

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ADRIJANA BOROVIČ

PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ZA PRIKAZ BAKTERIJE
HELICOBACTER PYLORI V BIOPSIJSKIH VZORCIH ŽELODČNE
SLUZNICE BOLNIKOV Z GASTRITISOM

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR
IDENTIFICATION OF BACTERIA *HELICOBACTER PYLORI*
IN BIOPSY SAMPLES OF GASTRIC MUCOSA
IN PATIENTS WITH GASTRITIS

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Mentorica: izr. prof. dr. Nina Zidar, dr. med.

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Somentorica: doc. dr. Margareta Strojjan Fležar, dr. med.

Inštitut za patologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo

Članica: doc. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. Nine Zidar, dr. med in somentorstvom doc. dr. Margarete Strojjan Fležar, dr. med.

Diplomantov lastoročni podpis:

Zahvala

Za strokovno pomoč pri delu se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nini Zidar in somentorici doc. dr. Margareti Strojan Fležar.

Za veliko pomoč pri nastajanju diplomske naloge se zahvaljujem Danijelu Velkavrhju ing. kem. teh, Majdi Dimnik, Tadeji Klemenc, Ireni Vidovič dipl. ing. kem. teh in vsem zaposlenim Kirurškega laboratorija na Inštitutu za patologijo.

Zahvaljujem se tudi svojim domačim in najbližjim za vzpodbudo in podporo v času študija.

VSEBINA

POVZETEK.....	1
ABSTRACT	3
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1. UVOD.....	6
1.1. Gastritis: definicija, Sydneyska klasifikacija, klinične značilnosti in zapleti, morfološke značilnosti.....	6
1.2. Pomen biopsije za opredelitev gastritisa in ocenjevanje sprememb v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice	7
1.3. Bakterija <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.3.1. Mikrobiološke in epidemiološke značilnosti bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.3.2. Patogeneza okvare želodčne sluznice pri okužbi s <i>Helicobacter pylori</i>	9
1.4. Značilnosti gastritisa, ki ga povzroča bakterija <i>Helicobacter pylori</i>	10
1.5. Metode za določanje bakterije <i>Helicobacter pylori</i> : hitri ureazni test, dihalni test s sečnino, serološka in molekularna diagnostika, histološka preiskava in različne metode za dokaz HP v tkivu, kultivacija in identifikacija	10
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIAL in METODE	14
3.1. Bolniki	14
3.2. Biopsijski vzorci želodčne sluznice.....	14
3.2.1. Priprava histopatoloških preparatov	14
3.2.2. Barvanje s hematoksilinom in eozinom.....	15
3.2.3. Barvanje po Kreybergu.....	16
3.3. Metode za prikaz bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	16
3.3.1. Barvanje po Giemsi	16
3.3.2. Barvanje "Alcian yellow"	17
3.3.3. Imunohistokemična metoda.....	17
3.3.4. Ocenjevanje histopatoloških sprememb v biopsijskih vzorcih in poselitve sluznice z bakterijo <i>Helicobacter pylori</i>	19
3.4. Primerjava različnih metod za prikaz bakterije <i>Helicobacter pylori</i> (barvanje po Giemsi in "Alcian yellow" ter imunohistokemična metoda).....	19
4. REZULTATI	20
4.1. Histopatološke spremembe v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice.....	20

4.2.	Ocenjevanje histopatoloških sprememb v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice v barvanju s hematoksilinom in eozinom ter v barvanju po Kreybergu.....	24
4.3.	Prikaz bakterije <i>Helicobacter pylori</i> v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice.....	24
4.3.1.	Barvanje s hematoksilinom in eozinom in barvanje po Kreybergu	24
4.3.2.	Barvanje po Giemsi	24
4.3.3.	Barvanje "Alcian yellow"	24
4.3.4.	Imunohistokemična metoda.....	25
4.4.	Primerjava barvanja po Giemsi in "Alcian yellow" z imunohistokemično metodo	25
4.5.	Trajanje in cena različnih metod za prikaz bakterije <i>Helicobacter pylori</i> v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice	28
5.	RAZPRAVA.....	29
5.1.	Histopatološke spremembe v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice bolnikov z gastritisom, povzročenim z bakterijo <i>Helicobacter pylori</i>	29
5.2.	Pomen biopsije želodčne sluznice pri kroničnem gastritisu	29
5.3.	Primerjava osnovnih barvanj biopsijskih vzorcev želodčne sluznice.....	30
5.4.	Primerjava različnih metod za prikaz bakterije <i>Helicobacter pylori</i> v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice	30
5.5.	Pomen kvalitete izdelave histološkega preparata in izbire barvanja pri pregledu biopsij želodčne sluznice	32
6.	SKLEPI.....	33
7.	LITERATURA	34

POVZETEK

Kronični gastritis je pogosta bolezen, ki se kot vnetni odgovor želodčne sluznice razvije zaradi delovanja različnih dejavnikov, med katerimi je najpogostejši okužba z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP). Natančno diagnozo lahko postavimo le s histopatološkim pregledom biopsijskih odvzemkov želodčne sluznice, ki jih zdravnik vzame pri gastroskopiji. Pri pregledu biopsijskih odvzemkov skušamo opredeliti vzrok gastritisa in morfološke spremembe, zlasti tiste, ki so povezane s pogostejšim vznikom raka (intestinalna metaplazija, atrofija, displazija).

Bakterije HP v biopsijskih vzorcih lahko prikažemo z različnimi metodami. V literaturi nismo zasledili podatkov o občutljivosti, trajanju in ceni različnih metod za prikaz HP. Zato smo v naši raziskavi primerjali tri pogoste načine za prikaz HP: barvanje po Giemsi, "Alcian yellow" in imunohistokemično metodo.

Raziskava je zajela 30 zaporednih primerov HP pozitivnega gastritisa iz arhiva Inštituta za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Vse biopsijske vzorce smo barvali s hematoksilinom in eozinom (HE) ter po Kreybergu (kot osnovni način barvanja) in s tremi metodami za prikaz HP: po Giemsi, z "Alcian yellow" in imunohistokemično. Morfološke spremembe in gostoto poselitve sluznice s HP smo ocenjevali po priporočilih Sydneyske klasifikacije kot blage, zmerne ali hude.

Ugotovili smo, da je kot osnovni način barvanja biopsijskih vzorcev želodčne sluznice barvanje po Kreybergu boljše kot s hematoksilinom in eozinom, ker omogoči bolj natančno oceno intestinalne metaplazije. Za prikaz bakterije HP barvanje s hematoksilinom in eozinom in barvanje po Kreybergu nista primerni, saj prikažeta bakterije HP le takrat, kadar so številne.

Za prikaz HP je najbolj občutljiva imunohistokemična metoda, vendar je zaradi visoke cene ne moremo uporabiti pri vseh biopsijah. Uspešno jo lahko nadomestimo z barvanjem po Giemsi, ki prikaže HP v večini primerov, razen kadar so prisotne le redke posamezne bakterije. Barvanje "Alcian yellow" je sicer podobno barvanju po Giemsi, vendar je prikaz bakterij nekoliko manj jasen in oster kot v barvanju po Giemsi, poleg tega je barvanje "Alcian yellow" mnogo dražje, podobno kot imunohistokemična metoda. Trajanje vseh treh metod za prikaz HP je podobno.

Za biopsije želodčne sluznice torej priporočamo kot osnovno metodo barvanje po Kreybergu in kot specialno metodo za prikaz helikobaktrov barvanje po Giemsi, v zahtevnih primerih pa je potrebno dodati imunohistokemično metodo.

ABSTRACT

Chronic gastritis is a frequent disorder, representing an inflammatory response of the gastric mucosa to many agents, the most common being the infection with *Helicobacter pylori* (HP). The correct diagnosis can be made after histopathological examination of the biopsy samples, obtained at gastroscopy. The aim of histopathological examination is to assess the etiology of the gastritis, as well as all morphological changes, particularly those which are associated with an increased risk of cancer. HP in biopsy samples can be identified using various methods. There is no data in the literature regarding their sensitivity, duration and price. The aim of our study was therefore to compare three methods which are often used to identify HP in biopsy samples: the Giemsa and the "Alcian yellow" stainings, and immunohistochemistry.

Our study included 30 consecutive cases of HP gastritis from the archives of the Institute of Pathology, Medical Faculty, Ljubljana. All samples were stained with hematoxylin and eosin (HE), and with Kreyberg stain (as the basic staining methods), as well as with Giemsa and "Alcian yellow" stains and immunohistochemically for detection of HP. Morphological changes and the density of colonisation with HP were graded according to Sydney classification as mild, moderate or severe.

We found that the Kreyberg staining is more appropriate as the basic staining method for gastric biopsies than staining with hematoxylin and eosin, because it enables more accurate assessment of intestinal metaplasia. Both stainings cannot be used for identification of bacteria HP because HP can be seen only when they are abundant.

Immunohistochemical method is the most sensitive method for HP identification, but is too expensive to be used in all biopsies. According to our results, it can be replaced successfully by the Giemsa staining, which enabled identification of HP in the majority of cases, with the exception of cases with very few HP. The "Alcian yellow" staining was similar to the Giemsa staining, though HP appeared less sharp and clear comparing to the Giemsa staining. The disadvantage of the "Alcian yellow" staining is its high price being similar to the price of immunohistochemistry.

We conclude that the Kreyberg staining can be recommended as the basic staining method for gastric biopsies, and that the Giemsa staining can be recommended as the

special staining method for identification of bacteria HP. However, in difficult cases immunohistochemistry must be used.

SEZNAM OKRAJŠAV

DAB	diaminobenzidin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
HE	hematoksilin in eozin
HP	Helicobacter pylori
Ig	imunoglobulin
MALT	limfatično tkivo sluznic (iz angl. mucosa-associated lymphoid tissue)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (iz angl. polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina

1. UVOD

1.1. Gastritis

Definicija. Gastritis je opredeljen kot vnetni odgovor želodčne sluznice in je histopatološka diagnoza, ki jo lahko postavimo šele po endoskopskem pregledu želodca ter odvzemu in histopatološkem pregledu biopsijskih odvzemkov želodčne sluznice (1, 2).

Sydneyska klasifikacija gastritisa. Po Sydneyski klasifikaciji delimo gastritis na akutni in kronični ter posebne oblike gastritisa. Kronični gastritis se deli na neatrofični, ki je ponavadi povezan z okužbo z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) in atrofični gastritis, ki se deli na avtoimunski in multifokalni (povezan s HP okužbo) in prehrano. Med posebne oblike spadajo kemični (reaktivni), radiacijski, limfocitni, granulomatozni, eozinofilni in drugi infekcijski gastritisi (3-5).

Gastritis lahko opredelimo le s histopatološkim pregledom biopsijskega vzorca želodčne sluznice, ki ga zdravnik odvzame ob gastrokopiji s pomočjo optičnega ali videoendoskopa, z biopsijskimi kleščicami. Po priporočilih Sydneyske klasifikacije je potrebno vzeti dva odvzemka iz antruma 2-3 cm od pilorusa (enega iz male in enega iz velike krivine), dva odvzemka iz korpusa, približno 8 cm od kardije (enega iz male, enega iz velike krivine) ter en odvzemek iz angularne incizure. Odvzemki iz vsake lokalizacije morajo biti poslani ločeno, v svoji steklenički, z označenim mestom odvzema.

Klinične značilnosti in zapleti. Bolniki z gastritisom so lahko povsem brez težav, lahko pa imajo občasne ali stalne bolečine v žlički in/ali okoli popka. Včasih se bolečina širi pod levi in desni rebrni lok. Bolniki lahko občutijo slabost in jih sili na bruhanje. Včasih je bolečina pekočega značaja, predvsem na prazen želodec, medtem ko je občutek polnosti in napetosti želodca predvsem po jedi, značilen za bolnike, ki imajo atrofični gastritis. Pogoste so nočne bolečine. Težave se lahko pojavijo sezonsko, spomladi in jeseni, ponovne zagone pa lahko povzročijo tudi psihične obremenitve (1, 2).

Številne klinično-patološke raziskave so pokazale, da ni jasne povezave med bolnikovimi težavami in vrsto ter stopnjo aktivnosti vnetja (6). Bolniki s histološko dokazanim gastritisom visoke stopnje aktivnosti so lahko praktično brez težav ali pa imajo le občasne težave v zgornjem delu trebuha, nekateri pa imajo hude težave v predelu želodca, histološko pa najdemo le blage vnetne znake (7-9).

Med najpomembnejše zaplete sodi peptična razjeda želodca in dvanajstnika (10) in maligni tumorji (11, 12). Pri bolnikih kroničnim gastritisom se lahko razvije žlezni rak (adenokarcinom) (13), pri tistih, ki imajo kronični gastritis, povzročen s HP, pa tudi limfom - neHodgkinov B-celični limfom limfatičnega tkiva sluznic (MALT) (14, 15).

Morfološke značilnosti kroničnega gastritisa. Glavne morfološke značilnosti kroničnega gastritisa so: infiltracija sluznice z vnetnicami, atrofija žlez, intestinalna metaplazija, displazija. Vnetnice so limfociti in plazmatke (mononuklearne vnetnice), ki infiltrirajo lamino proprijo (16) in nevtrofilni granulociti, ki infiltrirajo vratove žlez in so značilnost aktivnega (floridnega) vnetja. Pri dolgotrajnem kroničnem vnetju žleze propadajo (atrofija žlez), lahko jih nadomestijo žleze, ki jih sicer najdemo v črevesni sluznici (intestinalna metaplazije) (17). Epitelijske celice se lahko spremenijo, postanejo atipične, z večjimi jedri in poudarjeno mitotsko aktivnostjo (displazija), iz tako spremenjenih celic pa pogosteje vznikne karcinom (18).

1.2. Pomen biopsije za opredelitev gastritisa in ocenjevanje sprememb v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice

Biopsija želodčne sluznice s histopatološkim pregledom je edini način, ki omogoča opredelitev gastritisa. Ocenimo prisotnost, vrsto in stopnjo vnetja, prisotnost drugih sprememb, ki se lahko pojavijo ob kroničnem gastritisu in so pomembne, ker so povezane z večjo pojavnostjo raka (atrofija sluznice, intestinalna metaplazije, displazija), morebitno prisotnost rakavih sprememb in mikroorganizme, zlasti tiste, ki so vzročno povezani z nastankom gastritisa. Med mikroorganizmi, povzročitelji gastritisa je daleč najpomembnejša bakterija *Helicobacter pylori* (HP).

Po priporočilih Sydneyske klasifikacije patolog v biopsiji ocenjuje stopnjo intenzivnosti petih osnovnih parametrov: kroničnega vnetja, aktivnosti vnetja (prisotnost nevtrofilnih granulocitov), intestinalne metaplazije, žlezne atrofije in gostote bakterije HP. Pri oceni uporablja tri stopnje: blago, zmerno in hudo. V biopsiji se evidentirajo tudi spremembe, ki se ne gradirajo: poškodbe vrhnjega epitelija, deplecija sluzi, erozija, limfni folikli, foveolna hiperplazija, psevdopilorična metaplazija, pankreatična metaplazija in hiperplazija endokrinih celic.

Biopsija torej omogoči opredelitev gastritisa, ki v mnogih primerih vključuje tudi opredelitev vzroka (npr. okužba s HP, refluks, zdravila, avtoimunski mehanizmi, ipd), poleg tega pa omogoča oceno stopnje okvare želodčne sluznice in prisotnost sprememb, ki so povezane s pogostejšim vznikom raka (atrofija, metaplazija, displazija). Pri takih bolnikih so potrebne pogostejše gastroskopije z odvzemom biopsije (1, 2).

1.3. Bakterija *Helicobacter pylori*

Že dolgo je znano, da so v človekovem želodcu tudi bakterije, čeprav življensko okolje v želodcu ni prijazno za bakterije. Kisel želodčni sok je navadno sterilen zaradi proste HCl, vendar so v želodčni vsebini številne bakterije, kot so streptokoki, bifidobakterije in enterobakterije.

Zaradi različnih kulturnih in življenjskih navad, pomanjkanja želodčne kisline in bolezenskih procesov na želodcu lahko nastane kolonizacija z različnimi bakterijami. Od vseh bakterij, ki se pojavljajo v želodcu, je *Helicobacter pylori* (HP) mikrob, ki je zaradi svojih patofizioloških in virulenčnih značilnosti pomemben za nastanek aktivnega gastritisa, ulkusa in raka na želodcu.

Warren in Marshall iz bolnišnice Royal Perth v Avstraliji sta leta 1982 iz biopsijskega vzorca bolnika z razjedo na dvanajstniku po petdnevni inkubaciji na bakterijskem gojišču izolirala spiralno bakterijo (19). Zaradi morfološke podobnosti z kampilobaktri so jo imenovali *Campylobacter pyloridis*, vendar so jo na osnovi fenotipskih in genetskih značilnosti leta 1989 uvrstili v nov rod *Helicobacter* (2).

Z odkritjem HP se je pričelo odkrivanje pomena bakterije in njene povezave z različnimi bolezenskimi spremembami na želodcu in dvanajstniku.

1.3.1. Mikrobiološke in epidemiološke značilnosti bakterije *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je 3-5 µm dolga, po Gramu negativna, zapognjena ali spiralno zavita mikroareofilna bakterija. Giblje se s 4-6 unipolarnimi bički, vsak ima na koncu membranozno zadebelitev, ki se nadaljuje v bičkov ovoj (20). Naseljena je pod sluzjo v želodčnem in metaplastičnem gastričnem epiteliju v dvanajstniku. Bakterije HP so prilagojene na kislo okolje želodca (pH 1,5-2), saj izločajo encim ureazo, ki razgrajuje ureo na amonijak in bikarbonatni ion ter tako nevralizira okolico bakterije. Hitro se

gibljejo skozi zaščitno mukozno plast in se neenakomerno razporejajo po površini epitelijskih celic, vendar vanje ne vstopajo. V kulturi se večina sevov HP hitro preoblikuje v kokoidno obliko, za katero domnevajo, da je speča oblika, v kateri preživi slabe pogoje (21).

Okužba s HP je najpogostejša okužba pri človeku, vendar se prevalenca HP okužbe razlikuje med posameznimi državami in med starostnimi skupinami. V deželah v razvoju se okužba s HP pojavlja v pandemični obliki, večina prebivalstva je okužena že od otroštva, skoraj vsi odrasli v vseh starostnih skupinah imajo kronično HP okužbo. V razvitih deželah nastopi kolonizacija kasneje: seropozitivnost ugotavljajo pri 5-15 % otrok in pri 20-65 % odraslih (22, 23).

Te razlike kažejo, da so vpleteni ne le socioekonomski dejavniki, ampak tudi drugi dejavniki, npr. družinske navade, prekuženost določenega področja, higienski režim in genetski dejavniki (23, 24). Vzrok za opisane razlike je morda različna virulenca sevov HP, morda medsebojno delovanje več mikrobov, ki domnevno istočasno kolonizirajo želodčno sluznico in individualne posebnosti v imunskem odgovoru (2).

1.3.2. Patogeneza okvare želodčne sluznice pri okužbi z bakterijo *Helicobacter pylori*

Lastnosti, ki omogočajo bakteriji HP najti primerno mesto v želodčni sluznici in jih okvariti, so gibljivost, adhezivnost in antigenska spremenljivost. HP izloča različne snovi, ki omogočajo bakterijsko virulenco. Med encimi je najpomembnejši encim ureaza in dva toksina, vakuolizirajoči toksin (VacA) in citotoksični protein (CagA).

Ureaza je encim, ki katarizira hidrolizo uree, pri čemer nastane amoniak, ta se veže z vodo v amonijev hidroksid (25). Vakuolizirajoči toksin (VacA) je protein, velik 87 kDa, kodira ga gen *vac*. Povzroča nastajanje vakuol v epitelijskih celicah (26, 27). Drugi toksin, imenovan citotoksični protein (CagA), je polipeptid z velikostjo 130 kDa, njegov zapis je na genu *cagA* (28, 29). Večina sevov, ki so jih dokazali pri bolnikih z ulkusno boleznijo, ima enega ali oba toksinska gena.

Bolezniški proces zaradi okužbe s HP v želodčni sluznici spremljajo lokalna in sistemska imunska dogajanja (30). Epitelijske celice izločajo interlevkin 8, ki sproži migracijo nevtrofilnih granulocitov in monocitov, ki privabijo limfocite (31). Intraepitelijski

limfociti so v glavnem limfociti T, prisotne so tudi plazmatke, ki izločajo protitelesa IgA (2).

1.4. Značilnosti gastritisa, ki ga povzroča bakterija *Helicobacter pylori*

Vzrok kroničnega gastritisa je daleč najpogosteje kronična okužba želodčne sluznice z bakterijo *Helicobacter pylori*, ki jo ugotovimo pri 20 % sicer zdravih in asimptomatskih odraslih osebah, pri osebah z kronično dispepsijo pa je prisotna kar v 60-90 %.

Morfološko je gastritis, ki ga povzroča HP, kronični aktivni gastritis, kar pomeni kombinacijo infiltracije lamine proprije s plazmatkami in limfociti ter infiltracijo vratov žlez z nevtrofilnimi granulociti (5, 32). Limfociti v lamini propriji lahko tvorijo limfatične folikle, kar daje endoskopsko značilen nodularni videz sluznice (16). Ostale morfološke spremembe so podobne kot pri drugih vrstah kroničnega gastritisa (žlezna atrofija, intestinalna metaplazija, displazija).

1.5. Metode za določanje bakterije *Helicobacter pylori*

Pri diagnostiki okužbe s HP sodelujejo gastroenterolog, patolog in mikrobiolog. Okužbo je mogoče ugotavljati neposredno, z dokazovanjem ureaze v biopsijskem vzorcu, z dokazom mikroba v histološkem vzorcu in osamitvijo mikroba iz biopsijskega vzorca želodca (24, 30, 33, 34).

Posredno je mogoče dokazati okužbo s HP z ureaznim dihalnim testom in z dokazovanjem HP v blatu. Poznamo invazivne in neinvazivne metode za določanje okužbe s HP. Invazivne metode so hitri bioptični ureazni test, faznokontrastni mikroskopski pregled sveže odvzete biopsije, histološka preiskava biopsije, kultura in verižna reakcija s polimerazo. Neinvazivne metode pa so serološka preiskava (določanje protiteles IgG in IgA), dihalni test s sečnino in dokazovanje HP v blatu. Najpogosteje uporabljamo za dokaz okužbe s HP naslednje metode.

Hitri ureazni bioptični test. Najhitrejši odgovor o prisotnosti HP daje hitri ureazni bioptični test (HUT). Temelji na sposobnosti razgradnje sečnine (uree) s pomočjo bakterijskega encima ureaze v amonijev ion in bikarbonat (35).

V posebni plastični posodici je urea vklopljena v agar gel s fenilnim rdečilom in bakteriostatičnim sredstvom. Biopsijski vzorec želodčne sluznice potopimo v agar. V

primeru prisotnosti HP pride do razgradnje uree, pH se spremeni v alkalno smer, kar spremeni barvo pH indikatorja iz slamnato rumene v rdečo barvo.

Test je visoko specifičen (95-100 %), senzitivnost je nekoliko manjša. Slabost je počasnost pozitivne reakcije. Novi testi namesto agarja uporabljajo testni trak, pri katerem je reakcija hitrejša.

Dihalni test s sečnino. Dihalni test s sečnino temelji na isti reakciji kot hitri ureazni test, ki ga zdravnik naredi ob gastrokopiji. S testom določamo celokupno encimsko aktivnost (36). Bolnik spije določeno količino sečnine, ki ima namesto ^{12}C v molekuli ^{13}C . V želodcu ureaza, ki jo izloča HP, razgradi testno sečnino in ^{13}C se pojavi v bikarbonatnem anionu. Bikarbonatni anion se absorbira v kri in se kot CO_2 oz. $^{13}\text{CO}_2$ izloči v izdihanem zraku. Če izmerimo razmerje med $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ pred testom in po tem, ko je bolnik popil označeno sečnino, bo to razmerje ob prisotnosti bakterije spremenjeno. Če je povečano razmerje več kot 4 %, je rezultat pozitiven. Test odlikuje enostavnost, visoka občutljivost in specifičnost ter zanesljivost, zato ga pogosto uporabljajo. Izotop ^{13}C je povsem neškodljiv in je primeren tudi za uporabo pri otrocih, nosečnicah in doječih materah.

Serološka diagnostika. Serološke preiskave so za bolnika bolj prijazne, saj ni potrebno opraviti gastrokopije. Temeljijo na dokazovanju protiteles, ki jih sproži okužba s HP. Specifična protitelesa IgG so diagnostično pomembna. Pri otrocih z želodčnimi težavami pomeni povišan titer IgG verjeten dokaz okužbe s HP, pri odraslih pa povišan titer IgG ne pomeni vedno bolezni. Po uspešnem zdravljenju se v 3-6 mesecih titer protiteles IgG začne zniževati in se v 1-2 letih povsem zniža (37, 38).

Molekularna diagnostika. Verižna reakcija z polimerazo (angl. PCR - polymerase chain reaction) je relativno nova metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, s katero lahko v kratkem času pomnožimo določen odsek DNA ali RNA v velikem številu kopij. Za to preiskavo potrebujemo biopsijski vzorec želodčne sluznice, zato jo uvrščamo med invazivne metode.

Preiskavo, ki je korenito spremenila molekularno biologijo, danes največkrat uporabljamo za dokazovanje različnih mikroorganizmov. Dokazovanje mikroorganizmov s PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju specifičnih, majhnih odsekov njihovega dednega materiala. Temu sledi dokazovanje specifičnosti pomnoženega genomskega odseka mikroorganizma (39).

Histološka preiskava z različnimi metodami za dokaz HP v tkivu. Zdravnik pri gastroskopiji odvzame biopsijske vzorce na različnih mestih. Te vzorce barvamo s posebnimi barvili in jih pregledamo pod mikroskopom. Standardno barvanje s hematoksilinom in eozinom slabo prikaže HP, zato je priporočljivo uporabiti poleg HE še katero od specialnih barvanj ali imunohistkemično metodo (40).

Ta preiskava ne omogoča samo ugotavljanje okužbe s HP, ampak tudi natančno opredelitev sprememb v želodčni sluznici: vrsto gastritisa, prisotnost atrofije, metaplazije, displazije in malignega tumorja.

Kultivacija in identifikacija. Biopsijski vzorec pošljemo v mikrobiološki laboratorij v posebnem mediju. Razmaz biopsijskega vzorca obarvamo po Gramu, določimo prisotnost ureaze, zasejemo na obogatena gojišča in jih inkubiramo v mikroareofilnih okoliščinah 3-14 dni. HP prepoznamo z mikroskopsko sliko, dokazom gibljivosti, ureaze, oksidaze in katalaze. Kultivacija biopsijskega vzorca je pomembna zlasti kadar želimo ugotoviti odpornost oz. občutljivosti na antibiotike (30, 41).

2. NAMEN DELA

Ugotavljanje etiologije gastritisa je močno napredovalo po dokazu, da velik del primerov povzroči okužba z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) in po uvedbi specialnih barvanj za dokaz HP v rutinske preglede želodčnih biopsij.

Danes poznamo več načinov za prikaz bakterij *Helicobacter pylori* (HP) v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice (30). Ker gre za zelo pogosto bolezen, so biopsije želodčne sluznice zelo številne, zato je pomembno izbrati metodo za prikaz bakterije HP, ki je občutljiv, hiter in poceni.

Cilj naše raziskave je primerjati najpogostejše tehnike za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice: specialno barvanje po Giemsi in "Alcian yellow" ter imunohistokemično metodo. Med seboj bomo primerjali iste biopsije, barvane na različne načine in skušali ugotoviti, koliko bakterij je prikazanih v različnih metodah za prikaz bakterij, pri tem bomo ocenjevali tudi jasnost barvne reakcije in obarvanost ozadja.

3. MATERIAL in METODE

3.1. Bolniki

V arhivu Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani smo naključno izbrali zaporednih 30 primerov HP pozitivnega kroničnega gastritisa. Pri vseh biopsijah je bila že narejeno barvanje s hematoksilinom in eozinom ter barvanje po Giemsi. Za našo raziskavo smo iz parafinskih blokov odrezali dodatne rezine debeline 4-5 mikrometrov in dodatno naredili preparate, barvane po Kreybergu, »Alcian yellow« in z imunohistokemično metodo.

V skupini je bilo 17 moških in 13 žensk, starih 12 do 83 let, povprečna starost je bolnikov je bila 51,8 let. Pri vseh bolnikih je bila na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Kliničnega centra v Ljubljani narejena gastroskopija in odvzeta biopsija želodčne sluznice.

3.2. Biopsijski vzorci želodčne sluznice

3.2.1. Priprava histopatoloških preparatov

Priprava histopatoloških preparatov in različna barvanja na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani potekajo po natančno določenem postopku, ki je opisan v Poslovniku kakovosti (48).

Prvi korak v postopku izdelave trajnega histološkega preparata je bila fiksacija. Endoskopsko pridobljeni vzorci sluznice želodca so bili takoj po odvzemu potopljeni v fiksativ. Za fiksativ smo uporabili 10 % nevtralni pufran formalin, s čimer smo preprečili avtolizo in gnilobni razpad, ohranili morfološko strukturo tkiva, preprečili difuzijo topnih tkivnih komponent in ohranili kemične sestavine tkiva. Formalinska fiksacija je trajala 8-10 ur pri sobni temperaturi.

Fiksirane tkivne vzorce smo nato prepojili z mešanico visoko prečiščenega parafina, ki vsebuje plastične polimere regulirane molekulske mase, kar omogoča boljše tkivno prepajanje (Leica Paraplast Tissue Embedding Medium, McCormick ZDA, kat. št. 39501006). Parafin smo talili pri 56° C. Prepajanje s parafinom je omogočilo rezanje tankih histoloških rezin.

Postopek prepajanja z parafinom je sledeč. Fiksirano tkivo smo dehidrirali z etanolom, obdelali z organskim topilom ksilenom in prepojili v raztaljenem parafinu. Rutinski postopek fiksacije, dehidracije, bistrenja in prepajanja s parafinom je bil izveden v tkivnem procesorju (Sakura, Vip Junior, Japonska) in je trajal do 18 ur. S parafinom prepojene histološke vzorce smo narezali na 4-5 mikrometrov debele rezine na mikrotomu Leica RM 2135, Nemčija. Odrezane rezine tkiva smo pobrali na objektna stekla in jih v termostatu pri 60° C sušili 30 minut.

3.2.2. Barvanje s hematoksilinom in eozinom

Barvanje z hematoksilinom in eozinom je osnovno histološko barvanje, s katerim smo prikazali celična jedra v modri barvi, citoplazmo in večino ostalih medceličnih struktur pa v različnih odtenkih rožnato rdeče barve (slika 3a in 5a) (42).

Hematoksilin je naravno biološko barvilo, ki ga dobivajo z ekstrakcijo sredice drevesa *Haematoxylon campechianum*. Za barvanje smo uporabili galunski hematoksilin, vezni člen je galun. Barvilo smo pripravili sami v laboratoriju po navodilu za pripravo barvil. Sestavine so: hematoksilin, kalijev galun, natrijev jodat, 96 % etanol in destilirana voda.

Eozin je anionsko barvilo, ki obarva citoplazmo celic rožnato rdeče. Vsebuje proste anionske skupine, ki se vežejo na proste skupine proteinov z nasprotnim nabojem. Vodno raztopino barvila smo pripravili sami v laboratoriju po navodilu za pripravo barvil. Za barvanje parafinskih preparatov s hematoksilinom in eozinom smo uporabili aparat Medite TST 30 (Burgdorf, Nemčija). Postopek barvanja s hematoksilinom in eozinom je računalniško voden in je sledeč. Histološki preparati se deparafinirajo v ksilenu in rehidrirajo z alkoholi padajoče koncentracije. Sledi spiranje pod tekočo vodo, nato se preparati barvajo v vodni raztopini barvila hematoksilina. Zopet sledi spiranje pod tekočo vodo. Prebitek barvila se odstrani z blago raztopino klorovodikove kisline in s spiranjem pod tekočo vodo. Preparati se potopijo v vodno raztopino barvila eozin, čemur sledi spiranje pod tekočo vodo. Sledi dehidracija z alkoholi naraščajoče koncentracije. Postopek se konča z bistrenjem obarvanih preparatov v ksilenu. Obarvane preparate prekrijemo z medijem Perteks in krovnim stekelcem.

3.2.3. Barvanje po Kreybergu

Barvanje po Kreybergu je barvni postopek, ki prikaže kisle mukopolisaharide (mucin) v zeleni barvi, celična jedra v modri barvi, vezivna vlakna v rumeni do oranžni barvi, keratin v temno rdeči barvi in ostale tkivne strukture v rumeno rožnati barvi (slika 2a, 2b, 3b, 4a, 4b, 5b).

Za to metodo potrebujemo vodno raztopino barvila celestin blue za prikaz jeder, galunski hematoksilin za dodatno barvanje jeder, vodno raztopino barvila eritrozina za barvanje citoplazme, vodno raztopino barvil alcian blue in alcian green pri pH vrednosti 2,5 za prikaz kislinskih mukopolisaharidov, alkoholno raztopino barvila žafran za prikaz vezivnih vlaken. Vodna raztopina barvila celestin blue je barvilo, ki vsebuje železov galun, celestin blue, glicerol in demineralizirano vodo.

Galunski hematoksilin vsebuje hematoksilin, kalijev galun, natrijev jodat, 96 % etanol in destilirano vodo. Eritrozina vsebuje eritrozina B in tekočo vodo. Alciansko barvilo vsebuje alcian blue, alcian green, očetno kislino in demineralizirano vodo, pri pH vrednosti 2,5. Barvilo žafran vsebuje Safran du Gatinais in 100 % etanol.

Barvila smo pripravili sami v laboratoriju po navodilu za pripravo barvil, barvanje je potekalo v aparatu za barvanje Shandon (Varistain 24-3, Anglija). V aparatu so se preparati odparafinirali do tekoče vode, barvali v celestin blue barvilu, spirali pod tekočo vodo, barvali v galunskem hematoksilinu, zopet spirali v tekoči vodi, nato se prebitek barvila odstrani z blago raztopino klorovodikove kisline, preparati so se zopet spirali v tekoči vodi, barvali v eritrozinu, spirali pod tekočo vodo, v 96 % etanolu in še enkrat pod tekočo vodo, se nato barvali v alcianskem barvilu, spirali v destilirani vodi, v 100 % etanolu, barvali v žafranu in spirali v 100 % etanolu. Nato so se preparati bistrili v ksilenu in pokrili z medijem Perteks in krovnim stekelcem.

3.3. Metode za prikaz bakterije *Helicobacter pylori*

3.3.1. Barvanje po Giemsi

Za to barvanje smo uporabili barvilo Giemsa (Merck, Nemčija). Vodna raztopina, ki smo jo pripravili sami v laboratoriju, je mešanica barvila metilen blue, eozina, metanola in glicerina (40). Preparate smo najprej odparafinirali do tekoče vode, nato pa barvali v barvilu Giemsa 50 minut pri sobni temperaturi. Preparate smo nato sprali v tekoči vodi,

jih hitro dehidrirali v 96 % in 100 % etanolu, bistrili v ksilenu in prekrili z medijem Perteks ter krovnim steklom. Bakterije HP so se obarvale modro (slika 5c, 6a in 7a).

3.3.2. Barvanje "Alcian yellow"

Uporabili smo barvni komplet »Alcian Yellow« (Ventana Medical Systems, ZDA, PN 860-017).

Komplet vsebuje toluidin blue, bistrilo, senzibilizator, oksidant in »Alcian Yellow« barvilo. Barvanje poteka v računalniško vodenemu aparatu (Nexes Special Stains, Ventana Medical Systems, ZDA).

Bakterije HP se obarvajo modro zeleno (slika 6b in 7b), ozadje prav tako modro, mucin pa rumeno.

3.3.3. Imunohistokemična metoda

Z imunohistokemično metodo z uporabo specifičnih protiteles v histoloških rezinah prikazemo tiste snovi, ki imajo lastnosti antigena. Antigeni so snovi, s katerimi lahko v poskusni živali izzovemo nastajanje specifičnih protiteles (43).

Protitelesa, ki jih uporabljamo v imunohistoloških tehnikah, so izdelana v različnih živalskih vrstah (zajec, koza, miš). Lahko so poliklonska, dokazujemo celotno makromolekulo antigena, ali monoklonska, z katerimi dokazujemo posamezne antigenske determinante.

Za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* smo v naši raziskavi uporabili zajčja poliklonska protitelesa proizvajalca Dako (Glostrup, Danska, No. B0471), s katerimi dokazujemo posamezne antigenske determinante. Da postane pozitivna reakcija vidna, so protitelesa označena s fluorokromi (fluorescein izocianat, rodamin-B, tetrametilrodamin izocianat) ali encimi (hrenova peroksidaza, alkalna fosfataza).

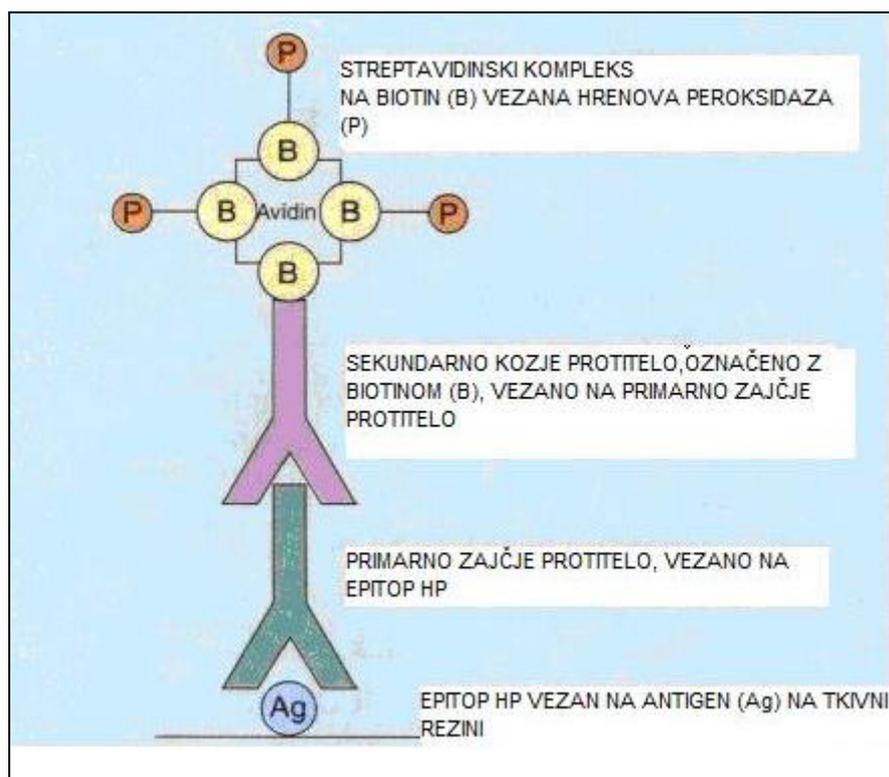
Ker smo uporabili z encimi označena protitelesa, smo morali pred inkubacijo tkivnega vzorca blokirati lastne tkivne in celične encime. Po inkubaciji smo dodali substrat, ki ga je encim razkrojil, produkt reakcije pa je spremenil neobarvani kromogen v obarvano obliko. Pozitivno reakcijo smo opazovali s svetlobnim mikroskopom.

Imunohistološke tehnike so lahko neposredne (direktne), če uporabimo eno samo protiteleso, ki je označeno, ali pa posredne (indirektne, dvo ali več stopenjske). Indirektne

tehnike so mnogo občutljivejše od direktnih. Pri dvostopenjski tehniki po inkubaciji s primarnim protitelesom, ki je usmerjen proti antigenu v tkivu in ni označeno, naneseemo drugo označeno protitelo, usmerjeno proti primernemu protitelesu.

Uporabili smo metodo kompleksa streptavidin-biotin (Slika 1). Na epitop bakterije HP se veže primarno zajčje poliklonsko protitelo. Na primarno protitelo se veže sekundarno kozje vezno protitelo, na katero je vezan vitamin biotin, nanj pa se z veliko afiniteto veže glikoprotein streptavidin, označen s hrenovo peroksidazo. Po dodatku vodikovega peroksida in ob prisotnosti kromogena diaminobenzidina (DAB) nastane na mestu imunskega kompleksa rjava oborina.

Za prikaz bakterije HP smo uporabili kupljen serum, ki se je uporabil v delovni koncentraciji 1 del seruma proti 30 delom pufru za redčenje protitelesa. Razredčitev 1:30 prikaže HP na površini ali v citoplazmi epiteljskih celic.



Slika 1. Shematski prikaz indirektna imunohistokemične metode z prikaz bakterije *Helicobacter pylori*.

3.3.4. Ocenjevanje histopatoloških sprememb v biopsijskih vzorcih in poselitve sluznice z bakterijo *Helicobacter pylori*

Histopatološke spremembe v biopsijskih vzorcih smo ocenjevali po Sydneyski klasifikaciji. Intenzivnost vnetne celične infiltracije, žlezno atrofijo, metaplazijo in displazijo smo ocenjevali po sistemu + blaga, ++ zmerna, +++ huda.

Poselitev sluznice z bakterijo *Helicobacter pylori* smo ocenili kot + (redke bakterije na manj kot 1/3 zajete sluznice), ++ (posamezne bakterije in manjše skupine na 1/3 do 2/3 zajete sluznice) in +++ (številne bakterije v vsaj 2/3 zajete sluznice).

3.4. Primerjava različnih metod za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* (barvanje po Giemsi in "Alcian yellow" ter imunohistokemična metoda)

S pomočjo svetlobnega mikroskopa smo primerjali iste biopsije, barvane na različne načine, in skušali ugotoviti, koliko bakterij je prikazanih v različnih metodah barvanja.

Upoštevali smo tudi jasnost barvne reakcije in obarvanost ozadja.

Posebej pozorno smo vrednotili biopsije, pri katerih so prisotne redke bakterije HP.

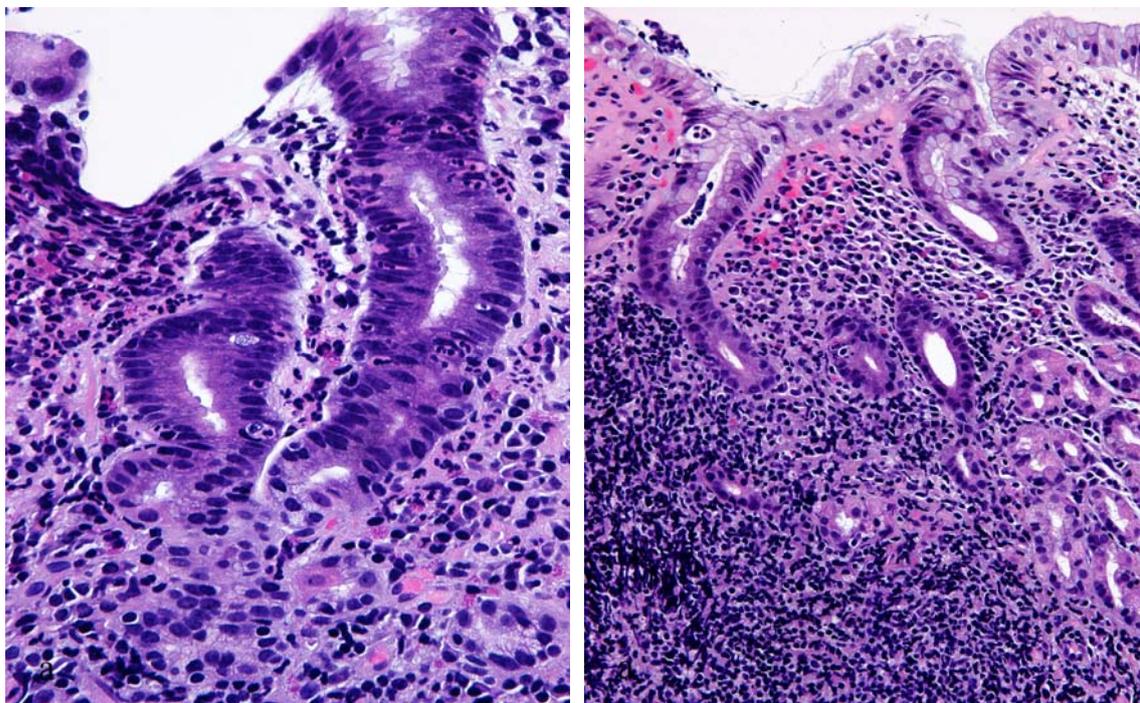
Primerjali smo tudi trajanje in ceno treh metod za prikaz bakterij HP v biopsijskih vzorcih.

4. REZULTATI

4.1. Histopatološke spremembe v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice

Podatke o histopatoloških spremembah pri naključno izbranih zaporednih biopsijah bolnikov s HP gastritisom prikazuje Preglednica I. Med 30 biopsijami je bilo 22 vzorcev želodčne sluznice antralnega tipa in 8 vzorcev želodčne sluznice korpusnega tipa. Tip sluznice smo lahko opredelili v preparatih, obarvanih s HE kot tudi v preparatih, obarvanih po Giemsi, vendar je v slednjem tip želodčne sluznice lažje opredeliti, saj se glavne celice, po katerih prepoznamo korpusno sluznico, v barvanju po Giemsi obarvajo temno modro (44).

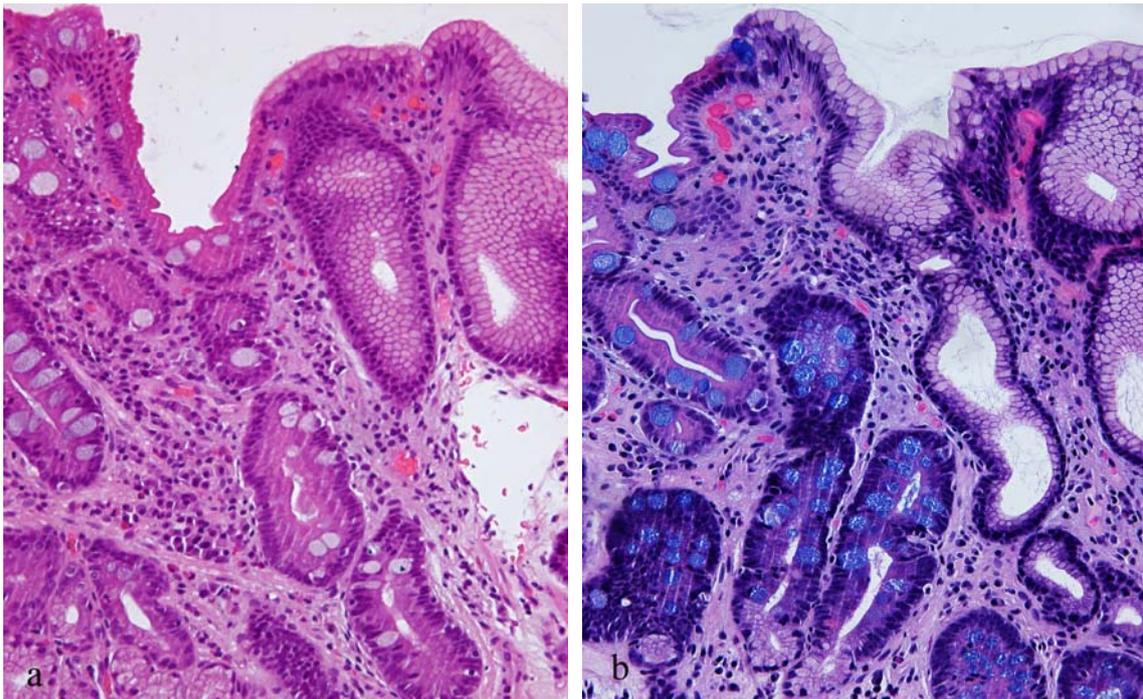
Intenzivnost kroničnega vnetja smo opredelili kot blago (3 primeri), zmerno (21 primerov) (slika 2b) ali hudo (6 primerov). Aktivnost (floridnost) vnetja pa smo opredelili kot blago pri 13 primerih, zmerno pri 8 (slika 2a) in hudo pri 6 primerih, pri 3 pa nismo našli histoloških znakov aktivnega (floridnega) vnetja.



Slika 2. Gastritis, povzročen z bakterijo *Helicobacter pylori*. Barvanje po Kreybergu. (a) Floridni (aktivni) gastritis zmerne stopnje: številni nevtrofilni granulociti vdirajo v vratove žlez. Povečava 40x. (b) Kronični gastritis zmerne stopnje: lamina propria je infiltrirana s številnimi limfociti in plazmatkami. Povečava 20x

Pri 15 primerih smo opazili intestinalno metaplazijo (slika 3a in 3b); intestinalno metaplazijo smo mnogo lažje prepoznali v barvanju po Kreybergu, ker se kisli mucini, značilni za intestinalno sluznico, obarvajo modro (slika 3b).

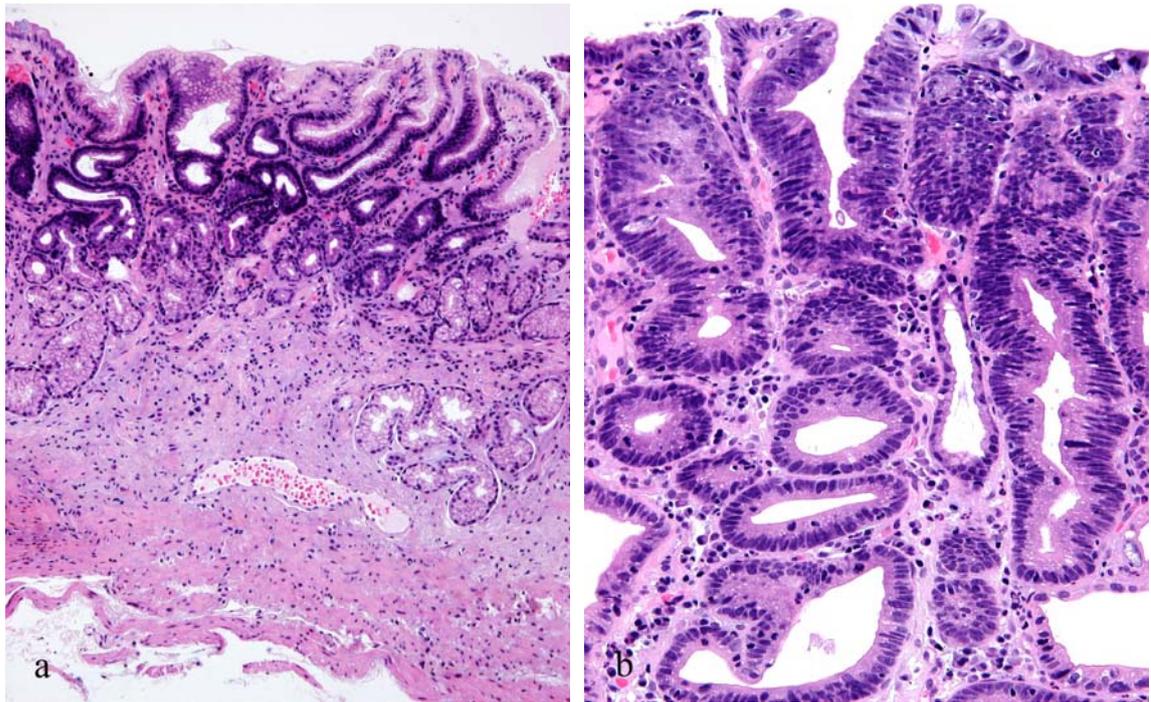
Pri 14 primerih smo opazili tudi atrofijo (slika 4a) in pri dveh displazijo želodčne sluznice (slika 4b).



Slika 3. Kronični gastritis z intestinalno metaplazijo. Povečava 20x.

(a) Barvanje s hematoksilinom in eozinom: metoplastična sluznica je na sliki levo.

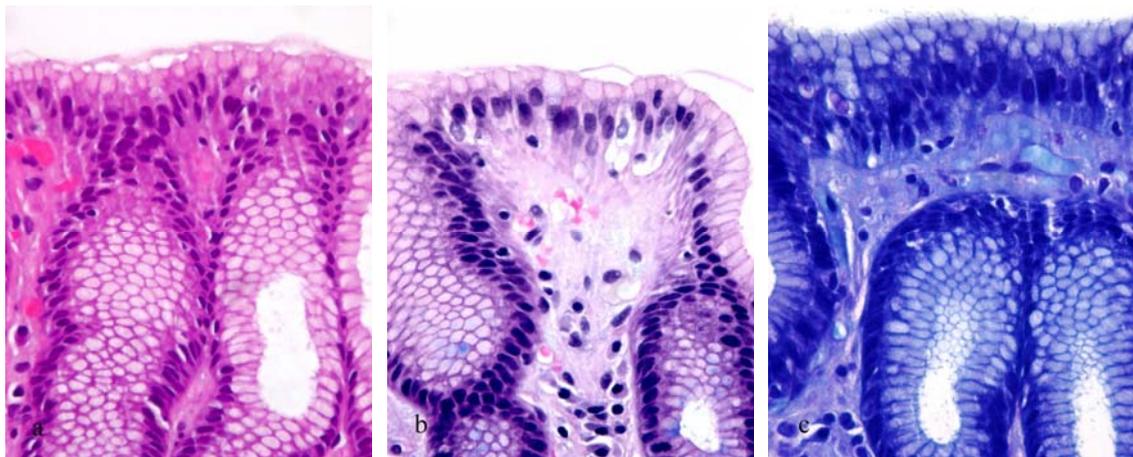
(b) Barvanje po Kreybergu: metoplastična sluznica se zaradi prisotnosti kislih mukopolisaharidov (mucinov) obarva modrikasto.



Slika 4. Kronični gastritis z atrofijo (a) in displazijo (b). Barvanje po Kreybergu.

(a) V področju atrofije so želodčne žleze razredčene. Povečava 10x.

(b) V področju displazije so epiteljske celice v žlezah in krovnem epiteliju večje, atipične in imajo hiperkromna jedra, poudarjena je mitotska aktivnost. Povečava 20x.



Slika 5. Barvanje s hematoksilinom in eozinom (a) in po Kreybergu (b) ne prikažeta jasno helikobaktrov. Barvanje po Giemsi (c) pa prikaže helikobaktrre predvsem v foveolah in redke na površini. Povečava 60x.

Preglednica I. Histopatološke spremembe v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice bolnikov s gastritisom, povzročnim z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP).

Legenda: * + blago, ++ zmerno, +++ hudo; ** 1: redke HP na manj kot 1/3 sluznice, 2: manjše skupine na 1- 2/3 sluznice, 3: številne HP v vsaj 2/3 zajete sluznice

Spol, starost	Tip sluznice	Kron. vnetje*	Aktivno vnetje*	Meta-plazija*	Atrofi-ja*	Displa-zija*	HP**
M, 18	antrum	++	+	0	+	0	1
Ž, 40	korpus	+	0	+	0	0	2
Ž, 71	antrum	++	+	0	0	0	2
Ž, 16	antrum	++	+	0	0	0	1
M, 19	antrum	++	+	+	0	0	2
M, 75	korpus	++	+	+	++	0	1
Ž, 48	antrum	++	+	+	0	0	2
Ž, 12	antrum	++	+	0	0	0	2
M, 41	antrum	++	+	0	0	0	1
M, 70	antrum	++	+	+	0	0	2
Ž, 15	antrum	++	0	+	+	0	1
Ž, 23	korpus	++	+++	0	0	0	2
M, 64	korpus	++	+++	0	0	0	2
Ž, 79	antrum	+	0	+	+	0	1
M, 56	korpus	+	+	+	0	0	1
M, 54	korpus	++	++	0	0	0	2-3
M, 54	antrum	++	+++	0	0	+	3
Ž, 61	antrum	++	++	0	+	0	3
M, 72	korpus	+++	+++	0	+	0	3
M, 72	antrum	++	+	0	+	0	1
M, 62	antrum	++	++	+	++	0	3
M, 15	antrum	+++	++	+	0	0	3
Ž, 74	korpus	+++	+++	+	++	0	3
Ž, 74	antrum	+++	+++	++	++	0	1
M, 56	antrum	+++	++	0	++	0	3
M, 44	antrum	++	++	0	++	0	3
M, 63	antrum	+++	++	+	++	0	2-3
Ž, 76	antrum	++	+	+	0	0	3
Ž, 73	antrum	++	++	+	0	0	2-3
M, 51	antrum	++	+	0	++	0	3

4.2. Ocenjevanje histopatoloških sprememb v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice v barvanju s hematoksilinom in eozinom ter v barvanju po Kreybergu

Primerjava obeh osnovnih histoloških barvanj pokaže, da sta zelo podobni. Najpomembnejša razlika je, da barvanje po Kreybergu obarva kisle mucine modro. Ker se kisli mucini tvorijo le v intestinalni, ne pa v normalni želodčni sluznici, nam barvanje po Kreybergu olajša prepoznavo področij intestinalne metaplazije v želodčni sluznici (slika 3a in 3b).

4.3. Prikaz bakterije *Helicobacter pylori* v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice

4.3.1. Barvanje s hematoksilinom in eozinom in barvanje po Kreybergu

Tako barvanje s hematoksilinom in eozinom kot tudi barvanje po Kreybergu prikazeta bakterije HP, kadar so številne («HP3 gastritis») (slika 5a in 5b), v obeh se obarvajo blede roza. Kadar je bakterij manj («HP1 in 2 gastritis»), smo jih zaznali le v dveh primerih.

4.3.2. Barvanje po Giemsi

V vzorcih, ki so bili barvani po Giemsi, so se bakterije HP obarvale sivo modro (slika 5a, 6a in 7a). Pri prepoznavi smo upoštevali tudi obliko bakterije in lokalizacijo (povrhnja plast sluzi, nad in med epitelijskimi celicami). Ob tem se je ozadje obarvalo minimalno, kar je omogočilo jasen in oster prikaz bakterij. Prepoznavna je bila enostavna, kadar so bile HP srednje do zelo številne (HP2 ali HP3). Bakterije HP s to metodo nismo prikazali le v enem primeru.

4.3.3. Barvanje "Alcian yellow"

V vzorcih, ki so bili barvani z "Alcian yellow", so se bakterije HP obarvale zeleno modro (slika 6b in 7b). Tudi v barvanju z "Alcian yellow" smo upoštevali obliko bakterij in lokalizacijo (povrhnja plast sluzi, nad in med epitelijskimi celicami). Nekoliko močnejše

se je obarvalo ozadje, tako da so bile bakterije prikazane nekoliko manj jasno in ostro. Podobno kot v barvanju po Giemsi je bila prepoznavna enostavna, kadar so bile HP srednje do zelo številne (HP2 ali HP3). Bakterije HP s to metodo nismo prikazali le v enem primeru gastritisa, v istem primeru se bakterije niso prikazale niti v barvanju po Giemsi.

4.3.4. Imunohistokemična metoda

Pri imunohistokemični metodi so se bakterije obarvale z rjavo barvo (slika 6c in 7c). Pri tem nismo opazili obarvanja ozadja, zato je bila slika ostra in jasna. Oblika in lokalizacija sta bili jasno prikazani. S to metodo smo prikazali tudi posamezne bakterije v edinem primeru gastritisa, v katerem se HP niso prikazale niti v barvanju po Giemsi niti v barvanju "Alcian yellow", bili pa so prisotni znaki floridnega (aktivnega) vnetja, ki so kazali na možnost okužbe z bakterijo HP.

4.4. Primerjava barvanja po Giemsi in "Alcian yellow" z imunohistokemično metodo

Primerjavo poselitve želodčne sluznice z bakterijo HP pri različnih metodah barvanja prikazuje Preglednica II.

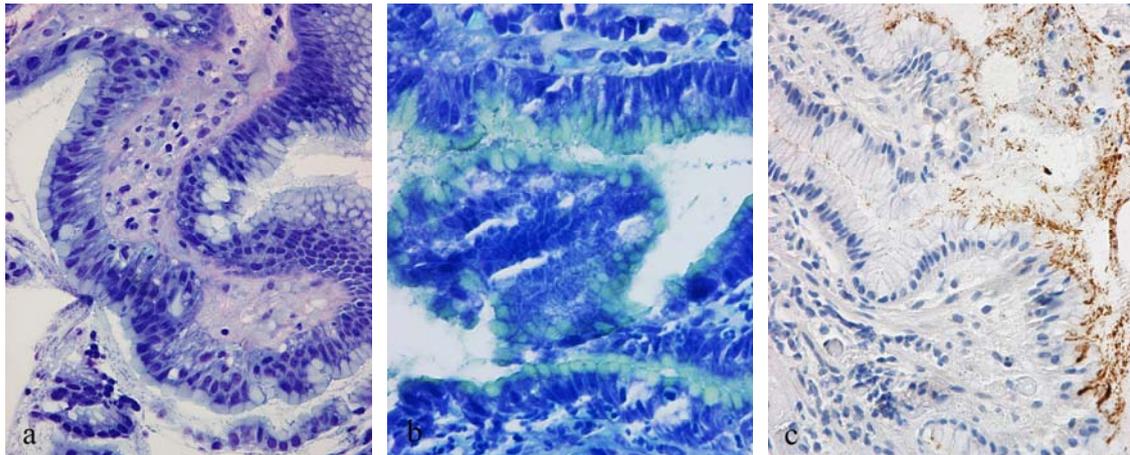
Prikaz bakterij HP z barvanjem po Giemsi in barvanjem "Alcian yellow" je bil podoben. Zdi se, da prikažeta podobno število bakterij in da omogočata oceno oblike in lokalizacije bakterije HP. Sama slika je v barvanju po Giemsi nekoliko bolj ostra, ker je manj obarvano ozadje. Obe barvanji sta enako uspešni pri ločevanju korpusne in antralne sluznice.

Imunohistokemična metoda očitno prikaže večje število bakterij. Primerjali smo iste biopsijske vzorce na istem mestu, barvane na tri različne načine. Na ta način seveda vzorci v posameznem barvanju niso povsem identični, ker gre za različne globine, kar kaže tudi sama oblika žlez (slika 6 a-c in 7 a-c). Imunohistokemična metoda je prikazala tudi posamezne bakterije, ki jih v ostalih dveh barvanjih nismo zaznali (slika 7 a-c).

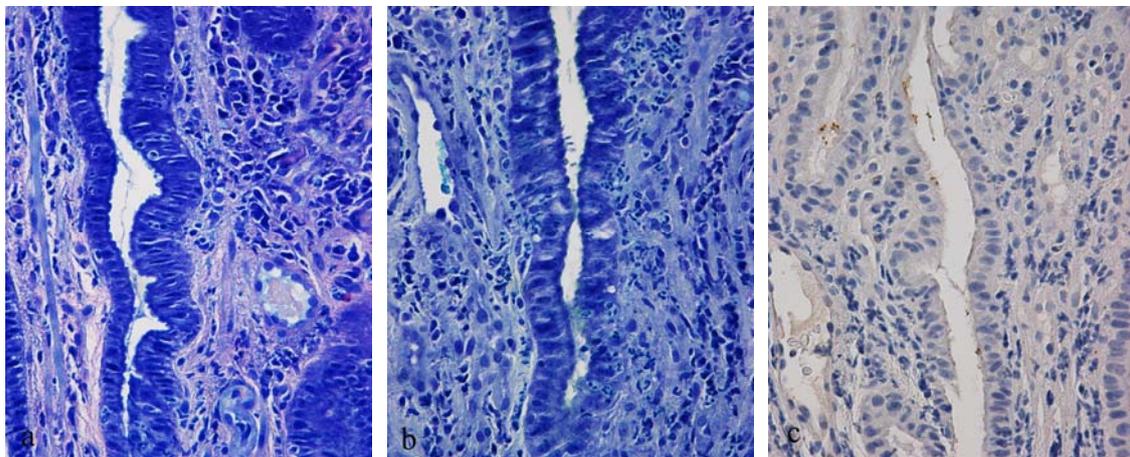
Preglednica II. Semikvantitativna ocena poselitve želodčne sluznice z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) pri različnih metodah barvanja za prikaz bakterij.

Legenda: * 1: redke HP na manj kot 1/3 sluznice, 2: manjše skupine na 1- 2/3 sluznice, 3: številne HP v vsaj 2/3 zajete sluznice

Zaporedna št. biopsije	Giemsa*	Alcian yellow*	Imunohistokemija*
1.	0	0	1
2.	1	1	2
3.	1	1	2
4.	0	0	1
5.	1	1	2
6.	0	0	1
7.	1	1	2
8.	1	1	2
9.	0	0	1
10.	1	1	2
11.	0	0	1
12.	1	1	2
13.	1	1	2
14.	0	0	1
15.	0	0	1
16.	3	3	3
17.	3	3	3
18.	3	3	3
19.	3	3	3
20.	0	0	1
21.	3	3	3
22.	3	3	3
23.	3	3	3
24.	0	0	1
25.	2	2	3
26.	3	3	3
27.	2	2	3
28.	3	3	3
29.	2	2	3
30.	3	3	3



Slika 6. Kronični in floridni (aktivni) gastritis, povzročeni z bakterijo *Helicobacter pylori*. Poselitev sluznice z bakterijo smo ocenili kot +++ (številne bakterije v vsaj 2/3 zajete sluznice). Za primerjavo metod za prikaz bakterije smo izbrali enako področje v biopsijskem vzorcu. Povečava 40x. (a) Barvanje po Giemsi. Na površini sluznice so številne modro obarvane bakterije. (b) Barvanje «Alcian Yellow». Na površini sluznice so številne modro-zelene obarvane bakterije. (c) Imunohistokemična metoda. Na površini sluznice so številne rjavo obarvane bakterije.



Slika 7. Kronični in floridni (aktivni) gastritis, povzročeni z bakterijo *Helicobacter pylori*. Poselitev sluznice z bakterijo *Helicobacter pylori* smo ocenili kot + (redke bakterije na manj kot 1/3 zajete sluznice). Za primerjavo metod za prikaz bakterije smo izbrali enako področje v biopsijskem vzorcu. Povečava 40x. (a) Barvanje po Giemsi. Na površini sluznice ni jasno vidnih bakterij. (b) Barvanje «Alcian Yellow». Na površini sluznice ni jasno vidnih bakterij. (c) Imunohistokemična metoda. Na površini sluznice so redke rjavo obarvane bakterije.

4.5. Trajanje in cena različnih metod za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice

Preglednica III prikazuje primerjavo trajanja izdelave 10 preparatov s pomočjo različnih metod za prikaz bakterij HP in cenovno razmerje.

Najbolj zamudno je barvanje po Giemsi, medtem ko med barvanjem "Alcian yellow" in imunohistokemično metodo ni bistvene razlike.

Preglednica III. Primerjava različnih metod za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice.

Metoda	Trajanje preiskave (min) (za 10 preparatov)	Razmerje cen (primerjava z barvanjem po Giemsi)
Barvanje po Giemsi	60	1
Barvanje "Alcian yellow"	45	1 : 160
Imunohistokemična metoda	45	1 : 240

Najcenejše je barvanje po Giemsi; barvanje "Alcian yellow" je približno 160-krat dražje, imunohistokemična metoda pa 240-krat dražja kot barvanje po Giemsi. Imunohistokemična metoda je 1,5-krat dražja kot barvanje "Alcian yellow" .

5. RAZPRAVA

5.1. Histopatološke spremembe v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice bolnikov z gastritisom, povzročenim z bakterijo *Helicobacter pylori*

V biopsijskih vzorcih želodčne sluznice smo pri gastritisu, povzročenem z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP), ugotovili kronično vnetje različne intenzivnosti pri vseh bolnikih; kronično vnetje smo prepoznali po infiltraciji lamine proprije z mononuklearnimi vnetnicami (limfociti in plazmatkami), pogosto so se tvorili limfatični folikli. Pri skoraj vseh bolnikih smo našli tudi znake aktivnega (floridnega) vnetja, za katerega je značilna infiltracija žleznih vratov z nevtrofilnimi granulociti.

Naše ugotovitve so skladne s podatki v literaturi, da je kronični aktivni gastritis značilna histološka slika pri HP gastritisu (1, 2). Zato je potrebno pri vsakem primeru kroničnega aktivnega gastritisa natančno pregledati histološki preparat in iskati bakterije HP.

Dokaj pogosto smo našli tudi intestinalno metaplazijo in atrofijo želodčne sluznice (pri polovici bolnikov). Intestinalno metaplazijo smo mnogo lažje prepoznali v barvanju po Kreybergu, ker se kisli mucini, značilni za intestinalno sluznico, obarvajo modro. Displazija želodčne sluznice je bila redka, ugotovili smo jo pri dveh bolnikih.

Intestinalna metaplazija, atrofija in displazija se ne pojavljajo samo pri HP gastritisu, ampak tudi pri drugih vrstah kroničnega gastritisa. Prisotnost vseh treh je pomembna zato, ker v tako spremenjeni želodčni sluznici pogosteje vznikne rak (13-15). Take bolnike je potrebno skrbno slediti.

5.2. Pomen biopsije želodčne sluznice pri kroničnem gastritisu

Klinične in endoskopske značilnosti HP gastritisa in drugih vrst gastritisa niso značilne (6-9), zato je za opredelitev gastritisa potrebna biopsija. V biopsiji med drugim vedno skušamo opredeliti vzrok (etiologijo) gastritisa. Najpogostejši vzrok kroničnega gastritisa je okužba želodčne sluznice z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP). Ugotavljanje vzroka gastritisa je pomembno, ker vsak nezdravljen kronični gastritis (ne glede na vzrok) lahko vodi v razvoj želodčnega karcinoma (13, 30), HP gastritis pa je povezan tudi z razvojem malignega limfoma (14, 15).

Okužbo s HP lahko pozdravimo z antibiotiki (45, 46). Raziskave so pokazale, da po eradikaciji HP vnetje v želodčni sluznici sčasoma izzveni, aktivno (floridno) vnetje v nekaj mesecih, kronično vnetje pa je lahko prisotno tudi do dve leti (47). Tudi ostale histopatološke spremembe lahko po odstranitvi vzroka izginejo, delno ali v celoti. Eradikacija HP pozdravi celo maligni limfom pri večini bolnikov, ki se lahko pojavi kot zaplet HP gastritisa (14, 15). Zato je opredelitev vzroka gastritisa eden od najpomembnejših ciljev pri pregledu biopsije, saj omogoči ustrezno zdravljenje (2).

Poleg vzroka gastritisa pa je seveda pomembna tudi ocena vseh histopatoloških sprememb v želodčni sluznici: nekatere so povezane s pogostejšim vznikom raka, npr. intestinalna metaplazija, atrofija, displazija (1, 12, 18), zato je te bolnike potrebno skrbno slediti in ponavljati biopsije. Včasih pa lahko v biopsiji najdemo rakave spremembe, ki zahtevajo takojšnje ukrepanje.

5.3. Primerjava osnovnih barvanj biopsijskih vzorcev želodčne sluznice

V patologiji se kot osnovno histološko barvanje najpogosteje uporablja barvanje s hematoksilinom in eozinom (HE) (42), v nekaterih laboratorijih pa pri biopsijah s področja prebavil uporabljajo barvanje po Kreybergu. Primerjava obeh je pokazala, da je v barvanju po Kreybergu mnogo lažje prepoznati intestinalno metaplazijo in oceniti njen obseg kot v barvanju s hematoksilinom in eozinom. Ocena intestinalne metaplazije je pomembna, saj se v tako spremenjeni sluznici pogosteje razvije rak. Razen omenjenega pa nismo opazili bistvenih razlik med obema osnovnima načinoma barvanja.

5.4. Primerjava različnih metod za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* v biopsijskih vzorcih želodčne sluznice

Skladno z našimi pričakovanji osnovno histološko barvanje, ne glede na to, za katero se odločimo, bodisi za barvanje s hematoksilinom in eozinom ali za barvanje po Kreybergu, za oceno poselitve sluznice z bakterijo HP ni primerno. Zato je potrebno pri vseh biopsijah želodčne sluznice dodati še eno metodo.

Najbolj občutljiva je imunohistokemična metoda, saj pri njej uporabimo monoklonska protitelesa, ki reagirajo z antigeni bakterije HP. Zato je prikaz bakterije HP s to metodo,

tudi če so zelo redke ali celo ena sama, zanesljiv. Zaradi visoke cene pa uporaba te metode pri vseh biopsijah ni upravičena.

Pomembno je izbira nadomestne metode, ki jo bomo uporabili pri vseh biopsijah želodčne sluznice. Biti mora čimbolj občutljiva, hitra in poceni. Naša raziskava kaže, da je občutljivost obeh testiranih specialnih barvanj, ki bi jih uporabili pri vseh biopsijah, barvanja po Giemsi in barvanja "Alcian yellow", podobna. Zdi se, da prikažeta podobno število bakterij HP, vendar je bil prikaz HP v barvanju po Giemsi nekoliko bolj jasen zaradi manj obarvanega ozadja. Obe barvanji seveda nista specifični, saj prikažeta tudi druge bakterije, ki so lahko prisotne v želodcu. Zato je potrebno pri obeh specialnih barvanjih upoštevati tudi značilno spiralno obliko bakterije HP in lokalizacijo – v povrhnji plasti sluzi na sluznici, nad in med epitelijskimi celicami. Zato je potrebno imeti pri interpretaciji ustrezno znanje in izkušnje.

Cena barvanj se razlikuje. Najcenejše je barvanje po Giemsi; barvanje "Alcian yellow" je približno 160-krat dražje, imunohistokemična metoda pa 240-krat dražja kot barvanje po Giemsi. Imunohistokemična metoda je 1,5-krat dražja kot barvanje "Alcian yellow" .

Primerjava trajanja obeh barvanj je pokazala, da je barvanje po Giemsi nekoliko hitrejše, barvanje "Alcian yellow" pa nekoliko bolj zamudno in primerljivo s imunohistokemično metodo.

Naša raziskava torej kaže, da je najbolj smiselno pri vseh biopsijah želodčne sluznice osnovnemu histološkemu barvanju za prikaz bakterije HP dodati barvanje po Giemsi, saj je od testiranih metod najhitrejša in najcenejša.

Kadar so morfološke spremembe sumljive za gastritis, povzročen z bakterijo HP, pa z barvanjem po Giemsi nismo prikazali HP, je potrebno narediti še imunohistokemično preiskavo. Naša raziskava je pokazala, da so pri redkih primerih prisotne posamezne bakterije HP, ki se v barvanju po Giemsi in v barvanju "Alcian yellow" niso prikazale, prikazali smo jih le z imunohistokemično metodo.

5.5. Pomen kvalitete izdelave histološkega preparata in izbire barvanja pri pregledu biopsij želodčne sluznice

Biopsijski material je dragocen, ker omogoča natančno diagnozo in s tem izbiro ustreznega zdravljenja, zavedati pa se moramo tudi, da je za biopsijski odvzem želodčne sluznice potrebno opraviti endoskopsko preiskavo - gastrokopijo, ki je zahtevna in za bolnika neprijetna.

Zato je potrebno z biopsijskimi vzorci ravnati skrbno in previdno, izdelati čimbolj kvalitetne histološke preparate ter izbrati optimalna barvanja. Žal nas pri slednjem ne vodi samo želja po čimboljši kvaliteti, ampak je potrebno upoštevati tudi ceno in trajanje preiskave, saj je kronični gastritis pogosta bolezen in so zato želodčne biopsije med najbolj številnimi v patologiji.

6. SKLEPI

Kot osnovni način barvanja biopsijskih vzorcev želodčne sluznice bolnikov s kroničnim gastritisom lahko uporabimo barvanje s hematoksilinom in eozinom (HE) in barvanje po Kreybergu. Prednost barvanja po Kreybergu je, da omogoči bolj natančno oceno intestinalne metaplazije.

Za prikaz bakterije *Helicobacter pylori* (HP) barvanje s HE in barvanje po Kreybergu nista primerni, saj prikažeta HP le v takrat, kadar so HP zelo številni.

Za prikaz HP smo testirali tri načine: barvanje po Giemsi, barvanje "Alcian yellow" in imunohistokemično metodo. Najbolj občutljiva je imunohistokemična metoda, vendar je zaradi visoke cene ne moremo uporabiti pri vseh biopsijah. Zato priporočamo uporabo specialnih barvanj, ki so cenejša.

Od specialnih barvanj smo testirali barvanje po Giemsi in barvanje "Alcian yellow". Prikaz HP je bil v barvanju po Giemsi nekoliko bolj jasen in oster kot v barvanju "Alcian yellow", poleg tega je barvanje po Giemsi mnogo cenejše.

Za biopsije želodčne sluznice zato priporočamo kot osnovno metodo barvanje po Kreybergu, kot specialno za prikaz helikobaktrov pa barvanje po Giemsi, v zahtevnih primerih pa je potrebno dodati imunohistokemično metodo.

7. LITERATURA

1. Fenoglio-Preiser C, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG: Gastrointestinal pathology. 3rd edition. Philadelphia, USA: Lippincott, 2008
2. Cerar A, Križman I. Gastritis in z njim povezane bolezni. Memorialni sestanek prof. Janeza Plečnika. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo, 1996
3. Misiewicz JJ: The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. J Gastroenterol Hepatol 1991; 6: 207-8.
4. Price AB: The Sydney System: histological division. J Gastroenterol Hepatol 1991; 6: 209-22.
5. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P: Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 1996; 20: 1161-81.
6. Tytgat GNJ: Gastritis. In: Misiewicz JJ, Pounder RE, Venables CW, editors: Diseases of the gut and pancreas. 2nd edition. Oxford: Blackwell, 1994, pp 221-235
7. Glasbrenner B, Weiler S, Ellenrieder V, Müller P, Adler G: Relationship between Helicobacter pylori infection, histological gastritis, and functional dyspepsia. Hepatogastroenterol 1998; 45: 2238-43.
8. Lo CC, Hsu PI, Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Tseng HH, Lin CK, Chan HH, Wang YY, Ku MK, Lin CP, Peng NJ, Chien EJ: Comparison of clinical, serological and histological findings between non-ulcer dyspepsia patients with and without Helicobacter pylori infection. J Gastroenterol Hepatol 2001; 16: 276-81.
9. Marzio L, Cappello G, Ballone E: Evaluation of dyspeptic symptoms in patients with and without Helicobacter pylori infection and normal upper gastrointestinal endoscopy. Dig Liver Dis 2003; 35: 138-42.

10. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ: Helicobacter pylori infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994; 120: 977-81.
11. Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A: Age at establishment of Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995; 55: 562-5.
12. Smith VC, Genta RM: Role of Helicobacter pylori gastritis in gastric atrophy, intestinal metaplasia and gastric neoplasia. *Microsc Res Tech* 2000; 48: 313-20.
13. Eslick GD, Lim LL, Byles JE, et al: Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta analysis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2373-9.
14. Isaacson PG, Spencer J: Is gastric lymphoma an infectious disease? *Hum Pathol* 1993; 24: 569-70.
15. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG: Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991; 338: 1175-6.
16. Stolte M, Eidt S: Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to Campylobacter pylori? *J Clin Pathol* 1989; 42: 1269-71.
17. Stemmermann GN: Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 1994; 74: 556-64.
18. Rugge M, Farinati F, Baffa R, Sonego F, Di Mario F, Leandro G, Valiante F: Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterol* 1994; 107: 1288-96.

19. Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-5.
20. Lambert JR, Lin SK, Aranda-Michel J: *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1995; 208: 33-46.
21. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS: Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Am J Clin Pathol* 1994; 102: 503-7.
22. Go MF: Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 Suppl 1: 3-15.
23. Brown LM; *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22: 283-97.
24. Czinn SJ: *Helicobacter pylori* infection: detection, investigation, and management. *J Pediatr* 2005; 146 (3 Suppl): S21-6.
25. Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, et al: *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1990; 58: 1992-4.
26. Montecucco C, Papini E, de Bernard M, et al: *Helicobacter pylori* VacA vacuolating cytotoxin and HP-Nap neutrophil activating protein. In: Achtman M, Suerbaum S (eds). *Helicobacter Pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press, 2001, pp 245-63.
27. Szabo I, Brutsche S, Tombola F, et al: Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacC of *Helicobacter pylori* is required or its biological activity. *EMBO J* 1999; 18: 5517-27.
28. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A: Infection with *Helicobacter pylori* strains

possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-5.

29. Segal ED, Cha J, Lo J, et al: Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14555-64.
30. Versalovic J: *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 403-12.
31. Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HMT, et al: Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterol* 2002; 123: 414-24.
32. Fiocca R, Villani L, Luinetti O, Gianatti A, Perego M, Alvisi C, Turpini F, Solcia E: *Helicobacter* colonization and histopathological profile of chronic gastritis in patients with or without dyspepsia, mucosal erosion and peptic ulcer: a morphological approach to the study of ulcerogenesis in man. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 420: 489-98.
33. Nakamura RM: Laboratory tests for the evaluation of *Helicobacter pylori* infections. *J Clin Lab Anal* 2001; 15: 301-7.
34. Ricci C, Holton J, Vaira D: Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 299-313.
35. Sato T, Fujino MA, Kojima Y, Kitahara F, Morozumi A, Nagata K, Nakamura M, Hosaka H: Evaluation of immunological rapid urease testing for detection of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 2000; 19: 438-42.
36. Dill S, Payne-James JJ, Misiewicz JJ, Grimble GK, McSwiggan D, Pathak K, Wood AJ, Scrimgeour CM, Rennie MJ: Evaluation of ¹³C-urea breath test in the

detection of *Helicobacter pylori* and in monitoring the effect of tripotassium dicitratobismuthate in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 1990; 31: 1237-41.

37. Kreuning J, Lindeman J, Biemond I, Lamers CBHW: Relation between IgG and IgA antibody titres against *Helicobacter pylori* in serum and severity of gastritis in asymptomatic subjects. *J Clin Pathol* 1994; 47: 227-31.
38. Laheij RJ, Straatman H, Jansen JB, Verbeek AL: Evaluation of commercially available *Helicobacter pylori* serology kits: a review. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2803-9.
39. Mikula M, Dzwonek A, Jagusztyn-Krynicka K, Ostrowski J: Quantitative detection for low levels of *Helicobacter pylori* infection in experimentally infected mice by real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2003; 55: 351-9.
40. Bancroft JD, Gamble M: *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002: 325-44.
41. DeCross AJ, Marshall BJ, McCallum RW, et al: Metronidazole susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: comparison of disk, broth, and agar dilution methods and their clinical relevance. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1971-4.
42. Bancroft JD, Gamble M: *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002: 129-38.
43. Bancroft JD, Gamble M: *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002: 421-64.
44. Cerar A, Jurčić V: Differential staining of the gastric mucosal chief cells by a modified Giemsa method. *J Histotechnol* 1999; 22: 125-7.
45. Crespo A, Suh B: *Helicobacter pylori* infection: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Arch Pharm Res* 2001; 24: 485-98.

46. Basset C, Holton J, Ricci C, Gatta L, Tampieri A, Perna F, Miglioli M, Vaira D: Review article: diagnosis and treatment of Helicobacter: a 2002 updated review. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17 Suppl 2: 89-97.
47. Tepeš B, Kavčič B, Zaletel LK, Gubina M, Ihan A, Poljak M, Križman I: Two- to four-year histological follow-up of gastric mucosa after Helicobacter pylori eradication. *J Pathol* 1999; 188: 24-9.
48. Poslovník kakovosti in Dokumenti sistema kakovosti Inštituta za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Inštitut za patologijo, Ljubljana 2009 (interno gradivo).