



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Diagnostika *Helicobacter pylori* pomocí
histologického a imunohistochemického
vyšetření**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Anna Burdová

Vedoucí práce: Mgr. Michala Velková

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Diagnostika Helicobacteria pylori pomocí histologického a imunohistochemického vyšetření*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí této práce Mgr. Michale Velkové za velmi cenné a užitečné rady, za vstřícnost a trpělivost. Děkuji také celému personálu na Oddělení patologicko-anatomickém Nemocnice Písek a.s. za umožnění práce v laboratoři. Poděkování patří i mé rodině za podporu v psaní bakalářské práce.

Diagnostika *Helicobacter pylori* pomocí histologického a imunohistochemického vyšetření

Abstrakt

Hlavním tématem této bakalářské práce je bakterie *Helicobacter pylori* (HP), její výskyt v žaludeční sliznici a způsob její diagnostiky v laboratoři pomocí histologického a imunohistochemického vyšetření.

V teoretické části se zabývám samotnou bakterií, její morfologií a hlavně diagnostikou. Způsobů, jak zjistit přítomnost této bakterie, je mnoho, nejčastější rozdělení je na invazivní testy, kam řadíme histologické vyšetření, kultivaci a ureázový test, a neinvazivní testy, kde můžeme využít sérologii a dechové testy. Popisuji zde také anatomii a histologickou stavbu žaludku a poté navazuji na patologii žaludku, kde jsem se zaměřila na nejčastější onemocnění způsobené *Helicobacterem pylori*, akutní a chronické gastritidy a nádory žaludku. Je zde zahrnut celý proces histologického vyšetření, od příjmu vzorku na oddělení, přes fixaci s příklady různých fixačních prostředků, k zalévání, krájení a barvení, kde popisuji i druhy barvení, které jsou využité v praktické části. Na konci teoretické části se zabývám i tématem imunohistochemie.

Jedním z cílů praktické části je osvojení si základního rutinního barvení Hematoxylin eosin, speciálního barvení Giemsa a imunohistochemického vyšetření antigenu pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*. Dalším cílem je zmapování výskytu infekce *Helicobacter pylori* dle věkových skupin, pohlaví vyšetřovaných pacientů a ročního období. Stanovila jsem si dvě výzkumné otázky, které bych ráda zodpověděla.

Výsledky vyšetření 38 žaludečních biopsií získaných v roce 2022 budou statisticky zpracovány a doplněny mikrofotografiemi vybraných vzorků.

Klíčová slova

Helicobacter pylori; histologie; Giemsa; imunohistochemie; žaludek; gastritida; histologické vyšetření

Diagnostics of *Helicobacter pylori* using histological and immunohistochemical examination

Abstract

The main topic of this bachelor thesis is the bacterium *Helicobacter pylori*, its occurrence in the gastric mucosa, and the method of its diagnosis in the laboratory using histological and immunohistochemical examination.

In the theoretical part, I describe the bacterium itself, its morphology and mainly its diagnostics. There are many ways to detect the presence of this bacterium, most commonly divided into invasive tests, which include histological examination, cultivation and urease test, and non-invasive, where we can use serological and breathing tests. I also describe the anatomy and histological structure of the stomach in this part. Then I follow up on stomach pathology, where I focused on the most common diseases caused by *Helicobacter pylori*, acute and chronic gastritis and stomach tumors. The over-all histological examination is also included, its parts being receiving the sample to the department through fixation with examples of various fixation agents, to embedding, cutting and staining, where I also describe the types of staining that are used in the practical part. I also deal with the topic of immunohistochemistry.

One of the goals of the practical part is to master the basic routine Hematoxylin eosin staining, special Giemsa staining and immunohistochemical examination of the antigen using the Anti-*Helicobacter pylori* polyclonal antibody. Another goal is to map the occurrence of *Helicobacter pylori* infection based on age groups, sex of examined patients and season. I set two research questions that I would like to answer.

Results obtained in the year 2022 will be statistically processed and supplemented with photomicrographs of selected samples.

Key words

Helicobacter pylori; histology; Giemsa; immunohistochemistry, stomach; gastritis; histological examination

Obsah

Úvod	9
1 Současný stav	10
2 <i>Helicobacter pylori</i>	11
2.1 Morfologie.....	11
2.2 Kultivace.....	12
2.3 Patogenita	12
2.4 Epidemiologie.....	12
2.5 Terapie	12
2.6 Prevence.....	12
3 Anatomie žaludku	14
4 Histologická stavba žaludku	15
4.1 Sliznice.....	15
4.1.1 Žlázy.....	15
4.2 Podslizniční vazivo.....	16
4.3 Zevní vrstva svalová	16
4.4 Seróza.....	16
5 Patologie žaludku a onemocnění způsobená <i>H. pylori</i>	17
5.1 Poruchy sekreční činnosti	17
5.2 Peptidické vředy.....	17
5.3 Gastritida.....	17
5.3.1 Akutní gastritida	17
5.3.2 Chronická gastritida	18
5.4 Nádory žaludku	18
5.4.1 MALT (mucosa-associated lymphoid tissue).....	18
5.4.2 GIST (gastrointestinální stromální tumor)	19
6 Diagnostika <i>Helicobacter pylori</i>	20
6.1 Neinvazivní metody.....	20
6.1.1 Sérologie.....	20
6.1.2 Dechový test.....	20
6.1.3 Detekce antigenu ve stolici	20
6.2 Invazivní metody	21
6.2.1 Histologie	21
6.2.2 Ureázový test	21
6.2.3 Kultivace.....	21

7	Teorie histologického vyšetření	22
7.1	Odběr materiálu	22
7.2	Fixace.....	22
7.3	Fyzikální fixační prostředky	22
7.4	Chemické fixační prostředky	23
7.5	Formol	23
7.6	Kyselina pikrová	23
7.6.1.1	Sloučeniny těžkých kovů	23
7.6.1.2	Organické kyseliny.....	24
7.7	Zalévání	24
7.7.1	Média rozpustná ve vodě.....	24
7.7.2	Média nerozpustná ve vodě.....	24
7.7.3	Zalévací a odvodňovací automaty.....	24
7.8	Krájení	25
7.9	Barvení	25
7.9.1	Hematoxylin eosin.....	25
7.9.2	Giemsa.....	25
7.10	Montování řezů.....	25
7.11	Mikroskopování.....	26
8	Imunohistochemie	27
8.1	Antigen	27
8.2	Protilátka.....	27
8.2.1	Primární protilátky	27
8.2.1.1	Monoklonální protilátky.....	27
8.2.1.2	Polyklonální protilátky.....	28
8.3	Imunohistochemické vyšetření	28
8.3.1	Hodnocení výsledků	29
9	Cíle práce a výzkumné otázky	30
9.1	Cíle práce.....	30
9.2	Výzkumné otázky	30
10	Metodika práce	31
10.1	Charakteristika výzkumného souboru	31
10.2	Odběr a transport na Oddělení patologicko-anatomickém	31
10.3	Příjem vzorku v laboratoři.....	31
10.4	Příprava vzorku před barvením.....	32
10.5	Barvení	32

10.5.1	Barvení Hematoxylin eosin	33
10.5.2	Barvení Giemsa	33
10.6	Imunohistochemické vyšetření	34
10.7	Mikroskopické zhodnocení	35
11	Výsledky	36
11.1	Výskyt infekce Helicobacter pylori v závislosti na věku	37
11.2	Výskyt infekce Helicobacter pylori v závislosti na pohlaví	38
11.3	Výskyt infekce Helicobacter pylori v závislosti na ročním období	39
11.4	Porovnání pozitivních vzorků z hlediska použitých metod diagnostiky	40
12	Diskuse	41
13	Závěr.....	44
14	Seznam použité literatury	45
15	Seznam příloh a obrázků	51
15.1	Seznam obrázků	51
15.2	Seznam příloh.....	52
16	Přílohy	53
16.1	Příloha 1: Data vyšetřovaných pacientů	53
16.2	Příloha 2: Postup zpracování vzorků v histologické laboratoři	57
16.3	Příloha 3: Mikrofotografie vybraných zpracovaných vzorků	64
17	Seznam zkratk	67

Úvod

Infekce, které způsobuje bakterie *Helicobacter pylori*, jsou celosvětově velmi rozšířené, prevalence často přesahuje 50 %. Způsob přenosu je mnohdy nejasný, ale jak se zdá, nejčastějším způsobem je z člověka na člověka. Jistý podíl na výskytu těchto infekcí mají určitě i hygienické podmínky domácností, například život na venkově nebo naopak v uzavřeném panelovém domě, či jakkoliv kontaminované potraviny a pitná voda.

Helicobacter pylori je spirálovitá gramnegativní bakterie, která nejčastěji osidluje žaludeční sliznici. Je příčinou vzniku jak chronických, tak akutních gastritid a je zařazena jako karcinogen první třídy ve vzniku rakoviny žaludku. K diagnostice můžeme využít jednak invazivní, tak neinvazivní testy, kdy se můžeme setkat s histologickým vyšetřením, ale například také s kultivací nebo dechovým testem. Při histologickém vyšetření se dají využít různé barvicí metody, ve většině laboratoří je rutinním barvením Hematoxylin eosin. Zda se jedná o *Helicobacter pylori*, nelze jednoznačně potvrdit pouze z morfologie. K potvrzení přítomnosti *Helicobacter pylori* v žaludeční sliznici se uplatňují speciální barvicí metody, např. Giemsa či barvení Warthin-Starry na bázi dusičnanu stříbrného. V posledních letech je trendem v diagnostice imunohistochemické vyšetření antigenu pomocí primární protilátky Anti-*Helicobacter pylori*.

K léčbě se následně používá kombinace různých antimikrobiálních látek.

1 Současný stav

V dnešní době je *Helicobacter pylori* vnímán jako celosvětový problém. Je hlavní příčinou vzniku nejen chronických gastritid a vředů, ale i rakoviny žaludku. Odhadem se nakazí až polovinu světové populace (Sutton a Mitchell, 2010). Za posledních několik let je ohromujícím znakem rychle klesající prevalence infekce *H. pylori* a to nejen v západním světě, ale i na Dálném východě. Mezi předpokládané příčiny může patřit menší počet rodin, zvýšená hygiena, či větší časový rozestup mezi porodem prvního a druhého dítěte (Tytgat, 2002).

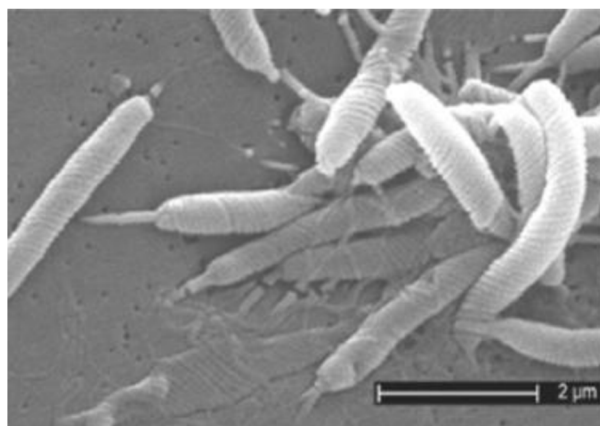
2 *Helicobacter pylori*

Historie této mikroaerofilní pohyblivé prohýbané tyčky je nedlouhá. Donedávna bylo předpokládáno, že díky vysoké kyselosti nemohou v žaludku přežít žádné bakterie. Až australský mikrobiolog Marshall testoval na svém těle hypotézu, že i peptidický vřed může být infekční. Díky tomuto testování byl objeven *Helicobacter pylori*, dříve řazený mezi rod *Campylobacter* (Schindler, 2010). Je to prokázaný karcinogen se vztahem k nádorům žaludku (Votava, 2007).

Kromě *Helicobacter pylori* lze rozlišit i několik dalších bakterií spadajících do tohoto rodu. *Helicobacter cinaedi*, nalezen u bakteremií, které se projeví u lidí nakažených HIV a tuberkulózou, *Helicobacter fennelliae*, nebo *Helicobacter heilmannii* (Votava, 2003).

2.1 Morfologie

Je to štíhlá gramnegativní tyčka, která je špatně barvitelná (Kramář, 2007). Má tvar zahnutých tyček, dlouhých až 3 μm a jsou umístěny v hleu (obr. 1). Bičíky má ve formě trsu na jednom pólu, které jsou na konci paličkovitě rozšířené (Bednář, 1996). Má velkou genetickou variabilitu, kdy některé kmeny mohou být více toxické než jiné. V současnosti je také znám kompletně celý gen této bakterie (Martínek a Špičák, 2000). Jeho specifickou vlastností je schopnost odolat extrémním kyselým podmínkám žaludku (Camilo et al., 2017).



Obr. 1 *Helicobacter pylori* (zdroj: Schindler, 2010)

2.2 *Kultivace*

Je růstově náročný a roste na speciální půdě až tři dny. Štěpí močovinu v žaludeční šťávě na CO₂ a amoniak, který neutralizuje kyselinu chlorovodíkovou (Schindler, 2010). Pro jeho kultivaci se používají půdy obohacené koňskou krví a heminem. Neroste ani za přítomnosti vzduchu ani v anaerobním prostředí. Roste při 37 °C za 5–7 dní. *Helicobacter pylori* nefermentuje ani neoxiduje a je tu výrazná tvorba ureázy, katalázy a oxidázy (Bednář, 1996). Lze ho kultivovat současně na jedné neselektivní půdě, na médiu s přidavkem antibiotik a antimykotik. To se vyplácí u pacientů se sníženou aciditou, kde odebraný vzorek může být kontaminován kvasinkami nebo nefermentujícími bakteriemi. Kolonie jsou nenápadné, drobné s našedlým povrchem, pokud pacient předtím dostal dávku antibiotik. V opačném případě jsou kolonie větší (Votava, 2003).

2.3 *Patogenita*

Tato bakterie je úzce spojena s chronickou gastritidou a žaludečními vředy. Vyskytuje se pouze u lidí, ale byl prokázán původ také u koček. Přenos probíhá pravděpodobně slinami nebo fekálně-orální cestou (Kramář, 2007).

2.4 *Epidemiologie*

Více než 50 % světové populace je postiženo chronickou gastritidou, široce převládá zejména v Asii (Khan et al., 2022). Naopak pokles výskytu rakoviny žaludku a peptidických vředů pokračuje v západní Evropě, Spojených státech a v Japonsku (Hooi et al., 2017). Světová zdravotnická organizace (WHO) zařadila *Helicobacter pylori* do první skupiny jako karcinogen pro adenokarcinom žaludku (Rowland et al., 2006).

2.5 *Terapie*

Helicobacter pylori je citlivý na betalaktamová antibiotika, která jsou bohužel znevýhodněna kyselým pH, vhodné jsou proto makrolidy a nitromidazoly (Bednář, 1996).

2.6 *Prevence*

V posledních letech je nejdiskutovanějším způsobem prevence rakoviny žaludku eradikace bakterie *Helicobacter pylori*, i když zcela výskytu rakoviny nezabrání

(Cheung a Wong, 2008). Diagnostické testy, jako dechové testy nebo detekce antigenu ve stolici, dosahují velmi vysoké senzitivity a specifity, nevýhodou je bohužel cena a časová náročnost. Naopak sérologie je levná a na práci jednoduchá, ale s nižší senzitivitou a specifitou (Wu et al., 2018).

3 Anatomie žaludku

Žaludek (gaster, ventriculus) navazuje na jícen jako dilatovaná neboli rozšířená část trávicí trubice. Funguje jako rezervoár potravy, kterou předběžně zpracovanou předává do tenkého střeva (Čihák, 2013). Hlavní úlohou je přidat kyselý roztok (kyselinu solnou) a hydrolytický enzym (pepsin) k potravě uložené v žaludku a přeměnit ji v chymus (Konrádová et al., 2000). Významně se podílí na zajištění stálosti vnitřního prostředí a na výstavbě organismu (Stříteský, 2001).

Nachází se v dutině břišní pod levou brániční klenbou. Je vysunutý vzhůru pod kostru hrudníku, má tvar zahnutého vaku s levým konvexním okrajem a pravým konkávním okrajem (Čihák, 2013).

Stavbu žaludku můžeme, i přes jeho proměnlivý tvar, funkční stav, polohu, pohlaví a věk, rozdělit na tři části. Místo vstupu jícnu do žaludku neboli kardií (česlo), polokulovitou část žaludku vlevo od vstupu jícnu tvořící dno žaludku – fundus, největší střední část, corpus (tělo) a koncový pylorický oddíl neboli pars pylorica (Dylevský, 2009).

4 Histologická stavba žaludku

Žaludeční stěna se skládá ze sliznice, podslizničního vaziva, zevní vrstvy svalové a z povlaku pobřišnice neboli serózy (Vacek, 1995).

4.1 Sliznice

Vrstva sliznice je přibližně 1 mm vysoká a pokryta 100–200 μm silnou vrstvou hlenu. Ten se skládá ze dvou typů mucinu, které se nachází ve vrstvách a tvoří povlak, který chrání epitel před složkami žaludečních šťáv, které by mohly povrch žaludku poškodit (Lüllmann-Rauch, 2012). Je šedě růžové až načervenalé barvy (Dylevský, 2009).

Sliznice v žaludku je rozdělena rýhami v lehce se vyklenující malá políčka, která jsou rozčleněna na četné prohlubeniny, tzv. žaludeční jamky. Povrch žaludeční sliznice vystýlá jednovrstevný cylindrický epitel. Žaludeční jamky nejsou v jednotlivých částech žaludku stejné, v kardií je nacházíme široké a mělké, v pyloru naopak hluboké a úzké a v těle se směrem od kardií k pyloru prohlubují a zužují. Do jamek ústí jednotlivé žaludeční žlázy (glandulae gastricae propriae), které rozeznáváme dle částí žaludku na žlázy kardií, těla a pyloru. V kardií nacházíme jednoduché až rozvětvené tubulózní, mucinózní žlázy (Vacek, 1995).

4.1.1 Žlázy

V žaludku nacházíme dva typy žláz, a to žlázy žaludeční, které produkují základní složky žaludeční šťávy, a hlenové žlázy, které tvoří hlen chránící povlak sliznice. Žlázy žaludeční jsou tvořeny čtyřmi základními druhy buněk (Dylevský, 2009).

Buňky hlavní vystýlají tělo a dno žlázek a produkují pepsin, enzym štěpící bílkoviny (Dylevský, 2009). Vyskytují se v basálních částech žlázek a mají charakter buněk syntetizujících a secernujících proteiny. Jejich cytoplasma je výrazně basofilní. Produkují také lipázu a hormon leptin (Vajner et al., 2017).

Krycí buňky se vyskytují nejvíce na přechodu krčku a těla žaludečních žlázek. Také se podílejí na tvorbě kyseliny chlorovodíkové (Dylevský, 2009). Jsou vsunuty mezi mucinózní buňky krčků. Jsou větší než okolní buňky a nasedají zevně na ostatní buňky. Mají tvar pyramidy a jsou sférické o průměru 20–30 μm . Obsahují jedno nebo dvě centrálně uložená sférická jádra, cytoplasma je eosinofilní. V klidové fázi jsou na povrchu buňky vyvinuty četné mikrokly, pod buněčnou membránou nacházíme

tubovesikulární struktury. Pokud je buňka stimulovaná, dojde ke splynutí tubovesikulárních struktur s buněčnou membránou a počet mikrokvlků se zvýší (Vajner et al., 2017).

Buňky krčků produkují hlen a obnovuje se z nich epitel žaludeční sliznice (Dylevský, 2009). Vyskytují se jednotlivě nebo v ostrůvcích mezi krycími buňkami v krčcích žlázek. Mají nepravidelný tvar a jádro je uloženo u base buňky. Sekreční granula jsou menší; sférická nebo ovoidní jsou PAS pozitivní (Vajner et al., 2017).

Jednobuněčný typ buněk jsou buňky endokrinní, jsou to buňky s vnitřní sekrecí a vylučují do krve různé hormony (Dylevský, 2009).

Nediferencované kmenové buňky nejsou příliš četné, nacházejí se v oblasti krčků žlázek. Jsou cylindrické, nepříliš vysoké, jejich velká, světlá, oválná jádra jsou uložena v blízkosti base buněk. Vykazují vysokou mitotickou aktivitu. Tyto buňky žijí pouze 3 až 7 dní (Vajner et al., 2017).

4.2 Podslizniční vazivo

Pod sliznicí nacházíme silnou vrstvu podslizničního vaziva s pleteněmi cévními a nervovými (Vacek, 1995). Podslizniční vazivo je řídké a umožňuje sliznici posouvat se při změnách náplně a při žaludečních pohybech (Čihák, 2013).

4.3 Zevní vrstva svalová

Skládá se ze tří vrstev: vnitřní, střední a zevní. Vnitřní vrstva se skládá ze snopců, které probíhají šikmo, vrstva střední je kruhovitě uspořádána a zevní vrstva probíhá podélně (Vacek, 1995). Svalovina umožňuje měnit tvar žaludku díky napětí a při naplňování žaludku vykonává peristaltickou a peristolickou činnost (Čihák, 2013).

4.4 Seróza

Serózní vrstva pokrývá žaludek. Jedná se o vazivovou blánu, která je stejná jako vnitřní list peritonea, na straně stočené do dutiny břišní je pokryta jednovrstevným plochým epitelem (Vacek, 1995). Povlak tvoří hladká, lesklá pobřišnice, která přechází z malé a velké křivatury ve dvojlist malé a velké předstěny (Čihák, 2013).

5 Patologie žaludku a onemocnění způsobená *H. pylori*

Při infekcích *Helicobacter pylori* dochází k rozvoji akutních gastritid, u kterých se zejména projevuje nauzea, zvracení či bolest v epigastriu. U většiny lidí způsobuje antrální gastritidu (Martínek a Špičák, 2000).

5.1 Poruchy sekreční činnosti

Mezi tyto poruchy patří hyperacidita, kdy je zvýšená kyselost žaludeční šťávy. Hypacidita je jejím opakem, nachází se zde snížená kyselost žaludečních šťáv. Dále mezi sekreční poruchy může patřit achlohydrie, kdy chybí kyselina solná v žaludeční šťávě, nebo achylie, kdy dochází k útlumu sekrece žaludeční šťávy (Stříteský, 2001).

5.2 Peptidické vředy

V současné době je *Helicobacter pylori* považován za jeden z důvodů vzniku vředů v žaludku i v duodenu. Pokud se po eradikaci neboli vymýcení bakterie sníží pravděpodobnost recidivy vředu na minimum, je to důkaz, že hlavním faktorem vzniku vředu je *H. pylori* (Martínek a Špička, 2000).

5.3 Gastritida

Pokud je pacient infikován, může mít několik forem zánětu žaludku, nejčastěji gastritidu B neboli chronickou superficiální antrální gastritidu. *Helicobacter pylori* je často spojován i s Ménérierovou chorobou a vznikem hyperplastických žaludečních polypů (Martínek a Špičák, 2000). Z gastritidy se poté může vyvinout vředová choroba nebo zhoubný nádor (Povýšil a Šteiner, 2011).

5.3.1 Akutní gastritida

Tento typ gastritidy se projevuje krátkodobým průběhem a spontánním hojením. Vznikat mohou po silně kořeněném jídle či alkoholu, nebo po působení některých léků, například protinádorových. Mezi další faktory může patřit kouření, stres nebo infekce postihující organismus. Sliznice žaludku je překrvená nebo edematózní s výskytem drobných erozí. Lze nalézt hyperémii, často vznikají povrchové slizniční eroze, které se rychle hojí pomocí zvýšené aktivity progenitorových buněk v oblasti krčků žlázek (Povýšil a Šteiner, 2007).

5.3.2 Chronická gastritida

Chronický typ gastritidy se vyznačuje výskytem chronických zánětlivých změn na žaludeční sliznici. V budoucnu může vést k atrofii žaludeční sliznice, ke vzniku intestinální metaplazie nebo ke zvýšenému riziku vzniku karcinomu. Mezi mikroskopické změny při chronické gastritidě patří intenzivní zánětlivá celulizace lamina propria mucosae. Bývají přítomny mononukleáry a při aktivitě zánětu hlavně neutrofilní granulocyty. Při vzniku chronické gastritidy se uplatňuje především *Helicobacter pylori*, dále léky, chemikálie, radiační záření či mechanické dráždění (Povýšil a Šteiner, 2007).

Pokud na žaludeční sliznici dochází k výraznému úbytku buněk, nastává atrofie. Na té se podílí snížená aktivita progenitorových buněk. Dochází k redukci, nebo až k vymizení žlázné vrstvy a ke zmnožení vazivového stromatu (Povýšil a Šteiner, 2007).

Při intestinální metaplazii dochází k náhradě epitelu žaludeční sliznice pomocí epitelu střevního typu. Rozlišujeme metaplazie kompletní a nekompletní. Kompletní metaplazie napodobuje sliznici tenkého střeva. Nekompletní metaplazie, kde jsou přítomné hlenotvorné buňky, se dělí na typ II, kde jsou přítomny pohárkové buňky, které obsahují sialomuciny, a hlenotvorné epitele obsahující neutrální hlen nebo sialomuciny. Typ III je charakterizován nepravidelnými větvičkami se kryptami, které jsou tvořeny cylindrickými buňkami produkující silfomuciny a pohárkovými buňkami, které produkují sialomuciny nebo sulfomuciny (Povýšil a Šteiner, 2007).

5.4 Nádory žaludku

5.4.1 MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*)

Mezi nejčastější nádory žaludku patří karcinomy, poté maligní lymfom, jenž je buď primární, nebo sekundární, a právě ty primární, které jsou nehodgkinského typu, vychází ze žaludku. V této skupině převažují lymfomy B-řady, zejména extranodální maligní lymfom typu MALT, který vzniká v okolí chronické helicobakterové gastritidy. Nádor je tvořen převážně menšími buňkami a nádorové buňky pronikají do epitelových struktur sliznice. Z lymfomu typu MALT může vzniknout i difúzní velkobuněčný B-lymfom, kdy převažují velké lymfoidní buňky a nádor je vysoce maligní (Povýšil a Šteiner, 2007). První volbou při léčbě lymfomu v časných stádiích je eradikace *Helicobacter pylori* (Violeta Filip et al., 2018). Umožňuje útlum lymfomu u 60 % až

90 % nemocných (Floch et al., 2017).

5.4.2 GIST (*gastrointestinální stromální tumor*)

Tento neepitelový nádor má primitivní vztah k mezenchymovým kmenovým buňkám a buňkám Cajalovým, které se nachází v tunica muscularis. Nádor tvoří ve stěně žaludku uzel, sliznice nad nádorem se může jevit nepoškozená. Nádor posuzujeme dle velikosti a podle mitotické aktivity nádorových buněk (Povýšil a Šteiner, 2007).

6 Diagnostika *Helicobacter pylori*

K diagnostice bakterie *Helicobacter pylori* můžeme použít testy, které se dělí na invazivní a neinvazivní, podle toho, zda potřebujeme endoskopické vyšetření (Martínek a Špičák, 2000).

6.1 Neinvazivní metody

Kromě sérologie a dechového testu lze k analýze *Helicobacter pylori* zařadit testy ze slin či stolice (Martínek a Špičák, 2000).

6.1.1 Sérologie

U této neinvazivní metody se obvykle vyšetřují protilátky třídy IgG enzymovou imunoabsorpční esejí neboli ELISA. Neukazuje aktuální stav infekce a může zůstat pozitivní i několik let po provedení úspěšné léčby. Setkat se lze i s falešně pozitivními výsledky, a to zejména u dětí či imunokomprimovaných osob. Tato metoda je vhodná pro epidemiologické studie nebo když se vyhledává HP v rodině, kde měl pacient těžký průběh choroby, která byla vázána právě s HP (Martínek a Špičák, 2000). Výhodou sérologických testů je, že nejsou ovlivněny předchozím užíváním antibiotik (Tonkic et al., 2018).

6.1.2 Dechový test

Dechový test je zlatým standardem s vysokou senzitivitou a specifitou (Tonkic et al., 2018). Tento test má nejvyšší specifitu a senzitivitu. Provádí se, pokud není určeno endoskopické vyšetření. Je to nejvhodnější test při kontrole eradikace léčby, zda byl původce nemoci zcela vymýcen. Test se provádí 4 týdny po ukončení léčby, protože může být falešně pozitivní 4–6 týdnů po skončení léčby antibiotiky nebo inhibitory. V České republice lze test provést na několika pracovištích, nebo provést odběr v ordinaci lékaře a zkumavku poslat na místo konečné analýzy (Martínek a Špičák, 2000).

6.1.3 Detekce antigenu ve stolici

Tato metoda nám detekuje přítomnost bakterie *Helicobacter pylori* ve vzorku stolice. Používají se metody založené na enzymové imunoanalýze a na imunochromatografickém testu, kdy se využívají monoklonální nebo polyklonální

protilátky. Test je levný, vysoce citlivý a specifický (Shimoyama, 2013).

6.2 Invazivní metody

6.2.1 Histologie

Histologie patří mezi nejčastěji využívané diagnostické metody. Výhodou tohoto vyšetření je zhodnocení aktivity zánětu a posouzení změn sliznice žaludku. Poté ho lze zvýraznit několika způsoby barvení, jako je stříbření, ale i základní hematoxylin eosin. Jeho senzitivita a specifita závisí právě na typu barvení (Martínek a Špičák, 2000). Giemsovo barvení, jedna z několika dalších technik, se stalo nejpoužívanější metodou pro diagnostiku *Helicobacteria pylori*, protože je levné, reprodukovatelné a snadno proveditelné (Tonkic et al., 2018).

6.2.2 Ureázový test

Princip spočívá ve změně zbarvení pH indikátoru při rozkladu močoviny na amoniak a oxid uhličitý, protože amoniak způsobí zvýšení pH, a tudíž dojde ke zbarvení pH indikátoru. Odebírají se nejlépe dvě biopsie (z antra a těla žaludku), které se umístí do připravených platiček nebo zkumavek s médiem. Negativní výsledek se prohlašuje během 24 hodin, pokud nedojde ke změně barvy, u pozitivních pacientů je výsledek znám do několika minut (Martínek a Špičák, 2000).

6.2.3 Kultivace

Tento způsob diagnostiky se kvůli náročnosti a vysoké ceně nevyužívá. K určování rezistence bakterie na antibiotika se využívá pokud selhala eradikační kúra (Martínek a Špičák, 2000). Používají se selektivní média, jako je Pylori agar, Columbia agar s koňskou krví a antibiotickým doplňkem (Tonkic et al., 2018).

7 Teorie histologického vyšetření

7.1 Odběr materiálu

Cílem celého procesu histologického vyšetření je stanovení klinické diagnózy. Používá se materiál buď z mrtvého organismu neboli nekropsie při pitvě, nebo u živého materiálu při biopsii. Dbá se na to, aby byl vzorek odebrán co nejrychleji a nejšetněji, proto se těmito okolnostmi řídí různé způsoby odběru (Jirkovská, 2006).

Nejobvyklejším způsobem je excize neboli vyříznutí vzorku. Provádí se ostrým nástrojem, nejlépe skalpelem či žiletkou. Používá se jak při bioptickém odběru či peroperační biopsii, tak při nekroptickém odběru, kdy je během pitvy lepší přístup k jednotlivým orgánům (Jirkovská, 2006).

Při punkci neboli nabodnutí, se používá dutá jehla jako odběrový nástroj. Lze odebrat váleček tkáně, např. z ledvin, jater či lymfatických uzlin. Při kyretáži, kdy se používá drátěná klička s rukojetí neboli kyreta, se seškrabává povrch sliznic a získává se vzorek povrchového epitelu. Podobně se dá získat vzorek aspirací z dutých orgánů, jako je děloha nebo žaludek. Z těžko přístupných míst, jako je jícen, žaludek, tlusté a tenké střevo, lze použít složitější technické zařízení (Jirkovská, 2006).

7.2 Fixace

Po odebrání vzorku je nutné zachovat jeho strukturu a barvitelnost, a proto se ihned po odběru fixuje. Nádobka, kde se nachází nejméně 20krát více roztoku, než je objem vzorku, se označí štítkem s údaji pacienta. S nádobkou je nutné vyplnit průvodní list k zásilce (Jirkovská, 2006).

Účelem fixace je vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které zabráňují samovolnému rozkladu tkáně. Denaturace by měla být jak rychlá, tak především šetrná, aby byla zachována struktura tkáně jako za živa. Kromě zachování struktury, by fixační prostředky měly zachovávat barvitelnost dané tkáně a rychle do ní pronikat. Fixační prostředky máme buď chemického, nebo fyzikálního původu (Vacek, 1996).

7.3 Fyzikální fixační prostředky

Tyto fixační prostředky jsou v laboratoři málo používané. Využívá buď teplo, nebo rychlé vysušení tkáně za nízké teploty. Někdy je využívána fixace varem, např. ke

koagulaci bílkovinného obsahu ledvinových kanálků. Tato metoda je nedokonalá a vede k porušení struktury tkáně (Vacek, 1996).

V posledních letech se využívá také mikrovlnné záření. Výhodou je rychlé působení na celý vzorek, kdy řízený ohřev v mikrovlnné troubě (45–55 °C) jemně denaturuje bílkoviny vzorku (Jirkovská, 2006).

7.4 Chemické fixační prostředky

Chemické prostředky jsou nejvyužívanější prostředky pro snadnou přípravu a jednoduché provedení fixace. Využívá se buď roztok, nebo různé chemické sloučeniny anorganické či organické povahy (Vacek, 1996).

7.5 Formol

Formaldehyd vzniká ředěním paraformaldehydu a poskytuje 40% nasycený roztok. Pro tento roztok se užívá obecný název 100% formol. V laboratoři se skladuje v tmavých lahvích s vrstvou namletého uhlíčitanu vápenatého na dně. Takto uložený formol se poté ředí na roztoky o koncentracích 10–25 %. K ředění se využívá fyziologický roztok nebo pufr (Jirkovská, 2006). Na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s., kde bude zpracována praktická část této bakalářské práce, se ke zředění používá voda.

Je to bezbarvá tekutina dráždivého zápachu a při styku s kůží způsobuje ztvrdnutí pokožky či ekzémy (Vacek, 1995).

7.6 Kyselina pikrová

Kyselina pikrová neboli trinitrofenol, je práškovitá látka zbarvená do žluta. Lze vytvořit např. Bouinovu nebo Gendreovu tekutinu. Vzorky s touto tekutinou dobře zachovávají polysacharidy (Jirkovská, 2006).

7.6.1.1 Sloučeniny těžkých kovů

Použit můžeme sublimát neboli chlorid rtuťnatý, tvořící Zenkerovu tekutinu, kde je přítomen dvojchroman draselný, nebo Hellyho tekutinu. Rtuťové sraženiny, vznikající během fixace, se odstraňují jódováním (Jirkovská, 2006).

7.6.1.2 Organické kyseliny

Z těchto kyselin se používá ledová kyselina octová a kyselina trichloroctová (Jirkovská, 2006).

7.7 Zalévání

Ke správnému histologickému vyšetření je zapotřebí odebraný vzorek nakrájet na řezy tenké 4–8 μm . Předtím se vzorek zalije do parafínu, kde dojde k prosycení odvodněné tkáně rozehřátým parafínem při teplotě cca 55 °C. Parafín výborně vyplní všechny štěrbinu ve tkáni, a proto jej můžeme krájet do tenkých řezů. Zalévání do parafínu je nejjednodušší a nejrychlejší metoda zalévání, jelikož parafín je snadno dostupný. Bohužel se nehodí na zalévání tkání, které mají tužší konzistenci, jako jsou kosti nebo chrupavky, a proto se na tyto tkáně používá např. celoidin.

Zalévací média se dělí na rozpustná a nerozpustná a jejich použití se řídí charakterem vzorku a tím jaké budou použity barvicí metody pro zviditelnění struktur tkáně (Jirkovská, 2006).

7.7.1 Média rozpustná ve vodě

Do těchto médií zaléváme v případech, kdy nesmí dojít ke styku tkáně s organickými rozpouštědly, jako je benzen nebo xylen (Vacek, 1996). Používáme je tehdy, když dochází při použití média ve vodě nerozpustného k nežádoucí extrakci tuků z tkáně. Mezi tato média patří například želatina, pryskyřice a vosky (Jirkovská, 2006).

7.7.2 Média nerozpustná ve vodě

Při zalévání pomocí nerozpustných médií se využívá například parafín, celoidin nebo ve vodě nerozpustné pryskyřice. Před zalitím jedním z těchto médií se provádí dva základní postupy, odvodnění a prosycení vzorku intermediem. Při odvodnění se nahrazuje voda ve tkáni odvodňovacím médiem, nejčastěji vzestupnou alkoholovou řadou. Poté se používá intermedium, které nahradí alkohol ve vzorku (Jirkovská, 2006).

7.7.3 Zalévací a odvodňovací automaty

Samotné zalévání je velmi časově náročný proces, kdy se zpracovává velké množství materiálu, a proto je výhodné využít odvodňovací automaty (Jirkovská, 2006).

7.8 *Krájení*

Dalším krokem ke stanovení diagnózy a správnému vytvoření histologického preparátu, je krájení, které je zprostředkované mikrotomem. Ten je připevněn na pevném podstavci, na kterém jsou namontované další součásti. Podle toho, jakou tloušťku řezu potřebujeme, si navolíme pomocí mikrometrického šroubu. Ke krájení se používají nože z tvrdé oceli, nebo žiletkové nože. Rozeznáváme dva typy mikrotomů, sáňkový a rotační, kdy sáňkový se pohybuje proti bločku, tzv. po saních. U rotačního zůstává nůž nehybný. U zmrazeného vzorku je používám kryostat, který je zamontován v mrazivém boxu. Nařezané vzorky se poté napínají, nejlépe na vodní hladině nebo se přenesou na suché sklíčko kde se pod něj nakape destilovaná voda. Poté se jen usuší v sušárně (Jirkovská, 2006).

7.9 *Barvení*

Nejdříve se používala přírodní barviva používaná k barvení textilních vláken, např. indigo, karmín nebo šafrán. V dnešní době jsou připravována pomocí chemické syntézy, aby bylo dosaženo kvality (Jirkovská, 2006).

7.9.1 *Hematoxylin eosin*

Využívá kombinaci dvou barviv, zásaditého hematoxylinu a kyselého eosinu. Hematoxylin je přírodní barvivo, které samo nemá barvicí vlastnosti. Získává se až oxidací, která z něj vytvoří hematein. Po přidání mořidla se vytvoří komplex, který váže bazofilní struktury (Jirkovská, 2006).

Eosin v kombinaci s hematoxylinem je schopný barvit cytoplasmu buněk a mezibuněčnou hmotu poživ (Jirkovská, 2006).

7.9.2 *Giemsa*

Barvení Giemsa se používá k barvení krevních nátěrů a ke znázornění některých bakterií a virů. Do odstínů červené znázorňuje acidické struktury a do purpurové až modré bazické struktury (Kobilková a Siracký, 1990).

7.10 *Montování řezů*

Pomocí montovacího média se instalují na projasněné řezy krycí sklíčka. Média mají v zásadě stejný index lomu jako sklo, aby nedocházelo k nežádoucím optickým

efektům. Dělí se na ve vodě rozpustná a nerozpustná. Používají se média na bázi pryskyřic nerozpustných ve vodě (Jirkovská, 2006).

7.11 Mikroskopování

Mikroskop je přístroj, který se používá ke zvětšení obrazu předmětů, aby byl vidět pouhým lidským okem. Dělí se na světelné a elektronové, kdy světelný mikroskop zobrazuje objekty v oblasti viditelného světla, cca 400–760 nm (Jirkovská, 2006).

8 Imunohistochemie

Principem imunohistochemických metod je vazba protilátka na antigen a jeho vizualizace pomocí detekčních systémů na základě vazby enzym-substrát (obr. 2). Využívají se k vyšetření exprese makromolekul v řezech formolem fixovaných a do parafínu zalitých. Také slouží ke stanovení diagnózy či určení prognózy. Barevný produkt je poté hodnocen ve světelném mikroskopu (Zámečník, 2019).

8.1 Antigen

Antigenem se rozumí makromolekulární látka, kterou imunitní systém rozpoznává jako cizí. Může být přírodního nebo syntetického původu. Aby mohl vyvolat imunitní odpověď, musí mít určité vlastnosti a být kompletní, ten se poté nazývá imunogen. Naopak nekompletní, haptén, sice může reagovat s protilátkou, ale nevyvolá imunitní odpověď (Gomolčák, 1997). Antigeny, které se imunohistochemicky prokazují, jsou většinou součástí tkání a buněk, ale kromě nich lze stanovit i cizorodé látky, například viry a bakterie (Zámečník, 2019).

8.2 Protilátka

Jedná se o látky v séru, které působí proti mikrobům a jiným cizím látkám v lidském těle. Z chemického hlediska se jedná o glykoproteiny. Je to dvojevazebná molekula, která se skládá ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců vzájemně propojené disulfidickými můstky. Na molekule se nachází i vnitřní vazby, které tvoří shluky, domény. Celá molekula imunoglobulinu má N- konec, určený skupinou NH₂ a C- konec, určená COOH (Gomolčák, 1997).

8.2.1 Primární protilátky

Jsou to první protilátky v pořadí, které jsou aplikované na tkáň při imunohistochemickém vyšetření. Využívají se buď monoklonální nebo polyklonální (Zámečník, 2019).

8.2.1.1 Monoklonální protilátky

Tyto protilátky reagují s jedním epitopem antigenu. Při jejich výrobě se využívá schopnost buď plazmatických buněk nebo transformovaných B lymfocytů produkovat specifické protilátky (Zámečník, 2019).

8.2.1.2 Polyklonální protilátky

Jsou to protilátky produkované po imunizaci zvířete. Je nutno je z krve izolovat, vyčistit, odstranit protilátky, které reagující zkříženě s jinými antigeny, zkoncentrovat a ověřit si specifitu protilátek (Zámečnick, 2019).

Protilátka Anti-*Helicobacter pylori* se používá při identifikaci infekce *Helicobacter pylori* v gastritidě a rakovině žaludku (Jonkers et al., 1997). Tuto protilátku je možné použít ke značení řezů, které jsou zalité v parafínu a fixované ve formalínu. Je nutné nařezat vzorky na přibližně 4 µm. Pokud je *Helicobacter pylori* přítomný v infikované gastrickém epitelu, zobrazuje apikální zbarvení buněk membrány (Dako, 2013).

8.3 Imunohistochemické vyšetření

Ukrojené řezy z formolem fixované tkáně zalité do parafinového bloku, jsou deparafinovány a postupně zavodněny pomocí roztoků se snižující se koncentrací etanolu až do destilované vody (Zámečnick, 2019).

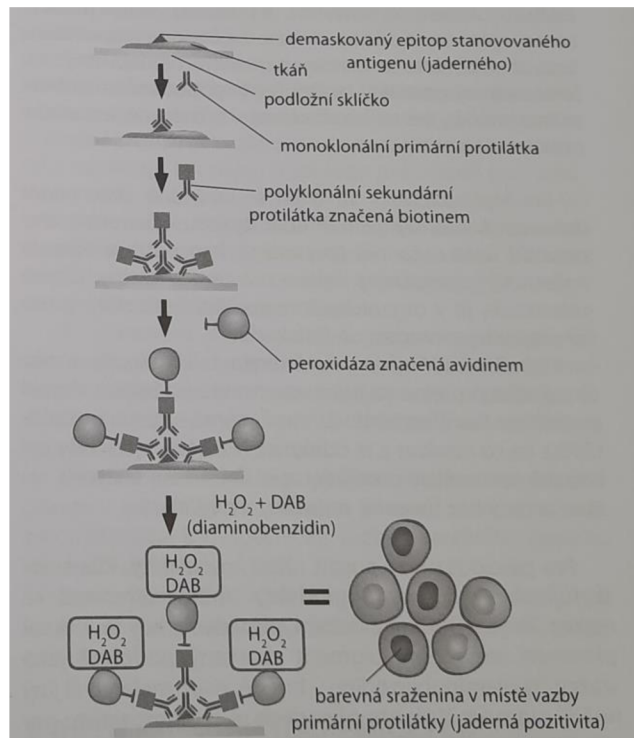
Po zavodnění přichází na řadu demaskování, při němž se zpřístupní antigenní epitop pro primární protilátku a lze ho provést různými způsoby, například varem ve vodní lázni v pufrech, které mají rozdílné pH, jež je určeno typem použité primární protilátky dle specifikace výrobce (Zámečnick, 2019).

Poté, co se demaskuje antigenní epitop, je zapotřebí zablokovat potenciální zbytkovou endogenní aktivitu enzymu, kdy enzymem bývá nejčastěji peroxidáza. Pokud by se aktivita nezablokovala, není možné odlišit pozitivitu způsobenou vazbou primární protilátky od endogenní peroxidázové aktivity, a tudíž by mohlo dojít k falešně pozitivnímu výsledku (Zámečnick, 2019).

V přítomnosti antigenu ve tkáni dojde k vazbě primární protilátky na antigenní epitop, proti kterému byla vytvořena. Je důležité použít správnou koncentraci protilátky a vhodné prostředí, které zahrnuje správnou teplotu, pH, iontovou sílu pufru i vlhkost inkubačního prostředí. Po celou dobu vazby antigen-protilátka je nutné udržovat stálé prostředí, aby nedošlo k uvolnění protilátky. Aby šla vazba pozorovat v mikroskopu, musíme ji vizualizovat detekčními systémy, kdy lze použít vícekrokové nebo jednokrokové aplikace sekundární protilátky. Ty jsou polyklonální a váží se na více epitopů. Vyráběny jsou proti myším či králíčím imunoglobulinům (Zámečnick, 2019).

Pomocí aplikace substrátu a kosubstrátu a jeho přeměnou reakce enzym-substrát vznikne barevný produkt. Aby se dalo lépe orientovat ve tkáni, lze jádra buněk dobarvit

hematoxylinem (Zámečník, 2019).



Obr. 2: Vícekrokové detekční systémy v imunohistochemii. (Zdroj: Zámečník, 2019)

8.3.1 Hodnocení výsledků

Hodnotit lze lokalizaci positivity ve tkáni či buňce. V částech buněk lze hodnotit expresi molekul například v jádrech buněk, cytoplazmě nebo na buněčných membránách. Důležitou roli u některých případů hraje i procento nádorové populace, proto lze hodnotit procentuální zastoupení nádorových buněk, které exprimují antigen, který stanovujeme (Zámečník, 2019).

9 Cíle práce a výzkumné otázky

9.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je porovnání použitých metod vyšetření Hematoxylin eosin, barvení Giemsa a imunohistochemického vyšetření antigenu pomocí primární protilátky *Anti-Helicobacter pylori* a jejich osvojení. Dalším cílem je zmapování výskytu *Helicobacter pylori* v souboru vyšetřovaných pacientů za dané období (věkové skupiny, pohlaví zkoumaných subjektů s přihlédnutím k ročním obdobím).

9.2 Výzkumné otázky

Je speciální barvení dle Giemsa dostatečně citlivou a snadno použitelnou metodou v detekci přítomnosti *Helicobacter pylori* v rutinní diagnostice?

Poskytuje barvení dle Giemsa srovnatelné výsledky jako imunohistochemická metoda pomocí protilátky *Anti-Helicobacter pylori* k identifikaci této bakterie v histologii?

10 Metodika práce

10.1 Charakteristika výzkumného souboru

Praktická část mé bakalářské práce byla provedena na Oddělení patologicko-anatomickém v Nemocnici Písek, a.s. Vše bylo provedeno pod dohledem vedoucí této bakalářské práce, Mgr. Michaly Velkové při dodržování daných bezpečnostních pravidel. Ve zkoumaném souboru jsou zahrnuty všechny žaludeční biopsie vykazující známky zánětu, které byly vyšetřené během roku 2022 a zpracovány na Oddělení patologicko-anatomickém. Vzorky byly zpracovány nejdříve histologicky, kdy se fixované parafínové bloky obarvily základním barvením Hematoxylin eosin. Pokud po mikroskopickém hodnocení vykazovaly vzorky žaludeční biopsie známky zánětu, byly zhotoveny dva preparáty, kdy se první obarvil metodou dle Giemsa a u druhého se provedlo imunohistochemické vyšetření antigenu pomocí protilátky *Anti-Helicobacter pylori*.

10.2 Odběr a transport na Oddělení patologicko-anatomickém

Odběr vzorků je prováděn odborným personálem Nemocnice Písek, a.s., nejčastěji na centrálních operačních sálech, popř. specializovaných ambulancích. V případě této bakalářské práce se odběr vzorků uskutečnil v gastroenterologické ambulanci během endoskopického výkonu. Odebrané vzorky tkáně byly ihned po odběru vloženy do označené nádoby s fixační tekutinou (obr. 7), v tomto případě se jednalo o 10% neutrální pufrovaný formalín. Transport odebraných vzorků probíhá v pravidelných intervalech, a to nejčastěji jedenkrát za den, v odpoledních hodinách sanitářem Patologie.

10.3 Příjem vzorku v laboratoři

Oddělení patologicko-anatomické Nemocnice Písek, a.s., sídlí v jižní části nemocničního areálu. Příjem vzorků probíhá v přízemní části budovy, která navazuje na laboratorní trakt. Laborant oddělení, určený pro daný den pro příjem vzorků, převezme doručený materiál od sanitáře. Pokud označená nádoba se vzorkem tkáně a průvodní list obsahují všechny potřebné informace viz Laboratorní příručka Patologie, je tento vzorek označen laboratorním číslem a informace z průvodního listu vloženy do laboratorního informačního systému (LIS).

10.4 Příprava vzorku před barvením

Přijaté vzorky jsem s lékařem nejprve přikrojila v odvětrávaném boxu na přikrajovacím pracovišti D-LAB 1650 od firmy Bamed s.r.o. (obr. 8). Lékař (patolog) jednotlivé vzorky makroskopicky popsal (vzhled, rozměry, počet odebraných a zpracovaných tkáňových částech) a určil postup provedení a barvení. Popis jsem zapsala na průvodní list a do laboratorního informačního systému. Přikrojené tkáňové částičky jsem vložila do vhodných umělohmotných či kovových kazet, které jsem musela předtím označit laboratorním číslem. Kazety jsem uzavřela a vložila do kovového koše a uzavřela víkem. Poté jsem vzorky oplachovala pod tekoucí vodou 10 minut.

Po uplynutí této doby jsem koš s kazetami vložila do standardního vakuového tkáňového procesoru (autotechnikon) RVG1, TP-300 od výrobce Intelsint srl (obr. 9). Nastavila jsem program dle F-PAT-054 Programovací pracovní list – tkáňový procesor a následně program spustila. Zde vzorky procházely sedmi lázněmi 96% alkoholu, třemi lázněmi xylenu a čtyřmi lázněmi rozpuštěného parafínu, který byl zahřátý na 60 °C. V každé lázni se vzorky nacházely po dobu jedné hodiny. Po ukončení programu jsem vyjmula koš se vzorky z tkáňového procesoru a vložila kazety do předehřívací parafínové lázně TES 99 od výrobce Medite-Medizintechnik GmbH.

Následně jsem provedla vlastní zalití tkáňových vzorků pomocí parafínové zalévací linky předehřátým parafínem na 65 °C do středu formy (obr. 10). Po zchladnutí nám vznikl parafínový blok, který obsahuje tkáňový vzorek a je připraven ke krájení.

Před samotným krájením jsem si bloky vyskládala na chladicí modul TES 99.410 od firmy Medite-Medizintechnik GmbH (obr. 11). Dosahuje teploty -10 °C. Tyto dostatečně vychlazené bloky jsem krájela na mikrotomu Ergostar HM 200 od firmy Mikrotom GmbH (obr. 12). Krájela jsem na tloušťku 4 µm a poté řezy nanasla na vodní lázeň ABW 210 od firmy AMOS Scientific Oty. Ltd (obr. 13). Rovné tkáňové řezy jsem natáhla na podložní sklo, které jsem si předem označila laboratorním číslem. Natažené sklo jsem vložila do připraveného stojanu na barvení.

10.5 Barvení

Před vlastním barvením preparátů jsem tkáňové řezy sušila v sušárně UN75 od firmy Memmert GmbH + CO. KG (obr. 14) po dobu 20 minut při teplotě 65 °C. U barvení Hematoxylin eosin je sušení zahrnuto v programu č. 2 barvicího automatu Leica

AutoStainer XL (obr. 15).

10.5.1 Barvení Hematoxylin eosin

Barvení Hematoxylin eosin jsem prováděla rutinně v rámci histologického vyšetření dle SOP-PAT-301 Histologické vyšetření a diagnostika. Barvení Hematoxylin eosin patří mezi základní barvicí metodu, potřebnou k rozlišení jednotlivých buněčných struktur. V neobarveném tkáňovém řezu nejsou totiž jednotlivé složky patrné. V případě našeho výzkumu jsem hledala v žaludeční biopsii známky zánětu. Na Oddělení patologicko-anatomickém se standardně barví Hematoxylin eosin pomocí barvicího automatu Leica AutoStainer XL (obr. 15) při nastavení programu č. 2 dle PP-PAT-001 Hematoxylin eosin. Potřebné barvicí roztoky jsem ručně vyráběla dle PP-PAT-001 Hematoxylin eosin.

Usušená sklíčka ve stojánku se přenesla k deparafinaci, která se provedla pomocí tří lázní xylenu, po sedmi minutách. Následně se všechny opláchla ve třech lázních 96% etanolu. Po opláchnutí se preparáty přesunuly na 2 minuty do Harrisova hematoxylinu. Následovalo opláchnutí pod tekoucí vodou alespoň na 4 minuty a vložení do 1% roztoku eosinu. Zde se preparáty barvily 2 minuty. Pak se preparáty oplachovaly ve třech lázních 96% etanolu, v jedné lázni acetonu, v jedné lázni aceton/xylen v poměru 1:1 a v jedné lázni xylenu. Obarvená sklíčka jsem pomocí Entellanu, montovacího média, přikryla krycím sklíčkem, očistila, seřadila do desek a odnesla lékaři k mikroskopickému zhodnocení (obr. 19, obr. 20, obr. 21).

10.5.2 Barvení Giemsa

Toto barvení jsem provedla už jako jedno ze speciálních barvení, kdy jsem se snažila prokázat přítomnost *Helicobacteria pylori* způsobující zánět, který se ve tkáni nachází. Jako první jsem si připravila základní barvicí chemikálii, roztok Giemsa-Romanovski, kdy jsem k 20 ml roztoku Giemsa-Romanovski, vyrobeného v Lékárně Nemocnice Písek, a.s., přidala 80 ml destilované vody. Dle pracovního postupu PP-PAT-101 Barvení Giemsa-Romanovski jsem provedla barvení. V prvním kroku jsem preparáty, které jsem předem usušila, vložila do lázně xylenu na 20 minut, kdy došlo k odstranění parafínu. Následně jsem preparáty oplachovala ve třech lázních 96% etanolu a navázala jsem na oplachování v destilované vodě. Po okapání stojánku jsem preparáty vložila do lázně s připraveným naředěným roztokem Giemsa. Barvila jsem je po dobu 30 minut. Po uplynutí stanovené doby jsem preparáty opláchla v destilované

vodě, dále ve dvou lázních 96% etanolu, jedné lázni acetonu, poté v jedné lázni aceton/xylenu, která byla v poměru 1:1 a celý cyklus jsem dokončila v lázni s xylenem (obr. 16). Když jsem oplachování dokončila, každý preparát jsem zamontovala pod krycí sklíčko, pomocí montovacího média Entellanu, poskládala do desek a odnesla ke zhodnocení (obr. 19, obr. 22, obr. 23).

10.6 Imunohistochemické vyšetření

Jak už bylo psáno výše, pokud se při rutinním histologickém vyšetření zjistí ve tkáni zánět, vzorek se podrobí jak barvení Giemsa, tak imunohistochemickému vyšetření. Postup imunohistochemického vyšetření antigenu je popsán v SOP-PAT-201 Imunohistochemické vyšetření antigenu. Z parafinového bloku obsahující vzorek jsem nakrájela na mikrotomu Ergostar HM 200 od firmy Mikrom řezy tenké 3–4 μm . Pomocí vodní lázně ABW 210 od firmy AMOS Scientific Oty. Ltd. jsem tkáň natahla na adhezivní pozitivně nabitá podložní sklíčka od firmy Bamed s.r.o. a v sušárně STZ 18 od firmy FALC Instruments s.r.o. usušila při 60 °C po dobu 20 minut. Tkáň nataženou na sklíčku poté musíme zbavit zbytků parafínu, a proto ji deparafinujeme 20 minut v lázni s xylenem. Následně jsem preparáty opláchla ve třech lázních s 96% etanolem a nakonec v destilované vodě. Abychom zpřístupnili pro primární protilátku antigenní epitop ve tkáni, demaskovala jsem epitop v digitální vodní lázni LCB-6D od firmy Daihan Labtech group (obr. 17) po dobu 20 minut s roztokem pro zpřístupnění epitopu (pufr o pH 9, EnVisionTMFLEX kit. Dako) naředěným v poměru 1:50 s destilovanou vodou. Po uplynutí doby jsem nechala preparáty zchladnout v lázni s roztokem pro zpřístupnění epitopu (pufr o pH 9, EnVisionTMFLEX kit. Dako) 20 minut. Poté jsem jednotlivá sklíčka vyjmula z lázně a ponořila do skleněné kyvety s promývacím pufrem, který měl pH 7,6–7,8 a byl naředěný v poměru 1:20 s destilovanou vodou. Preparáty jsem zde nechala po dobu 1 až 5 minut. Následně jsem na jednotlivých sklíčkách pomocí Pap peny, který je na olejové bázi, označila kolem tkáňového řezu aplikační zónu, na kterou jsem nanesla blokátor endogenní peroxidázy (EnVisionTMFLEX kit. Dako), což je komerčně vyráběná reagentie, kterou jsem nechala inkubovat (obr. 18) 10 minut. V této fázi dojde k zablokování aktivity enzymu peroxidázy přirozeně přítomné ve tkáni. Inkubace proběhla ve vlhké komoře při pokojové teplotě. Po proběhlé inkubaci jsem přebytek reagentie odstranila a preparáty vložila do skleněné kyvety s promývacím pufrem. Následně přišel čas na aplikaci primární protilátky – polyklonální králičí protilátky *Anti-Helicobacter pylori* (Dako), kterou jsem nechala

působit na preparátu s tkáňovým řezem 30 minut ve vlhké komoře. Po uplynulé době jsem preparáty ponořila opět do promývacího pufru ve skleněné kyvetě a promývala až 5 minut. V dalším kroku jsem do vyznačené aplikační zóny nanesla značený polymer HRP systém (EnVision™FLEX kit. Dako). Tato inkubace trvala 30 minut ve vlhké komoře při pokojové teplotě. Po ukončené inkubaci jsem preparáty opláchla ve skleněné kyvetě promývacím pufrem 1 až 5 minut. Abych imunokomplex zviditelnila, použila jsem naředěný roztok diaminobenzidinu – DAB (1 kapka DAB+ chromogen a 1 ml DAB substrátu), tento roztok jsem aplikovala na preparáty a nechala inkubovat 10 minut. Poté jsem preparáty vložila do skleněné kyvety s destilovanou vodou, opláchla a přendala do umělohmotného stojanu, který jsem vložila do kyvety s roztokem Harrisova hematoxylinu na 30 vteřin, aby se dobarvily jaderné složky tkáně. Ihned po uplynutí 30 vteřin jsem preparáty oplachovala ve vodě do zmodrání jader a odstranění přebytku barvicího roztoku. Následovala fáze oplachů ve třech lázních 96% etanolu, v jedné lázni acetonu, dále v jedné lázni acetonu/xylenu v poměru 1:1 a nakonec v lázni xylenu. Poté jsem provedla montování sklíček pod krycí sklo s použitím montovacího média Entellanu. Zamontované preparáty jsem uložila do kartonových desek a odnesla lékařům ke zhodnocení (obr. 19). Gastrický epitel, který je infikovaný *Helicobacter pylori* byl zobrazen apikálním hnědým zbarvením buněk membrány (obr. 22, obr. 23).

10.7 Mikroskopické zhodnocení

Mikroskopické zhodnocení bylo provedeno dvěma nezávisle na sobě pracujícími lékaři – patology. K hodnocení byly použity mikroskopy Jenamed 2 od firmy Zeiss a Nikon Eclipse E200 od firmy Nikon Corporation.

Byla hodnocena přítomnost *Helicobacter pylori* u speciální barvicí metody Giemsa a imunohistochemického vyšetření antigenu u žaludečních biopsií, které vykazovaly známky zánětu v základním barvení Hematoxylin eosin.

11 Výsledky

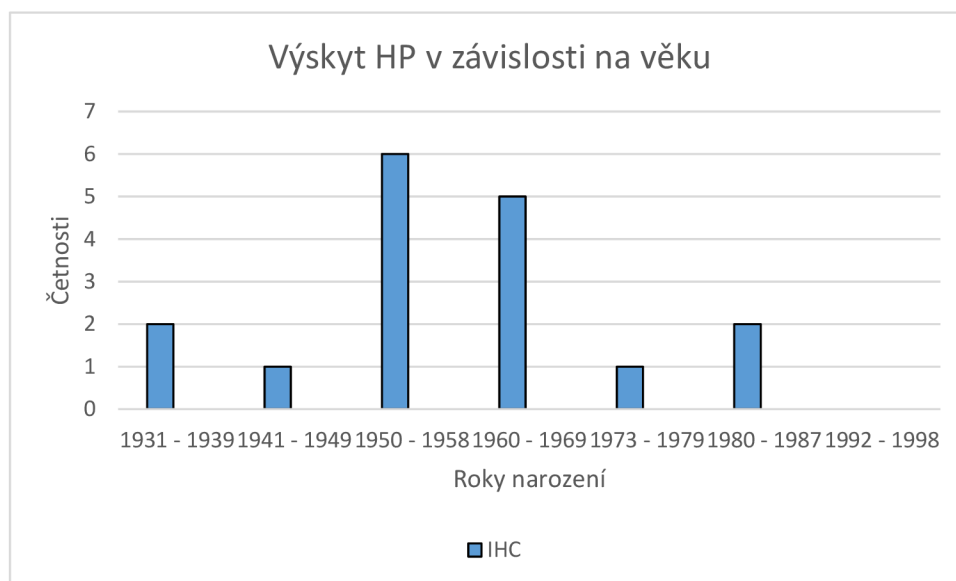
Za rok 2022 bylo na Oddělení patologicko-anatomickém v Nemocnici Písek, a.s. zpracováno 38 vzorků biopsií žaludku s různým stupněm výskytu zánětu. Všechny tyto vzorky prošly zprvu rutinním vyšetřením a základním barvením Hematoxylin eosin, posléze byly doplněny o speciální barvení Giemsa a imunohistochemické vyšetření antigenu pomocí protilátky *Anti-Helicobacter pylori*.

Následně byly vzorky zpracovány do přehledné tabulky s informacemi o pohlaví, věku, diagnóze a měsíci, kdy došlo k vyšetření (tab. 1). Jsou zde zaznamenány výsledky od dvou lékařů (patologů). Pomocí grafů bude znázorněn výskyt infekce *Helicobacter pylori* v závislosti na věku, pohlaví a ročním období pouze u imunohistochemického vyšetření a následně budou pomocí grafu porovnány obě použité metody.

11.1 Výskyt infekce *Helicobacter pylori* v závislosti na věku

V roce 2022 bylo v Nemocnici Písek, a.s., na Oddělení patologicko-anatomickém zpracováno 38 vzorků biopsií žaludku od pacientů různé věkové kategorie, u kterých byl při rutinním barvení Hematoxylinem eosinem zjištěn různý stupeň zánětu.

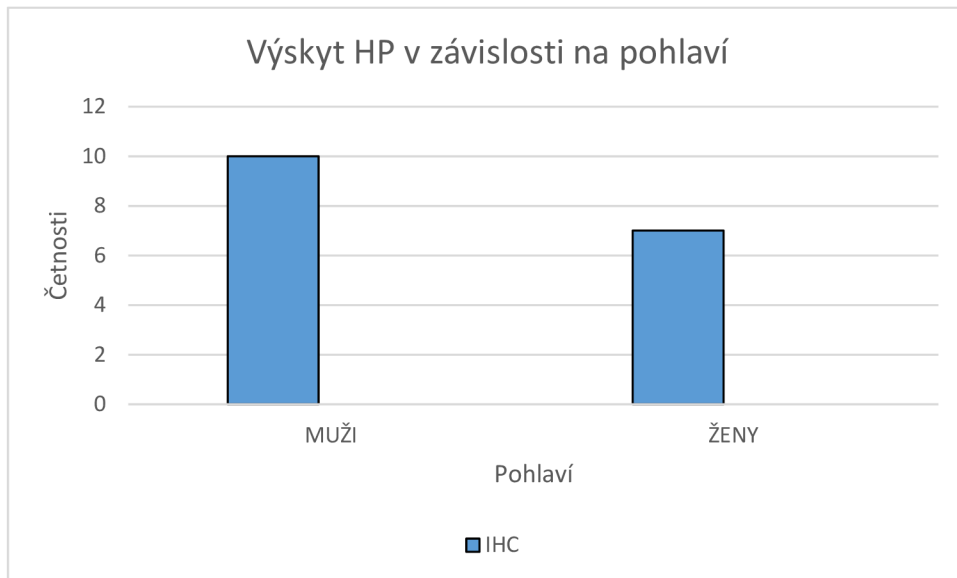
Při imunohistochemickém vyšetření antigenu Anti-*Helicobacter pylori* byla zjištěna pozitivita u 17 vzorků. Největší zastoupení, šest, měli pacienti narození v letech 1950–1958 (64–72 let). Dále potom bylo pět pacientů narozených v letech 1960–1969 (53–62 let). Dva pacienti měli u této metody pozitivní nález a to ti, kteří se narodili mezi lety 1931–1939 (83–91 let) a dva pacienti narození mezi roky 1980–1987 (35–42 let). A pouze u dvou pacientů, narozených v roce 1948 (74 let) a v roce 1979 (43 let) byla taktéž nalezena pozitivita. Naopak u žádného pacienta narozeného po roce 1992 nebyla pozitivita prokázána. Nejmladší pacient, u něhož byl HP prokázán, je narozený v roce 1984, naopak nejstarší diagnostikovaný je narozen v roce 1938.



Obr. 3: Zmapování výskytu HP v závislosti na věku (zdroj: vlastní)

11.2 Výskyt infekce *Helicobacter pylori* v závislosti na pohlaví

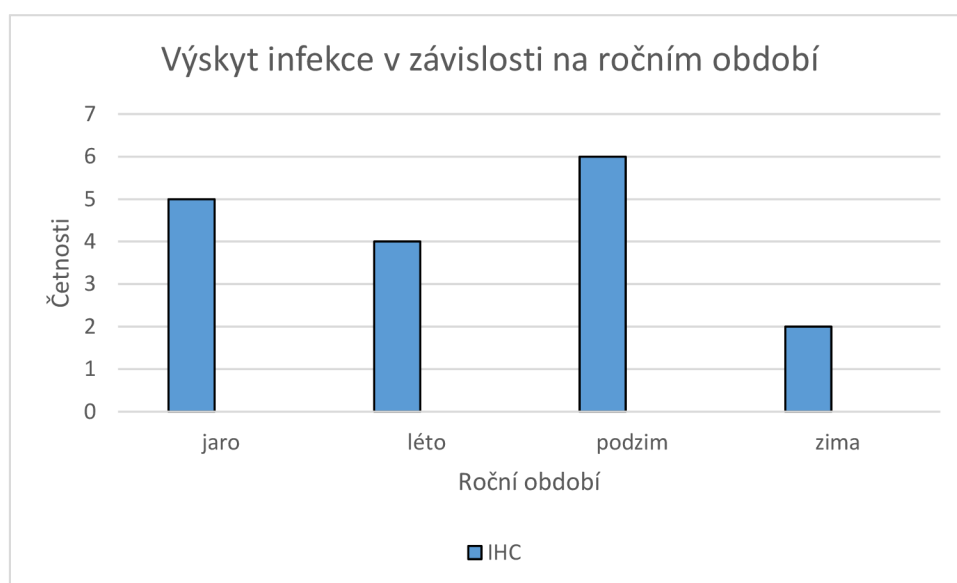
Jak je patrné z přiloženého grafu, při imunohistochemickém vyšetření byla nalezena pozitivita u deseti vzorků, které byly odebrané od mužů a u sedmi vzorků odebraných od žen. Ženy byly pozitivně diagnostikovány v 41,2 % a muži v 58,8 %.



Obr. 4: Zmapování výskytu infekce v závislosti na pohlaví (zdroj: vlastní)

11.3 Výskyt infekce *Helicobacter pylori* v závislosti na ročním období

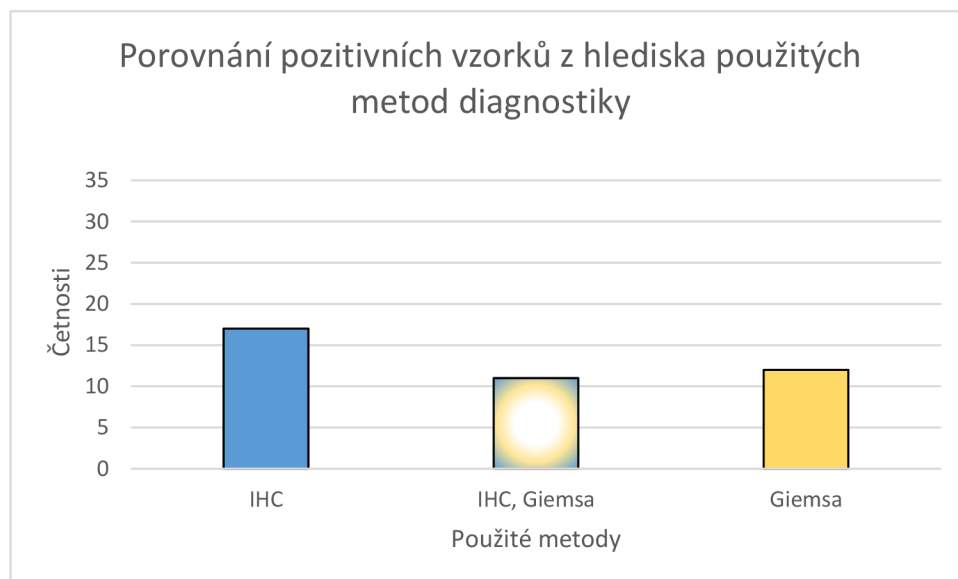
Jak už víme, při imunohistochemickém vyšetření byla pozitivita nalezena u 17 vzorků. Z tohoto počtu bylo šest vzorků odebráno a vyšetřeno na podzim (v září, říjnu i v listopadu), pět vzorků na jaře (v březnu a dubnu, v květnu žádný), čtyři vzorky v létě (všechny v srpnu) a pouze dva vzorky byly vyšetřeny v zimě (v prosinci a lednu, v únoru žádný). Na jaře tedy bylo pozitivních 29,4 %, v létě 23,5 %, na podzim 35,3 % a v zimě 11,8 % vzorků.



Obr. 5: Zmapování výskytu infekce v závislosti na ročním období (zdroj: vlastní)

11.4 Porovnání pozitivních vzorků z hlediska použitých metod diagnostiky

Z celkem vyšetřených 38 vzorků, které po obarvení Hematoxylinem eosinem vykazovaly přítomnost zánětu, bylo 17 vzorků (44,7 %) pozitivně diagnostikováno na přítomnost HP po imunohistochemickém vyšetření pomocí polyklonální protilátky *Anti-Helicobacter pylori*. 12 vzorků (31,6 %) vykazovalo přítomnost této bakterie po obarvení Giemsa barvením. U 11 vzorků se pozitivita projevila jak po imunohistochemickém vyšetření, tak po barvení Giemsa. 20 vzorků (52,6 %) nevykazovalo po žádné speciální metodě známky přítomnosti *Helicobacter pylori*.



Obr. 6: Porovnání pozitivních vzorků z hlediska použitých metod diagnostiky (zdroj: vlastní)

12 Diskuse

Helicobacter pylori, gramnegativní bakterii, lze diagnostikovat několika způsoby. Při rutinním vyšetření se vzorky z biopsií žaludku barví Hematoxylin eosinem, při výskytu zánětu se doplňuje další vyšetření, v případě této bakalářské práce to bylo barvení Giemsa a imunohistochemické vyšetření antigenu pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*.

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vyšetřovací metody, a to základní barvení Hematoxylin eosin, barvení Giemsa a imunohistochemické vyšetření antigenu pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori* a jejich osvojení. Vzorky ze sliznice žaludku získané biopsií, které byly přijaty na Oddělení patologicko-anatomické Nemocnice Písek, a.s., zde byly rutinně zpracovány a obarveny základním barvením Hematoxylin eosin. Po mikroskopickém hodnocení, 38 žaludečních biopsií vykazovalo známky zánětu různého stupně. U těchto vzorků se následně provedly 2 speciální metody na průkaz přítomnosti *Helicobacter pylori*, pomocí barvení Giemsa, u kterého se pozitivita projevila u 12 vzorků, a imunohistochemicky, kdy byla pozitivita viditelná u 17 vzorků.

Dalším cílem bylo zmapování výskytu *Helicobacter pylori* v souboru vyšetřovaných pacientů za rok 2022 se zaměřením na věkové skupiny pacientů, pohlaví a roční období. Na každé zaměření byly vytvořeny grafy, které znázorňují největší zastoupení u pozitivních vzorků při imunohistochemickém vyšetření. Nejvíce byl zastoupen věk pacientů mezi 64–72 lety. Co se týče zastoupení pohlaví, převládaly vzorky odebrané od pacientů mužského pohlaví. Nejvíce odebraných, vyšetřených a pozitivně diagnostikovaných vzorků pomocí imunohistochemického vyšetření antigenu Anti-*Helicobacter pylori* bylo v podzimních měsících.

Na začátku zpracování této práce jsem vyslovila dvě otázky, které bych ráda zodpověděla.

Výzkumná otázka 1: Je speciální barvení dle Giemsa dostatečně citlivou a snadno použitelnou metodou k detekci přítomnosti HP v rutinní diagnostice? Barvení Hematoxylin eosin je základním barvením použitým v rámci histologického vyšetření. Po mikroskopickém hodnocení se eventuálně doplňuje speciální barvení. Ve srovnání s IHC vykazuje Giemsa barvení nižší senzitivitu a citlivost klesla, když ve tkáni nebyl objeven žádný zánět. Citlivost Giemsa barvení také závisí na tom, jaké množství HP se v tkáni nachází (Kocsmár et al., 2017). U Giemsa barvení, které bylo provedeno

v praktické části této bakalářské práce, můžeme pozorovat také nižší senzitivitu a nižší citlivost dle množství bakterie přítomné ve tkáni, tak jako zmiňuje ve své studii Kocsmár et al. (2017).

Výzkumná otázka 2: Poskytuje barvení dle Giemsa srovnatelné výsledky jako imunohistochemická metoda pomocí protilátky Anti-*Helicobacter pylori* k identifikaci této bakterie v histologii? Při vyhodnocování výsledků barvení Giemsa byla pozitivita diagnostikována u 12 vzorků (31,6 %) z celkových 38, u kterých se projevil zánět. Naopak u imunohistochemického vyšetření bylo pozitivních vzorků 17 (44,7 %), ale u většiny vzorků (11 vzorků) se pozitivita projevila jak u Giemsa barvení, tak u imunohistochemie. Dle výsledků lze usoudit, že barvení Giemsa nedosahuje výsledků srovnatelných s imunohistochemickým vyšetřením.

Rozhodla jsem se výsledky porovnat se studií, kterou provedl Khan et al. (2022), kdy byly použity na vzorky žaludečních biopsií vyšetřovací metody, a to barvení Hematoxylin eosin, barvení Giemsa a imunohistochemické vyšetření (využili taktéž barvení modifikovanou toluidinovou modří, kterou já jsem nepoužila, ale tvrdí, že je výhodnější pro využití v rozvojových zemích z hlediska ceny a dostupnosti než barvení Hematoxylin eosin). Khan et al. hodnotí schopnosti jednotlivých metod zjistit přítomnost *Helicobacter pylori* na základě stupně zánětu. Barvení Hematoxylin eosin není až tak spolehlivá metoda k určení přítomnosti této bakterie, počet pozitivních vzorků se stupňoval až se zvyšujícím se stupněm zánětu. Toto barvení je dostatečné k rutinnímu zjištění přítomnosti *Helicobacter pylori*, ale vykazuje nejnižší citlivost. Giemsa barvení je považováno za doplňkové z důvodu dostupnosti, ceny a snadné proveditelnosti. Imunohistochemické vyšetření je považováno za zlatý standard a patří mezi jednu ze spolehlivějších metod, ale z finančního hlediska není dostupná natolik, aby byla využívána pro všechna běžná vyšetření biopsií, s výjimkou velkých laboratoří. I studie Kocsmár et al. (2017) se též ztotožňuje s tvrzením o modernějším řešení problému diagnostiky *Helicobacter pylori*, kdy doporučují imunohistochemii k detekci klinicky citlivých případů chronické gastritidy.

Zaměřila jsem se také na studie, které zmiňují, jaké zastoupení věku a pohlaví se nejvíce při vyšetření vyskytuje. Dle studie od Shukla et al. (2012), tu byl zastoupen poměr mužů a žen přibližně 1:1, 52 mužů a 50 žen. Podobnou situaci můžeme vidět i v této bakalářské práci, kde bylo zahrnuto 58,8 % mužů a 41,2 % žen. Nejvíce zastoupená věková kategorie je 64–72 let, kdežto studie udává větší rozmezí, a to 19–80 let.

Třetí charakteristikou statisticky zpracovanou bylo roční období. Při našem výzkumu se infekce *Helicobacter pylori* nejvíce diagnostikovala v podzimních měsících. Yuan et al. (2015) se domnívá, že výskyt infekce je výraznější v chladném podnebí než v teplém. V roce 2009 provedl studii i Raschka et al., kdy bylo nejvíce diagnostikováno v prosinci, nadále v květnu, a poté i v září a v říjnu.

13 Závěr

Za rok 2022 byla na Oddělení patologicko-anatomickém Nemocnice Písek a.s. imunohistochemicky potvrzena přítomnost *Helicobacteria pylori* u 17 vzorků z celkových 38, u kterých se při barvení Hematoxylin eosin projevil nějaký zánět. Dle výsledků vyšetření byl *Helicobacter pylori* častěji diagnostikován u mužské části populace (58,8 %), oproti části populace ženské (41,2 %). Nejvyšší počet vyšetřených vzorků připadá na věkovou skupinu 64 až 72 let, a to v počtu 6 případů. Dalším zajímavým poznatkem bylo zjištění vlivu ročních období na detekce *Helicobacteria pylori*. Z uvedených výsledků vyplývá, že nejčastější průkaznost *Helicobacteria pylori* na období podzimních měsíců (35,3 %).

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo porovnání dvou metod na průkaz *Helicobacteria pylori* – barvení dle Giemsa a imunohistochemického vyšetření antigenu pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori* v žaludečních biopsiích vykazujících různý stupeň zánětu, které byly nejprve obarvené základní metodou Hematoxylin eosin. Z pouhého znázornění buněčných struktur barvením Hematoxylin eosin není možné spolehlivě prokázat přítomnost HP v postižených tkáňových vzorcích. Proto je možné následně uplatnit speciální metody pro detekci HP. Námi bylo použité barvení dle Giemsa, které vykazovalo menší záchyt (o 13,2 %) *Helicobacteria pylori* ve vzorcích než u imunohistochemického vyšetření antigenu pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*. Barvení dle Giemsa není dostatečně citlivou metodou pro detekci HP v rutinní diagnostice, pokud je možné provést imunohistochemické vyšetření antigenu pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*. Avšak imunohistochemické vyšetření antigenu je oproti barvení Giemsa časově náročnější na provedení, vyžaduje speciální vybavení a používané reagentie jsou nesrovnatelně dražší. Imunohistochemickou metodou je vhodné identifikovat žaludeční biopsie vykazující akutní i chronickou gastritidu. Rutinně je zbytečné vyšetřovat každý vzorek žaludeční biopsie ihned imunohistochemickou metodou.

14 Seznam použité literatury

1. BEDNÁŘ, Marek et al. 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
2. CAMILO, V., SUGIYAMA, T., TOUATI, E., 2017. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* [online]. 22 [cit. 2023-3-22]. DOI: 10.1111/hel.12405. ISSN 10834389.
3. ČIHÁK, R., 2013. *Anatomie 2*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4788-0.
4. DAKO, 2013. *FLEX Polyclonal Rabbit: Anti-Helicobacter pylori Ready-to-Use* [online]. Dostupné také z: <https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/118180003.PDF>
5. DYLEVSKÝ, I., 2009. *Funkční anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3240-4.
6. FLOCH, P., MÉGRAUD, F., LEHOURS, P., 2017. *Helicobacter pylori* Strains and Gastric MALT Lymphoma. *Toxins* [online]. 9(4) [cit. 2023-4-4]. DOI: 10.3390/toxins9040132. ISSN 2072-6651.
7. GOMOLČÁK, P., 1997. *Základy imunohistochemie v patologii*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-239-6.
8. HOOI, J.K.Y. et al., 2017. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* [online]. 153(2), 420-429 [cit. 2023-3-26]. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.04.022. ISSN 00165085.

9. CHEUNG, T.K., WONG, B.C.Y., 2008. Treatment of *Helicobacter pylori* and prevention of gastric cancer. *Journal of Digestive Diseases* [online]. 9(1), 8-13 [cit. 2023-4-4]. DOI: 10.1111/j.1443-9573.2007.00315.x. ISSN 1751-2972.
10. JIRKOVSKÁ, M., 2006. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-263-4.
11. JONKERS, D. et al., 1997. *Helicobacter pylori* and non- *Helicobacter pylori* bacterial flora in gastric mucosal and tumour specimens of patients with primary gastric lymphoma. *European Journal of Clinical Investigation* [online]. 27(11), 885-892 [cit. 2023-4-7]. DOI: 10.1046/j.1365-2362.1997.1940756.x. ISSN 0014-2972.
12. KHAN, H. et al., 2022. Comparison of special stains (Giemsa stain and Modified Toluidine Blue stain) with immunohistochemistry as gold standard for the detection of *H. pylori* in gastric biopsies. *Arab Journal of Gastroenterology* [online]. 23(2), 75-81 [cit. 2023-3-24]. DOI: 10.1016/j.ajg.2021.12.005. ISSN 16871979.
13. KOBILKOVÁ, J., SIRACKÝ, J., 1990. *Cyodiagnostika v gynekologii*. 2., přepřac. vyd. Praha: Avicenum.
14. KOCSMÁR, É. et al., 2017. Sensitivity of *Helicobacter pylori* detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity. *Helicobacter* [online]. 22(4) [cit. 2023-3-27]. DOI: 10.1111/hel.12387. ISSN 10834389.
15. KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK, J., VAJNER, L., 2000. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H & H. ISBN 80-86022-80-3.

16. KRAMÁŘ, R., 2007. *Lékařská mikrobiologie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. ISBN 978-80-7394-021-8.
17. LÜLLMANN-RAUCH, R., 2012. *Histologie*. Překlad 3. vydání. Praha: Grada Publishing, 576 s. ISBN 978-80-247-3729-4.
18. MARTÍNEK, J., ŠPIČÁK, J., 2000. *Onemocnění žaludku a dvanáctníku, Helicobacter pylori*. Praha: Triton. ISBN 80-7254-106-4.
19. POVÝŠIL, C., ŠTEINER, I., 2011. *Obecná patologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-773-8.
20. RASCHKA, C., SCHORR, W., KOCH, H.J., 2009. Is There Seasonal Periodicity in the Prevalence of Helicobacter Pylori?. *Chronobiology International* [online]. 16(6), 811-819 [cit. 2023-4-8]. DOI: 10.3109/07420529909016947. ISSN 0742-0528.
21. ROWLAND, M. et al., 2006. Age-Specific Incidence of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* [online]. 130(1), 65-72 [cit. 2023-3-26]. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.11.004. ISSN 00165085.
22. SHIMOYAMA, T., 2013. Stool antigen tests for the management of Helicobacter pylori infection. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 19(45) [cit. 2023-4-4]. DOI: 10.3748/wjg.v19.i45.8188. ISSN 1007-9327.
23. SHUKLA, S., PUJANI, M., AGARWAL, A., PUJANI, M., ROHTAGI, A., 2012. Correlation of serology with morphological changes in gastric biopsy in Helicobacter pylori infection and evaluation of immunohistochemistry for H. pylori identification. *Saudi Journal of Gastroenterology* [online]. 18(6) [cit. 2023-4-8]. DOI: 10.4103/1319-3767.103428. ISSN 1319-3767.

24. SCHINDLER, J., 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3170-4.
25. STRŽÍTESKÝ, J., 2001. *Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]*. Olomouc: Epava, 338 s. ISBN 80-86297-06-3.
26. SUTTON, P., MITCHELL, H., ed., 2010. *Helicobacter pylori in the 21st Century* [online]. Wallingford: CABI [cit. 2022-11-10]. DOI: 10.1079/9781845935948.0000. ISBN 9781845935948.
27. TONKIC, A., VUKOVIC, J., VREBALOV CINDRO, P., PESUTIC PISAC, V., TONKIC, M., 2018. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Wiener klinische Wochenschrift* [online]. 130(17-18), 530-534 [cit. 2023-3-23]. DOI: 10.1007/s00508-018-1356-6. ISSN 0043-5325.
28. TYTGAT, G., 2002. Helicobacter pylori: Past, present and future. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 15(s3), G30-G33 [cit. 2022-11-26]. DOI: 10.1046/j.1440-1746.2000.02262.x. ISSN 0815-9319.
29. VACEK, Z., 1996. *Histologie a histologická technika II. část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 185 s. ISBN 80-7013-202-7.
30. VAJNER, L., UHLÍK, J., NOVOTNÝ, T., KONRÁDOVÁ, V., 2017. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie. 2., upravené vydání*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3827-0.
31. VELKOVÁ, M., 2022. *F-PAT-054 Programovací pracovní list - tkáňový procesor*. Verze 01. Nemocnice Písek, a.s. Oddělení patologicko-anatomické, 1 s.

32. VELKOVÁ, M., 2022. *PP-PAT-101 Barvení Giemsa-Romanovski*. Verze 01. Nemocnice Písek, a.s. Oddělení patologicko-anatomické, 2 s.
33. VELKOVÁ, M., 2015. *PP-PAT-001 Hematoxylin eosin*. Verze 01. Nemocnice Písek, a.s. Oddělení patologicko-anatomické, 2 s.
34. VELKOVÁ, M., 2022. *SOP-PAT-301 Histologické vyšetření tkání a diagnostika*. Verze 08. Nemocnice Písek, a.s. Oddělení patologicko-anatomické, 7 s.
35. VELKOVÁ, M., 2022. *SOP-PAT-201 Imunohistochemické vyšetření antigenů*. Verze 12. Nemocnice Písek, a.s. Oddělení patologicko-anatomické, 8 s.
36. VIOLETA FILIP, P., CUCIUREANU, D., SORINA DIACONU, L., MARIA VLADAREANU, A., SILVIA POP, C., 2018. MALT lymphoma: epidemiology, clinical diagnosis and treatment. *Journal of Medicine and Life* [online]. 11(3), 187-193 [cit. 2023-4-4]. DOI: 10.25122/jml-2018-0035. ISSN 1844-122X.
37. VOTAVA, M., 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902896-6-5.
38. VOTAVA, M., BROUKAL, Z., VANĚK, J., 2007. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-03-0.
39. WU, J.-Y., LEE, Y.-C., GRAHAM, D.Y., 2018. The eradication of *Helicobacter pylori* to prevent gastric cancer: a critical appraisal. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* [online]. 13(1), 17-24 [cit. 2023-4-4]. DOI: 10.1080/17474124.2019.1542299. ISSN 1747-4124.

40. YUAN, X.I.A.O.-G.A.N.G. et al., 2015. Seasonal changes in gastric mucosal factors associated with peptic ulcer bleeding. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 9(1), 125-130 [cit. 2023-4-8]. DOI: 10.3892/etm.2014.2080. ISSN 1792-0981.

41. ZÁMEČNÍK, J., 2019. *Patologie: 3*. Praha: LD, s.r.o. - PRAGER PUBLISHING. ISBN 978-80-270-6457-1.

15 Seznam příloh a obrázků

15.1 Seznam obrázků

- Obr. 1: *Helicobacter pylori* (zdroj: Schindler, 2010)
- Obr. 2: Vícekrokové detekční systémy v imunohistochemii (zdroj: Zámečník, 2019)
- Obr. 3: Zmapování výskytu HP v závislosti na věku (zdroj: vlastní)
- Obr. 4: Zmapování výskytu infekce v závislosti na pohlaví (zdroj: vlastní)
- Obr. 5: Zmapování výskytu infekce v závislosti na ročním období (zdroj: vlastní)
- Obr. 6: Porovnání pozitivních vzorků z hlediska použitých metod diagnostiky (zdroj: vlastní)
- Obr. 7: Odběrové nádoby (zdroj: vlastní)
- Obr. 8: Odvětrávaný box na přikrajovacím pracovišti (zdroj: vlastní)
- Obr. 9: Standardní vakuový tkáňový procesor (autotechnikon) (zdroj: vlastní)
- Obr. 10: Parafinová zalévací linka – součástí je i předehřívací parafinová lázeň (zdroj: vlastní)
- Obr. 11: Chladicí modul (zdroj: vlastní)
- Obr. 12: Mikrotom (zdroj: vlastní)
- Obr. 13: Vodní lázeň (zdroj: vlastní)
- Obr. 14: Sušárna (zdroj: vlastní)
- Obr. 15: Barvicí automat (zdroj: vlastní)
- Obr. 16: Skleněné lázně použité při barvení Giemsa (zdroj: vlastní)
- Obr. 17: Digitální vodní lázeň použitá při IHC (zdroj: vlastní)
- Obr. 18: Vlhká komora použitá při IHC (zdroj: vlastní)
- Obr. 19: Mikroskop (zdroj: vlastní)
- Obr. 20: Vzorek tkáně obarvený Hematoxylinem eosinem, příklad 1 (zdroj: vlastní)
- Obr. 21: Vzorek tkáně obarvený Hematoxylinem eosinem, příklad 2 (zdroj: vlastní)
- Obr. 22: Vzorek tkáně obarvený dle Giemsa, příklad 1 (zdroj: vlastní)

Obr. 23: Vzorek tkáně obarvený dle Giemsa, příklad 2 (zdroj: vlastní)

Obr. 24: Vzorek tkáně, který byl vyšetřen imunohistochemicky pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*, příklad 1 (zdroj: vlastní)

Obr. 25: Vzorek tkáně, který byl vyšetřen imunohistochemicky pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*, příklad 2 (zdroj: vlastní)

15.2 Seznam příloh

Příloha 1: Data vyšetřovaných pacientů

Příloha 2: Postup zpracování vzorků v histologické laboratoři

Příloha 3: Mikrofotografie vybraných zpracovaných vzorků

16 Přílohy

16.1 Příloha 1: Data vyšetřovaných pacientů

Tabulka 1: Data vyšetřovaných pacientů za rok 2022

Pořadí	Měsíc	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Bioptické číslo	IHC číslo	Přítomnost zánětu	IHC	Barvení Giemsa
1.	1	M	1947	K 31. Jiné neurčené nemoci žaludku a dvanáctníku	67	1.8.2022	+	0	0
2.	2	M	1949	K 29.5 Chronická gastritida NS	541-3	36	+	0	0
3.	2	M	1969	K 29.5 Chronická gastritida NS	603	42	+	+	+
4.	2	Ž	1973	K 25.3 Žaludeční vřed akutní bez krvácení nebo perforace	738	48	+	0	0
5.	3	M	1992	K 29.5 Chronická gastritida NS	1022	69	+	0	0
6.	3	Ž	1948	K 29.5 Chronická gastritida NS	1117-8	78	+	0	0
7.	3	M	1948	K 29.3 Chronická superficiální gastritida	1217	85	+	+	+
8.	3	Ž	1957	K 29.5 Chronická gastritida NS	1267	91	+	0	0
9.	3	Ž	1956	K 31.8 Jiné neurčené nemoci žaludku a dvanáctníku	1536	107	+	0	0

Pořadí	Měsíc	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Bioptické číslo	IHC číslo	Přítomnost zánětu	IHC	Barvení Giemsa
10.	3	Ž	1953	K29.5 Chronická gastritida NS	1537	108	+	+	+
11.	4	M	1939	K 29.4 Chronická atrofická gastritida	1887	147	+	+	0
12.	4	M	1952	K 31.7 Polyp žaludku a dvanáctníku	1909	148	+	0	0
13.	4	Ž	1960	K 29.3 Chronická superficiální gastritida	1922	151	+	+	+
14.	4	Ž	1979	K 29.5 Chronická gastritida NS	2038	164	+	+	+
15.	6	Ž	1946	K 29.5 Chronická gastritida NS	2861	242	+	0	0
16.	6	M	1951	K 29.5 Chronická gastritida NS	3309	275	+	0	+
17.	7	Ž	1950	K 31.7 Polyp žaludku a dvanáctníku	3483	292	+	0	0
18.	8	Ž	1951	K 29.5 Chronická gastritida NS	3776	328	+	+	0
19.	8	M	1950	K 25.3 Žaludeční vřed akutní bez krvácení nebo perforace	3896	337	+	+	+

Pořadí	Měsíc	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Bioptické číslo	IHC číslo	Přítomnost zánětu	IHC	Barvení Giemsa
20.	8	M	1941	K 29.5 Chronická gastritida NS	3981	344	+	0	0
21.	8	M	1958	K 25.3 Žaludeční vřed akutní bez krvácení nebo perforace	3977	345	+	+	+
22.	8	M	1955	K 29.5 Chronická gastritida NS	4035	351	min. +	0	0
23.	8	M	1984	K 29.7 Gastritida NS	4031	353	+	+	+
24.	8	Ž	1987	K 29.5 Chronická gastritida NS	4058	360	+	0	0
25.	9	M	1952	K 29.5 Chronická gastritida NS	4138-9	366	+	+	+
26.	9	M	1942	K 29.5 Chronická gastritida NS	4183	373	+	0	0
27.	9	M	1998	K 29.5 Chronická gastritida NS	4215-16	379	+	0	0
28.	9	Ž	1963	K 31.8 Jiné neurčené nemoci žaludku a dvanáctníku	4247	380	+	+	+
29.	9	M	1951	K 20 Zánět jícnu	4245	381	+	0	0
30.	9	Ž	1957	K 29.5 Chronická gastritida NS	4280	382	+	0	0
31.	9	M	1946	K 29.5 Chronická gastritida NS	4524	403	min. +	0	0

Pořadí	Měsíc	Pohlaví	Rok narození	Diagnóza	Bioptické číslo	IHC číslo	Přítomnost zánětu	IHC	Barvení Giemsa
32.	9	M	1980	K 25.3 Žaludeční vřed akutní bez krvácení nebo perforace	4613	415	+	+	0
33.	10	M	1968	K 29.5 Chronická gastritida NS	4879	431	+	+	0
34.	10	Ž	1931	K 29.5 Chronická gastritida NS	4970	444	+	+	0
35.	11	M	1966	K25.3 Žaludeční vřed akutní bez krvácení nebo perforace	5308	477	+	+	0
36.	11	Ž	1974	K 29.5 Chronická gastritida NS	5339	482	+	0	0
37.	11	Ž	1953	K29.5 Chronická gastritida NS	5647	504	+	0	0
38.	12	Ž	1956	K 29.5 Chronická gastritida NS	6164-5	556	+	+	+

(zdroj: vlastní)

16.2 Příloha 2: Postup zpracování vzorků v histologické laboratoři



Obr. 7: Odběrové nádoby (zdroj: vlastní)



Obr. 8: Odvětrávaný box na přikrajovacím pracovišti (zdroj: vlastní)



Obr. 9: Standardní vakuový tkáňový procesor (autotechnikon) (zdroj: vlastní)



Obr. 10: Parafinová zalévací linka – součástí je i přehřívací parafinová lázeň (zdroj: vlastní)



Obr. 11: Chladící modul (zdroj: vlastní)



Obr. 12: Mikrotom (zdroj: vlastní)



Obr. 13: Vodní lázeň (zdroj: vlastní)



Obr. 14: Sušárna (zdroj: vlastní)



Obr. 15: Barvící automat použitý na rutinní barvení
Hematoxylin eosin (zdroj: vlastní)



Obr. 16: Skleněné lázně použité při barvení Giemsa
(zdroj: vlastní)



Obr. 17: Digitální vodní lázeň použitá při IHC (zdroj: vlastní)

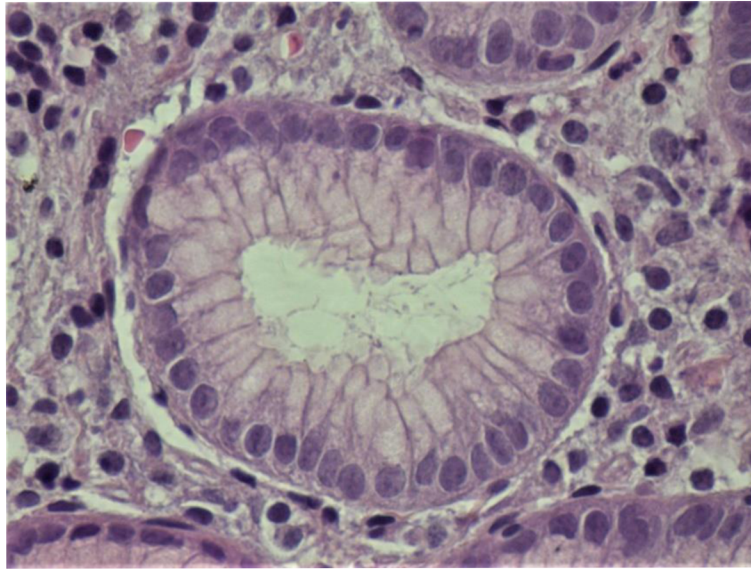


Obr. 18: Vlhká komora použitá při IHC (zdroj: vlastní)

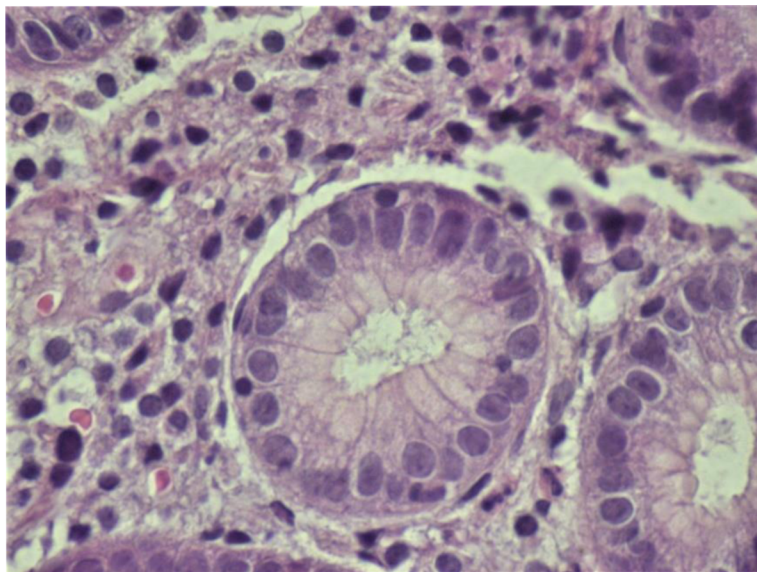


Obr. 19: Mikroskop (zdroj: vlastní)

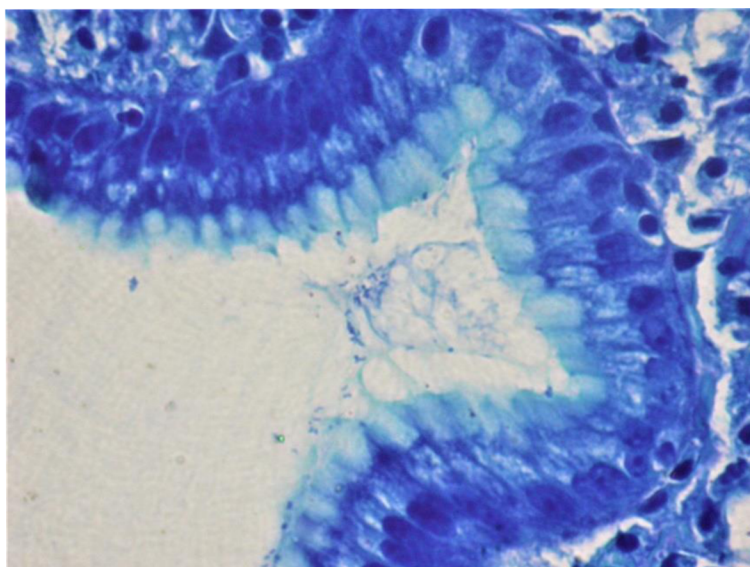
16.3 Příloha 3: Mikrofotografie vybraných zpracovaných vzorků



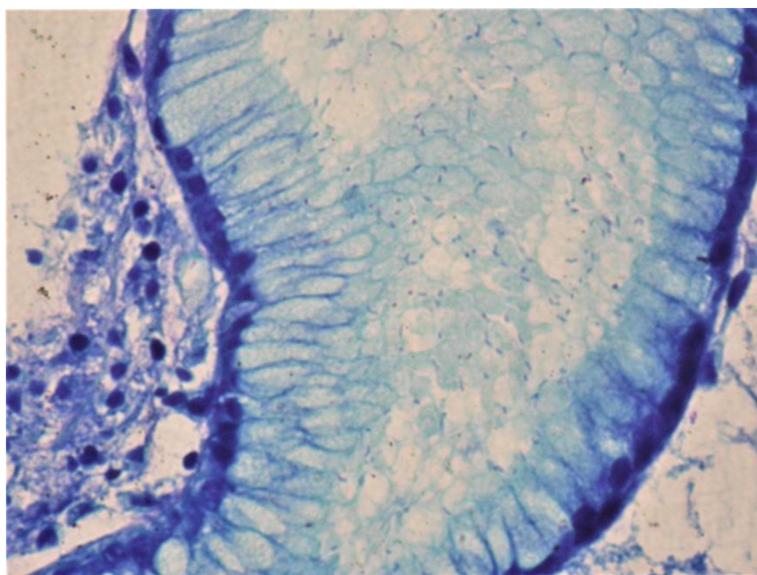
Obr. 20: Vzorek tkáně obarvený Hematoxylinem eosinem, příklad 1 (zvětšeno 400x) (zdroj: vlastní)



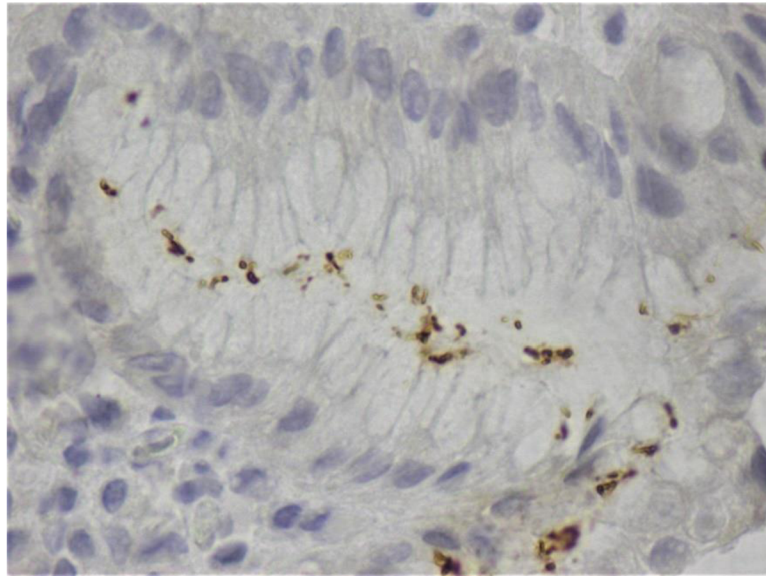
Obr. 21: Vzorek tkáně obarvený Hematoxylinem eosinem, příklad 2 (zvětšeno 400x) (zdroj: vlastní)



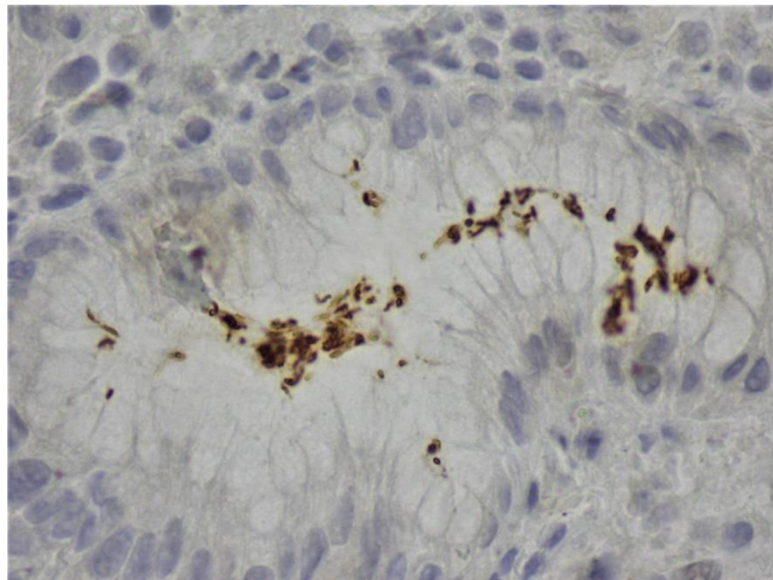
Obr. 22: Vzorek tkáně barvený dle Giemsa – příklad 1
(zvětšeno 400x) (zdroj: vlastní)



Obr. 23: Vzorek tkáně barvený dle Giemsa – příklad 2
(zvětšeno 400x) (zdroj: vlastní)



Obr. 24: Vzorek tkáně, který byl vyšetřen imunohistochemicky pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*, příklad 1 (zvětšeno 400x) (zdroj: vlastní)



Obr. 25: Vzorek tkáně, který byl vyšetřen imunohistochemicky pomocí polyklonální protilátky Anti-*Helicobacter pylori*, příklad 2 (zvětšeno 400x) (zdroj: vlastní)

17 Seznam zkratek

0	negativní výsledek (nepřítomnost)
+	pozitivní výsledek (přítomnost)
F-PAT	Formulář – Oddělení patologicko-anatomické
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
IHC	imunohistochemie
LIS	laboratorní informační systém
M	mužské pohlaví
PP-PAT	Pracovní postup – Oddělení patologicko-anatomické
SOP-PAT	Standardní operační postup – Oddělení patologicko-anatomické
Ž	ženské pohlaví