobulin-producing cells in SIDS palatine tonsils. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 6(1):48-55.
- (33) Lindgren C. Respiratory syncytial virus and the sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr Suppl.* 1993 Jun; 82 Suppl 389:67-9.
- (34) Samuels M. Viruses and sudden infant death. *Paediatric Respiratory Reviews* Sept 2003; Volume 4, Issue3: 178-183.
- (35) Lindgren C, Milerad J, Lagercrantz H. Sudden infant death and prevalence of whooping cough in the Swedish and Norwegian communities. *Eur J Pediatr.* 1997; 156: 405-409.

- (36) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1(8390):1311-1315.
- (37) Fox JG, Megraud F. *Helicobacter*. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1. ASM Press, Washington DC, 2007; pp. 947-962.
- (38) Schøyen R: Mikroorganismer og sykdom. Lærebok i mikrobiologi og infeksjonssykdommer for helsepersonell. ISBN 82-05-28059-2, Gyldendal Norsk Forlag AS, 2002; s. 426-427, 245.
- (39) Versalovic J. *Helicobacter pylori*. Pathology and Diagnostic Strategies. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 000-000.
- (40) Murray P, Rosenthal K, Pfaller M: *Medical Microbiology*, fifth edition. ISBN 0-323-03303-2, Elsevier Mosby, Philadelphia, Pennsylvania, 2005; s. 352-353.
- (41) Rehnberg-Laiho L, Rautelin H, Valle M, Kosunen TU. Persisting *Helicobacter* antibodies in Finnish children and adolescents between two and twenty years of age. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17(9): 796-799.
- (42) Granstrom M, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. *J Clin Microbiol* 35, 1997; 468.
- (43) Hveem K, Krüger O. The prevalence and transmission of *Helicobacter pylori* in a large population based screening programme in Norway. The Nord-Trøndelag healthstudy (HUNT). EHSg: XVIth International Workshop in Gastrointestinal Pathology and *Helicobacter* 2003; 386.
- (44) Egan BJ, Holmes K, O'Connor HJ, O'Morain CA. *Helicobacter pylori* Gastritis, the Unifying Concept for Gastric Diseases. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 39-44.
- (45) Pattison CP, Marshall BJ. Proposed link between *Helicobacter pylori* and sudden infant death syndrome. *Med. Hypotheses* 1997; 49: 365-9.
- (46) Kerr JR. An association between sudden infant death syndrome (SIDS) and *Helicobacter pylori* infection. *Arch Dis Child* 2000; 83: 429-434.
- (47) Several authors. Comments on: Kerr et al. An association between sudden infant death syndrome (SIDS) and *Helicobacter pylori* infection. *Arch Dis Child* 2001 Jun; 84(6):525.

(48) Stray-Pedersen A, Vege Å, Musse MA, Rognum TO. *Helicobacter pylori* antigen in stool is associated with SIDS and sudden infant deaths due to infectious disease.

Submitted.

(49) Stray-Pedersen A, Gaustad P, Stray-Pedersen B, Rognum TO. Detection rate of *Helicobacter pylori* stool antigen in newborn infants and small children. J of Perinatal Med 35, 2007; 155-158.

(50) Nordøy I, Müller F. Retningslinjer *Helicobacter pylori*. Mikrobiologisk institutt, Bakteriologisk seksjon, 2006.

(51) Becton Dickison, Microbiology Systems, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA.

(52) Lautrop H, Høiby N, Bremmelgaard A, Korsager B: Bakteriologiske undersøgelses metoder. ISBN 87-7437-692-6, FADLs Forlag, København, Århus, Odense 1979.

(53) Kitagawa M, Natori M, Katoh M, Sugimoto K, Omi H, Akiyama Y, Sago H, et al. Maternal transmission of *Helicobacter pylori* in the perinatal period. J Obstet Gynaecol Res 27 2001; 225.

(54) Ho GY, Windsor HM, Snowball B, Marshall BJ. *Helicobacter pylori* is not the cause of sudden infant death syndrome (SIDS). Am J Gastroenterol 2001 Dec; 96(12): 3288-94.

(55) Degré M, Hovig B, Bukholm G, Rollag H: Medisinsk mikrobiologi. ISBN 82-00-45056-2, Gyldendal Norsk Forlag AS, 2002.