

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2023**

**Barbora Brumovská**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**Barbora Brumovská**

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

**ROZDÍLY V SENZITIVITĚ A SPECIFIKACE  
HISTOCHEMICKÝCH BARVENÍ URČENÝCH K  
IDENTIFIKACI MIKROORGANISMU HELICOBACTER  
PYLORI V BIOPSIÍ SLIZNICE ŽALUDKU**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Ondřej Ondič, Ph.D.

PLZEŇ 2023

POZOR! Místo tohoto listu bude vloženo **zadání bakalářské práce** s razítkem.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 28. 1. 2023.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Brumovská Barbora

Katedra: záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Rozdíly v senzitivitě a specifikace histochemických barvení určených k identifikaci mikroorganismu *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku

Vedoucí práce: MUDr. Ondrej Ondič, Ph.D.

Počet stran – číslované: 38

Počet stran – nečíslované: 16

Počet příloh: 2

Počet titulů použité literatury: 19

Klíčová slova: *Helicobacter pylori*, žaludek, gastritida, histochemie, barvení dle Giemsy, impregnační metoda Warthin-Starry

### **Souhrn:**

Tato bakalářská práce se věnuje průkazu infekce sliznice žaludku mikroorganismem *Helicobacter pylori* za pomoci histochemických barvení. Jedná se o metodu barvení dle Giemsy a stříbrící metodu Warthin-Starry. Metoda impregnace dle Warthin-Starryho byla prokázána jako senzitivnější metoda k průkazu *Helicobacter pylori*.

## **Abstract**

Surname and name: Brumovská Barbora

Department: Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Differences in sensitivity and specifications of histochemical stains designed to identify the microorganism *Helicobacter pylori* in a biopsy of the gastric mucosa

Consultant: MUDr. Ondrej Ondič, Ph.D.

Number of pages – numbered: 38

Number of pages – unnumbered: 16

Number of appendices: 2

Number of literature items used: 19

Keywords: *Helicobacter pylori*, stomach, gastritis, histochemistry, Giemsa stain, impregnation method Warthin-Starry

### Summary:

This bachelor thesis deals with the demonstration of gastric *Helicobacter pylori* infection by using two different histological stains namely the Giemsa staining method and the Warthin-Starry silvering method. The Warthin-Starry impregnation method has been shown to be a more sensitive method for detecting *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa.

## **Předmluva**

V této práci jsem chtěla zhodnotit histologická barvení, která jsou vhodná pro detekci *Helicobacter pylori* ve žlázkách žaludku. Cílem práce bylo porovnat senzitivitu metody barvení dle Giemsy a impregnační metody Warthin-Starry. Poznatky z této práce by mohly pomoci zlepšit diagnostiku mikroorganismu *Helicobacter pylori* pomocí histochemických metod.

## **Poděkování**

Děkuji MUDr. Ondreji Ondičovi, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a podkladů a za trpělivost. Dále děkuji laborantům ze Šiklova ústavu FN Plzeň, kteří mi pomáhali s přípravou a barvením vzorků. Také děkuji mé spolužačce Markétě Lomozové, která spolupracovala na této práci a dalším mým spolužákům, se kterými jsme si byli vzájemně oporou. Nakonec děkuji své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po celou dobu studia.

# OBSAH

SEZNAM GRAFŮ .....	10
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	11
SEZNAM TABULEK .....	12
SEZNAM ZKRATEK .....	13
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1 ŽALUDEK .....	15
1.1 Anatomie.....	15
1.2 Histologická stavba.....	15
1.2.1 Sliznice .....	15
1.2.2 Žlázy žaludku .....	16
1.2.3 Submukóza .....	17
1.2.4 Svalovina .....	17
1.2.5 Seróza .....	18
1.3 Krevní zásobení .....	18
1.4 Nervový systém .....	18
1.5 Fyziologie .....	19
2 ONEMOCNĚNÍ ŽALUDKU .....	20
2.1 Záněty žaludku.....	20
2.1.1 Akutní gastritida .....	20
2.1.2 Chronická gastritida.....	21
2.1.3 Speciální formy gastritid .....	22
2.2 Vředová onemocnění .....	22
2.2.1 Akutní vřed.....	22
2.2.2 Chronický vřed .....	23
2.3 Nádory žaludku.....	24
2.3.1 Benigní nádory a polypy .....	24
2.3.2 Maligní nádory .....	25
3 HELICOBACTER PYLORI .....	28
4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HELICOBACTER PYLORI .....	30
4.1 Neinvazivní metody .....	30
4.1.1 Sérologické testy .....	31
4.1.2 Dechový test .....	31
4.1.3 Průkaz antigenu H. pylori ve stolici .....	32
4.2 Invazivní metody .....	32



4.2.1	Histologické vyšetření .....	32
4.2.2	Rychlý ureázový test .....	33
4.2.3	Kultivace.....	33
4.2.4	Metody molekulární biologie .....	34
PRAKTICKÁ ČÁST .....		35
5	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	35
5.1	Hlavní cíl.....	35
6	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	36
7	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	37
8	METODIKA PRÁCE .....	38
8.1	Přikrajování materiálu.....	38
8.2	Odvodnění a prosycení materiálu .....	38
8.3	Zalévání do parafinu .....	39
8.4	Krájení bločků se vzorky .....	39
8.5	Napínání řezů na podložní skla.....	39
8.6	Barvení preparátů.....	40
8.6.1	Barvení dle Giemsy .....	40
8.6.2	Impregnační metoda Warthin-Starry .....	41
8.7	Odvodnění a montování preparátů.....	42
8.8	Hodnocení ve světelném mikroskopu.....	42
9	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	43
9.1	Výsledky barvení .....	44
9.2	Hodnocení preparátů.....	45
9.3	Analýza vzorků .....	46
9.3.1	Hodnotitel 1 .....	47
9.3.2	Hodnotitel 2 .....	48
9.3.3	Hodnotitel 3 .....	49
DISKUZE .....		50
ZÁVĚR.....		51
SEZNAM LITERATURY.....		52
SEZNAM PŘÍLOH .....		54
Příloha A – Pracovní postup ŠÚP FN Plzeň – Giemsa .....		55
Příloha B – Pracovní postup ŠÚP FN Plzeň – Warthin-Starry .....		56

## **SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1 - Srovnání barvení I.....	47
Graf 2 - Srovnání barvení II .....	48
Graf 3 - Srovnání barvení III .....	49

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Anatomie žaludku.....	15
Obrázek 2 - Histologická stavba žaludku.....	17
Obrázek 3 - Helicobacter pylori .....	28
Obrázek 4 - Krájení tkáňových bločků.....	39
Obrázek 5 - Kyvety Giemsovo barvení .....	40
Obrázek 6 - Příprava roztoků Warthin-Starry .....	41
Obrázek 7 - Pozorování v mikroskopu.....	42
Obrázek 8 - Výsledek barvení Giemsa .....	44
Obrázek 9 – Výsledek barvení Warthin-Starry .....	44

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 - Počty bakterií <i>Helicobacter pylori</i> .....	45
Tabulka 2 - Výsledky t-testu I .....	47
Tabulka 3 - Výsledky t-testu II .....	48
Tabulka 4 - Výsledky t-testu III .....	49

## SEZNAM ZKRATEK

API2 .....	Inhibitor apoptózy 2
CD .....	Cluster designation, označení povrchových molekul buněk
CO <sub>2</sub> .....	Oxid uhličitý
ELISA .....	Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
H <sup>+</sup> .....	Vodíkový kation
HCl .....	Kyselina chlorovodíková
IL .....	Interleukin
K <sup>+</sup> .....	Draselný kation
M .....	průměr
MALT .....	Mucosa associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň ve slizničním vazivu
N <sub>2</sub> .....	Molekula dusíku
NH <sub>3</sub> .....	Amoniak
O <sub>2</sub> .....	Molekula kyslíku
SD .....	Směrodatná odchylka
SE .....	Standartní chyba
TNF .....	Tumor nekrotizující faktor
VacA .....	Vakuolizující toxin

## ÚVOD

Bakterie *Helicobacter pylori* se řadí mezi mikroaerofilní bakterie spirálovitého tvaru. Osidluje žaludeční sliznici, a proto má různé ochranné mechanismy pro přežití v kyselém prostředí.

Infekce *Helicobacter pylori* způsobuje velmi závažná onemocnění žaludku. Svým působením zvyšuje kyselost žaludečních šťáv, což vede ke vzniku gastritid. *H. pylori* se podílí i na vzniku žaludečních a duodenálních vředů, u většiny pacientů s těmito problémy byla prokázána přítomnost *H. pylori*. A v neposlední řadě je infekce *H. pylori* spojována s karcinomem žaludku.

Na světě je touto bakterií infikováno téměř 50 % populace, a proto je diagnostika *H. pylori* velice rozšířená a častá. Metod k diagnostice *H. pylori* je značné množství a můžeme je dělit na invazivní, které vyžadují biopsii sliznice žaludku a neinvazivní. Nejvíce užívanou metodou zůstává histologické vyšetření.

Tato práce má část teoretickou a praktickou. V teoretické části je popsán žaludek, onemocnění žaludku, bakterie *Helicobacter pylori* a jeho diagnostika. V praktické části se věnují porovnávání senzitivity a specifity dvou histologických barvení. Jedním je metoda stříbření Warthin-Starry a druhým je modifikované barvení dle Giemsy.

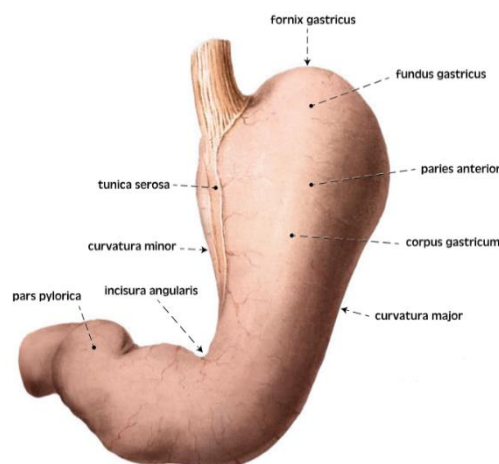
# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ŽALUDEK

Žaludek lat. *ventriculus* navazuje na jícen jako rozšířený oddíl trávicího traktu, který je uložen v dutině břišní pod levou brániční klenbou. Tento orgán je dutý, vakovitý, s průměrným objemem jeden litr a maximální kapacitou dva až tři litry. (1; 2) Žaludek tráví potravu a vylučuje hormony, je proto smíšeným exokrinním a endokrinním orgánem. Hlavní funkcí žaludku je pokračovat v trávení sacharidů, které bylo zahájeno v dutině ústní, započít trávení bílkovin pomocí sekrece enzymu pepsinu, okyselovat rozmělněnou potravu a svalovou činností ji měnit na chymus, tráveninu. (3)

### 1.1 Anatomie

Tvar žaludku je proměnlivý a závisí na několika faktorech jako je náplň žaludku, jeho funkční stav nebo poloha těla. Ale přesto ho z anatomického hlediska můžeme dělit na několik částí. Místo, kde jícen vstupuje do žaludku včetně přilehající části, se nazývá česlo (kardie); vlevo od vstupu jícnu je polokulovitá část tvořící dno žaludku (fundus); největší částí je tělo (corpus) a koncovou částí je vratník (pars pylorica), kde žaludek přechází ve dvanáctník (duodenum). Z funkčního hlediska žaludek rozdělujeme pouze na dva oddíly, oddíl trávicí – kardie, fundus, corpus a oddíl vyprazdňovací – vratník. (4)



Obrázek 1 - Anatomie žaludku

Zdroj: GRIM M., NAŇKA O., HELEKAL I. - *Atlas anatomie člověka II.*

### 1.2 Histologická stavba

Stěnu žaludku tvoří čtyři vrstvy. Vnitřní vrstva je sliznice (tunica mucosa), dále je podslizniční vazivo (tunica submucosa), svalová vrstva (tunica muscularis) a vnější vrstva je seróza (tunica serosa). (5)

#### 1.2.1 Sliznice

Histologicky je slizniční vrstva tvořena vysokými cylindrickými hlen vylučujícími buňkami. Vrstva sliznice je asi 1 mm vysoká a pokrývá jí 100–200  $\mu\text{m}$  silná vrstva hlenu.

Povrchový reliéf sliznice je strukturován do žaludečních jamek (foveolae gastricae), které jsou vystlané jednovrstevným cylindrickým epitelem. Do těchto jamek ústí tubulózní žlázy (glandulae), které jsou rozdílné pro každý oddíl žaludku.

Žlázy jsou zasazeny do vrstvy lamina propria. Tato vrstva poskytuje strukturní podporu, protože je složena převážně z retikulárních vláken s malým množstvím kolagenních a elastických vláken. Obsahuje mnoho typů buněk, včetně lymfocytů, fibroblastů a plazmatických buněk. Je také protkána cévami a nemyelinizovanými nervovými vlákny.

Svalovina slizniční vrstvy (lamina muscularis mucosae) je tvořena dvěma vrstvami – vnitřní cirkulární a vnější podélnou. (3; 5; 6)

### 1.2.2 Žlázy žaludku

Žlázy ve sliznici se liší podle oddílu žaludku, ve kterém se nacházejí. V oblastech těla a dna žaludku žlázy obsahují více typů exokrinních buněk, ale v oblastech česla a vratníku obsahují pouze jeden typ buněk. Žlázy můžeme rozdělit na dvě části – krček (horní polovina) a bázi (dolní polovina).

V oblasti kardia tvoří jamky až polovinu tloušťky sliznice. Nacházíme v ní jednoduché nebo větvené tubulózní žlázy, které vylučují převážně neutrální mucin a lysozym.

V oddílech těla a dna žaludku zabírají jamky pouze necelou jednu čtvrtinu tloušťky sliznice. Žlázy v těchto oblastech jsou více zabaleny než v kardiální části a jsou spíše rovné než stočené. V krčku žlázek nacházíme nediferencované a mucinózní buňky, v bázi nacházíme naopak buňky parietální, hlavní a enteroendokrinní.

- a. Nediferencované buňky jsou v malém množství zastoupeny v oblasti krčků. V případě potřeby se diferencují a putují vzhůru nahradit povrchové mucinózní buňky, jiné mohou sestupovat dolů a diferencovat se v jiný typ buňky přítomný ve žláze.
- b. Mucinózní buňky krčků pravděpodobně slouží k proliferaci a regeneraci sliznice. Vyskytují se ve shlucích nebo jednotlivě a vylučují neutrální nebo kyselý hlen.
- c. Parietální (krycí, oxyntické) buňky mají na svém povrchu mikrovlnky, kterými mohou zvětšovat svůj objem. Tyto buňky produkují protony a chloridové



ionty, ze kterých vzniká kyselina chlorovodíková a glykoprotein (vnitřní faktor), který je důležitý pro vstřebávání vitamínu B<sub>12</sub>.

- d. Hlavní (zymogenní) buňky obsahují zymogenní granula s pepsinogeny, které jsou vylučovány do kyselého prostředí žaludku.
- e. Enteroendokrinní buňky jsou buňky produkující hormony. V žaludku rozlišujeme G buňky produkující gastrin, D buňky produkující somatostatin a enterochromafinní (EC) buňky, které produkují serotonin.

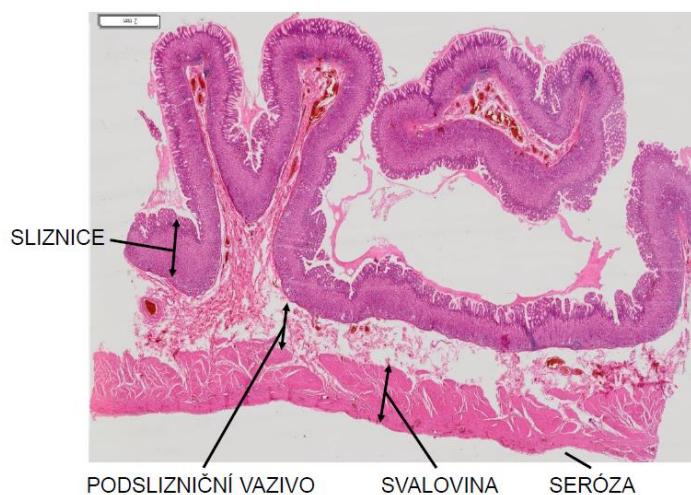
V pyloru nacházíme podobné buňky jako žlázy, ale pylorické jsou dlouhé. Tyto žlázy vylučují hlen a enzym lysozym. Nacházíme zde G a D buňky. (3; 5; 6)

### 1.2.3 Submukóza

Submukóza je tvořena z volné pojivové tkáně, ve které se nachází mnoho elastických vláken. V této vrstvě se nachází autonomní nervová pletěň a stejně tak cévní a lymfatické pleteně. Submukóza společně se sliznicí vytváří v neroztaženém žaludku podélně probíhající řasy – rugae. (3; 6)

### 1.2.4 Svalovina

Svalovina žaludku má tři vrstvy, které se liší směrem vláken. Vnější vlákna jsou podélná, střední cirkulární a vnitřní běží šikmo. Cirkulární svalovina je nejvíce patrná v oblasti pyloru, kde je zesílena a tvoří svěrač dvanáctníku (musculus sphincter pylori). Šikmá svalová vlákna jsou neúplnou vrstvou přítomnou uvnitř cirkulárních vláken, nejvíce jsou přítomna v oblasti kardié. (6)



Obrázek 2 - Histologická stavba žaludku

Zdroj: MUDr. ČEDÍKOVÁ Miroslava Ph.D. - prezentace

### 1.2.5 Seróza

Pobřišnice (tunica serosa) je tenká vrstva kolagenního vaziva krytá mezotelem. (3)

## 1.3 Krevní zásobení

Žaludek je zásobován pěti tepnami. Tyto tepny vycházejí z první nepárové větve břišní aorty – truncus coeliacus. Vytváří se dva tepenné oblouky. Levá žaludeční tepna (arteria gastrica sinistra) vychází přímo z útrobního kmene (truncus coeliacus) a zásobuje hlavně tělo žaludku. Z jaterní tepny vychází pravá žaludeční tepna (arteria gastrica dextra), která přivádí krev do malého zakřivení žaludku, a pravá gastroepiploická tepna (arteria gastroepiploica dextra), která zásobuje velké zakřivení žaludku. Spolu s nimi přivádí krev do velkého zakřivení i levá gastroepiploická tepna (arteria gastroepiploica sinistra) a krátké žaludeční tepny (arteriae gastricae breves). Všechny tepny jsou vzájemně propojeny a prostupují vrstvami žaludku, ve kterých tvoří rozsáhlé pleteně. Díky bohatému prokrvení jsou málo časté infarkty žaludku.

Žíly žaludku následují tepny a podél obou zakřivení tvoří podobné oblouky. Z malého zakřivení odvádí krev pravá a levá žaludeční žíla (vena gastrica dextra et sinistra), z velkého zakřivení odvádí krev pravá a levá gastroepiploická žíla (vena gastroepiploici dextra et sinistra). Od těla žaludku ústí krátké žaludeční žíly (venae gastricae breves). Všechny tyto žíly se sbíhají do vrátnicové žíly (vena portae) a jejích přítoků. (1; 6)

## 1.4 Nervový systém

Sympatická nervová vlákna se k žaludku dostávají z kmene sympatiku nervy, které následují žaludeční a gastroepiploické tepny. Některá nervová vlákna přicházejí i od levého bráničního nervu (nervus phrenicus).

Nervová vlákna parasympatiku jsou přiváděna pravým a levým bloudivým nervem (nervus vagus dextra et sinistra) jako přední a zadní kmen. Tato vlákna vytváří pleteně a jejich větévky sahají až ke žlázám, cévám a buňkám hladké svaloviny. Parasympatická vlákna mají funkci zvyšovat svalové napětí stěny žaludku a peristaltiku.

Parasympatické i sympatické nervy obsahují senzitivní vlákna, díky kterým můžeme vnímat tlak a teplotu nebo pocit bolesti. Společně vytváří sympatikus s parasympatikem pleteně ve stěně žaludku. Těmi jsou řízeny útvary žaludeční stěny, parasympatikem opačně než sympatikem. (1; 6)

## 1.5 Fyziologie

Funkcí žaludku je chovat se jako rezervoár potravy, která je v něm promíchávána a dále zpracovávána mechanicky nebo chemicky působením žaludeční šťávy. Díky působení kyselého prostředí a svalové aktivity je potrava přeměněna na kašovitou hmotu (chymus). Dále zde pokračuje trávení sacharidů, které bylo započato v dutině ústní a zahajuje se trávení bílkovin. (3; 6)

Při přijímání potravy je žaludek v adaptivní relaxaci (peristole), kdy se hromadí jednotlivá sousta a stěna žaludku jim povoluje. V této fázi se nemění tlak v žaludku. Později (po přibližně hodině) přichází žaludeční peristaltika, kdy oběma zakřiveními žaludku probíhají kontrakce odshora dolů. Při této fázi je rozmělněná potrava promíchávána se žaludeční šťávou.

Denně se vytvoří přibližně 2 litry žaludeční šťávy s velmi nízkým pH 2–3. Tvorba žaludečního sekretu je řízena parasymptikem na základě podmíněných nebo nepodmíněných reflexů. Vlákna bloudivého nervu buď přímo stimulují oxyntické buňky nebo na ně působí prostřednictvím gastrinu produkovaného G buňkami. Oxyntické buňky po tomto působení začínají vytvářet kyselinu chlorovodíkovou. Ta má v žaludku několik funkcí – snižuje pH, působí antibakteriálně, pomáhá redukci železa a resorpci vápníku, denaturuje bílkoviny a tím usnadňuje jejich trávení a aktivuje enzym pepsinogen. Před působením kyselé šťávy na stěnu žaludku ji chrání hlen, který obsahuje mucin. (7; 8; 9)

## 2 ONEMOCNĚNÍ ŽALUDKU

Žaludeční léze jsou častou příčinou klinických onemocnění. Peptické vředy se během života vytvoří až 10 % lidí ze západních rozvinutých zemí. Chronická infekce žaludeční sliznice způsobená bakterií *Helicobacter pylori* je celosvětově nejrozšířenější infekcí. (10)

### 2.1 Záněty žaludku

Gastritidy jsou definovány jako zánět žaludeční sliznice. Záněty mohou probíhat s určitými klinickými příznaky, hlavně bolestí žaludku, nebo mohou být zcela bezpříznakové. Gastritidy jsou převážně děleny na akutní s infiltrací neutrofilů nebo chronické s přítomnými lymfocyty a/nebo plazmatickými buňkami. (10; 11)

#### 2.1.1 Akutní gastritida

Akutní gastritida obvykle bývá pomíjivé povahy, trvá pouze jeden nebo dva dny. Zánět může být zcela asymptomatický, ale v některých případech je doprovázen epigastrickou bolestí, nevolností až zvracením, krvácením do sliznice žaludku, masivní hematemézí (zvracení krve) a v závažných případech potencionálně fatálními krevními ztrátami. Největší pravděpodobnost masivního krvácení je u alkoholiků. (10)

Akutní gastritidy bývají často způsobeny nadměrným užíváním nesteroidních anti-flogistik (zejména aspirinu), nadměrné užívání alkoholu, kouření, léčba chemoterapií, uremie, stresové stavy (trauma, operace, popáleniny), ischemie, sebevražedné pokusy (požití kyselin/zásad) nebo infekce bakteriemi a viry. Gastroenteritidy vyvolané bakteriemi jsou nejčastěji způsobené salmonelami, často *S. typhimurium* a *S. enteritidis*. Onemocnění je přenášeno na člověka kontaminovanou potravou nebo použitím nástrojů, které se používali na úpravu kontaminovaných potravin. Tyto záněty se projevují bolestmi břicha, nevolností, zvracením a průjmy. (10; 11)

Při nejmírnější formě akutní gastritidy vykazuje lamina propria mírný edém a mírné ucpání cév. Povrchový epitel je neporušený a rozptýlené neutrofilů jsou přítomny mezi buňkami povrchového epitelu nebo v epiteliální vrstvě a krčku žlázek. Přítomnost neutrofilů nad bazální membránou je abnormální a značí aktivní zánět. Se závažnějším poškozením sliznice se rozvíjí eroze a krvácení. Eroze označuje ztrátu povrchového epitelu, defekt sliznice, který nezasahuje do muscularis mucosa. Eroze bývají doprovázeny silným akutním zánětlivým

infiltrátem a vytlačováním purulentního exsudátu, který obsahuje fibrin. Krvácení může vytvořit tmavé skvrny na sliznici nebo okolo erozí. Tento stav se nazývá akutní erozivní hemoragická gastritida. (10)

### 2.1.2 Chronická gastritida

Chronická gastritida je definována jako přítomnost chronických zánětlivých změn sliznice, které mohou vést k atrofii sliznice a intestinální metaplazii. Obvykle je bez erozí. Změny epitelu se mohou stát dysplastické a vytvořit prostředí pro rozvoj karcinomu. (10)

Hlavními příčinami vzniku chronické gastritidy jsou chronická infekce bakterií *Helicobacter pylori*, imunologické onemocnění, alkohol a kouření, granulomatózní záněty (Crohnova choroba), uremie a reakce štetu proti hostiteli. (10)

Nejčastější etiologické spojení chronické gastritidy je s bakterií *H. pylori*. Toto spojení bylo objeveno v roce 1983, kdy se bakterie chybně nazývala *Campylobacter pylori-dis*. Infekce *H. pylori* je spojována i s dalšími žaludečními a duodenálními onemocněními, převážně s peptickými vředy a karcinomem žaludku. Po počáteční expozici *H. pylori* se gastritida dělí do dvou druhů – převážně antrálního typu a pangastritida. Při gastritidě převážně antrálního typu převládá vysoká produkce kyseliny a je zvýšené riziko duodenálního vředu. Pangastritida je typická sníženou produkcí žaludeční kyseliny a multifokální atrofii, zvyšuje riziko adenokarcinomu. Bakterie se hromadí v hlenové vrstvě na povrchu epitelu a způsobují chronický zánět, který vede ke tvorbě lymfoidní tkáně. Ve vážných případech může dojít až k rozvoji MALT lymfomu. Pacienti s chronickou gastritidou způsobenou infekcí *H. pylori* jsou obvykle léčeni antibiotiky. Tato léčba bývá úspěšná a k relapsům dochází pouze v případě opětovné nákazy bakterií. (10; 11)

Menší procento chronických gastritid jsou autoimunitní. Je způsobená přítomností autoprotilátek proti komponentům parietálních buněk žaludečních žláz. Nejčastěji jsou přítomny protilátky proti enzymu  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPáza, gastrinovému receptoru a vnitřnímu faktoru. Při tomto onemocnění dochází k destrukci žláz a atrofii sliznice, která vede ke ztrátě produkce žaludeční kyseliny. Také se objevuje intestinální metaplazie sliznice, kdy se v žaludku vyskytují vysoké cylindrické buňky a pohárkové buňky, které normálně nacházíme ve sliznici tenkého střeva. Ve vážných případech dochází ke ztrátě produkce vnitřního faktoru vedoucí ke zhoubné anemii.

Tato gastritida bývá asociována s dalšími autoimunitními onemocněními jako Hashimotova tyreoiditida, Addisonova choroba a diabetes typu I. (10; 11)

Chronické gastritidy mohou postihnout různé části žaludku a vykazovat různou míru poškození sliznice. Během zánětu je v lamina propria nakupena chronická zánětlivá celulizace. O aktivitě zánětu svědčí přítomnost granulocytů v krčcích žaludečních žláz. Pokud dojde k výraznému úbytku žlázek, vzniká atrofie sliznice. (10; 11)

### **2.1.3 Speciální formy gastritid**

Eozinofilní gastritida je idiopatický stav, který se vyznačuje eozinofilní infiltrací sliznice, svalové stěny nebo všech vrstev žaludku, obvykle v pylorické části žaludku. Může se vyskytovat společně s eozinofilní enteritidou a obvykle je doprovázena periferní eozinofilií.

Alergická gastroenteropatie je dětské onemocnění. Může způsobovat nevolnost, zvracení a v některých případech poruchu růstu.

Lymfocytární gastritida je stav, kdy lymfocyty hustě osidlují epiteliální vrstvu slizničního povrchu a žaludečních žláz. Skoro polovina případů je spojena s celiakií.

Granulomatózní gastritida se vyznačuje přítomností epitelioidních granulomů. Tyto granulomy se běžně vyskytují u Crohnovi choroby a sarkoidózy. (10)

## **2.2 Vředová onemocnění**

Defekt povrchu žaludeční nebo střevní sliznice, který neproniká hlouběji než ke slizniční svalovině, je nazýván eroze. Eroze může přecházet ve vřed, pokud pronikne vrstvou slizniční svaloviny a hlouběji do částí stěny trávicí trubice. Vředy se mohou vyskytovat ve všech částech trávicího traktu, ale nejčastěji je nacházíme v žaludku a duodenu. (11)

### **2.2.1 Akutní vřed**

Akutní vředy často vznikají při užívání nesteroidních antiflogistik. V jiných případech vznikají jako následek vážného fyziologického stresu, jako například při popáleninách a velkých úrazech, ale i vlivem emočního stresu, a proto se často nazývají stresové vředy. Mnohdy vznikají během desítek minut. (8)

Obvykle jsou mnohočetné vyskytující se převážně v žaludku a méně často v duodenu. Primárním příznakem většinou bývá krvácení do gastrointestinálního traktu. Akutní vředy jsou často spojovány s lokálními vazospazmy, které jsou způsobeny extrémní aktivací

sympatiku. Při tomto stavu brzy dochází k porušení slizniční bariéry a sliznice je samonatravena působením kyselé žaludeční šťávy. Vředy vzniklé tímto způsobem se nazývají ischemické nebo Cushingovy vředy. Při zvýšení hladiny histaminu v plazmě, ke kterému dochází při popáleninách nebo velkých ztrátách plazmy vznikají Curlingovy vředy. (8)

Akutní vředy bývají kruhovitě nebo oválné s ostrými okraji. Stěna vředu je nerovná a obsahuje zbytky nekrotické tkáně. Spodina vředu bývá pokryta natrávenou krví a v jeho okolí může být malá zánětlivá infiltrace. (11)

### **2.2.2 Chronický vřed**

Chronické nebo také peptické vředy bývají samostatné léze vyskytující v jakékoli části gastrointestinálního traktu, který je vystaven agresivnímu působení kyselých šťáv. Nejčastěji se vyskytují v žaludku a duodenu (poměr žaludek : duodenum je 1 : 4). Toto onemocnění často probíhá sezónně na jaře a na podzim a může trvat až několik let. (10; 11; 12)

Hlavním předpokladem pro vznik peptického vředu je nerovnováha mezi ochranným mechanismem žaludeční sliznice a poškozujícími faktory, zejména žaludeční kyseliny a pepsin. Kromě hyperacidit mohou být peptické vředy vyvolány také selháním obrany sliznice, snížením průtoku krve žaludeční sliznicí, opožděným vyprazdňováním žaludku nebo narušením obnovy epitelu. (10)

Infekce *H. pylori* je hlavním faktorem patogeneze tohoto onemocnění, vyskytuje se až u 70 % pacientů trpících peptickým vředem. *H. pylori* nenapadá tkáně, ale indukuje intenzivní zánětlivé a imunitní reakce. Mikrob zvyšuje produkci prozánětlivých cytokinů jako IL-1, IL-6, TNF a zejména IL-8, tímto cytokinem jsou aktivovány neutrofilové. *Helicobacter* také podněcuje sekreci žaludeční kyseliny, jeho metabolity narušují slizniční obranu a některé jeho proteiny vyvolávají imunitní odpověď ve sliznici. Po antibiotické léčbě dochází k vymýcení bakteriální kolonizace a hojení vředů. Pokud nejsou pacienti opět infikováni bakterií, klesá počet recidiv vředu. (8; 10; 11)

Hyperacidita nemusí být způsobena pouze infekcí *H. pylori*. Může být způsobena zvýšenou masou parietálních buněk, zvýšenou senzitivitou k sekrečním stimulům nebo narušením inhibice stimulačního mechanismu, například uvolňováním gastrinu. Peptické vředy také mohou být způsobeny nadměrným užíváním nesteroidních antiflogistik, kouřením nebo alkoholickou cirhózou. (10)

Okraje peptického vředu bývají navolitě vyklenuté, čímž je zúženo ústí vředu. Stěnu vředu tvoří několik vrstev, povrchová vrstva je nekrotická, pod se nachází vrstva zánětlivé infiltrace a níže je granulační tkáň. Zevní vrstva je tvořena vazivovou jizevnatou tkání. (11)

Komplikace, které nejčastěji nastávají u chronického vředu, jsou krvácení, perforace, penetrace, jizevnatá stenóza a zřídka maligní zvrát v karcinom. Krvácení může být okultní (skryté), ale také život ohrožující, když vřed nahlodá stěnu tepny. V takovém případě pacient zvrací krev nebo má krev ve stolici (meléna), ve vážných případech může vykrváct. Pokud vřed proděraví stěnu žaludku a proniká do sousedních orgánů a tkání, hovoříme o penetraci. V případě, že vřed nekryjí přilehlé tkáně, perforuje do peritoneální dutiny a může vyvolat šokový stav. (11; 12)

Vřed je zhojen paprscitou jizvou, která může vést ke stenóze (zúžení). Zúžení bývá významné v oblasti vratníku a může vést k funkčním poruchám. (11; 12)

## **2.3 Nádory žaludku**

Nádory žaludku jsou častěji nádory vznikající ze sliznice než mezenchymální nebo stromální nádory. Jsou rozdělovány na benigní a maligní.

### **2.3.1 Benigní nádory a polypy**

Termínem polyp jsou označovány uzliny nebo útvary vystupující nad okolní sliznici. Polypy sliznice jsou děleny na neoplastické a non-neoplastické. Nejčastěji nacházíme v žaludku tři typy polypů – hyperplastické, polypy žlázek fundu a adenomatózní polypy (polypózní adenomy). (10; 11)

Hyperplastické polypy tvoří hyperplastický slizniční epitel, který je často doprovázen zánětem a edémem. Hyperplastický epitel vzniká jako reakce na chronické poškození sliznice žaludku. Většinou jsou tyto polypy malé a přisedlé, nejčastěji se vyskytují v antru pyloru. Asi ve čtvrtině případů se objevují jako vícečetné polypy, kdy jich může být nalezeno více než dvacet. (10; 11)

Adenomatózní polypy jsou polypovité benigní adenomy. Tyto léze se obvykle objevují samostatně, před detekcí mohou narůst do velikosti až 4 centimetrů. Benigní adenomy mohou být přisedlé nebo stopkaté. Pokud v těchto polypech dojde k dysplastickým změnám epitelu, může to vést až k tvorbě adenokarcinomu. (10; 11)



Polypy žlázek fundu jsou neškodné cystické dilatace žlázek v parietální sliznici. Obvykle se objevují sporadicky a jsou spojovány se syndromem familiární adenomatózní polypózy. (10)

V žaludeční stěně se často objevují gastrointestinální stromální nádory. Většinou je tvoří protáhlé buňky, ze kterých se vytvářejí vzájemně propletené snopce. Tyto nádory mohou být různě velké, v některých případech dosahují velikosti nad 10 centimetrů. Pravděpodobně jsou odvozeny od Cajalových buněk nebo jejich prekurzorů. Tyto buňky řídí peristaltiku gastrointestinálního traktu. (11)

V žaludku můžeme nacházet leiomyomy. Jsou to nádory odvozené od hladké svaloviny a vyskytují se méně než stromální nádory. Ojedinele můžeme v žaludku nalézt neuriomy. (11)

### **2.3.2 Maligní nádory**

Nejčastějšími zhoubnými nádory žaludku jsou karcinomy, které tvoří 90 až 95 %, méně časté jsou lymfomy, sarkomy a neuroendokrinní tumory. Karcinomy žaludku bývaly nejčastějšími nádory, v současnosti je přeskočily karcinomy plic. (11)

#### **2.3.2.1 Karcinom žaludku**

Karcinom žaludku je druhým nejčastějším tumorem na světě. Jeho incidence je zvláště vysoká v Japonsku, Chile, Kostarice, Kolumbii, Číně a Maďarsku. Je více rozšířen v nižších sociálně-ekonomických třídách a poměr pacientů mužů : žen je 2 : 1. (10; 11)

Makroskopicky jsou rozlišovány čtyři základní typy – karcinom polypovitý, miskovitý, vředovitý a difuzní. Polypovitý má vyklenutý květákovitý tvar, miskovitý se vyznačuje valovitými okraji a vkleslým středem, vředovitý vzhledem připomíná chronický vřed a difuzní prorůstá celou stěnou žaludku. (11)

Histologicky se jedná o adenokarcinom a rozlišujeme dva základní typy – intestinální a difuzní. Varianta intestinální má papilární nebo tubulární uspořádání, jako je tomu u dobře diferencovaných nádorů. Varianta difuzní v podobě buněk proniká celou stěnou žaludku. Buňky mají prstenčitý vzhled nebo tvoří drobné skupinky malých nádorových buněk. (11)

Intestinální typ vzniká z prekurzorových lézí a je spojen s chronickou gastritidou vyvolanou *H. pylori*. Chronická infekce *H. pylori* zvyšuje riziko vzniku karcinomu pětikrát až šestkrát. Zda se karcinom rozvine závisí na přítomnosti bakteriálních proteinů a imunitní odpovědi pacienta. Dalšími rizikovými faktory vzniku karcinomu jsou velký příjem nitritů

a nitrátů, které se mohou vyskytovat v uzených, solených a jinak konzervovaných rybách nebo nekvalitní vodě, dále jsou to konzervační činidla, barviva, aflatoxin a různé kancerogeny vznikající tepelnými úpravami. Také to může být ovlivněno nedostatkem zeleniny a jódu a samozřejmě genetickými predispozicemi. (8; 10; 11)

Difuzní typ obvykle vzniká de novo a nenavazuje na chronický zánět. Tato varianta se vyskytuje spíše u nižších věkových skupin. Jeho prognóza není dobrá, protože nevytváří ohraničené nádorové tělísko, ale roste v celé žaludeční stěně. (11)

Karcinomy ještě můžeme rozdělit podle hloubky invaze na časný a pokročilý karcinom. Časný nádor postihuje pouze mukózu a submukózu a může, ale nemusí metastazovat do perigastrických lymfatických uzlin. Často se šíří do plochy a může vytvářet ložiska o průměru až 10 centimetrů. Prognóza tohoto nádoru je příznivá. Pokročilý karcinom proniká až do vrstvy svalové a má větší tendenci se šířit. (11)

Karcinom nejdříve metastazuje do regionálních lymfatických uzlin a později do jater, plic, kostí a po peritoneu. Klinicky významná je metastáze v levé nadklíčkové uzlině. U žen fertilního věku může metastazovat do ovarií, což nazýváme Krukenbergerův nádor. Ovaria jsou výrazně zvětšená a mají bramborovitý vzhled. Často se tento problém projeví dříve a pomůže odhalit karcinom žaludku. (11; 12)

Karcinom bývá asymptomatický a jediným způsobem, jak ho odhalit v brzké fázi, je zjištění okultního krvácení, které je přítomné od začátku. Dalšími příznaky jsou ztráta chuti k jídlu, převážně k masu, bolest břicha, pálení žáhy, nauzea a zvracení, průjem nebo zácpa. (8; 12)

#### 2.3.2.2 MALT lymfom

Přibližně 40 % lymfomů vzniká mimo lymfatické uzliny a často právě v žaludku, ty se nazývají gastrointestinální lymfomy. Většinou se jedná o lymfomy B – řady. (10)

Zatímco některé žaludeční lymfomy vznikají de novo, většina (>80 %) z nich je spojena s chronickou gastritidou a infekcí *H. pylori*. Buňky těchto nádorů obvykle pronikají mezi epitel žlázek, což označujeme jako epitelotropismus. Ten je pro MALT lymfomy charakteristický. V lymfomech dochází ke stimulaci B-buněk, která vede k proliferaci. Stimulace B-lymfocytů je způsobena ovlivňováním T-buněk *Helicobacterem*. Vlivem proliferace se v žaludku hromadí lymfoidní tkáň. Při nakupení cytogenetických odchylek v této tkáni

může docházet k transformaci v lymfom. V případě eradikace bakterií antibiotiky je až polovina žaludečních lymfomů regredována. (10; 11)

Některé MALT lymfomy vznikají na genetickém podkladě. Většinou se jedná o Trisomii 3 nebo o translokaci t (11;18). Tato translokace spojuje gen API2 z chromozomu 11 s genem MLT z chromozomu 18. Proteiny kódovány tímto genem inhibují apoptózu. (10; 11)

MALT lymfomy nejčastěji rostou lokálně a dále do organismu se nešíří. Mají dobrou prognózu. (11)

V žaludku se častěji objevují difuzní velkobuněčné B-lymfomy. Vznikají transformací níže maligního MALT lymfomu nebo de novo. (11)

#### 2.3.2.3 Stromální tumor

Gastrointestinální stromální tumory vznikají z Cajalových intersticiálních buněk. Tyto buňky se nacházejí v gastrointestinálním traktu a řídí peristaltiku. (10)

Histologicky jsou podobné leiomyomům. Bývají tvořeny protáhlými buňkami, ty vzájemným propletením vytváření snopce. Nádory mají speciální fenotyp, kdy 95 % z nich obsahuje buňky, které jsou pozitivní na CD117. Proto tyto nádory můžeme prokazovat imunohistochemickým barvením. (10; 11)

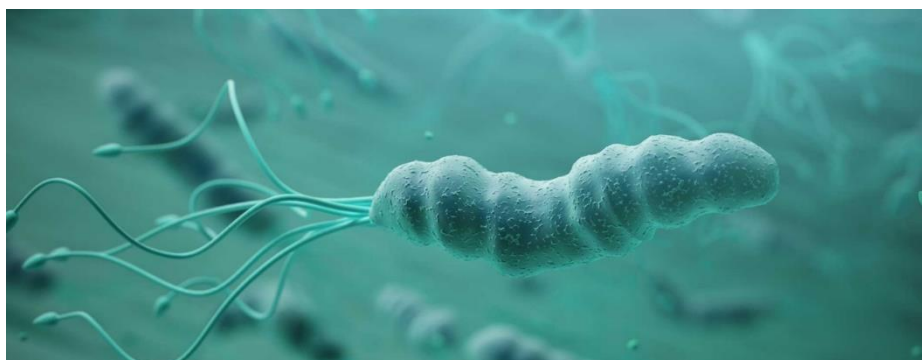
Mohou se vyskytovat jako samostatné nebo vícečetné tumory. Nádor může vyčnívat do lumen nebo vystupovat na serózní straně žaludeční stěny. (10)

### 3 HELICOBACTER PYLORI

Tento mikrob spadá do rodu *Helicobacter*, který je specifický mikroaerofilními spirálovitými bakteriemi s ureázovou aktivitou. Z tohoto rodu byli u člověka popsány *Helicobacter heilmannii*, *Helicobacter fennelliae*, *Helicobacter cinaedi*, který se hlavně vyskytuje u nakažených HIV nebo TBC a nejdůležitější druh *Helicobacter pylori*. (13)

*Helicobacter pylori* byl poprvé vykultivován v roce 1983 mikrobiology Marshalllem a Warrenem z odebrané sliznice pacienta trpícího chronickou gastritidou. Tím byla navržena hypotéza, že infekce tímto mikrobem má spojitost s chronickou gastritidou. Pro potvrzení hypotézy testoval pan Marshall infekci na vlastním těle. Později, v roce 2005, za tento objev a objasnění úlohy *Helicobacter pylori* u gastritidy a vředové choroby získali mikrobiologové Marshall a Warren Nobelovu cenu. (13; 14; 15)

*Helicobacter pylori* je Gramnegativní pohyblivá bakterie velikosti až 3 $\mu$ m. Pohybu je schopna díky svazku bičíků, které se nacházejí na jednom pólu buňky. Mikroby bývají spirálovitého nebo zakřiveného tvaru, v některých případech mohou mít tvar písmene X nebo Y. (13; 14)



Obrázek 3 - *Helicobacter pylori*

Zdroj: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/helicobacter-pylori>

Genom *H. pylori* obsahuje 1,65 milionu párů bází a kóduje přibližně 1500 proteinů. Typická je schopnost produkovat oxidázu, katalázu a hlavně ureázu. Díky vylučování ureázy je bakterie chráněna proti účinku HCl přítomné v žaludku. Ureáza štěpí močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Vzniklý amoniak neutralizuje HCl v žaludku. Vylučování ureázy je jedním faktorem patogenity *Helicobacter*. Dalšími patogenními faktory jsou cytotoxiny, například VacA, které ničí buňky žaludeční sliznice. (10; 13)

Přenosová forma bakterie je pravděpodobně kokoidní, která je více odolná vůči zevním vlivům. V žaludku je chráněna produkcí ureázy a neutralizací HCl, průnik vrstvou hlenu žaludeční sliznice je usnadněn tvarem a pohybem bakterie. Přenos infekce je pravděpodobně fekálně-orální nebo přímo z úst do úst. Patrně je touto bakterií infikována až polovina populace včetně dětí. (13; 14)

Mikrob je patogenní jen pro člověka a je nejčastější příčinou chronické gastritidy. Nejméně u 95 % pacientů s vředem dvanáctníku a 85 % pacientů s vředem žaludku je přítomen *H. pylori*. (13)

Terapie infekce *H. pylori* je nejčastěji antibiotická. Dobře citlivý je mikrob na beta-laktamová antibiotika, která ovšem mají sníženou účinnost kvůli kyselému pH žaludku. Nejvíce používaná je kombinace antimikrobiálních látek amoxicilinu, metronidazolu a solí vizmutu. Terapie obvykle trvá dva týdny. (13; 14)

## 4 LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HELICOBACTER PYLORI

Od doby, kdy byl objeven *Helicobacter pylori* a byla objasněna jeho úloha v patogenezi gastritidy, bylo vyvinuto několik diagnostických metod, jak prokázat infekci způsobenou tímto patogenem. (16)

Laboratorní testy můžeme rozdělit do dvou kategorií – invazivní a neinvazivní. Při vyšetření invazivním je potřeba odebrat pacientovi bioptické vzorky žaludeční sliznice, které získáme při endoskopickém vyšetření. Mezi testy patří histologické vyšetření, kultivace, rychlý ureázový test a molekulární metody. Testy neinvazivní jsou pro pacienta šetrnější, protože není potřeba vzorek žaludeční sliznice. Do neinvazivních metod řadíme sérologické vyšetření, detekci antigenů *H. pylori* ve stolici a detekce metabolitů urey ve vydechaném vzduchu. (16)

Ani jeden z výše uvedených testů není senzitivní ani specifický na sto procent, a proto se infekce *H. pylori* musí stanovovat alespoň dvěma metodami. Diagnostickým standardem zůstává kombinace kultivačního a histologického vyšetření, ale konkrétní výběr metod je závislý na dané klinické situaci a pracovišti. Užívání antibiotik nebo léků blokujících sekreci žaludeční kyseliny negativně ovlivňují výtěžnost všech diagnostických metod. (13; 16)

### 4.1 Neinvazivní metody

Tento druh testů se používá nejčastěji při dvou následujících situacích:

- 1) průkaz infekce u pacientů mladších 45 let, kteří trpí dyspepsií horního typu a jsou bez tzv. alarmujících příznaků (úbytek hmotnosti, anémie). Při pozitivním nálezů následuje eradikace infekce. Tato strategie, která se nazývá test and treat je v České republice považována za nevhodný přístup, pokud je prováděna bez endoskopického vyšetření.
- 2) Ke zjištění, zda eradikační léčba byla úspěšná, pokud není indikováno endoskopické vyšetření. V České republice jsou ovšem levnější invazivní metody, a proto se k ověření eradikační léčby používají spíše tyto metody nebo se léčba neověřuje vůbec.

Neinvazivní metody se také používají v případech, kdy není invazivní vyšetření možné, například těhotenství a v epidemiologických studiích.

Tyto testy jsou výrazně ovlivněny léčbou. Léčba antibiotiky, bismutem a léky, které inhibují žaludeční sekreci často vede k falešně negativním výsledkům, protože tlumí metabolismus *H. pylori*, který je klíčový pro testování. Z tohoto důvodu by se léčba měla přizpůsobit nebo včasné přerušit. (16)

#### **4.1.1 Sérologické testy**

Jedná se o vyšetření protilátek ze séra, slin, případně stolice nebo moči. Tyto testy neurčí, zda se jedná o aktuální infekci nebo infekci, která proběhla v minulosti, z důvodu přetrvávání pozitivita i po několik let po úspěšné léčbě. (13; 16)

Testy sérologické musí být standardizovány pro daný region s danou populací, protože u imunosuprimovaných, dětí a starších a vlivem rasy se mění senzitivita testů. (16)

Můžeme stanovovat protilátky ve třídách IgG, IgA a IgM, ale nejčastěji se používají protilátky třídy IgG, protože stanovení protilátek IgA je málo senzitivní a protilátky IgM se nevyskytují u všech pacientů infikovaných *H. pylori*. (16)

Nejpoužívanější metodou k detekci protilátek je metoda ELISA. Tato metoda je velice spolehlivá a její senzitivita dosahuje 90–100 %. Dalšími méně využívanými metodami jsou imunoblotting a vyšetřování protilátek ve slinách. Vyšetření ze slin se častěji užívá u dětí, protože není nutný odběr krve. Existují také rychlé sérologické testy, ke kterým je potřeba pouhá kapka krve. Tyto testy poskytují pouze kvantitativní výsledky a mají nižší senzitivitu i specifitu proti metodě ELISA, proto se rutinně nepoužívají. (16)

#### **4.1.2 Dechový test**

Jedná se o neinvazivní test s nejvyšší senzitivitou a specifitou, který je primární volbou při prvotní diagnostice *H. pylori*, pokud není indikováno gastrokopické vyšetření. (16)

Dechový test je velice ovlivněn užíváním antibiotik, inhibitory žaludeční sekrece a bismutem, a proto se musí provádět minimálně čtyři týdny po vysazení léků. Při kontrole úspěchu eradikační léčby se po získání negativního výsledku raději test zopakuje s větším odstupem od ukončení léčby, aby negativita byla opravdu jistá. (16)

Principem dechového testu je rozklad močoviny, podané perorálně, ureázou produkovanou *Helicobacterem*. Ureáza močovinu rozkládá na  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$ . V podávané močovinně

je značený izotop uhlíku  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{14}\text{C}$ , který pak detekujeme ve formě  $\text{CO}_2$  ve vydechovaném vzduchu. Pro vyhodnocení testu se měří poměr značeného a přírodního izotopu uhlíku ve vydechovaném vzduchu. Poměr se určuje před podáním urey a následně 30 minut po podání. Test je považován za pozitivní, pokud je rozdíl těchto hodnot větší než 5 promile. (16)

Analýzu vzorků můžeme provádět metodou poměrové hmotnostní spektrometrie, u které je potřeba jen několik mililitrů vzduchu. Dalším způsobem je detekce v infračerveném spektru, které mají nižší citlivost a je potřeba mnohem větší objem vzorku vzduchu. (16)

#### **4.1.3 Průkaz antigenu H. pylori ve stolici**

Tato metoda má srovnatelné hodnoty senzitivity a specifity jako dechový test, ale nepoužívá se tak často, protože se v klinické praxi nepoužívá tak dlouho. (16)

Průkaz se provádí metodou ELISA s použitím monoklonálních nebo polyklonálních protilátek. Stolica se před provedením testu může skladovat maximálně tři dny při teplotě 2-8 °C nebo bez omezení při teplotě -20 °C. (16)

První studie této metody prokázaly, že užívání léků blokujících aktivitu H. pylori také ovlivňují výsledky testu a ten může vycházet falešně negativní. Proto by se vyšetření mělo provádět po čtyřech až šesti týdnech po vysazení léčby. (16)

## **4.2 Invazivní metody**

Většina invazivních vyšetření k průkazu H. pylori vyžaduje provedení endoskopického vyšetření, protože se provádí z odebraných vzorků sliznice žaludku. Existují i invazivní metody, které nevyžadují endoskopii, je to například nazogastrická intubace sondou, při které se aspiruje žaludeční šťáva a vyšetřuje se. (16)

Do skupiny invazivních testů řadíme histologické vyšetření, kultivaci, rychlý ureázový test a v současnosti se rozvíjí použití metod molekulární diagnostiky. (16)

### **4.2.1 Histologické vyšetření**

Histologické vyšetření je hlavním diagnostickým standardem při diagnostice H. pylori. Dle doporučení se pro vyšetření odebírají dva vzorky z antra a dva z těla žaludku. (13; 16)

Mikroorganismus nacházíme na povrchu epitelových buněk ve tvaru spirál. Pro obarvení vzorků se dříve užívalo barvení Warthin-Starry, které je založeno na principu stříbření.



V dnešní době se do popředí dostalo modifikované barvení dle Giemsy, které má senzitivitu kolem 90 %. Dalším možným barvením je barvení alcianovou žlutí s toluidinovou modří, které poskytuje podobné výsledky jako modifikované barvení dle Giemsy. Novou metodou je barvení dle Genty, které kvalitně zobrazí i okolní tkáň. Lepších výsledků lze dosáhnout použitím imunohistochemie s monoklonálními protilátkami. (16)

Výhodou při použití histologického vyšetření je, že se současně může zhodnotit aktivita zánětu a odhalí se případné změny sliznice žaludku. Pokud je v biopsiích zachycena atrofie nebo intestinální mataplazie, nebývá zde *H. pylori* přítomen a je nutné opakovat odběr nebo využít neinvazivních metod. Pacientům, kteří mají patrnou atrofii žaludeční sliznice makroskopicky, se doporučuje odebírat vzorky ze středu antra a podél velké křivatury těla žaludku, protože to jsou místa s největší pravděpodobností záchytu infekce. (16)

#### **4.2.2 Rychlý ureázový test**

Jelikož jsou tyto testy velmi levné, spolehlivé a rychlé, jsou velice rozšířené. Provedení testu a získání výsledku zabere pouze několik minut, maximálně hodin. Rychlejší je získání pozitivního výsledku, který je hodnotitelný většinou do několika minut, negativní výsledek můžeme definitivně vydat až po uplynutí 24 hodin. (16)

Principem testu je změna zbarvení indikátoru, který reaguje na změnu pH. Ke změně pH dochází působením ureázy na močovinu, kdy vzniká  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$ . Zvýšení pH způsobuje amoniak. Indikátor se při zvýšeném pH zbarvuje fialově nebo červeně. K testu je potřeba dvou vzorků biopsie žaludku, jeden z antra a jeden z těla. Vzorky jsou umístěny do malých zkumavek nebo platíček s tekutým či polotekutým médiem. V některých případech může být indikátor aplikován i přímo na sliznici během endoskopického vyšetření. (16)

Senzitivita i specifita tohoto testu dosahují 90 %, ovšem jsou snižovány užíváním léčby proti *H. pylori*. (16)

Některé testy mohou osídlení žaludku bakterií hodnotit i semikvantitativně. Hojnost osídlení se projeví na zbarvení indikátoru, které může nabývat barev od žluté, přes zelenou, k modré až tmavě modré. Senzitivita i specifita těchto testů je srovnatelná s klasickými. (16)

#### **4.2.3 Kultivace**

Mikrobiologické vyšetření se k základní diagnostice rutinně nevyužívá, protože je náročné a drahé. V klinické praxi se kultivace využívá jen k vyšetření rezistence *H. pylori*

na antibiotika. Rezistenci *H. pylori* vyšetřujeme pouze u pacientů, u kterých selhala jedna nebo dvě eradikační léčby. (16)

Aby kultivace byla úspěšná, musí se dodržet standardní postupy pro dopravu a zpracování vzorků. Nejčastěji se vzorky přepravují ve Stuartově transportním médiu, ve kterém *H. pylori* přežívá až 24 hodin při teplotě 4 °C. Kultivace probíhá na různých půdách, hlavně se používá Columbia agar. Nutné jsou mikroaerofilní podmínky, při kterých je v prostředí 5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> a 85 % N<sub>2</sub>. (13; 16)

#### **4.2.4 Metody molekulární biologie**

Využití těchto metod zatím nenašlo místo v rutinní klinické praxi, ale uplatňují se v základním a klinickém výzkumu. (16)

Metodou molekulární biologie, která je nejrozšířenější, je polymerázová řetězová reakce. Touto metodou můžeme *H. pylori* prokázat v biopsii žaludku, v žaludeční šťávě, zubním povlaku a stolici. Senzitivita metody je až 100 %, ale velice závisí na výběru primární sekvence nukleových kyselin. (16)

Druhou metodou je in situ hybridizace, která je ale velice náročná. (16)

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 5 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 5.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem této práce je porovnat senzitivitu dvou základních histochemických barvení k průkazu *Helicobacter pylori*. Jedná se o impregnační metodu dle Warthin-Starryho a modifikovaného barvení dle Giemsy.

## **6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

1. Které barvení je senzitivnější k průkazu *Helicobacter pylori* ve tkáni sliznice žaludku?
2. Které faktory ovlivňují výsledek?

## **7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

Archivní parafinové bloky tkáně s histologicky potvrzenou diagnózou gastritidy způsobenou mikroorganismem *Helicobacter pylori* v počtu 35 vzorků.

## 8 METODIKA PRÁCE

### 8.1 Příkrajování materiálu

Po odběru vzorku, jeho fixování ve fixační tekutině a doručení do laboratoře, dochází k jeho příkrajování. Příkrajováním jsou z materiálu vybrány důležité části nebo je vzorek rozdělen na části menší. Po přikrojení jsou vzorky vloženy do biokazet pro další zpracování.

Příkrajování vzorků probíhá na příkrajovacím stanovišti. Musí zde být přítomen příkrajovací stůl a odťah, díky kterému nepronikají páry formaldehydu do místnosti. Stůl je vybaven umyvadlem, výlevkou a diktafonem, případně i fotoaparát, pro provedení popisu materiálu lékařem.

Materiál, který po přikrojení zbude, je ukládán do kovových skříní s odtahem, aby mohl být případně ještě použit.

### 8.2 Odvodnění a prosycení materiálu

Abychom vzorek v biokazetě mohli prosytit parafinem, musíme ho nejdříve zbavit vody. Principem odvodnění je nahrazování vody ve vzorku pomocí vzestupné řady alkoholů. Před ponořením do alkoholu je materiál naložen ve 4% pufrovaném formolu. Následně je vkládán do lázní 70%, 80% a dvou lázní 96% ethanolu. Postupné zvyšování koncentrace alkoholu je nutné pro postupné vytěsňování vody ze tkání. Při použití pouze vysoce koncentrovaného ethanolu by mohlo dojít ke smrštění a ztuhnutí tkání.

Po odvodnění tkání je nutné zbavit je ethanolu, protože v něm je parafin nerozpustný. Odstranění ethanolu probíhá v lázni acetonu. Následují dvě lázně xylenu, který je látkou rozpouštějící parafin.

Pokud je tkáň prosycena xylenem, můžeme ji prosytit parafinem. To probíhá ve dvou až třech lázních parafinu, který je rozpuštěný při teplotě 56 až 58°C. Tím se tkáň plně prosytí a dojde k jejímu zakonzervování.

Ve většině histologických laboratoří všechny tyto kroky probíhají v přístroji zvaném autotechnikon. V něm jsou biokazety se vzorky umístěny v kovových koších, které jsou zavěšeny nad zásobníky tekutin. Vzorky větší, které potřebují delší čas na prosycení, jsou přesouvány mezi tekutinami v intervalu dvou hodin, vzorky menší jsou přesouvány po hodině. V přístroji je po celou dobu procesu navozeno vakuum. Vzorky jsou přístrojem připraveny na další zpracování za 12–24 hodin.

### 8.3 Zalévání do parafinu

Zalévání probíhá na speciálním přístroji, který se nazývá zalévadlo. Do formičky se pomocí přístroje nalije rozehřátý parafin a následně se do něj vloží vzorek tkáně. Zalévací přístroj má část, která je zahřívána. Na této části mohou být vzorky v parafinu upravovány, protože teplo udržuje parafin tekutý. Další částí přístroje je chladicí deska, na kterou jsou formičky se vzorky přesunuty, aby došlo k zatuhnutí tkáně do parafinu. Poté na formičku nasadíme původní kazetku, která je označena číslem a přilijeme další parafin, aby kazetka byla naplněna po okraj. Naplněnou formičku přesuneme na chladicí desku a necháme zatuhnout parafin. Nakonec vyjmeme zatuhlý bloček z formičky, očistíme ho od nadbytečného parafinu a uchováme ho na mrazících podložkách nebo v mrazáku, než bude dále zpracován.

### 8.4 Krájení bločků se vzorky

Abychom mohli tkáně prohlížet v mikroskopu, musí být nakrájeny na tenké řezy. Ke krájení využíváme mikrotom. Tento přístroj může nakrájet bloček i na řezy tenké několik tisícín milimetru. Pro běžnou praxi se krájí řezy silné 2–4  $\mu\text{m}$ . Pro různá speciální barvení mohou být krájeny řezy silnější nebo slabší.

V současnosti máme dva druhy mikrotomů. Sáňkový mikrotom, u kterého je pohyblivá část se žiletkou a bloček je pevně ukotven. Druhým typem je mikrotom rotační, kde je nůž stabilní a pohybuje se bloček uchycený svorkou.



Při krájení musí být bločky vychlazené, k udržení jejich nízké teploty se používají chladicí desky nebo kusy suchého ledu. *Obrázek 4 - Krájení tkáňových bločků*  
*Zdroj: vlastní*

### 8.5 Napínání řezů na podložní skla

Pro napínání řezů na podložní mikroskopická skla používáme studenou a teplou vodu. Po ukrojení jsou řezy nejdříve umístěny do velké Petriho misky se studenou vodou. Díky studené vodě můžeme řezy oddělovat, rovnat a vypínat, k tomu používáme preparační

jehly. Když máme řezy upravené, přesuneme je do vody o teplotě 47–49°C. Řezy se na hladině teplé vody plně napnou a narovnají. Následně je můžeme uchytit na podložní skla, u čehož si opět pomáháme preparačními jehlami.

Ve velkých rutinních provozech, kde jsou denně stovky vzorků ke zpracování, se proces urychluje napínáním řezů rovnou v teplé vodě. V provozech menších se používá studená a následně teplá voda.

## 8.6 Barvení preparátů

Před barvením musíme preparáty zbavit parafinu, protože většina barviv jsou vodné roztoky. Odparafinování začínáme několika lázněmi xylenu. Následuje sestupná řada ethanolů – dvě lázně 96% ethanolu a dále po jedné lázni 80% a 70% ethanolu.

### 8.6.1 Barvení dle Giemsy

Roztok Giemsy se skládá z několika barev, kterými jsou methylenová modř, eozin a azur B. Při barvení dochází k absorpci barviva organickými strukturami.

Giemsův roztok je do laboratoří dodáván již připravený. Roztok nalijeme do kyvety a ponoříme do něj skla s odparafinovanými preparáty na dobu 40 minut. Po uplynutí této doby skla oplachujeme v destilované vodě, dokud se nezbavíme veškerých zbytků barviva. Oplach provádíme ve více kyvetách. Takto obarvené



Obrázek 5 - Kyvety Giemsovo barvení

Zdroj: vlastní

preparáty musíme diferencovat v deionizované vodě s několika kapkami ledové kyseliny octové. Diferenciací dochází k rozlišení buněčných struktur. Poté znovu oplachujeme destilovanou vodou. Finálním krokem je ponoření preparátů do lázně 70% alkoholu a následně 80% alkoholu, čímž se zahájí proces odvodnění.

Preparáty obarvené Giemsovým roztokem mají jádra buněk zbarvena sytě modře až fialově, ostatní struktury jsou světle modré. Při použití k diagnostice *Helicobacter pylori*, se tato bakterie zvýrazní modrou barvou.



### 8.6.2 Impregnační metoda Warthin-Starry

Tato metoda využívá stříbření, při kterém dochází k redukci stříbra na jeho elementární podobu. Redukcí stříbra dochází ke zvýraznění požadovaných struktur černou barvou.

Pro tuto metodu si musíme připravit několik roztoků. Prvním je kyselá voda, kterou získáme smícháním 2400 mililitrů s 1,6 mililitry 1% roztoku kyseliny citronové. Kyselou vodu potřebujeme pro přípravu všech dalších roztoků. Jedním je 2% roztok dusičnanu stříbrného. Ten připravíme smícháním 1 gramu dusičnanu stříbrného s 50 mililitry kyselé vody. Dále potřebujeme roztok hydrochinonu, na který použijeme 0,15 gramu hydrochinonu a 100 mililitrů kyselé vody. Dalším roztokem je roztok želatiny. Ten získáme smícháním 3,75 gramů želatiny a 75 mililitrů kyselé vody. Posledním roztokem je vývojka, pro kterou pou-

žijeme všechny již připravené roztoky. Před použitím na vývojku musí být všechny roztoky ohřáté na 56°C. Pro roztok vývojky smícháme 30 mililitrů 2% roztoku dusičnanu stříbrného, 40,5 mililitrů roztoku hydrochinonu a 75 mililitrů roztoku želatiny. Vývojku připravujeme až těsně před použitím.



Obrázek 6 - Příprava roztoků Warthin-Starry

Zdroj: vlastní

Samotné barvení začíná naložením preparátů do kyselé vody na dobu 5 minut. Poté se sklíčka ponoří do 2% roztoku dusičnanu stříbrného, který musí být ohřátý na 56°C. Impregnace probíhá v termostatu, aby se udržela teplota roztoku, 45 minut. Po uplynutí doby impregnace se sklíčka musí dvakrát až třikrát propláchnout v teplé vodě a následně přelit vývojkou. Vývojku necháváme působit 2 až 4 minuty. Posledním krokem je opět proplach v teplé vodě, nejlépe o 50°C. Proplach provedeme dvakrát až třikrát.

Výsledkem této metody jsou hnědě zbarvená jádra buněk, žlutá cytoplazma buněk a v našem případě černě zvýrazněn *Helicobacter pylori*.

## 8.7 Odvodnění a montování preparátů

Obarvené řezy musíme nejdříve odvodnit, abychom je mohli uzavřít mezi podložní a krycí sklička. Odvodnění probíhá vzestupnou řadou alkoholů, lázní acetonu a dvěma lázněmi xylenu.

Po odvodnění můžeme preparáty montovat mezi podložní a krycí skličko. Pro uzavírání používáme montovací médium. Toto médium musí být dokonale průhledná látka, která má vysoký index lomu světla a nepoškodí zbarvení tkáně. V našem případě byl montovacím médiem Pertex, který je rozpustný v xylenu.

V některých laboratořích mají dostupný montovací přístroj, který uzavírá preparáty.

## 8.8 Hodnocení ve světelném mikroskopu

Posledním krokem je hodnocení vzorků, které je prováděno pomocí světelného mikroskopu. Hodnocení provádí specializovaný lékař.

Světelný mikroskop využívá viditelné světlo. Mikroskop je složen ze stativu mikroskopu, ve kterém je zasazen zdroj světla s kondenzorem. Ve většině mikroskopů je jako zdroj světla využívána klasická nebo halogenová žárovka. Další částí je tubus s revolverovým měničem objektivů a držák osvětlovací soustavy. Na výběr máme z několika objektivů, největší má stonásobné zvětšení. Další částí jsou okuláry, které mají desetinásobné zvětšení.

Největší zvětšení je tisícinásobné, u kterého musíme použít imerzní olej, abychom sjednotili indexy lomu světla. Rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je přibližně  $0,25 \mu\text{m}$ .



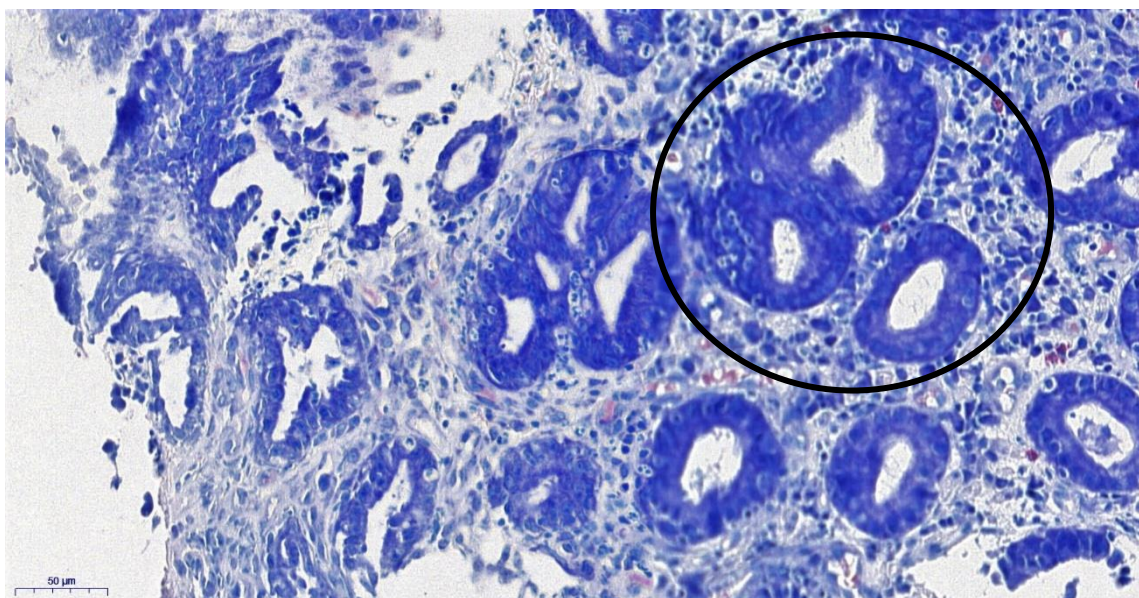
Obrázek 7 - Pozorování v mikroskopu

Zdroj: vlastní

## **9 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

Vzorky byly hodnoceny ve světelném mikroskopu. Každý vzorek byl prohlížen třemi hodnotiteli – mnou, další studentkou a vedoucím práce. Naším úkolem bylo vybrat si v každém vzorku tři žaludeční žlázky, které jsou nejvíce osídleny bakterií *Helicobacter pylori* a následně jednotlivé bakterie spočítat. Tyto data budou dále zpracovávána pro zhodnocení rozdílu mezi jednotlivými barvenými.

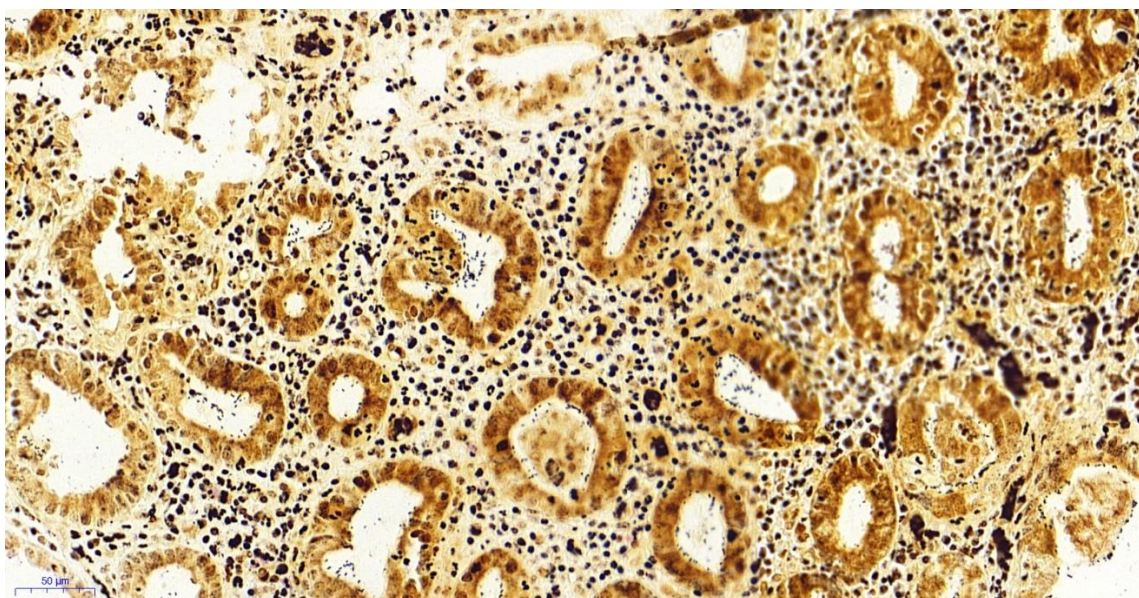
## 9.1 Výsledky barvení



Obrázek 8 - Výsledek barvení Giemsa

Zdroj: vlastní

Na obrázku můžeme vidět bakterie *Helicobacter pylori* ve žlázkách žaludku. Bakterie jsou obarveny světle modrou barvou, a proto nejsou snadno rozlišitelné.



Obrázek 9 – Výsledek barvení Warthin-Starry

Zdroj: vlastní

Na obrázku jsou viditelné bakterie *Helicobacter pylori*, které osidlují žaludeční žlásky. Bakterie jsou zbarveny sytou hnědou až černou barvou.

## 9.2 Hodnocení preparátů

Tabulka obsahuje počty bakterií ve žlázkách.

Tabulka 1 - Počty bakterií *Helicobacter pylori*

	vzorek (-Ž)	hodnotitel: Brumovská		hodnotitel: Lomozová		hodnotitel: Ondič	
		Giemsa	Warthin-Starry	Giemsa	Warthin-Starry	Giemsa	Warthin-Starry
1	740/20-1	27	108	74	184	52	150
2	740/20-2	11	60	31	109	21	100
3	1651/20-1	20	38	22	135	21	25
4	1651/20-2	16	135	14	67	10	87
5	2150/20	3	47	36	152	10	120
6	2706/20-1	0	0	0	0	0	0
7	2706/20-2	0	0	0	0	0	0
8	2706/20-3	6	19	0	0	0	0
9	3139/20-1	0	0	0	0	0	0
10	3139/20-2	104	82	74	111	90	51
11	3142/20-1	0	0	0	0	0	0
12	3142/20-2	0	30	0	2	0	0
13	3142/20-3	2	9	12	4	5	0
14	3142/20-4	16	27	34	38	15	31
15	3345/20	27	30	17	34	25	34
16	3695/20-1	71	79	34	162	58	130
17	3695/20-2	79	82	146	171	102	166
18	4286/20	40	136	83	263	62	174
19	5496/20	44	73	53	115	47	94
20	5675/21	81	63	76	120	80	120
21	6779/20	6	14	11	26	7	24
22	6868/21-1	12	21	27	59	19	48
23	6868/21-2	18	27	12	21	15	26
24	6868/21-3	9	14	8	21	5	18
25	8903/20	14	113	77	107	3	31
26	10714/20	77	104	116	158	85	147
27	11701/21-1	13	85	17	63	15	80
28	11701/21-2	18	45	15	52	15	50
29	11989/20	2	6	16	47	0	2
30	13750/20-1	220	229	171	310	20	270
31	13750/20-2	28	93	104	246	14	100
32	13864/20	20	85	28	127	20	86
33	14353/20	56	107	44	130	0	0
34	14532/20-1	0	0	0	0	25	52
35	14532/20-2	14	37	56	71	50	109

### 9.3 Analýza vzorků

Analýza vzorků byla provedena pomocí Studentova t-testu. Studentův t-test je metoda matematické statistiky. Existují dva druhy t-testu – jednovýběrový a dvouvýběrový. Jednovýběrový t-test porovnává základní soubor, u kterého známe střední hodnotu a výběrový soubor. U dvouvýběrového t-testu porovnáváme dva soubory výběrové. (17)

V našem případě jsme využili dvouvýběrový t-test. Pomocí tohoto druhu t-testu můžeme určit, jak významný je rozdíl mezi skupinami dat. K tomu využívá t-statistiku a porovnává ji s t-distribucí. V konečném výsledku t-test určí, zda jsou rozdíly souborů dat statisticky významné. Dvouvýběrový Studentův t-test je vhodný pouze pro porovnávání dvou skupin dat. (18; 19)

Pro hodnocení se používá výpočet t-skóre, které je poměrem mezi rozdíly dvou hodnocených skupin dat. Nejobecnějším vzorcem pro výpočet t-skóre se skládá ze dvou průměrů ( $M_1$  a  $M_2$ ) a celkové standardní chyby (SE) dvou vzorků:  $t = \frac{M_1 - M_2}{SE}$ . Čím větší je  $t$ , tím větší je rozdílnost mezi soubory. (18; 19)

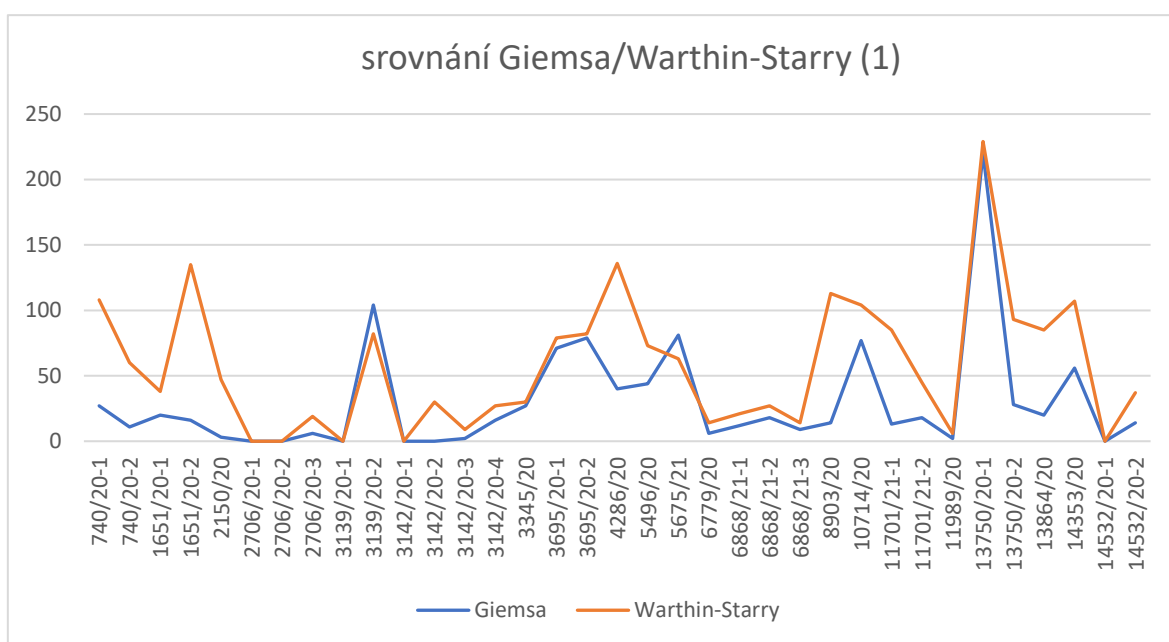
Pro výpočet t-skóre existují kalkulačky dostupné na různých webových stránkách. Dle propracovanosti kalkulačky získáme hodnocení testu. Některá zpracování nám poskytnou jen vypočtené t-skóre, některá lepší poskytují hodnoty směrodatné odchylky, chyby měření, průměrů obou sad dat a t-skóre.

### 9.3.1 Hodnotitel 1

Tabulka 2 - Výsledky t-testu I

t-test	Brumovská	
	Giemsa	Warthin-Starry
M	30,11	57,09
SD	43,09	51,19
SE	11,310	
t	<b>2,3847</b>	

Dle výsledku Studentova t-testu je rozdíl mezi soubory statisticky významný. Hodnota t určuje, že jeden soubor dat je 2,3847krát rozdílnější než druhý soubor. Tento výsledek byl očekávaný, data jsou na první pohled rozdílná, což dokazuje i graf.



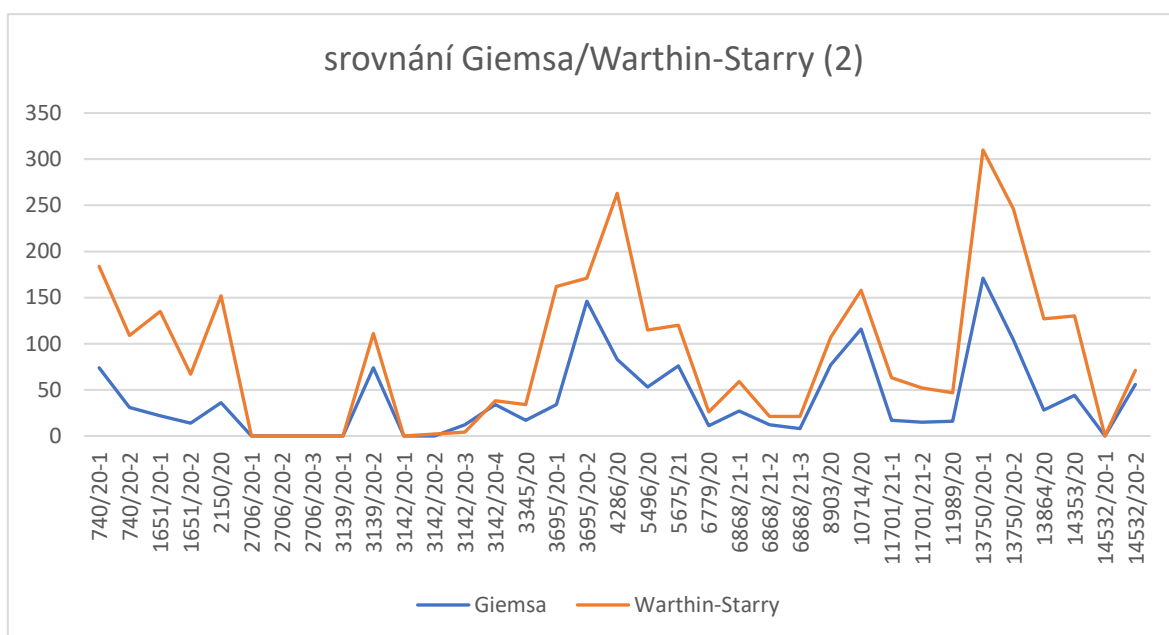
Graf 1 - Srovnání barvení I

### 9.3.2 Hodnotitel 2

Tabulka 3 - Výsledky t-testu II

t-test	Lomozová	
	Giemsa	Warthin-Starry
M	40,23	88,71
SD	43,35	81,95
SE	15,671	
t	<b>3,0940</b>	

Výsledky t-testu opět vyhodnotily rozdíl mezi soubory dat jako statisticky významný. Odlišení jednoho souboru od druhého je 3,0940krát. Tento výsledek byl očekávaný, je prokazatelný i z grafu.



Graf 2 - Srovnání barvení II

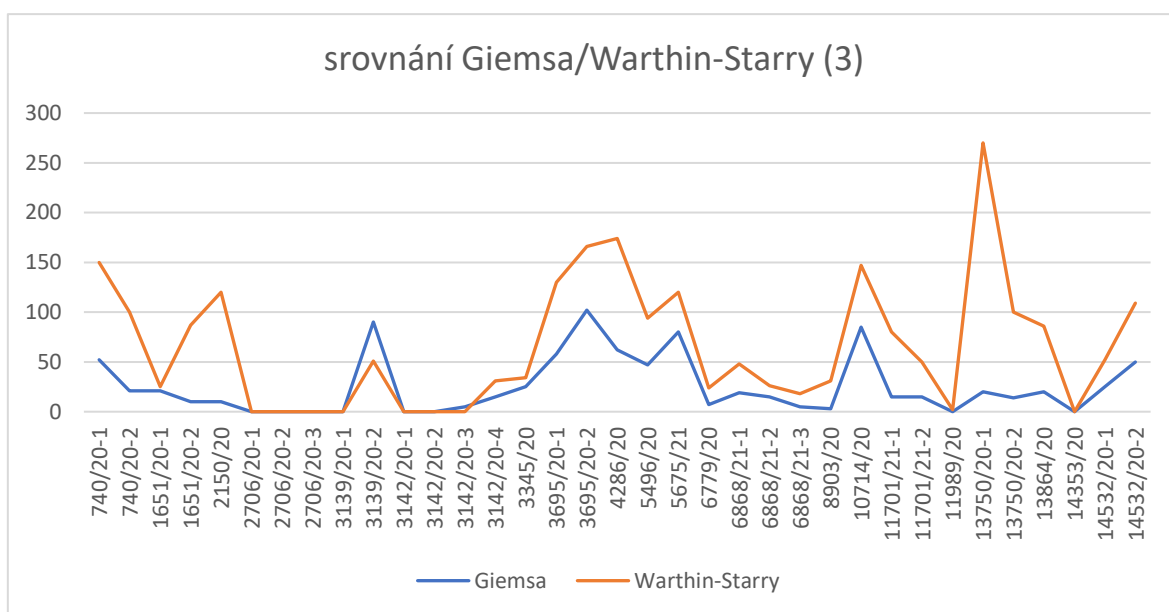


### 9.3.3 Hodnotitel 3

Tabulka 4 - Výsledky t-testu III

t-test	Ondič	
	Giemsa	Warthin-Starry
M	25,46	66,43
SD	29,09	64,98
SE	12,034	
t	<b>3,4046</b>	

Rozdíl mezi průměry souborů je opět statisticky významný. Soubory se liší 3,4046krát. O takovém výsledku opět hovoří graf, ze kterého je viditelná rozdílnost dat.



Graf 3 - Srovnání barvení III

## DISKUZE

Dle analýzy a hodnocení vzorků je pro průkaz infekce *Helicobacter pylori* senzitivnější histologická metoda impregnace Warthin-Starry. Tato metoda je senzitivnější proto, že lépe zvýrazní jednotlivé bakterie. Díky tmavému zvýraznění bakterií se infekce snadněji prokazuje a bakterie se snadněji počítají. Hodnotitel identifikuje více bakterií. Tím se zvyšuje senzitivita metody.

Specifitu mají obě metody podobnou. U obou metod dochází k obarvení bakterií *Helicobacter pylori*, a proto můžeme přítomnost bakterie prokázat. Jednotlivá barvení se liší pouze barvou, kterou jsou obarveny bakterie.

Ve většině případů bylo nalezeno více bakterií u stříbrící metody Warthin-Starry. V pár případech bylo nalezeno více bakterií u metody barvení dle Giesmy. Tyto výjimky mohly být způsobeny zkrajováním tkáňového bloku, kdy bylo více prokazatelných bakterií ve vrstvě bločku, která byla použita pro metodu dle Giemsy.

U jednotlivých hodnotitelů se liší konkrétní počty nalezených bakterií. Tato variabilita je známa z hodnocení mnoha jiných barvení, či histologických parametrů. Z toho důvodu vzorky hodnotily 3 hodnotitelé nezávisle. K určení významnosti rozdílů v počtech bakterií nalezených s použitím dvou různých barvení byla použita objektivní statistická metoda Studentův t-test a to samostatně pro každého hodnotitele.

Z provozního hlediska u histochemických metod je potřeba hodnotit i snadnost jejich provedení, časovou náročnost a možnost automatizace. V těchto ohledech je vhodnější metoda barevná dle Giemsy. Roztok pro barvení je vyráběn ve firmách a hotový dodáván do laboratoří. Časově tato metoda náročná není, barvení společně s oplachem a diferenciací zabere přibližně hodinu. Automatizace by pravděpodobně byla možná v barvicím stroji.

V současnosti se pro průkaz *Helicobacter pylori* používají i imunohistochemické metody založené na reakci antigen – protilátka. O srovnání imunohistochemických metod a impregnační metody Warthin-Starry byla vypracována bakalářská práce na Masarykově univerzitě. V této bylo zhodnoceno, že tyto metody mají vyšší senzitivitu i specifitu. Dále je možné je standardizovat, automatizovat a jsou dostupné elektronické kontroly postupu. Jedinou nevýhodou imunohistochemických metod je jejich finanční náročnost.

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zejména porovnat senzitivitu dvou histologických barvení pro průkaz bakterie *Helicobacter pylori* ve sliznici žaludku počítáním přítomných bakterií v terénu chronické gastritidy. Jednalo se o barvení dle Giemsy a impregnační metodu Warthin-Starry.

V teoretické části byl popsán žaludek z hlediska anatomie, histologie a fyziologie, onemocnění žaludku. Dále zde byl věnován prostor popisu bakterie *Helicobacter pylori* a její laboratorní diagnostice.

Praktická část byla zaměřena na porovnání dvou histologických barvení. Byla popsána metodika práce od zpracování vzorků až po jejich barvení a montování. Byl popsán princip Studentova t-testu, kterým byla zpracována data. Výsledky porovnání metod byly zpracovány do tabulek a podloženy grafy.

Bylo zjištěno, že hodnotitel mikroskopicky identifikuje statisticky významně vyšší počet mikroorganismů *H. pylori*, pokud je bioptický vzorek žaludeční sliznice obarven metodou Warthin-Starry ve srovnání s barvením dle Giemsy. Práce tak jednoznačně prokazuje vyšší senzitivitu impregnační metody Warthin-Starry pro průkaz infekce *Helicobacter pylori*.

## SEZNAM LITERATURY

1. **HUDÁK, Radovan.** *Memorix anatomie.* Plzeň : autor neznámý, 2020.
2. **ČIHÁK, Radomír.** *Anatomie 2.* Praha : Avicenum, 1988. ISBN 80-060-88.
3. **JUNQUEIRA, Luiz Carlos, CARNEIRO, José a KELLEY, Robert O.** *Základy histologie.* Jinočany : H & H, 1997. 80-85787-37-7.
4. **DYLEVSKÝ, Ivan.** *Funkční anatomie.* Praha : Grada, 2009. 978-80-247-3240-4.
5. **LÜLLMANN-RAUCH, Renate.** *Histologie.* Praha : Grada, 2012. 978-80-247-3729-4.
6. **MILLS, Stacey, E. and colleagues.** *Histology for pathologists.* Philadelphia : LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER Business, 2012. 978-1-4511-1303-7.
7. **MOUREK, Jindřich.** *Fyziologie.* Praha : Grada, 2012. 978-80-247-3918-2.
8. **ROKYTA, Richard.** *Fyziologie a patologická fyziologie.* Praha : Grada, 2015. 978-80-247-4867-2.
9. **KITTNAR, Otomar.** *Lékařská fyziologie.* Praha : Grada, 2020. 978-80-247-1963-4.
10. **KUMAR, Vinay, MBBS, MD, FRCPath, ABBAS, Abul, K., MBBS a FAUSTO, Nelson, MD.** *Pathologic basis of disease.* Philadelphia : Elsevier Saunders, 2005. 0-8089-2302-1.
11. **MAČÁK, Petr a MAČÁKOVÁ, Jana.** *Patologie.* Praha : Grada, 2022. 978-80-271-3507-3.
12. **BÁRTOVÁ, Jarmila.** *Přehled patologie.* Praha : Karolinum, 2021. 978-80-246-4775-3.
13. **VOTAVA, Miroslav a kolektiv.** *Lékařská mikrobiologie, vyšetřovací metody.* Brno : NEPTUN, 2010. 978-80-86850-04-8.
14. **BEDNÁŘ, Marek a spol.** *Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie.* Praha : Marvil, 1996. 978-80-2380-297-9.

15. **SCHINDLER, Jiří.** *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů.* Praha : Grada, 2010. 978-80-247-3170-4.
16. **ZIMA, Tomáš.** *Laboratorní diagnostika.* Praha : Galén, 2013. 978-80-7492-062-2.
17. **Parametrické testy - Studentův t-test.** *Veterinární univerzita Brno.* [Online] [Citace: 19. 1 2023.] <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn3/ttest.htm>.
18. **T Test (Student's T-Test): Definition and Examples.** *Statistics How To.* [Online] [Citace: 19. 1 2023.] <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/t-test/>.
19. **T test calculator.** *GraphPad.* [Online] [Citace: 19. 1 2023.] <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>.

## **SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha A – Pracovní postup ŠÚP FN Plzeň – Giemsa
- Příloha B – Pracovní postup ŠÚP FN Plzeň – Warthin-Starry

# Příloha A – Pracovní postup ŠÚP FN Plzeň – Giemsa

Pracovní postup zkrácený PPZ/SUP/036/05

## Giemsovo barvení sternálních punkcí

Účinnost od:	28. 1. 2022	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	Prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.	Garant:	Prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.
Rozsah působnosti:	ŠÚP FN Plzeň/Zdravotní laboranti a laboratorní asistenti		

Po vytisknutí je dokument platný jen po označení razítkem správce dokumentů „Kopie platná do:“, jinak se jedná o neřízený dokument.

### Účel:

Průkaz krevních elementů v kostní dřevě v parafinových řezech

### Postup:

1. odparafinovat
2. opláchnout v deionizované vodě
3. barvit roztokem Giemsy 40 min
4. opláchnout v deionizované vodě
5. diferencovat ve 400ml deionizované vody + 8 kapek kyseliny octové do růžového zbarvení
6. opláchnout deionizovanou vodou
7. odvodnit, projasnit
8. montovat

Body č. 1 - 4 lze provést v barvicím automatu, dle příslušného programu.

### Výsledek barvení:

Jádra modrá, cytoplazma růžová, granula eosinofilních granulocytů červená, granula mastocytů tmavě modrá

### Příprava roztoků:

Pracovní roztok Giemsy:

40 ml základního roztoku Giemsy + 360 ml deionizované vody

Základní roztok Giemsy:

Používáme hotový roztok od firmy Merck

Všechny úsy a teploty uváděné v PPZ jsou pouze orientační a důležitá je kontrola pod mikroskopem, neboť barvení každé tkáně je individuální.

Ověřil: Petra Vopelková Načeradská, DiS	Správce dokumentů: Eva Kaslová Al2740	Zpracoval/datum: Petra Vopelková Načeradská, DiS, 20.1.2022	Schválil/datum: Prof. MUDr. Michal Michal 21.1.2022
---	--	---	---

# Příloha B – Pracovní postup ŠÚP FN Plzeň – Warthin-Starry

Pracovní postup zkrácený PPZ/SUP/018/05

## Impregnační metoda Warthin-Starry

Účinnost od:	7. 9. 2020	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	Prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.	Garant:	Prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.
Rozsah působnosti:	ŠÚP FN Plzeň/Zdravotní laboranti a laboratorní asistenti		

Po vytisknutí je dokument platný jen po označení razítkem správce dokumentů „Kopie platná do:“, jinak se jedná o neřízený dokument.

### Účel:

Průkaz *Helicobacter pylori* v parafinových řezech

### Postup:

1. odparafinovat
2. naložit do roztoku kyseliny citronové na 5 minut
3. impregnovat ve 2% roztoku AgNO<sub>3</sub> při 56°C (termostaf) 45 minut
4. práť v horké vodě
5. přelit vývojkou na 2-4 minuty, nutná kontrola pod mikroskopem
6. práť v horké vodě
7. odvodnit, projasnit
8. montovat

Bod č. 1 a 7 lze provést v barvicím automatu.

### Výsledek barvení:

*Helicobacter pylori* hnědožemě

### Příprava roztoků:

roztok kyseliny citronové:

deionizovaná voda.....2400 ml  
1% roztok kyseliny citronové.....1,6 ml

2% roztok AgNO<sub>3</sub>:

AgNO<sub>3</sub> .....1 g  
kyselá voda.....50 ml

roztok hydrochinonu:

hydrochinon .....0,15 g  
kyselá voda.....100 ml ( uchovávat v lednici )

roztok želatiny:

želatina .....1,25 g  
kyselá voda.....25 ml

vývojka:

2% roztok AgNO<sub>3</sub>.....10 ml  
roztok hydrochinonu.....13,5 ml  
roztok želatiny.....25 ml

1 nepřipravovat předem !

všechny roztoky se dají předeheřt do termostatu (56°C)

Všechny časy a teploty uváděné v PPZ jsou pouze orientační a stáčí se kontrola pod mikroskopem, neboť barvení každé tkáně je individuální.

Ověřil: Petra Vopalková Načeradská	Správce dokumentů: Eva Kaslová, M.2740	Zpracovatel: Prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D./ 1.9.2020	Schválil/datum: Prim. MUDr. Petr Mukentnátl, Ph.D./ 2.9.2020
---------------------------------------	---	---	--