

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Markéta Lomozová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Markéta Lomozová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914A360002

**HODNOCENÍ SHODY MEZI HODNOTITELI PŘI
HISTOLOGICKÉ KVANTIFIKACI NÁLEZU
MIKROORGANISMU HELICOBACTER PYLORI
V BIOPSII SLIZNICE ŽALUDKU**

Bakalářská práce

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

PLZEŇ 2024

Prohlášení

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

V Plzni dne 27. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Markéta Lomozová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Hodnocení shody mezi hodnotiteli při histologické kvantifikaci nálezu mikroorganismu *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku

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

Počet stran – číslované: 38

Počet stran – nečíslované: 21

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 28

Klíčová slova: bakterie, *Helicobacter pylori*, histologie, Warthin-Starry, Giemsa, žaludek, sliznice, biopsie, gastritida,

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá kvantitativní shodou počtu mikroorganismů *Helicobacter pylori* mezi hodnotícími v biopsiích sliznice žaludku obarvenými metodami Warthin-Starry a Giemsa. Pearsonův korelační koeficient dokazuje větší shodu u vzorků barvených metodou Warthin-Starry. Wilcoxonův test ukázal, že díky této stříbřící metodě je možné identifikovat mnohem větší množství bakterií *H. pylori*, než barvením dle Giemsa.

Abstract

Surname and name: Markéta Lomozová

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Evaluation of match between evaluators in histological quantification of finding of microorganism *Helicobacter pylori* in gastric mucosa biopsy

Consultant: MUDr. Ondřej Ondič, Ph.D.

Number of pages – numbered: 38

Number of pages – unnumbered: 21

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 28

Keywords: bacteria, *Helicobacter pylori*, histology, Warthin-Starry, Giemsa, mucosa, biopsy, stomach, gastritis

Summary:

This Bachelor aims to compare the quantitative match when counting *Helicobacter pylori* in gastric mucosal biopsies stained using Warthin-Starry and Giemsa methods. The Pearson correlation factor clearly shows greater agreement when evaluating samples stained by the Warthin-Starry method. Wilcoxon's test shows that this silvering method makes it possible to identify a much larger amount of *H. pylori* bacteria compared to the Giemsa stain

Předmluva

Bakalářská práce na téma Hodnocení shody mezi hodnotiteli při histologické kvantifikaci nálezů mikroorganismu *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku měla za účel poukázat a potvrdit lepší shodu mezi hodnotiteli při použití barvení stříbřením, které je sice nákladnější, ale zároveň lepší pro přesnější diagnostiku infekce.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat mému vedoucímu práce MUDr. Ondřeji Ondičovi, Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady při praktické části bakalářské práce. Dále děkuji laborantům ŠÚP FN Plzeň za poskytování odborných rad a materiálů.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK	12
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST	15
1 ŽALUDEK	15
1.1 Poloha žaludku.....	15
1.2 Stavba žaludku	15
1.2.1 Závěsy žaludku	16
1.3 Stavba stěn žaludku	17
1.3.1 Sliznice žaludku.....	17
1.3.2 Podslizniční vazivo žaludku	18
1.3.3 Svalovina žaludku	18
1.3.4 Serosní povlak žaludku.....	18
1.4 Cévní zásobení žaludku	18
1.5 Inervace žaludku	19
1.6 Funkce.....	19
1.6.1 Trávení a vyprazdňování žaludku	19
1.7 Patologie žaludku.....	20
1.7.1 Poruchy činnosti žaludku	20
1.7.2 Anatomická patologie.....	21
1.7.3 Gastritida	21
1.7.4 Eroze a vředová onemocnění.....	21
1.7.5 Pseudotumory žaludku	22
1.7.6 Nádory žaludku	22
2 HELICOBACTER PYLORI	25
2.1 Charakteristika <i>Helicobacter pylori</i>	25
2.1.1 Biochemická aktivita	25
2.2 Epidemiologie infekce <i>Helicobacter pylori</i>	25
2.3 Patogeneze	26
2.4 Nemoci žaludku způsobené infekcí <i>Helicobacter pylori</i>	26
2.4.1 Chronická gastritida.....	26
2.4.2 Gastroduodenální vředová choroba	27
2.4.3 Rakovina žaludku	27
2.5 Diagnostika <i>H. pylori</i>	28

2.5.1	Neinvazivní.....	28
2.5.2	Invazivní.....	29
2.6	Léčba infekce <i>Helicobacter pylori</i>	31
	PRAKTICKÁ ČÁST	32
3	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	32
3.1	Hlavní cíl.....	32
3.2	Dílčí cíle.....	32
4	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	33
4.1	Hlavní otázka	33
4.2	Dílčí výzkumné otázky	33
5	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	34
6	METODIKA PRÁCE	36
6.1	Přikrajování tkáně	36
6.2	Odvodnění a prosycení vzorku	36
6.3	Zalítí do parafinového bloku.....	36
6.4	Krájení parafinových bločků.....	37
6.5	Natahování parafinových řezů	37
6.6	Odparafinování tkáňových řezů.....	37
6.7	Barvení.....	38
6.7.1	Hematoxylin-eosin	38
6.7.2	Warthin-Starry	38
6.7.3	Giemsa.....	39
6.8	Montování.....	39
6.9	Hodnocení vzorků pod světelným mikroskopem	39
6.10	Statistické zhodnocení výsledků	40
6.10.1	Wilcoxonův test.....	41
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	42
7.1	Výsledek barvení	42
7.1.1	Hematoxylin-eosin	42
7.1.2	Geimsa.....	43
7.1.3	Warthin-Starry	44
7.2	Analýza vzorků	44
7.2.1	Statitická analýza.....	46
	DISKUZE.....	50
	ZÁVĚR.....	51
	SEZNAM LITERATURY.....	52
	SEZNAM PŘÍLOH	55

PŘÍLOHY	56
Příloha A – Pracovní postup pro barvení metodou Hematoxylin-Eosin	56
Příloha B – Pracovní postup pro barvení metodou Warthin-Starry	57
Příloha C – Pracovní postup pro barvení metodou Giemsa	58
Příloha D – Protokol statistického výpočtu Wilcoxonova testu	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stavba žaludku	16
Obrázek 2: Schéma klasifikace nádorů žaludku.....	23
Obrázek 3: Vzorek biopsie sliznice žaludku barvený metodou hematoxylin-eosin.....	42
Obrázek 4: Vzorek biopsie sliznice žaludku barvený metodou Giemsa.	43
Obrázek 5: Vzorek biopsie sliznice žaludku barvený metodou Warthin-Starry.	44
Obrázek 6: Korelační koeficienty mezi hodnotiteli <i>Helicobacter pylori</i> v biopsii sliznice žaludku barvené Giemsou.	47
Obrázek 7: Korelační koeficienty mezi hodnotiteli <i>Helicobacter pylori</i> v biopsii sliznice žaludku barvené metodou Warthin-Starry.....	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Výsledky kvantitativního hodnocení bakterie <i>Helicobacter pylori</i> v biopsii sliznice žaludku barvené Giemsou	45
Tabulka 2: Výsledky kvantitativního hodnocení bakterie <i>Helicobacter pylori</i> v biopsii sliznice žaludku barvené metodou Warthin-Starry.	46
Tabulka 3: Korelační koeficienty hodnotitelů <i>Helicobacter pylori</i> v biopsii sliznice žaludku.	48
Tabulka 4: Průměrný PCC a směrodatné odchylky.....	49

SEZNAM ZKRATEK

CCL buňky.....	centrocyte-like (centrocytu podobné buňky)
CO ₂	oxid uhličitý
GIST.....	gastrointestinální stromální tumor
HCl.....	kyselina chlorovodíková
L1–L5.....	<i>vertebrae lumbales</i>
N ₂	molekula dusíku
PCC.....	Pearson correlation coefficient
PCR.....	polymerázová řetězová reakce
pH.....	potenciál vodíku
ŠÚP.....	Šiklův ústav patologie
Th1–Th12.....	<i>vertebrae thoracicae</i>

ÚVOD

Tato bakalářská práce je zaměřena na určení shody mezi hodnotiteli při počítání bakterie *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku. Shoda byla hodnocena statisticky u třech hodnotitelů, kteří klasifikovali kvantitativně vzorky barvené metodami Warthin-Starry a Giemsa.

Histologické vyšetření infekce *Helicobacter pylori* je zlatým standardem při diagnostice tohoto mikroorganismu. Lze díky němu zhodnotit aktivitu zánětu, míru výskytu eventuelních změn (atrofie a metaplazie) a četnost spirálních bakterií *H. pylori*. V základním barvení hematoxylin-eosin jsou patrné změny na sliznici či zánět, mikroorganismy jsou však špatně viditelné. Proto se využívají specifická barvení, v případě této práce Warthin-Starry a Giemsa. Cílem práce bylo za pomoci statistických metod zhodnotit míru shody mezi hodnotiteli u těchto dvou barvení a zjistit, u kterého barvení je shoda při kvantitativní kvalitaci lepší.

Bakalářská práce obsahuje teoretickou a praktickou část. Teoretická část je dělena na kapitoly s všeobecným přehledem o žaludku (stavba, cévní zásobení, inervace, funkce, patologie) a kapitolu zaměřenou na bakterii *Helicobacter pylori* (charakteristika bakterie, epidemiologie, patogeneze, nemoci žaludku spojené s *H. pylori*, diagnostika a léčba). Praktická část zahrnuje vytyčení cílů a výzkumných otázek, charakteristiku materiálu, metodiku práce (výroba parafinových bločků, krájení, barvení vzorků, práce se světelným mikroskopem, statistické vyhodnocení), výsledky a diskuzi.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ŽALUDEK

Žaludek (latinsky *Ventriculus*, řecky *Gaster*) je roztáhlá část trávicí trubice, která navazuje na jícen v místě zvaném česlo. Najdeme ho pod levou brániční klenbou v břišní dutině. Jeho tvar je dosti proměnlivý, záleží na kvantitě potravy a pozici těla. Jeho dlouhá část většinou měří okolo 21-25 cm a jeho objem je okolo 1,5 litru. Tvarově se žaludek podobá písmenu J. (1; 2; 3)

1.1 Poloha žaludku

Žaludek se nachází převážně v levé části břišní dutiny, pokud je naplněn, sahá jeho velké zakřivení až k pupku (těla obratlů L4–L5). Kardie je uložena vlevo u páteře ve výši těl obratlů Th10–Th12. Pokud je tělo ve vzpřímené poloze, je *fundus* žaludku prakticky ve vzpřímené poloze. Místo pyloru je značně proměnlivější, ve stoje ho najdeme 1–4 cm vpravo od páteře ve výši těl obratlů L1–L4 podle naplněnosti žaludku. Plný žaludek je ve styku s dolní rovinou levého jaterního laloku a levé brániční klenbu, a jeho zadní stěna je v blízkosti levé ledviny levé nadledviny, přední plochy slinivky břišní a sleziny. (1; 2)

1.2 Stavba žaludku

Žaludek lze rozdělit na několik funkčních a tvarových úseků. **Česlo** (*kardie*), je úzké svalové místo široké 1,5–3 cm představující napojení jícnu na žaludek. **Vrátník** (*pylorus*) je zúžená oblast žaludku, pokračující do dvanáctníku. **Malé zakřivení** (*curvatura minor*), táhnoucí se od česla k vrátníku na pravém, menším, konkávním okraji žaludku obráceném nahoru a doprava. **Velké zakřivení** (*curvatura major*), nachází se na levém okraji žaludku, obrácené konvexitou dolů. **Dno žaludku** (*fundus gastricus/ventriculi*) je jeho horní a nejširší část s polokulovitým tvarem umístěné vlevo od česla. Jeho okraj je v blízkosti bránice. **Tělo žaludku** (*corpus gastricum/ventriculi*) je největší partií žaludku nacházející se v jeho centru. **Pylorický oddíl žaludku** (*pars pylorica*) je koncová, mírně vzestupná část. Jejím pokračováním je dvanáctník. (1; 2; 4)

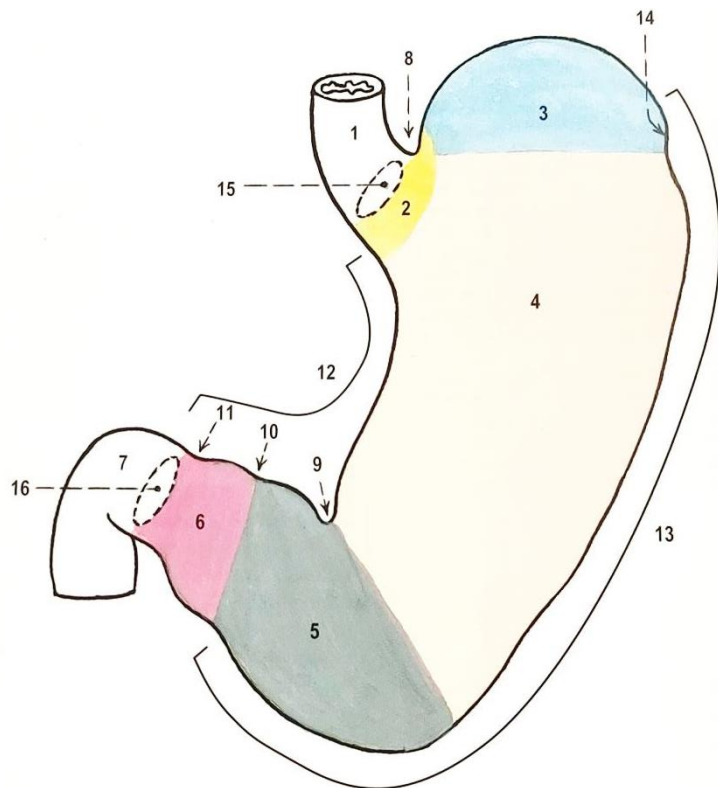
Každá ze tří základních partií žaludku má další morfologické jednotky:

- Na *fundus gastricus* rozlišujeme část česlovou (*pars cardiaca*), vlastní vyústění jícnu (*ostium cardiacum*) a rýha mezi ústím jícnu a dnem žaludku (*incisura cardiaca*).

- Na *corpus gastricum* rozlišujeme vnitřní část těla žaludku (*canalis gastricus*) a šterbinu mezi tělem a vrátníkem žaludku, ze strany malého zakřivení (*incisura angularis*).
- Na *pars pylorica* rozlišujeme vchod vrátníku (*antrum pyloricum*), dále jeho navazující oddíl dlouhý 2–3 cm (*canalis pyloricus*), vlastní vyústění žaludku do dvanáctníku (*ostium pyloricum*). (1)

Obrázek 1: Stavba žaludku

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| 1 – oesophagus | 9 – incisura angularis |
| 2 – pars cardiaca | 10 – sulcus intermedius |
| 3 – fundus gastricus | 11 – pylorus |
| 4 – corpus gastricum | 12 – curvatura minor |
| 5 – antrum pyloricum | 13 – curvatura major |
| 6 – canalis pyloricus | 14 – incisura major |
| 7 – pars superior duodeni | 15 – ostium cardiacum |
| 8 – incisura cardiaca | 16 – ostium pyloricum |



Zdroj: (1)

1.2.1 Závěsy žaludku

Na malé zakřivení je připojena malá předstěra (*omentum minus*), je to dvouvrstvá peritoneální vrstva, která vede od malého zakřivení žaludku k viscerálnímu povrchu jater. U malé kurvatury se dva listy *omentum minus* větví na přední list kryjící přední stěnu ža-

ludku a zadní list potahující zadní stěnu. Po setkání dvou listů u velké kurvatury se tvoří velká předstěra (*omentum majus*), ta visí směrem dolů od velkého zakřivení. Předstěry spojují žaludek s okolím a přicházejí v nich k zakřivením cévy. (1; 3)

1.3 Stavba stěn žaludku

Stěna žaludku má elementárními znaky obecné struktury trávicí trubice, je ale také prvním oddílem, který je anatomicky a funkčně uzpůsoben kromě mechanické úpravy potravy i té chemické. Aby se zvětšil povrch žaludeční sliznice, vnitřní strana žaludku je tvořena z podélných řas tzv. *rugae*, které umožňují rozšíření žaludku při požití potravy. Stěna žaludku se skládá ze čtyř různých tkáňových vrstev; sliznice, podslizniční vazivo, svalovina a serosní povlak žaludku. (4; 5; 2)

1.3.1 Sliznice žaludku

Sliznice žaludku má oranžově červenou barvu a je tvořena povrchovým jednovrstevným cylindrickým epitelem, ten vytváří žaludeční jamky. Do nich vylučují žaludeční šťávu větvené tubulózní žlázy (*Žaludeční a hlenové žlázy*). Žaludeční žlázy jsou tvořeny z různých buněk, vylučujících rozdílné enzymy včetně kyseliny chlorovodíkové aktivující pepsin, který tráví bílkoviny. Hlenové žlázy vytváří na povrchu epitelu ochranný obal z alkalického hlenu. (1; 4; 6)

V každém oddílu žaludku je trochu jiné zastoupení žláz. V **kardii** jsou především žlázy produkující hlen a lysozym. Také v **pyloru** jsou hlavně žlázy vylučující hlen, najdeme zde, ale i buňky produkující stimulační hormon gastrin (G-buňky) a inhibující hormon somatostatin (D-buňky). Žlázy **fundu a těla žaludku** zastávají funkci většiny chemického trávení, produkují majoritní množství žaludečních sekretů a jsou tvořeny ze čtyř druhů buněk:

- Parietální buňky: Jsou okrouhlého či pyramidového tvaru s jedním jádrem ve středu. Tyto poměrně velké buňky vytváří kyselinu chlorovodíkovou (HCl) a „žaludeční faktor“, glykoprotein vázající se na vstřebávání vitamínu B12 v tenkém střevě. HCl se podílí na kyselosti žaludku a je nezbytná pro aktivaci pepsinu, enzymu, jež tráví bílkoviny. Kyselé prostředí také napomáhá zabíjení většiny patogenů.
- Hlavní buňky: Nacházejí se hlavně v dolním úseku žaludečních žlázek. Produkují pepsinogen, neaktivní forma pepsinu.
- Mucinózní buňky krčků: Vyskytují se ve shlucích či samostatně v krčcích žaludečních žláz. Produkují alkalický hlen a regeneruje se z nich žaludeční sliznice

- Enteroendokrinní buňky: Jsou v blízkosti bází žaludečních žláz. Buňky produkující různé hormony do intersticiální tekutiny (například již zmíněné G-buňky či D-buňky). (1; 2; 4; 6)

Na povrchu sliznice je slizniční bariéra, která má ochrannou funkci před velmi žíravou kyselostí žaludeční šťávy. Také enzymy trávicí bílkoviny mohou strávit i žaludek samotný. Mezi částí slizniční bariéry patří velmi silná vrstva hlenu tvořeného převážně bikarbonátem. Hydrogenuhličitanové ionty neutralizují kyselinu. Druhou ochrannou funkci zastupují buňky epitelové, které zamezují vstupu žaludeční šťávy do tkáňových vrstev. Navíc se poškozené epitelové buňky každých 3 až 6 dní kompletně vymění. (6)

1.3.2 Podslizniční vazivo žaludku

Submukóza je tvořena z řídkého vaziva obsahující krevní, mízní a nervové sítě. Při potřebě pohybu žaludku dovoluje sliznici její posouvání. (1; 4)

1.3.3 Svalovina žaludku

Svalovina je z dvou typických vrstev pro trávicí soustavu: kruhové (*cirkulární*) a podélné (*longitudinální*) svaloviny. Žaludek má ještě jednu nejvnitřnější vrstvu těsně v blízkosti submukosy, tzv. *fibrae obliquae*. Jsou to snopce podélné svaloviny jícnu jdoucí od kardie k velkému zakřivení, které zrychlují vyprazdňování. V místě pyloru vytváří zesílená cirkulární svalovina vrátníkový svěrač (*musculus sphincter pylori*), ten napomáhá uzavírání průchodu ze žaludku do dvanáctníku. (1; 6)

1.3.4 Serosní povlak žaludku

Lesklým, hladkým obalem žaludku je pobřišnice, ta pokračuje u malého a velkého zakřivení ve velkou a malou předstěru (*omentum majus* a *omentum minus*). (1; 2)

1.4 Cévní zásobení žaludku

Krevní zásobení žaludku je bohaté a vede převážně z celiakální tepny, ta se rozvět-vuje na tři větve, žaludeční tepnu, společnou jaterní tepnu a slezinnou tepnu. Tyto tři arte-rie zásobují žaludek okysličenou krví vytvořením dvou tepenných oblouků umístěných podél malého a velkého zakřivení. Oblouk podél malého zakřivení nalezneme mezi listy malé předstěry, je tvořen anastomózou pravé a levé žaludeční tepny a zásobuje přední a zadní stěnu žaludku v blízkosti *curvatura minor*. Oblouk podél velkého zakřivení je mezi dvěma listy velké předstěry, vychází z pravé gastroepiploické tepny (z arterie gastroduode-nální) a levé gastroepiploické tepny (z arterie slezinné). Gastroepiploický tepenný oblouk zásobuje hlavně zadní a přední stěnu žaludku v okolí velkého zakřivení. Oblouky

v kurvaturách se přizpůsobují podle změn velikosti žaludku. Z nich odstupují na přední i zadní stěně mnoho dalších větví, které proudí nejdříve serózou, poté pronikají do svaloviny, až se dostanou do podslizničního vaziva. (1; 3)

Žíly žaludku převážně odpovídají obloukům okolo malé a velké křivky, které zásobují žaludek. Většina těchto žil odtéká do slezinné nebo horní mezenterické žíly (ty dále do portální žíly), některé z nich odtékají do portální žíly přímo. (3)

1.5 Inervace žaludku

Zásobení žaludku nervovými vlákny je autonomní, tedy sympatické a parasympatické. Sympatická vlákna přicházejí do žaludku z *plexus coeliacus* a poté nervy v okolí celiakálních cév až do pletení na stěně žaludku, z kterých vedou vzruchy do jednotlivých částí žaludku. Sympatická vlákna snižují napětí svalové stěny, peristaltiku a omezují sekreci žláz žaludku. Nacházejí se zde i sensitivní vlákna, ty vedou do míšních segmentů Th7–Th9 podněty pocitu bolesti v žaludku. Parasympatická vlákna jsou větvemi zadního a předního bloudivého nervu (*nervus vagus*). Vagové kmene probíhají souběžně s jícnem do břicha až k malému zakřivení. Odtud se nervy větví a vytváří pleteně ve svalovině a podslizničním vazivu žaludku, kde konečné větévky vedou až ke žlázám, buňkám svaloviny a cévám. Parasympatická vlákna jsou antagonisty sympatických, podporují tedy žaludeční motilitu a sekreci. V nich zahrnutá senzitivní vlákna vnímají teplo, tlak a chlad. (1; 3)

1.6 Funkce

Žaludek funguje jako rezervoár, které umí v krátkém časovém úseku pojmout velké množství potravy a pak ji po menších fyziologicky vhodných dávkách posílat do dvanáctníku. Jeho hlavní funkcí je natrávit potravu a vyprázdnit svůj obsah dál trávicí soustavou do duodena. (1; 3)

1.6.1 Trávení a vyprazdňování žaludku

Vyprazdňování je proces, při kterém žaludek vypouští svůj obsah do tenkého střeva, to pak dále tráví a absorbuje živiny. Trávení je proces, který začíná požitím potravin, ty jsou dále systematicky rozkládány pomocí enzymatických a mechanických procesů pro dosažení, co nejlepší absorpce živin. Potraviny v žaludku se neupravují v pořadí, v kterém byly zkonsumovány, spíše se smíchávají s trávicí šťávou a po jejich přetvoření v tráveninu (chyme) jsou uvolněny do duodena. (3; 6)

Chemická role žaludku v trávení spočívá v počátečním trávení bílkovin pepsinem a triglyceridů kyselinou chlorovodíkovou. Další jeho rolí je utlumit slinné amylázy. Vstřebávání se v žaludku takřka neděje, jediné vstřebatelné jsou látky rozpustné v tucích, jako je alkohol a aspirin. (6)

Mechanické trávení žaludku probíhá v rámci žaludečních pohybů. Při tomto procesu se natrávená potrava z úst a jícnu (bolus) rozděljuje na menší složky (chyme), které se pak snáze vstřebávají v tenkém střevě. Žaludek tyto mechanické pohyby provádí za pomoci tří svalovin: šikmá (jedinečná pouze pro žaludek), kruhová a podélná. Vnitřní šikmá svalová vrstva vytváří stloukavé pohyby. Díky kruhové a podélné svalovině žaludek vyprazdňuje tráveninu skrz pylorický svěrač, který nechá projít pouze tekutiny a velmi malé kousky potravy. Vracená část tráveniny se bude v žaludku dále zpracovávat, dokud také neprojde přes svěrač do duodena. (5)

Fáze vyprazdňování zabere 3 až 4 hodiny a je ovládána lokálními nervovými a hormonálními mechanismy, které se spustí s příchodem potravy do žaludku. Vniknutí potravy do žaludku vyvolá zvýšenou sekreci žaludečních šťáv. Naopak natrávené bílkoviny a zvyšující se pH zapříčiní uvolnění gastrinu z enteroendokrinních G-buněk, ten zase ovlivní parietální buňky k produkci HCl, která svými kyselými vlastnostmi přemění pepsinogen na pepsin, a tak běží tyto fáze stále dokola. Žaludek má přirozený systém, který při velmi nízkém pH v žaludku pozastaví sekreci HCl a zvýší sekreci slizniční bariéry. (6)

1.7 Patologie žaludku

Obecně jsou nemoci žaludku způsobené samonatrávením tkáně kvůli velmi kyselé žaludeční šťávě (pH trávicí šťávy se ohybuje okolo 2) a enzymům trávicí bílkoviny. Na ochraně sliznice se podílí několik protektivních faktorů, pokud se naruší rovnováha, může vzniknout onemocnění. Mezi tyto faktory řadíme povrchový slizniční film hlenu s bikarbonátem, který neutralizuje pH v místě slizničního povrchu a inhibuje proteolytické působení pepsinu. Další obranou je fosfolipidová dvojvrstva lumenální membrány a tight junction povrchových (epitelových) buněk sliznice, které zajišťují mechanickou bariéru žaludeční tkáně od trávicí kyseliny. Jako poslední faktor lze uvést průchod krve slizničními kapilárami, jež přivádí kyslík, živiny a bikarbonát k povrchu. Vodíkové kationty naopak odvádějí pryč, tím zajišťují buněčnou výživu a alkalizují oblast povrchu sliznice. (7)

1.7.1 Poruchy činnosti žaludku

- *Pylorospasmus* – většinou vrozené, stálé stažení svaloviny pyloru.

- *Ructacio* (říhání) – vyloučení vzdušné (někdy s menším množstvím potravy) bubliny z komory žaludku.
- *Nauzea* – nevolnost, jedinec má potřebu zvracet (vyvoláno např. psychicky, podrážděním trávicího aparátu).
- *Vomitus* – zvracení, je podrážděno centrum v prodloužené míše.
- *Pyrosis* – pálení žáhy, způsobeno nadměrnou kyselostí žaludečních šťáv v jícnu.
- *Singultus* – škytavka, vyvolána podrážděním bráničního nervu a následně způsobenými stahy bránice. (8)

1.7.2 Anatomická patologie

Mezi anatomicko-patologické nálezy můžeme zařadit například hypertrofickou pylorickou stenózu. Je to hyperplazie svaloviny žaludku na úrovni pyloru. To vede k nekrvavému zvracení u kojenců (okolo 4. týdne života). Časté zvracení způsobuje hypochloremickou hypokalemickou metabolickou alkalózu, kvůli ztrátě HCl a pokusu těla vyrovnat alkalózu zvýšením reabsorpce vodíkových a vyloučením draselných kationtů. (5)

1.7.3 Gastritida

Zánět sliznice neboli gastritida je charakterizovaná zánětlivou infiltrací sliznice. Její klinické příznaky jsou zvracení, bolest břicha, ale může být i bez příznaků. Gastritida se typicky rozděluje na akutní a chronickou. (7; 8)

Akutní gastritida se vyznačuje nerovnováhou mezi kyselou žaludeční šťávou žaludku a jeho ochrannými faktory sliznice vůči kyselině. Za nevyváženost může více vlivů, mezi nimi jsou například alkohol, nadměrné užívání nesteroidních protizánětlivých léků, kouření, chemoterapie, infekce či stres. Známkou akutního zánětu je přítomnost neutrofilních granulocytů. (5; 7; 8)

Znakem chronické gastritidy jsou plazmatické buňky a další změny, jako je atrofie žaludeční sliznice a epitelová metaplazie. Chronický zánět se dělí na dva subtypy, autoimunitní gastritida a bakteriální gastritida (více v kapitole 2.4). Autoimunitní gastritida zahrnuje destrukci parietálních buněk protilátkami. (5; 7; 8)

1.7.4 Eroze a vředová onemocnění

Jedná se o heterogenní skupinu povrchových defektů žaludeční sliznice. Pokud nezasahuje hlouběji než do slizniční svaloviny, jde o erozi. Pokud se eroze dostane do hlubších vrstev, jde o vřed. Za jejich vznik může agresivní vliv kyseliny chlorovodíkové a pepsinu, také přítomnost infekce *H. pylori*, která je prokázána až v 70 % případů. (7; 8)

1.7.5 Pseudotumory žaludku

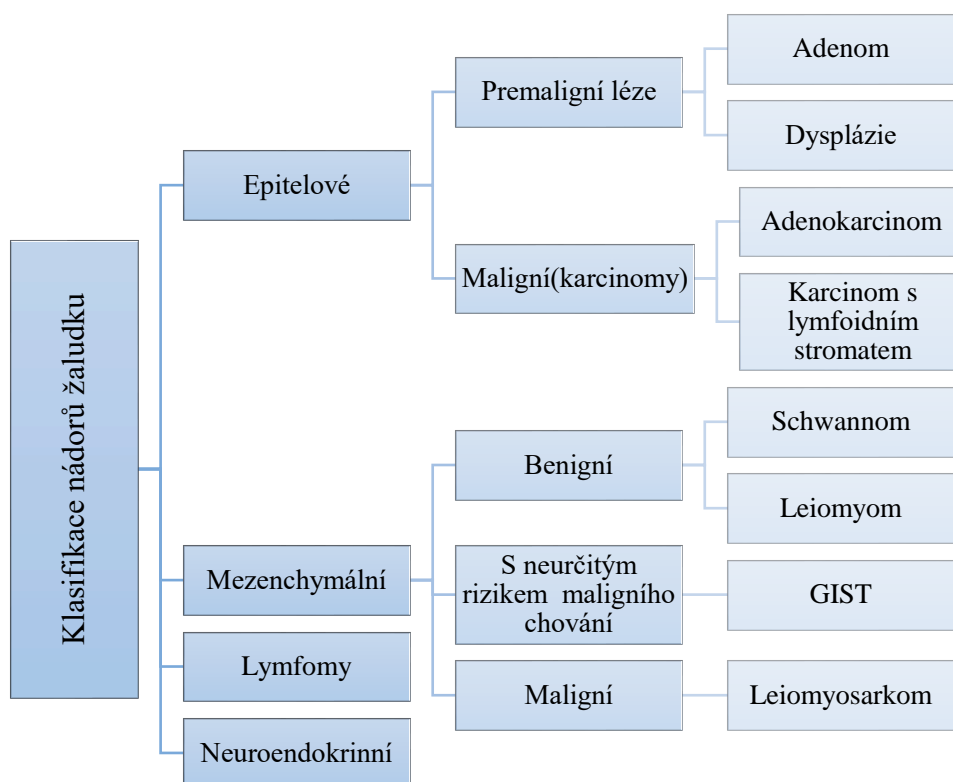
Mezi pseudotumory žaludku spadají polypy, ale tyto pojmy nejsou synonymum. Polyp je jen označení pro ohraničené vyklenutí sliznice do dutiny, může být však podmíněn nenádorovým i nádorovým průběhem. Pseudotumory jsou jen nenádorového charakteru. Až 75 % polypů zastupují hyperplastické polypy. Ty se vyskytují současně s chronickou gastritidou, reaktivní gastropatií, hypochlorhydrií a hypergastrinemií, v okolí chirurgické anastomózy. Hyperplastické polypy jsou ze začátku menší a přisedlé s hladkým, postupně se zvětšují do stopkatého, někdy rozčleněného tvaru. Dalšími pseudotumory vyskytující se v žaludku jsou například fundický glandulární polyp, heteropatie pankreatické tkáně, hamartomatózní polypy a inflamatorní fibroidní polyp. (7)

1.7.6 Nádory žaludku

Nádorem žaludku je postiženo zhruba 10 % z celkového počtu nemocných rakovinou na světě. Nejvíce případů je zaznamenáno ve východní Asii, východní Evropě a Latinské Americe. V zemích s nejčastějším výskytem jsou nejčastější karcinomy v oblasti pyloru. Adenokarcinomy žaludku jsou výsledkem genetické a environmentální multifaktoriální etiologie. Jeden z faktorů je i postižení *H. pylori*, který je řazen WHO jako karcinogen 1. třídy. Také jsou známé souvislosti s environmentálními stravovacími složkami a to zejména s konzervovanými a uzenými potravinami. Z mnoha případů je patrné, že vývoj rakoviny žaludku je vícestupňový proces, popsáný jako Correova kaskáda. Ta postupuje od zdravé sliznice přes chronickou gastritidu, atrofickou gastritidu a střevní metaplazii k dysplazii a karcinomu. (9)

Nádory žaludku lze dle jejich histogeneze rozdělit na epitelové, neuroendokrinní, mezenchymální a lymfomy (více v obrázku 2). (7)

Obrázek 2: Schéma klasifikace nádorů žaludku.



Zdroj: (7)

Karcinom žaludku

Karcinomy žaludku jsou maligní epitelové nádory infiltrující stěnu přes bazální membránu epitelu žaludeční sliznice. Nejčastější formou karcinomů, až 90 %, jsou adenokarcinomy, ostatní patří mezi karcinomy s lymfoidním stromatem. Adenokarcinom žaludku je 5. nejčastější maligní nádor na světě a postižení jsou více muži než ženy v poměru 2:1. Celosvětový průměr incidence je 17/100 000. Výskyt je však značně variabilní, oblast s nejvyšší incidencí je Japonsko, naopak s nejnižší Afrika a Severní Amerika. Oblastní rozdíly v incidenci značí o důležitosti environmentálních faktorů v onkogenezi adenokarcinomu. Nejvýznamnější faktory karcinomů jsou infekce *Helicobacter pylori* a strava s obsahem N-nitrosloúčenin. Ty jsou obsaženy hlavně v potravě konzervované nasolením a uzením. Dalšími prokázanými faktory jsou kouření tabáku, infekce EBV či subtotální resekce žaludku.

Mikroskopicky lze adenokarcinom rozdělit na dva běžné typy: intestinální a difúzní. Intestinální typ utváří žlázné struktury, hlavně tubuly a papily. Existuje i nediferencovaná forma obsahující čepy nebo plachty nádorových buněk. Difúzní typ je méně častý, tvoří

žlázové struktury, ale charakteristicky proniká stěnou ve formě disociovaných buněk s prstenčítým vzhledem. Tyto buňky se šíří po ploše žaludku a způsobují rozšíření stěny žaludku. (5; 7; 8)

Gastrointestinální stromální tumor (GIST)

GIST jsou nejběžnější mezenchymální nádory a na rozdíl od ostatních skupin je těžké tento nádor jasně vyznačit jako benigní nebo maligní. Charakteristicky má velké spektrum histologických obrazů s rozmanitým typem agresivního chování a předpokládá se, že pochází z mezenchymálních progenitorových Cajalových interstiálních buněk umístěných v *tunica muscularis propria*. Vyskytuje se od jícnu až po konečník, většina případů se však vyvíjí v žaludku (60–70 %), tenkém střevě a jícnu. Nádory GIST vznikají většinou z *muscularis propria* a vyrůstají do dutiny, popřípadě do serózy žaludku. Tumory jsou zpravidla dobře ohraničené s kulovitým nebo vejčítým tvarem.

GIST lze ze stránky molekulární biologie rozdělit na SDHB-pozitivní (adultní forma) a SDHB-deficientní (pediatrická forma). Dělení GIST spočívá v imunohistochemickém průkazu exprese enzymového komplexu sukcinát-dehydrogenázy (SDHB), ten se vyskytuje na vnitřní membráně mitochondrií nádorových buněk. U cca 85 % případů je exprese SDHB zachovalá. Tato forma je charakteristická mutací genu kódujícího tyrozinkinázu III. typu: KIT („kitten“, podle průkazu na kočičím sarkomu) a PDGFR α (receptor pro růstový faktor alfa). Aktivací těchto genů se spustí kaskáda ovlivňující proliferaci, apoptózu, diferenciaci a angiogenezi, s epigenetickými faktory poté způsobují vznik nádorů. SDHB-deficientní typ je na rozdíl od pozitivní formy charakteristický inaktivací podjednotky komplexu mitochondriální sukcinát-dehydrogenázy, to vede ke vzniku buněčné hypoxie, ovlivnění metabolismu a následně k nádorové změně. (5; 7)

2 HELICOBACTER PYLORI

2.1 Charakteristika *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori se řadí do skupiny bakterií, přesněji mikroaerofilních gramnegativních tyčinek spirálového tvaru. Při laboratorní metodě Gramovo barvení se vzorek postupně barví krystalovou violetí, Lugolovo roztokem, alkoholem a karbol-fuchsinem. U gramnegativních bakterií alkoholem odbarví krystalová violet' a zachycuje se karbol-fuchsin, díky němuž se *H. pylori* při použití této metody barví červeně.

Dalším charakteristickým znakem bakterie je její pohyblivost, které je schopna díky 5–7 polárně umístěným bičíkům. Ty jsou kryty dvěma obaly fosfolipidů, které chrání bičík před nízkým pH. Velikost tyčinek *H. pylori* bývá zhruba 5 μm do délky a 0,5 μm do šířky. (10; 11; 12; 13)

2.1.1 Biochemická aktivita

H. pylori vytváří ureázu, proteázy, fosfolipázy, fosfatázy, glykosulfatázy, hemolysin (bílkovina potlačující tvorbu HCl), endotoxin a adhezivní faktory. Biochemické aktivity bakterie *Helicobacter pylori* mají svůj význam v roli života tohoto mikroba. Ureáza neutralizuje kyselé mikroprostředí prostředí žaludku v okolí bakterie. Glukosulfatázy napomáhají bakterii prostoupit hlenem v žaludku. Před toxickými účinky fagocytů, se *H. pylori* chrání katalázou. Fosfolipáza je enzym štěpící fosfolipidové membrány buněk, díky tomu se bakterie do buňky dostane jednodušeji. Důležitý virulentní faktor je CagA (cytotoxin associated gene A), u něhož se předpokládá karcinogenní účinek. V západních zemích se vyskytuje asi u 60 % izolovaných kmenů, v Asii je přítomnost CagA prakticky u všech kmenů. (10; 14)

2.2 Epidemiologie infekce *Helicobacter pylori*

H. pylori osidluje membránu sliznice žaludku a dvanáctníku u více než poloviny populace. Což tuto bakterii řadí mezi první v žebříčku bakteriálních patogenů člověka. U 15–20 % nakažených se rozvinou gastrointestinální obtíže. Příčinou různého průběhu infekce je antigenní různorodost *H. pylori*, jiná imunitní odpověď nakaženého a životospráva jedince (kouření, pití alkoholu, strava). Výskyt v populaci je nerovnoměrný, za regionální rozdíly mohou především socioekonomické rozdíly, které mají vliv na hygienické podmínky. Přenos *H. pylori* má fekálně-orální a přímou (orál-orální) dráhu. Také v rodinách je

prevalence zvýšená až na 80 % ze stejných důvodů, kde přenos bývá již v dětství z matky na dítě či mezi sourozenci. (11; 13; 7)

2.3 Patogeneze

Prostředí žaludku bývá pro bakterie velmi nehostinné, *Helicobacter pylori* je však na kyselé žaludeční šťávy uzpůsoben (viz podkapitola 2.1.1. Biochemická aktivita). Za pomoci bičíku se mikrob dostane až do ochranné hlenové vrstvy na vnějšku žaludeční sliznice. Adheziny bakterie zajistí kontakt mikroorganismu s receptory foveolárních buněk žaludku. Poté patogen ničí žaludeční sliznici svými dvěma cytotoxiny a chemotaktickými faktory, které jsou spojeny s větší zánětlivou odpovědí organismu hostitele, rizikem vzniku vředové choroby a také maligního nádoru. Cytotoxiny vytvořené *H. pylori* jsou CagA (cytotoxin-associated gene A) a VacA (vakuolizující cytotoxin A). Oba dva synergickým působením poškozují epitelové buňky, to vede k rozsáhlým zánětlivým změnám. Důsledkem je poškození tvorby hlenu, tím se agresivní kyselá šťáva žaludku dostane k nechráněné sliznici. Nejdříve mechanismy parietálních buněk zvýší produkci HCl, následně rozšíření zánětu spojené se zničením korporálních žlázek způsobí hypochlorhydrii. To při pokročilé fázi zánětu zapříčiní velké zvýšení pH a přesun bakterie *Helicobacter pylori*, která prospívá při pH 3,5–5 do korporálních žlázek sliznice žaludku, kde je pH nižší. (7)

2.4 Nemoci žaludku způsobené infekcí *Helicobacter pylori*

Mezi nejvýznamnější nemoci žaludku asociované s infekcí bakterií *Helicobacter pylori* můžeme zařadit chronickou gastritidu, peptidický vřed, adenokarcinom žaludku a MALT lymfom žaludku. (7; 11)

2.4.1 Chronická gastritida

Většina pacientů je asymptotická a chronická gastritida způsobena *H. pylori* může probíhat po mnoho let bez povšimnutí. Někteří mohou zaznamenat bolest v epigastriu, poruchy trávení, nevolnosti či zvracení. Je zaznamenáno i spontánní vymizení bakterií a ústup gastritidy zhruba u 10 % případů. Zhruba čtvrtina pacientů s eradikací bakterie nepocítuje zlepšení dyspeptických obtíží. (9)

Chronická gastritida se vyvíjí ve dvou fázích: akutní a pokročilá fáze, Akutní fáze má obvykle subklinický charakter, proto se většinou nestanovuje biopticky. Projevuje se otokem proprie a neutrofilů v epitelu. V rané fázi chronické gastritidy mikroorganismus charakteristicky osidluje antrum díky vhodnému mikroprostředí a pH. Pokročilá fáze je typická zánětlivou destrukcí žlázek a faveol epitelu, tím vzniká metaplazie a atrofie antrální slizni-

ce. Protože je atrofované prostředí pro bakterii *H. pylori* nehostinné, přесidluje mikroorganismus a s ním i zánět od antra směrem ke kardii po sliznici celého žaludku (pangastritida). Tím dochází k atrofii a metaplazii i v ostatních částech žaludku zasažených zánětem. Komplikacemi chronické gastritidy, jež byla způsobena kmeny *H. pylori* produkující cytotoxiny CagA a VacA jsou těžší průběh gastritidy, ale i riziko vyvinutí duodenálního vředu, žaludečního vředu, adenokarcinomu žaludku a MALT lymfomu žaludku. (7; 9)

2.4.2 Gastroduodenální vředová choroba

Pro gastroduodenální vředovou chorobu je charakteristický zánět a ulcerace žaludeční sliznice. K tomu dochází v závislosti na vzrůstu škodlivých podnětů působících na sliznici (kyselé prostředí žaludku a pepsin trávicí bílkoviny). Vzniklý chronický vřed je kulatá, jasně ohraničená léze s lehce sbíhající se slizniční řasou na okraji. Mezi majoritní příčiny vředové choroby patří nesteroidní protizánětlivé léky, kouření, cirkulační poruchy a infekce *Helicobacter pylori* spojená s chronickou gastritidou. Nejčastěji se vředy nacházejí v antrální části žaludku. Typickým příznakem je bolest žaludku za chvíli po jídle. Pokud se vředová choroba rozvine, mohou vzniknout tyto komplikace: penetrace vředu do vedlejšího orgánu, perforace stěny žaludku nebo dvanáctníku, krvácení vředu při destrukci stěny cévy a stenóza pylorické části. (7; 9)

2.4.3 Rakovina žaludku

Rakovina žaludku je 3. nejčastější nádorové onemocnění na světě. Nádorová onemocnění žaludku jsou až z 80 % způsobena infekcí *Helicobacter pylori*, proto je také tento patogen, jako jediný mikrob, karcinogenem v kategorii A dle WHO. Do této kategorie patří pro srovnání i kouření cigaret. Důležitým činitelem pro vyvinutí nádoru, je délka působení mikroba v těle. S delším výskytem bakterie vzniká více poškození i mutací buněk, které se mohou rozvinout v nádor. (14)

Nejčastěji je infekce spojována s adenokarcinomem žaludku, gastrointestinálním stromálním tumorem (viz podkapitola 1.7.6 Nádory žaludku), a MALT-lymfomem. (9)

Gastrointestinální lymfom (MALT-lymfom)

Téměř 40 % lymfomů je primárně extranodálních (vně lymfatických uzlin) a až v 60 % případů je postiženým místem žaludek. MALT-lymfom neboli non-Hodgkinův lymfom je u dospělých po adenokarcinomu druhým nejpočetnějším nádorem žaludku. Chronická gastritida způsobena infekcí *Helicobacter pylori* je typická tvorbou lymfatických folikulů, které se normálně ve tkáni žaludku nenacházejí. Z nich se poté v malém procentu

případů rozvine MALT lymfom spadající do B-řady lymfomů. Nejčastějším místem vzniku je antrum, kde se nejčastěji rozvíjí chronická gastritida. Patologicky je tento novotvar svými rysy podobný střevním Payerovým plátům, jež mají lymfoidní folikuly z aktivního zárodečného centra zahaleného pláštěovou oblastí malých lymfocytů a středně velkých buněk. Nádorové B-buňky jsou podobné centrocytům zárodečných center a označují se CCL buňky (centrocyte-like). CCL buňky mnohdy prorůstají do epitelu žlázek a dochází k tvorbě lymfoepiteliárních lézí, ty jsou charakteristické pro MALT-lymfomy. *Helicobacter pylori* má vliv na T-lymfocyty, které napomáhají dělení B-buňky. (8; 9; 11)

2.5 Diagnostika *H. pylori*

Diagnostiku mikroba *Helicobacter pylori* můžeme rozdělit na dva základní typy: invazivní (je potřeba odebrání kusu tkáně při endoskopickém vyšetření) a neinvazivní (není zapotřebí endoskopie). Mezi invazivní metody spadá histologické vyšetření, rychlý ureázový test, kultivace a molekulárně-genetické metody. K neinvazivním testům řadíme vyšetření sérologické, detekce antigenu *Helicobacter pylori* ve stolici, detekce metabolitů hydrolýzy urey ve vydechovaném vzduchu (díky označenému uhlíku C₁₃ a C₁₄), krvi a moči. Kvůli ne zcela stoprocentní specificitě a senzitivitě testů by se měli použít alespoň dvě metody. (15)

2.5.1 Neinvazivní

Neinvazivní testy se většinou používají, pokud mají pacienti dyspepsii před 45 rokem života a neobjevují se u nich žádné alarmující příznaky jako je anémie nebo ztráta hmotnosti. Při pozitivním výsledku následuje eradikace infekce. Tento postup není v České Republice bez endoskopického vyšetření považován za vhodný. Další situace, při které se neinvazivní testy používají, je ověření stavu po eradikační léčbě. Vzhledem ke špatné dostupnosti neinvazivních testů a nízké ceně endoskopického vyšetření se i v tomto případě využívá spíše invazivních testů. Proto se neinvazivních testů využívá spíše jen u pacientů s rizikovostí endoskopického vyšetření, jako jsou těhotné ženy. (15)

Sérologické

Sérologické vyšetření s detekcí protilátek neukazuje současný stav infekce z důvodu až několikaletého přetrvání protilátek po uzdravení pacienta. Naopak falešně

negativní výsledky jsou často u starších osob, dětí a imunosuprimovaných lidí, také rasa má vliv na senzitivu. Proto by sérologické vyšetření mělo být standardizováno v závislosti na oblasti s určitou populací. Vzhledem k malému poklesu protilátek po vyléčení infekce je tato metoda vhodná spíše pro epidemiologické průzkumy či hledání bakterie v rodině pacientů postižených nemocí spojenými s výskytem *Helicobacter pylori*. Mezi antigeny schopné vyvolat imunitní odpověď se řadí sekreční liposacharidové antigeny, cagA, ureázové složky, proteiny tepelného šoku či kataláza. Infekce *Helicobacter pylori* je v podstatě chronický stav, a díky tomu převažuje v séru IgG odpověď. Senzitivita této metody je 80–90 %. (15; 16)

Průkaz antigenu ve stolici

Při průkazu antigenu ve stolici se využívá monoklonálních či polyklonálních protilátek proti *H. pylori*, metodou ELISA. Senzitivita a specifita této metody je až 94 % a 91 %. Výhodou této metody je vyhodnocení eradikace infekce. V případě snížení koncentrace antigenu se však výsledek může jevit falešně negativní. Další nevýhodou metody může být nestálé vylučování antigenu stolicí v čase či degradace antigenu ve střevě. (15; 16)

Dechový test

Dechový test je zlatým standardem v diagnostice infekce *Helicobacter pylori*. Tato metoda využívá pacientovi podávanou značenou močovinu izotopem uhlíkem C₁₃ nebo C₁₄, která je rozštěpena ureázovým enzymem produkovaným bakterií *Helicobacter pylori*. Pokud je mikrob v žaludku přítomen, rozloží se značená močovina na oxid uhličitý a amoniak, CO₂ putuje krví do plic. Z plic se CO₂ vydechuje s užitým izotopem uhlíku, který se dá detekovat. Z většiny provedených studií lze říci, že specifita a senzitivita metody je více než 90 %. Nevýhodou testu je falešná pozitivita v případě kolonizace žaludku jinými mikroby produkující ureázový enzym. Falešně negativní výsledky se mohou objevit při požívání antibiotik pacientem. Nedostatky této metody jsou například u lidí po operaci žaludku či pacientů užívajících léky působící na pH žaludeční sliznice. (15; 16)

2.5.2 Invazivní

Pro provedení invazivních metod je povětšinou nutné provést endoskopické vyšetření s odběrem. Do kategorie invazivních testů spadá histologické vyšetření, rychlý ureázový test, kultivace a metody molekulární diagnostiky. (15)

Histologické vyšetření

Histologické vyšetření bylo první použitou metodou pro detekci infekce *Helicobacter pylori*. V současnosti je to nejužívanější metoda, která hodnotí přítomnost typické spirálové bakterie a zánětlivou reakci v tkáňových preparátech sliznice antra a těla žaludku. Užívá se metoda stříbření (Warthin-Starry), a dle Giemsky s udávanou senzitivitou 90 %. Dalšími použitelnými barvenými jsou akridinová oranž, barvení dle Genty, Mc Mullena či Dieterleho. Základní barvení hematoxylin-eosin ukazuje závažnost zánětu. Specificita a senzitivita histochemického barvení je okolo 90 % podle typu barvení a odbornosti hodnotitelů. Správné detekci může zabránit přeměna typického spirálového tvaru bakterie *H. pylori* v kokovitou formu. Tato transformace může být způsobena dřívější léčbou antibiotiky. (15; 16)

Rychlý ureázový test

Ureázový test využívá podobně jako dechový test přeměny močoviny v amoniak a oxid uhličitý enzymem ureázy, kterou produkuje bakterie *H. pylori*. Amoniak působí zásaditě na pH, který zbarví pH citlivý indikátor. Vyšetření se provádí buďto v pevném podpurném médiu nebo v roztoku a je k němu zapotřebí odebrat dvě biopsie, z antra a těla. Senzitivita a specificita testu je až 90 %, pokud má pacient krvácení do gastrointestinálního traktu, senzitivita se sníží na 60 %. (15; 16)

Mikrobiologické vyšetření

Mikrobiologické vyšetření neboli kultivace mikroba *Helicobacter pylori* se běžně kvůli vysoké ceně rutinně nedělá. Metoda se provádí kvůli citlivosti bakterie na antibiotika u pacientů, u kterých selhala léčba jedné či dvou eradikačních terapií. Pro úspěšnou kultivaci je nutná správná přeprava vzorku do laboratoře, která se provádí ve Stuartově transportním médiu při teplotě 4 °C, takto mikrob přežívá až 24 hodin. Pro izolaci je poté mikrob nanesen na kultivační medium, nejčastěji Columbia agar nebo Brain heart infusion (BHI), bujón doplněný krví. Inkubace se provádí při 37 °C v mikroaerobní atmosféře s 5–10 % CO₂, 80–90 % N₂ a 5–10 % O₂. Kultivace trvá 5–7 dní. Specifičnost metody je nejlepší z metod, její citlivost však dost kolísá (50–70 %) podle schopnosti laboratoře kmeny *Helicobacter pylori* obnovit. (15; 16)

Metody molekulární biologie

Nejčastěji využívanou molekulární metodou při detekci bakterie *Helicobacter pylori* je PCR. Ta dokáže detekovat bakterie z biopsií žaludku, v žaludeční šťávě, stolici či zubním povlaku. Metoda má až 100% senzitivitu, ta však kolísá podle správnosti výběru

primeru. Molekulární metody jsou stále dosti drahé a náročné, proto se zatím v rutinní praxi nepoužívají. (15)

2.6 Léčba infekce *Helicobacter pylori*

Podle průzkumů z roku 2022 je míra vyléčení infekce *H. pylori* 80 % nebo méně. Skoro všechny léčebné terapie jsou empirické, tedy založené na zkušenosti. Bohužel jsou v posledních letech mikroby čím dál více rezistentní vůči antibiotikům, a tak dříve dobře působící trojitá terapie (amoxicilin, klarithromycin a metronidazol nebo levofloxacin) začíná být neúčinná. Terapeutické pokyny se povětšinou vydávají na základě metaanalýz. Zajímavostí je, že nevhodná indikace antibiotik při léčbě *H. pylori* přispívá k celosvětové rezistenci na antibiotika.

PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

3.1 Hlavní cíl

Cílem této práce bakalářské práce bylo za pomoci statistické analýzy vyhodnotit shodu mezi histologickými hodnotiteli při kvantifikaci mikroorganismu *Helicobacter pylori* ve vzorcích z biopsie sliznice žaludku.

3.2 Dílčí cíle

1. Dílčím cílem bakalářské práce bylo využít histochemických metod pro zviditelnění bakterie *Helicobacter pylori* v biopsii žaludku

4 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

4.1 Hlavní otázka

Je shoda v hodnocení nad 70 %?

4.2 Dílčí výzkumné otázky

Které faktory ovlivňují výsledek?

5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Z archivního materiálu Šiklova ústavu patologie FN Plzeň bylo vybráno celkem 35 vzorků parafinových bloků, které obsahovaly tkáň sliznice žaludku s histologicky potvrzenou diagnózou gastritidy původu *Helicobacter pylori*.

Vzorek č. 740/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 740/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 1651/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 1651/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 2150/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 2706/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 2706/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 2706/20/3 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3139/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3139/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3142/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3142/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3142/20/3 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3142/20/4 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3345/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3695/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 3695/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 4286/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 5496/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 5675/21 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 6779/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 6868/21/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 6868/21/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 6868/21/3 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 8903/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 10714/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 11701/21/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 11701/21/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 11989/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 13750/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 13750/20/2 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 13864/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 14353/20 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 14532/20/1 – Sliznice žaludku

Vzorek č. 14532/20/2 – Sliznice žaludku

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Přikrajování tkáně

Pokud chceme zpracovávat odejmuté tkáně velkých rozměrů (resekáty, excize), musíme je nejdříve správně přikrojit na menší kousky, které následně pro vyrobení histologických preparátů zaléváme do parafínových bločků. Přikrajování už fixovaných tkání ve formolu vykonává patolog v odvětrávaných boxech s pomocí laborantů a zapisovatelky nebo diktafonu. Těm patolog během přípravy diktuje popis materiálu, v kterém zahrnuje anatomické partie odejmuté tkáně, počet kousků, velikost, konzistenci, barvu a jasné patologické změny. Tyto informace jsou zaznamenány do průvodního listu nebo počítačové databáze. Výsledkem správného přikrojení by měly být dobře vybrané kousky tkáně, které mají přítomny všechny skruktury potřebné pro mikroskopické hodnocení. Poté jsou vzorky vloženy do kazet, ve kterých jsou dofixovány formolem a putují do autotechnikonu (viz 6.2). Na každé kazetě je řádně zaznamenáno označení vzorku. (7)

V rámci BP byly zpracovávány velmi malé tkáňové vzorky sliznice žaludku získané takzvanou endoskopickou biopsií. Ty byly dopraveny do patologické laboratoře v nádobce zalité pufrovaným formolem.

6.2 Odvodnění a prosycení vzorku

Po fixaci ve formolu se tkáň vypírá vodou, proto se následně odvodňuje za pomoci posloupné řady roztoků se stoupající koncentrací etanolu a následného přenesení do xylenu. Poté se pokračuje procesem prosycení tkáně parafínem za zvýšené teploty (tomu napomáhá předchozí organické rozpouštědlo xylén). Prosycení parafínem je důležité provést řádně, kvůli možnému rozkladu tkáně v mikroskopických prostorách. Celý tento proces je v dnešní době již automatizován přístrojem autotechnikon. (7; 19)

6.3 Zalítí do parafínového bloku

Vzorek ve fixační tekutině není možné krájet rovnou, ale je nutné ho zalít do zalévacího media, to vzorkem dobře pronikne a je jednodušší provádět tenké řezy. Proto byly tkáně po vyjmutí z autotechnikonu vyndány z histologických kazetek a zality do parafínu. Proces zalévání se provádí na specializované lince. Zalévací linka udržuje teplotu media mezi 56–58 °C, při nichž je parafín v tekutém stavu. Vzorek byl zalit do kovové zalévací komůrky/formičky. To je malá nádobka, do které bylo nejdříve nalito malé množství para-

finu. Poté byl vložen vzorek tkáně, který musel být správně orientovaný pro následovné krájení. Na formičku byla nasazena spodní část histologické kazetky, na které bylo číslo vzorku, a nakonec byl vzorek zalit nadbytkem media (tkáň musela být řádně potopena). Nakonec se takto zalitá komůrka přesunula na chlazenou část zalévací linky. Po zatuhnutí parafinu byl z formičky vyklepnut parafinový bloček s tkání. (19)

6.4 Krájení parafinových bločků

Z parafinových bločků byly následně na speciálním přístroji zvaném mikrotom připraveny tenké řezy o tloušťce 2–4 μm . Mikrotomy můžeme rozdělit na rotační a sáňkový podle způsobu, kterým se používají. U rotačního mikrotomu je ve stálé pozici žiletkový vyměnitelný nůž, vzorek je uchycen ve svorce, kterou se pohybuje za pomoci rotace páčky. U sáňkového je naopak ve fixní pozici vzorek umístěný ve svorkách a pohybuje se přes něj žiletkovým nožem. (19)

Aby se parafinové bločky lépe krájely, byly nejdříve schlazeny, to se provádělo buďto na chladicí desce nebo za pomoci kovové formičky a suchého ledu. Ztuhlé vzorky se umístily do svorek sáňkového mikrotomu. Poté bylo třeba vzorek nastavit do požadované pozice za pomoci mikrometrického šroubu a na mikrometrické stupnici nastavit danou tloušťku řezů. Mikro tahem byly prováděny řezy, z nichž se vybralo pár vhodných pro další zkoumání.

6.5 Natahování parafinových řezů

Po ukrojení byly řezy vloženy na studenou hladinu destilované vody v Petriho misce. Zde se daly řezy za pomoci preparačních jehel a podložních skel rovnat, vypínat a oddělovat na jednotlivé řezy. Poté bylo vybráno několik kvalitních řezů, které byly zachyceny na podložní sklíčko a přeneseny do teplé lázně (destilovaná voda o teplotě 47–49 $^{\circ}\text{C}$). Díky teplé vodě se řezy ještě více vyhladily a mohly se za pomoci pátracích jehel přenést na podložní sklíčko, kde se uchytily vytažením z vody. Každé podložní sklíčko obsahovalo před použitím číslo vzorku. (19)

6.6 Odparafinování tkáňových řezů

Před každým barvením byly parafinové řezy řádně odparafinovány z důvodu nerozpustnosti parafinu ve vodě (aplikovaná barviva byla ve formě vodného roztoku). Odparafinování se provádělo v lázních xylenu a poté se řezy zavodňovaly v sestupné etanolové řadě až do deionizované vody. (7)

6.7 Barvení

Protože se neobarvené tkáně v běžném světelném mikroskopu nedají pozorovat a tato BP práce je zaměřena na detekování *Helicobacter pylori* hodnotiteli, bylo nezbytné bakterie zvýraznit speciálním histologickým barvením. (7)

6.7.1 Hematoxylin-eosin

Hematoxylin-eosin je základní barvicí metoda patologie. Vytvořila se spojením zásaditého barviva hematoxylinu, které barví jádra buněk modře a kyselého eosinu, ten barví cytoplasmu červeně. V ŠÚP FN Plzeň se používá Gillův hematoxylin. Roztok hematoxylinu by zásadité substance neobarvil, a proto se nejdříve jodičnanem sodným oxiduje na hematein, z něj přidáním mořidla (kamence draselného) vznikne barevný lak. Z eosinu se vyvine přidáním deiozinované vody žlutý roztok barvicí kyselá substance. (18)

Při barvení vzorků metodou hematoxylin-eosin byl použit barvicí automat. Řezy byly nejdříve odparafinovány do 70% alkoholu. Dále se nechaly se v Gillově hematoxylinu po dobu 7 minut a byly diferenciovány v kyselém alkoholu. Následně byly vzorky prány pod tekoucí vodou. Po zmodrání jader byly ponořeny na 1 minutu do roztoku eosinu. Nakonec se opláchly v deionizované vodě, odvodnily, projasnily a montovaly. Více v příloze A.

6.7.2 Warthin-Starry

Warthin-Starry je doplňkové barvení k běžnému barvení hematoxylinem-eosinem, které se používá pro detekování bakterie *Helicobacter sp.*, spirochet a dalších organismů v řezech tkání. (20)

Pro tuto bakalářskou práci byly vzorky barveny ručně podle předepsaného manuálu Šiklova ústavu patologie FN Plzeň (viz příloha B). Nejdříve se vzorky musely odparafinovat do deionizované vody. Dále naložit do kyselá vody (roztok kyseliny citronové). Po 5 minutách impregnovat 45 minut v 2% roztoku dusičnanu stříbrného při 56 °C v termostatu. Po vyndání z termostatu se 2–3krát propláchly v teplé vodě a přelily vývojkou na 2–4 minuty. Následně se tkáň zkontrolovala pod mikroskopem, zda je správně obarvena a opět 2–3krát propláchla v teplé vodě. Nakonec se všechny vzorky odvodnily, projasnily a montovaly.

Poměry pro přípravu roztoků:

Kyselá voda: 2400 ml deionizované vody + 1,6 ml 1% roztoku kyseliny citronové.

2% roztok dusičnanu stříbrného: 1 g dusičnanu stříbrného + 50 ml kyselá vody.

Roztok hydrochinonu: 0,15 g hydrochinonu + 100 ml kyselá vody.

Roztok želatiny: 1,25 g želatiny + 25 ml kyselé vody.

Vývojka (nutné smíchat těsně před použitím): 10 ml 2% roztoku dusičnanu stříbrného + 13,5 ml roztoku hydrochinonu + 25 ml roztoku želatiny.

Všechny roztoky se dávají přehřát do termostatu na 56 °C.

6.7.3 Giemsa

Pokud chceme morfologicky identifikovat prvky a bakterie, je Giemsovo barvení jednou z možností. Giemsův roztok je neutrální barvivo zhotovené namícháním zásaditého (například azure B, metylonové modři) a kyselého barviva (například eosinu). Po obarvení jsou mikroorganismy v tkáni modrofialové, cytoplazma světle modrá, jádra jsou modrá, a erythrocyty, kolagen, svaly kosti jsou růžové. (19)

Vzorky biopsií byly nejdříve odparafinovány do deionizované vody a poté naloženy do roztoku Giemsy na 40 minut při 56 °C v termostatu. Po uplynutí doby se opláchly deionizovanou vodou a nechaly se diferencovat v 400 ml destilované vody s 8 kapkami ledové kyseliny octové do růžového zbarvení. Následoval opět oplach deionizovanou vodou a nakonec odvodnění, projasnění a montování. Přesný postup ŠÚP FN Plzeň Příloha C.

6.8 Montování

Po obarvení byly vzorky uzavřeny v montovacím automatu do vodou nemísitelného media (rozpuštějícího se v xylenu). V ŠÚP FN Plzeň se používá Pertex. Mezi vodou nemísitelné látky používajících se k montování patří například i Solakryl či Kanadský balzám (viskózní světlá pryskyřice z jedle kanadské). Při tomto procesu bylo medium kápnuto na vzorek a následně překryto krycím sklíčkem. (7)

6.9 Hodnocení vzorků pod světelným mikroskopem

Světelný mikroskop je primární pracovní pomůcka patologa. Používá se denně ke klasifikaci základního a speciálního histologického barvení, enzymové histochemie a výsledků imunohistochemických metod. Lidské oko má rozlišovací schopnost (vzdálenost mezi dvěma body, u které je od sebe ještě dokážeme odlišit) 0,25 mm, ve světelném mikroskopu je až 0,25 μm . Vždy však záleží na různých faktorech, jako je oko jedince, dostupné světlo či zdroj a kvalita použitého mikroskopu. (7)

V rámci této práce byl použit světelný diaskopický mikroskop, u kterého světelný paprsek vznikající ze zdroje záření prochází přes kondenzor a přes vzorek do objektivu a okuláru.

Pozorovaný již montovaný vzorek byl vždy položen na podložní stolek světelného mikroskopu při zvětšení 4×10 , při tomto zvětšení se nastavila vzdálenost makroskopickým a mikroskopickým šroubem, aby byl vzorek viděn ostře. Následně se objektivem nastavilo zvětšení 10×10 a poté 20×10 , při kterém byly dobře viditelné bakterie *Helicobacter pylori*. Ty se vždy sčítaly ve třech nejvíce zamořených celistvých žlázkách sliznice žaludku. Výsledné číslo bylo zaznamenáno. Pozorování probíhalo stejně u všech 35 vzorků barvených metodou Giemsa a Warthin-Starry.

6.10 Statistické zhodnocení výsledků

Výsledné hodnoty všech hodnotitelů byly statisticky zhodnoceny pomocí Pearsonovy korelace a výsledného korelačního koeficientu. Tato metoda byla vyvinuta Pearsonem v roce 1896. Korelaci lze popsat jako míru lineární závislosti mezi dvěma náhodnými proměnnými. Pearsonův korelační koeficient dvou proměnných X a Y je definován jako kovariance dvou proměnných dělená součinem jejich směrodatných odchylek, ta slouží jako normalizační faktor. Korelační koeficient můžeme vyjádřit za pomoci této rovnice:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{(n-1) s_x s_y}$$

kde \bar{x} a \bar{y} jsou výběrové průměry, s_x a s_y jsou výběrové směrodatné odchylky. Koeficient r_{xy} je vždy v rozmezí -1 až 1 a je invariantní k lineárním transformacím obou proměnných. Znaménko PCC znázorňuje intenzitu vztahu mezi dvěma náhodnými proměnnými X a Y , to je kladné, pokud jsou proměnné přímo úměrné a záporné, pokud jsou nepřímo úměrné. Čím více se hodnota r_{xy} blíží $|1|$, tím je silnější lineární korelace. Při vysoké hodnotě r_{xy} lze očekávat korelaci i ve skutečném stavu pozorování. (21; 22; 23)

Podle Evansovy příručky můžeme hodnotu $|r|$ kvantifikovat i verbálně takto:

- 0,00 – 0,19 = velmi slabá,
- 0,20 – 0,39 = slabá,
- 0,40 – 0,59 = střední,
- 0,60 – 0,79 = silná,
- 0,80 – 1,00 = velmi silná. (24)

Grafy v kapitole Analýza a interpretace výsledků s hodnotou r_{xy} (Pearsonův korelační koeficient) jsou vytvořeny ve statistickém programu GraphPadPrism 9. (25)

6.10.1 Wilcoxonův test

Výsledky byly statisticky zhodnoceny také dle Wilcoxonova testu, který je neparametrický test dvou závislých datových sad. Test srovnává pravděpodobnost, že jedna sada dat obsahuje vyšší naměřenou hodnotu než druhá závislá sada dat.

Používá se pro hodnocení párových pokusů, kdy sledovaná veličina neodpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení. Porovnává 2 měření provedená u jednoho výběrového souboru. Testuje hypotézu rovnosti distribučních funkcí na základě ověření symetrického rozložení sledované náhodné veličiny. Výpočet testu vychází z párových hodnot dvou měření na jednom výběrovém souboru: veličiny X a X' . Výpočet byl proveden kalkulátorem webové platformy Statistics kingdom. (26; 27)

7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Jde o analýza 35 vybraných vzorků biopsie žaludku, které byly barveny histochemickými metodami Giemsa a Warthin-Starry. Byly hodnoceny třemi na sobě nezávislými hodnotiteli ve světelném mikroskopu. Hodnotily se tři žlázy ve sliznici žaludku, které obsahovaly nejvíce bakterií *Helicobacter pylori*. Ve všech třech žlázách se spočetly bakterie a jejich součet zaznamenal.

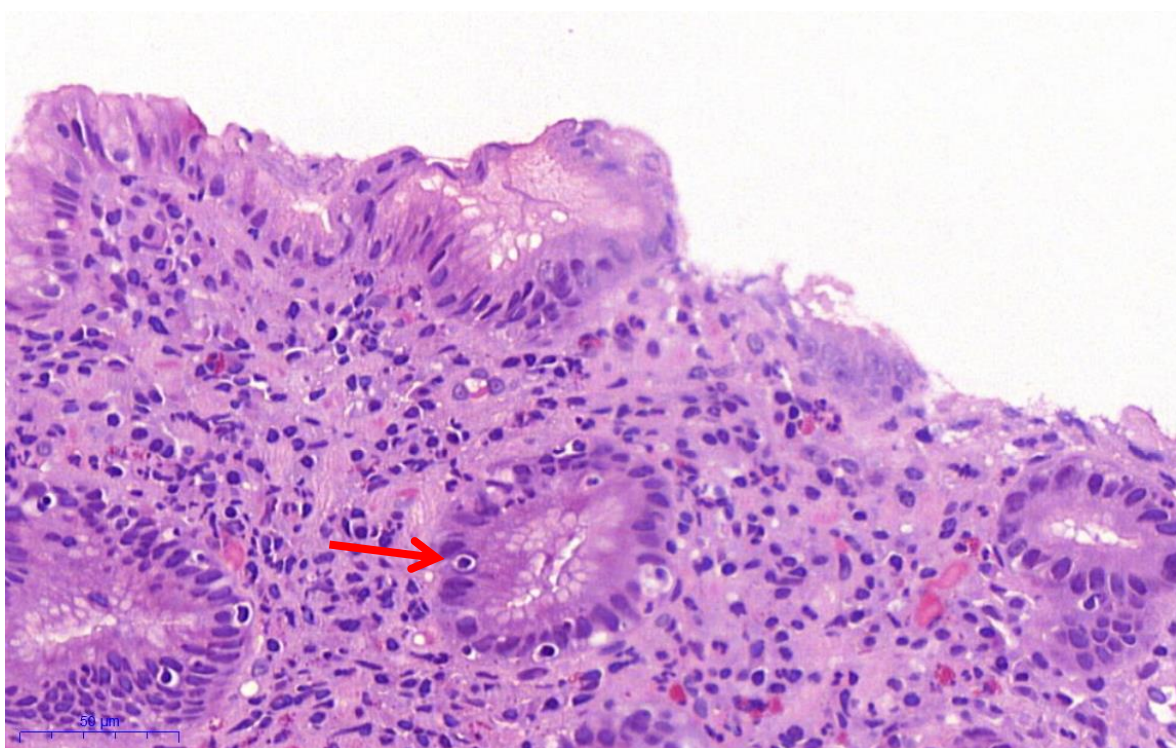
7.1 Výsledek barvení

Vzorky byly barveny třemi histochemickými metodami: hematoxylin-eosin, Giemsa a Warthin-Starry. V následujících podkapitolách je vidět jejich výsledné barvení.

7.1.1 Hematoxylin-eosin

Hematoxylin-eosin je základní barvení, které při infekci bakterií *Helicobacter pylori* zvýrazní zánět či změny na sliznici žaludku.

Obrázek 3: Vzorek biopsie sliznice žaludku barvený metodou hematoxylin-eosin.

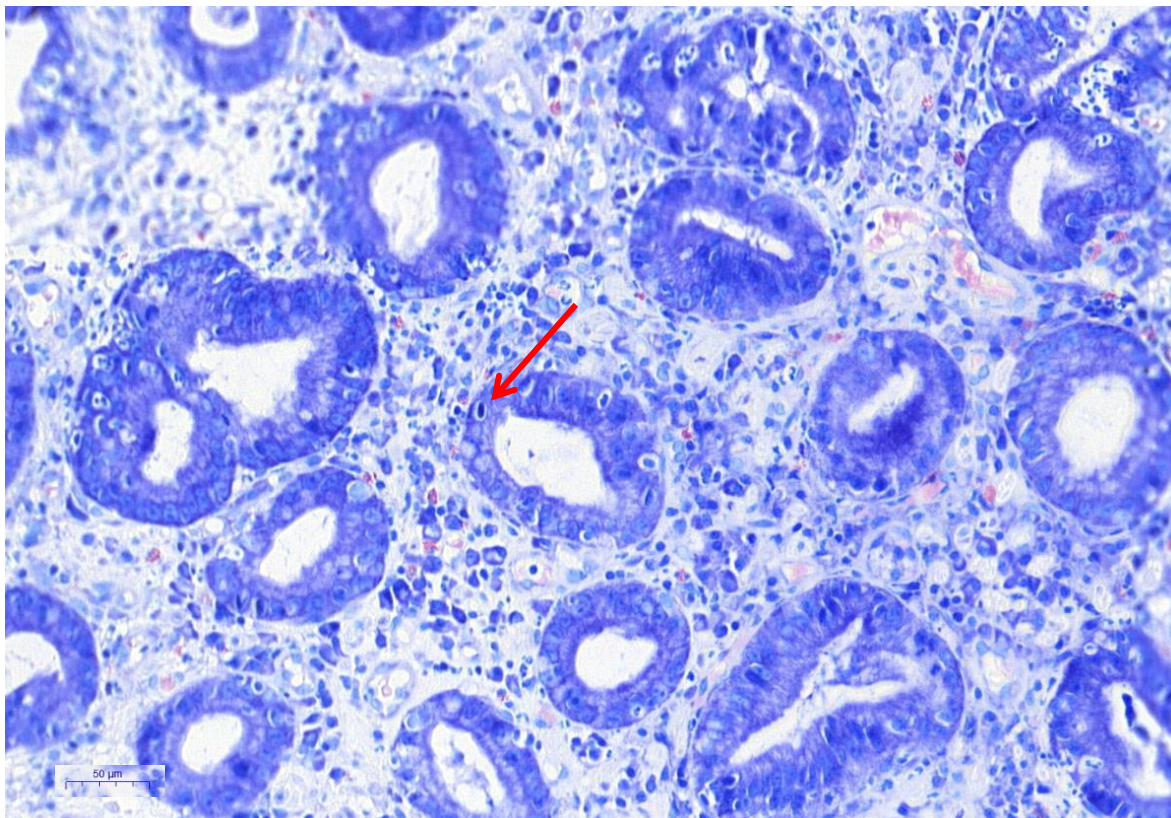


Zdroj: vlastní

Na obrázku 3 je pod červenou šipkou viditelný neutrofilní granulocyt v žláze sliznice žaludku. Tyto jsou charakteristické pro akutní zánět.

7.1.2 Geimsa

Obrázek 4: Vzorek biopsie sliznice žaludku barvený metodou Giemsa.

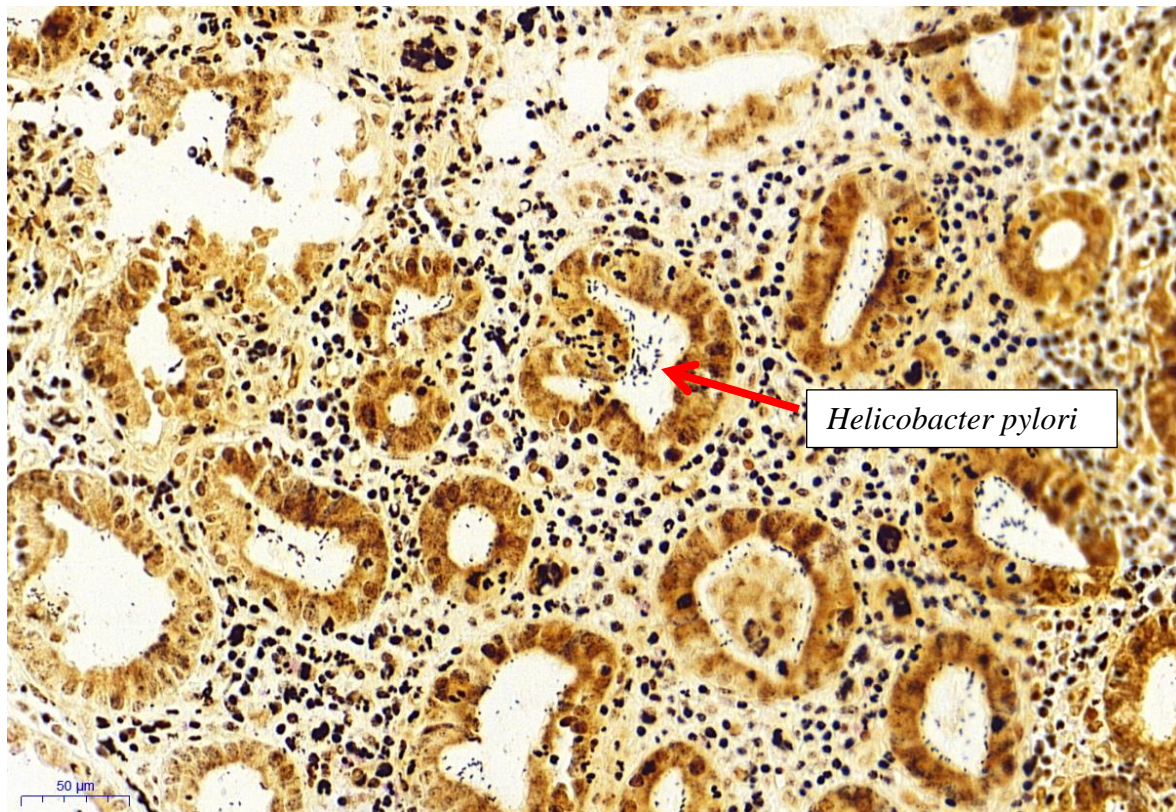


Zdroj: vlastní

Na obrázku 4 je sliznice žaludku obarvená specifickým barvením Giemsa. Červená šipka ukazuje na neutrofilní granulocyt specifické pro akutní zánět. Na mikrofotografii špatně viditelné bakterie *Helicobacter pylori* jsou světle modré.

7.1.3 Warthin-Starry

Obrázek 5: Vzorek biopsie sliznice žaludku barvený metodou Warthin-Starry.



Zdroj: vlastní

Na obrázku 5 je vyfocena tkáň sliznice žaludku s infekcí *Helicobacter pylori*, barvená specifickou metodou Warthin-Starry. Oproti fotografii 4, kde je tkáň barvena Giemsou, jsou zde jasně viditelné spirální bakterie *H. pylori*, které jsou v barvení stříbřením hnědočerné.

7.2 Analýza vzorků

Výsledky získané kvantitativním hodnocením vybraných vzorků byly každým hodnotitelem zaznamenány do následujících tabulek. Vždy se sečetly bakterie *Helicobacter pylori* ve třech nejvíce zamořených žlázách sliznice žaludku.

Tabulka 1: Výsledky kvantitativního hodnocení bakterie *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku barvené Giemsou

Giemsa			
Vzorek	Hodnotitel 1	Hodnotitel 2	Hodnotitel 3
740/20/1	27	74	52
740/20/2	11	31	21
1651/20/1	20	22	21
1651/20/2	16	14	10
2150/20	3	36	10
2706/20/1	0	0	0
2706/20/2	0	0	0
2706/20/3	6	0	0
3139/20/1	0	0	0
3139/20/2	104	74	90
3142/20/1	0	0	0
3142/20/2	0	0	0
3142/20/3	2	12	5
3142/20/4	16	34	15
3345/20	27	17	25
3695/20/1	71	34	58
3695/20/2	79	146	102
4286/20	40	83	62
5496/20	44	53	47
5675/21	81	76	80
6779/20	6	11	7
6868/21/1	12	27	19
6868/21/2	18	12	15
6868/21/3	9	8	5
8903/20	14	77	3
10714/20	77	116	85
11701/21/1	13	17	15
11701/21/2	18	15	15
11989/20	2	16	0
13750/20/1	220	171	20
13750/20/2	28	104	14
13864/20	20	28	20
14353/20	56	44	50
14532/20/1	0	0	0
14532/20/2	14	56	25

Zdroj: vlastní

Tabulka 2: Výsledky kvantitativního hodnocení bakterie *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku barvené metodou Warthin-Starry.

Warthin-Starry			
Vzorek	Hodnotitel 1	Hodnotitel 2	Hodnotitel 3
740/20/1	108	184	150
740/20/2	60	109	100
1651/20/1	38	135	25
1651/20/2	135	67	87
2150/20	47	152	120
2706/20/1	0	0	0
2706/20/2	0	0	0
2706/20/3	19	0	0
3139/20/1	0	0	0
3139/20/2	82	111	51
3142/20/1	0	0	0
3142/20/2	30	2	0
3142/20/3	9	4	0
3142/20/4	27	38	31
3345/20	30	34	34
3695/20/1	79	162	130
3695/20/2	82	171	166
4286/20	136	263	174
5496/20	73	115	94
5675/21	63	120	120
6779/20	14	26	24
6868/21/1	21	59	48
6868/21/2	27	21	26
6868/21/3	14	21	18
8903/20	113	107	31
10714/20	104	158	147
11701/21/1	85	63	80
11701/21/2	45	52	50
11989/20	6	47	2
13750/20/1	229	310	270
13750/20/2	93	246	100
13864/20	85	127	86
14353/20	107	130	109
14532/20/1	0	0	0
14532/20/2	37	71	52

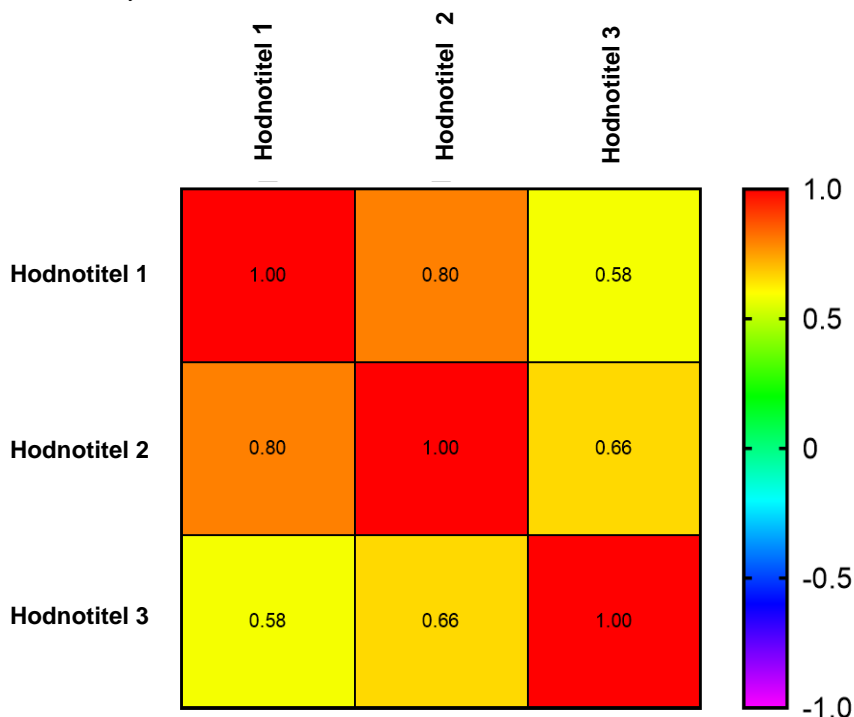
Zdroj: vlastní

7.2.1 Statistická analýza

Statistické zhodnocení výsledků mezi třemi hodnotiteli bylo provedeno zvlášť pro metodu barvení Giemsa a pro metodu Warthin-Starry v softwaru Graphpad prism 9. Shoda

mezi dvěma hodnotiteli byla spočtena softwarem s použitím funkce korelačního koeficientu. Výsledné PCC jsou vyobrazeny na obrázku 6 a 7.

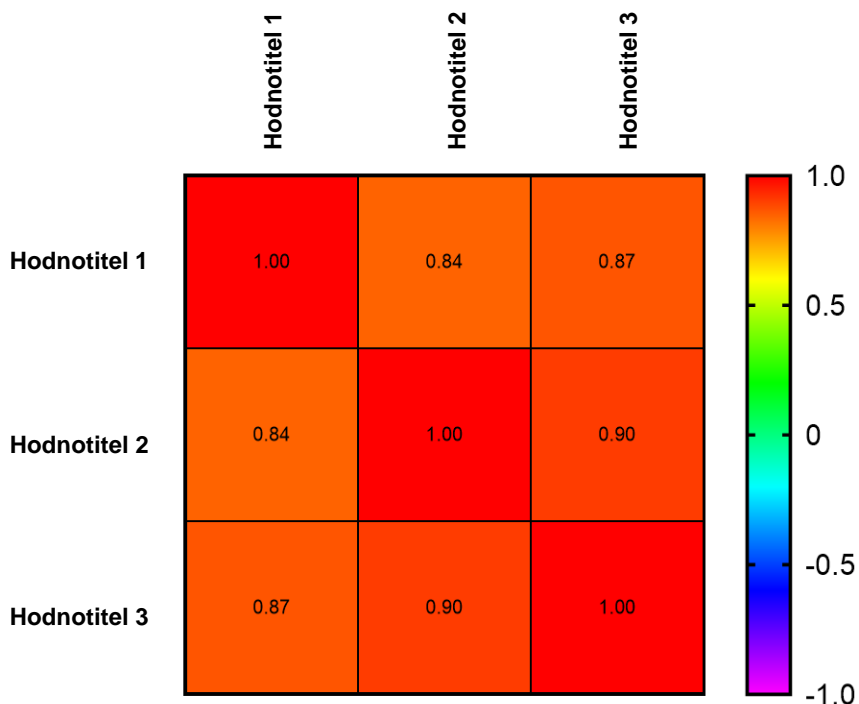
Obrázek 6: Korelační koeficienty pro počet *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku barvené dle Giemsy.



Zdroj: vlastní

Korelační koeficienty hodnotitelů *H. pylori* v tkáních barvených metodou Giemsa se pohybují od 0,58 do 0,80. Aritmetický průměr PCC je 0,68 (viz tabulka 4), to podle Evansovy příručky můžeme brát jako silnou shodu. Z procentuálního hlediska je shoda kvantitativní kvalifikace mezi hodnotiteli 68 %.

Obrázek 7: Korelační koeficienty mezi hodnotiteli *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku barvené metodou Warthin-Starry.



Zdroj: vlastní

Korelační koeficienty hodnotitelů *H. pylori* v tkáních barvených metodou Warthin-Starry se pohybují od 0,84 do 0,90. Aritmetický průměr PCC je 0,87 (viz tabulka 4), to podle Evansovy příručky můžeme brát jako velmi silnou shodu. V procentech je shoda kvantitativní kvalifikace mezi hodnotiteli 87 %.

Tabulka 3: Korelační koeficienty hodnotitelů *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku.

Korelační koeficienty hodnotitelů [r]						
Hodnotitelé	1-2	1-3	2-1	2-3	3-1	3-2
Giemsa	0,80	0,58	0,80	0,66	0,58	0,66
Warthin-Starry	0,84	0,87	0,84	0,90	0,87	0,90

Zdroj: vlastní

Tabulka 4: Průměrný PCC a směrodatné odchylky.

Barvení	Průměrný korelační koeficient	Směrodatná odchylka (základní)	Směrodatná odchylka (výběrová)
Giemsa	0,68	0,09	0,10
Warthin-Starry	0,87	0,02	0,03

Zdroj: vlastní

V tabulce 4 jsou zaznamenány průměrné korelační koeficienty, směrodatné odchylky základní a směrodatné odchylky výběrové výsledků hodnotitelů z metody barvení Giemsou a Warthin-Starry. Směrodatná odchylka základní je pro metodu Giemsa 0,09, metoda Warthin-Starry ji má 0,02, je tedy 3,71 krát menší a odpovídá to lepší shodě u barvení stříbřením.

Wilcoxonův test

Wilcoxonův test, u kterého byly zjištěné hodnoty od všech hodnotitelů pro barvení Giemsa srovnány s hodnotami zjištěnými pro barvení W-S, nám ukázal statisticky významný rozdíl mezi výslednými počty mikroorganismů *H. pylori* u srovnávaných barvení. Výsledky jsou v příloze D.

DISKUZE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo za pomoci statistické analýzy dat vyhodnotit shodu mezi histologickými hodnotiteli při kvantifikaci mikroorganismu *Helicobacter pylori* ve vzorcích z biopsie sliznice žaludku. K tomu bylo vybráno celkem 35 biopsií sliznice žaludku z archivních parafinových bločků Šiklova ústavu patologie Plzeň. Vzorky z těchto parafinových bločků byly barveny histochemickými metodami: základním barvením hematoxylin-eosin a specifickými barvicími metodami Giemsa a Warthin-Starry. Dále hodnotitelé kvantitativně (spočetli mikroorganismy ve třech nejvíce zanesených žlázách vzorku) kvalifikovali bakterii ve vzorcích Giemsa a Warthin-Starryho a zaznamenali. Z výsledků se provedla statistická analýza shody Pearsonovým korelačním koeficientem, která ukázala shodu mezi hodnotiteli v barvení Giemsa 68 % a u hodnotitelů v barvicí metodě Warthin-Starry 87 %. To odpovídá na hlavní výzkumnou otázku, která zní: Je shoda v hodnocení nad 70 %? U metody Warthin-Starry ano, a u barvení Giemsou ne.

Rozdíly mezi barvicími metodami zaznamenal i Willi Sandhika v roce 2019, který ve svém výzkumu použil 30 vzorků biopsií sliznice žaludku. Tyto vzorky hodnotil na škále, kde 0 = bez nálezu, +1 = řídké osídlen, +2 = středně osídlen a +3 = vysoce osídlen bakterií *Helicobacter pylori* podle počtu mikroorganismů vyskytujících se v jednom zorném poli. Odchylnka se objevila u 3 vzorků, kdy u tkání barvených metodou Warthin-Starry bylo registrováno řídké osídlení mikrobem (+1) a u Giemsa byl vzorek bez nálezu (0). V jednom případě byla u Giemsa pozorována přítomnost +1 a metodou Warthin-Starry byl detekován organismus na skóre +2. Pokud byla ve tkáni střední až vysoká intenzita přítomnosti mikroorganismy, byla shoda v hodnocení 100 %. (28)

Z výsledků této bakalářské práce je patrné, že se bakterie *Helicobacter pylori* lépe detekuje histochemickou barvicí metodou Warthin-Starry. Laboratoře však spíše využívají barvení Giemsou z důvodu levnější a jednodušší varianty. Faktorem ovlivňující rozdíl detekce mikroorganismu v sliznici žaludku barvené těmito dvěma metodami by mohl být jasný kontrast černé barvy bakterie a žlutého pozadí barvením Warthin-Starry, který u Giemsa není (odstín modré bakterie na modrém pozadí). Navíc se metodou Warthin-Starry potahují mikroorganismy stříbrem, a tím působí ve světelném mikroskopu zvětšeně. Na druhou stranu například buňky zánětu (neutrofilní granulocyty) jsou lépe viditelné ve tkáních barvených Giemsou.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zhodnotit shodu hodnotitelů při kvantifikaci *Helicobacter pylori* v biopsii sliznice žaludku barvené histochemickými specifickými metodami Warthin-Starry a Giemsa. Pro analýzu dat bylo vybráno 35 archivních parafinových bločků biopsií sliznice žaludku ŠÚP. Ty byly dle metodiky zpracovány a nabarveny. Poté byly třemi na sobě nezávislými hodnotiteli kvantitativně klasifikovány a výsledky byly zaznamenány. Statisticky za pomoci Pearsonova korelačního koeficientu se určila shoda mezi hodnotiteli u každé barvicí metody. Shoda hodnotitelů pro kvantitativní kvalifikaci při použití barvicí metody Giemsa je 68 %, a při obarvení vzorků metodou Warthin-Starry je 87 %. Směrodatná odchylka od průměru korelačních koeficientů shody hodnotitelů u barvení Giemsou je 0,09 a pro barvení Warthin-Starry 0,02.

Z výsledných hodnot je jasně patrná větší shoda v kvantitativní kvalifikaci mikroorganismu *Helicobacter pylori* u vzorků barvených histochemickou metodou stříbřením (Warthin-Starry). Dále jsme zjistily, že toto barvení umožňuje identifikaci významně vyššího počtu mikroorganismů *H. pylori* než barvení dle Giemsa.

SEZNAM LITERATURY

1. **Čihák, Radomír.** *Anatomie 2.* Praha : Grada, 2013. str. 512. ISBN 978-80-247-4788-0.
2. **Dylevský, Ivan.** *Funkční anatomie.* Praha : Grada, 2009. str. 544. ISBN 978-80-247-3240-4.
3. **Mahadevan, Vishy.** Anatomy of the stomach. *Surgery.* [Online] 2017. [Citace: 16. prosinec 2022.] <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.09.009>.
4. **Junqueirs, I., Carlos, Carneiro, José a Kelley, Robert O.** *Základy histologie.* [překl.] Richard Jelínek. Jinočany : H & H, 1997. str. 502. ISBN 80-85787-37-7.
5. **Hsu, Mark, Safadi, Anthony a Lui, Forshing.** Physiology, stomach. *StatPearls.* [Online] 18. červenec 2022. [Citace: 6. únor 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535425/>.
6. **Biga, Lindsay M., a další, a další.** Anatomy & physiology. *DSpace.* [Online] 2020. [Citace: 8. únor 2023.] <https://openlibrary-repo.ecampusontario.ca/jspui/handle/123456789/834>.
7. **Zámečník, Josef, a další, a další.** *Patologie.* 1. Praha : LD Prager Publishing, 2019. str. 915. Sv. I-III. ISBN 978-80-270-6457-1.
8. **Mačák, Jiří, Mačáková, Jana.** *Patologie.* 3., doplněné a přepracované vydání. Praha : Grada, 2022. str. 367. ISBN 978-80-271-3.
9. **Woods, L., Yvonne a Carey, A., Frank.** Pathology and histology of the oesophagus and stomach. *Surgery.* [Online] 2017. [Citace: 17. leden 2023.] <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.08.002>.
10. **Hurych, Jakub a Štícha, Roman.** *Lékařská mikrobiologie:repetitorium.* Praha : Triton, 2020. str. 621. ISBN 978-80-7553-844-4.
11. **Kyzeková, Jozefína.** *Žaludeční dyspepsie a helicobacter pylori.* Praha : Grada, 1998. str. 144. ISBN 80-7169-621-8.

12. **Göpfertová, Dana, a další, a další.** *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. doplněné vydání. Praha : Triton, 2002. str. 148. ISBN 80-7254-223-0.
13. **Roudnicka, Karolina, a další, a další.** Helicobacter pylori morphological forms and their potential role in the transmission of infection. *phdm*. [Online] 3. březen 2014. [Citace: 2. březen 2023.] 10.5604/17322693.1092705. ISSN 0032-5449.
14. **Finlay, B. Bret . a Finlayová, Jessica M.** *Mikrobiom lidského těla: Jak spolupracovat s mikroby v těle a prostředí a žít déle a zdravěji*. [překl.] Václav Petr. Praha : Triton, 2020. str. 349. ISBN 978-80-7553-777-5.
15. **Zima, Tomáš a kolektiv.** *Laboratorní diagnostika*. 3. doplněné a přepracované vydání. Praha : Galén, 2013. str. 1145. ISBN 978-80-7492-062-2.
16. **Patel, Saurabh, Kumar, a další, a další.** Diagnosis of Helicobacter pylori: What should be the gold standard? *World journal of gastroenterology*. [Online] 2014. [Citace: 22. leden 2023.] 10.3748/wjg.v20.i36.12847.
17. **Lee, Yi-Chia, Dore, Maria Pina a Graham, David.** Diagnosis and treatment of Helicobacter pylori infection. *Annual review of medicine*. [Online] 2022. [Citace: 10. březen 2023.] <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-med-042220-020814>.
18. **Dvořák, Karel, a další, a další.** Základy histopatologických vyšetřovacích metod . [Online] 2008. [Citace: 28. listopad 2022.] <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf>.
19. **Čížková, Kateřina.** *Základy histochemických metod*. [Skriptum] Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. 8024453673.
20. **Farouk, Wirda, Indah, a další, a další.** Wartin-Starry staining for the detection of Helicobacter pylori on gastric biopsies. *The Malaysian journal of medical sciences*. [Online] červenec 2018. [Citace: 6. březen 2023.] 10.21315/mjms2018.25.4.9.
21. **Zhou, Haomiao, a další, a další.** A new sampling method in particle filter based on Pearson correlation coefficient. *Neurocomputing*. [Online] 18. květen 2016. [Citace: 20. únor 2023.] <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2016.07.036>.

22. **Institut biostatiky a analýz Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.** Výpočet Pearsonova korelačního koeficientu. *Biostatika pro lékařskou biologii*. [Online] Matematická biologie. [Citace: 18. únor 2023.] <http://portal.matematickabiologie.cz>.
23. **Asuero, Augustin, Garcia, Sayago, Ana a González, A., G.** The correlation coefficient: An overview. *Critical reviews in analytical chemistry*. [Online] 12. January 2006. [Citace: 18. únor 2023.] <https://doi.org/10.1080/10408340500526766>.
24. **Evans, James, D.** *Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences*. Monterey : Brooks/Cole Publishing Company, 1996. str. 600. ISBN 9780534338633.
25. **GraphPad Software.** GraphPadPrism 9 for Windows. [Online] 2022. [Citace: 2. únor 2023.] www.graphpad.com.
26. **Statistics kingdom.** Wilcoxon signed rank test calculator. *Statistics kingdom 2017*. [Online] 2017. [Citace: 22. březen 2023.] https://www.statskingdom.com/175wilcoxon_signed_ranks.html.
27. **Taheri, S. a Hesamian, G.** A generalization of the Wilcoxon signed-rank test and its applications. *Statistical papers*. [Online] 2013. [Citace: 22. březen 2023.] 10.1007/s00362-012-0443-4.
28. **Sandhiku, Willy.** Detection of Helicobacter pylori infection chronic gastritis biopsy specimen using Warthin-Starry and modified giemsa stain in dr soetomo hospital surabaya. *Indonesium journal of tropical and infectious disease*. 2019, 7, stránky 150–154.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Pracovní postup pro barvení metodou Hematoxylin-Eosin
- Příloha B – Pracovní postup pro barvení metodou Warthin-Starry
- Příloha C – Pracovní postup pro barvení metodou Giemsa
- Příloha D – Protokol statistického výpočtu Wilcoxonova testu

PŘÍLOHY

Příloha A – Pracovní postup pro barvení metodou Hematoxylin-Eosin

Pracovní postup zkrácený SUP/003/06

Barvení Hematoxylin – Eosin

Účinnost od:	15. 4. 2019	Revize:	1x za 2 roky
Kontaktní osoba:	Petra Vopelková Načeradská	Garant:	Doc. MUDr. Ondřej Daum, PhD.
Rozsah působnosti:	ŠÚP FN Plzeň/Zdravotní laboranti		

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

Účel:

Přehledné barvení pro parafínové fezy

Postup:

1. odparafinovat do 70% alkoholu
2. Gillův hematoxylin – 7 min
3. diferencovat v diferenciačním roztoku
4. prát pod tekoucí vodou (zmodráná jader)
5. roztok Eosinu – 1 min
6. opláchnout v deionizované vodě
7. odvodnit, projasnit, montovat

Celý postup barvení se provede v barvicím automatu – program č. 1 na Borech, program č. 7 na Lochotíně

Výsledek barvení:

Jádra buněk modře, kolagen růžově, hyalin růžově, fibrin červeně, svalovina růžovočerveně, chrupavka modře

Příprava roztoků:

Gillův hematoxylin (na 2 l roztoku):

Hematoxylin	8 g
jodičnan sodný	0,8 g
síran hlinitý	70,4 g
deionizovaná voda	1420 ml
etylenglykol	500 ml
kyselina octová (ledová)	80 ml

Rozpustit hematoxylin, jodičnan sodný a síran hlinitý v destilované vodě (rozpustit každé zvlášť a pak teprve smíchat). Přidat ethylenglykol, promíchat. Naposledy přidat kyselinu octovou ledovou. Hematoxylin možno ihned použít. Někdy však vzhledem k tomu, že může být nedostatečně oxidován, první 4 dny může barvit slabě. Pak se může dooxidovat přidáním jodičnanu sodného v množství 10-20 mg/l.

V současné době odebíráme již hotový Gillův hematoxylin od firmy Merck.

Ověřil: Petra Vopelková Načeradská	Správce dokumentů: Eva Kaslová kl. 2740	Vedoucí ZT/datum: Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D./ 12. 4. 2019	Schválil/datum: Prim. MUDr. Petr Mukenšabl, Ph.D./ 12. 4. 2019
--	---	--	--

Příloha B – Pracovní postup pro barvení metodou Warthin-Starry

Pracovní postup zkrácený PPZ/SUP/018/05

Imregnační 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 vytištění 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 AgNO₃ při 56°C (termostát) 45 minut
4. prát v horké vodě
5. přelít vývojkou na 2-4 minuty, nutná kontrola pod mikroskopem
6. prát v horké vodě
7. odvodnit, projasnit
8. montovat

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

Výsledek barvení:

Helicobacter pylori hnědočerně

Příprava roztoků:

roztok kyseliny citronové:

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

2% roztok AgNO₃:

AgNO₃1 g
kyselá voda.....50 ml

roztok hydrochinonu:

hydrochinon0,15 g
kyselá voda.....100 ml (uchovávat v lednici)

roztok želatiny:

želatina1,25 g
kyselá voda.....25 ml

vývojka:

2% roztok AgNO₃.....10 ml
roztok hydrochinonu.....13,5 ml
roztok želatiny.....25 ml

! nepřipravovat předem !

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

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

Ověřil: Petra Vopelková Načeradská	Správce dokumentů: Eva Kaslová, kl.2740	Zpracoval/datum: Prof. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D./ 1.9. 2020	Schválil/datum: Prim. MUDr. Petr Mukenšnábl, Ph.D./ 2.9.2020
---------------------------------------	--	--	--

Příloha C – Pracovní postup pro barvení metodou 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 vytištění je dokument platný jen po označení razítkem správce dokumentů „Kopie platná do.“, jinak se jedná o neřízený dokument.

Účel:

Průkaz krevních elementů v kostní dřeni v parafinových řezech

Postup:

1. odparafínovat
2. oplach v deionizované vodě
3. barvit roztokem Giemsy 40 min
4. oplach 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 časy a teploty uváděné v PPZ jsou pouze orientační a důležitá je kontrola pod mikroskopem, neboť barvení každé tkáňě je individuální.

Ověřil: Petra Vopelková Načeradská, DiS.	Správce dokumentů: Eva Kaslová /kl.2740	Zpracoval/datum: Petra Vopelková Načeradská, DiS., 20.1.2022	Schválil/datum: Prof. MUDr. Michal Michal 21.1.2022
--	--	--	---

Příloha D – Protokol statistického výpočtu Wilcoxonova testu

Wilcoxon Signed-Rank, using Normal distribution (n=87.0000) (two-tailed)

Name: After minus Before

Sample average (X): 38.809524

Sample Size: 105

n: 87

Sample SD (S): 46.906842

Median: 27

Skewness: 1.535504

Skewness Shape: positive_skew

Normality: 2.139e-8

Outliers: 180, 250

Outliers Count: 2

W- : 128

W+ 3700

Ties Correction:7

Exact: false

.....

Wilcoxon Signed-Rank, using Normal distribution (n=87.0000) (two-tailed) (validation)

The normal approximation is used. The statistic's distribution is $N(1914.000, 236.2582)$.

$\mu = n(n+1)/4 = 87(87+1)/4$, $\sigma^2 = n(n+1)(2n+1)/24 - Cties = 87(87+1)(2*87+1)/24 - 7$.

$Z=(W- - \mu + Ccontinuity)/\sigma = (128 - 1914.000 + 0.5)/236.258$.

The data contains ties, identical values, it is recommended to use the normal approximation that uses the ties correction. Since $n > 40$, the tool cannot use the exact calculation.

1. H0 hypothesis

Since $p\text{-value} < \alpha$, H0 is rejected.

The value of After minus Before's population is considered to be not equal to the Expected difference (μ_0).

In other words, the difference between the value of the After minus Before and Expected difference (μ_0) is big enough to be statistically significant.

2. P-value

The p-value equals $4.22995e-14$, ($p(x \leq Z) = 2.11497e-14$). It means that the chance of type I error (rejecting a correct H_0) is small: $4.230e-14$ (4.2e-12%).

The smaller the p-value the more it supports H_1 .

3. The statistics

The test statistic Z equals -7.557405 , which is not in the 95% region of acceptance: $[-1.9600 : 1.9600]$.

$W=128.00$, is not in the 95% region of acceptance: $[1450.9400 : 2377.0600]$.

4. Effect size

The observed standardized effect size, Z/\sqrt{n} , is large (0.81). That indicates that the magnitude of the difference between the value from Before and the value from After is large.

The observed common language effect size, $2W/(n(1+n))$, is 0.033, this is the probability that a random value from Before is greater than its corresponding value from After.

.....

Test validation

The requested test was calculated, it is likely you chose the right test.

Outliers

Outliers' detection method: Tukey Fence, $k=1.5$

After minus Before contains 2 potential outliers, which is 1.90% of the observations.

Wilcoxon Sign Rank test is robust to the presence of outliers, more robust than the paired t-test.

Zdroj: (26)