

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



PETRA FINDERLE

**KLINIČNI POMEN RAZLIČNIH DIAGNOSTIČNIH METOD ZA DOLOČANJE
IN SPREMLJANJE USPEŠNOSTI ZDRAVLJENJA OKUŽBE S HELICOBACTER
PYLORI**

CLINICAL SIGNIFICANCE OF DIFFERENT DIAGNOSTIC METHODS FOR
DETERMINATION AND MONITORING OF HELICOBACTER PYLORI
TREATMENT SUCCESS

UNIVERZITETNI ZNANSTVENI PODIPLOMSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
BIOMEDICINA, SMER KLINIČNA KEMIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika. Vse laboratorijske analize so bile opravljene v laboratorijih Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, hitri ureazni test so opravili na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Jošku Osredkarju za vodenje in pomoč pri izdelavi magistrske naloge ter mentorici specializacije klinične biokemije, doc. dr. Mariji Prezelj za vso spodbudo in izkušnje, ki sem jih pridobila ob njej, ter za vpeljavo v širino klinično biokemijske stroke.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem iz Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ki so pripomogli k izvedbi laboratorijskih analiz in omogočili izdelavo te magistrske naloge.

Zahvaljujem se staršem za vso potrpežljivost, podporo in ljubezen.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., višjega svetnika.

Petra Finderle

Komisija za zagovor naloge

prof. dr. Janja Marc, predsednica;

prof. dr. Joško Osredkar, član in

doc. dr. Nataša Karas Kuželički, članica.

VSEBINA

VSEBINA.....	i
POVZETEK	ii
ABSTRACT	iii
SEZNAM OKRAJŠAV	iv
1. UVOD	1
1.1 Anatomija in fiziologija želodca.....	1
1.2. Bolezni želodca povezane z okužbo s <i>H. pylori</i>	4
1.2.1. Gastritis.....	4
1.2.2. Peptična razjeda – Ulkus	5
1.2.3. Neoplazme želodca	6
1.2.4. Funkcionalne bolezni želodca.....	7
1.2.5. Motilitetne motje želodca	7
1.3. <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.4. Diagnostika okužbe s <i>H. pylori</i>	10
1.4.1. Neinvazivne diagnostične metode.....	10
1.4.2. Invazivne diagnostične metode.....	12
1.5. Zdravljenje okužbe s <i>Helicobacter pylori</i>	14
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. Vzorčenje in pridobivanje podatkov	18
3.2. Uporabljene diagnostične metode.....	18
3.2.1. Hitri ureazni test biopta po gastroskopiji.....	19
3.2.2. Dihalni test s sečnino.....	20
3.2.3. Kvalitativni test določitve antigena <i>H. pylori</i> v blatu z ELISA metodo	22
3.2.4. Hitri test za določitev antigena <i>H. pylori</i> v blatu 1	24
3.2.5. Hitri test za določitev antigena <i>H. pylori</i> v blatu 2	26
3.2.6. Kvalitativna določitev <i>H. pylori</i> ureaze v slini	27
3.2.7. Kvantitativna določitev specifičnih protiteles IgA in IgG proti <i>H. pylori</i> v serumu ..	29
3.3. Statistično ovrednotenje rezultatov	30
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	35
4.1. Statistično ovrednotenje rezultatov	37
4.2. Korelacija med kvantitativnimi in semikvantitativnimi metodami.....	43
4.3. Uspešnost eradikacijske terapije	47
4.4. Finančni vpogled na klinično laboratorijsko diagnostiko okužbe s <i>H. pylori</i>	50
SKLEPI	53
LITERATURA	54

POVZETEK

Helicobacter pylori je po Gramu negativna spiralna bakterija, ki je edina prilagojena na kislo okolje želodca. Gre za najpogostejšo bakterijsko okužbo pri ljudeh, ki lahko poteka popolnoma asimptomatsko ali pa se razvije gastritis, razjeda želodca ali dvanajstnika ter rak na želodcu ali MALT limfom. Zato je ključno njeno pravočasno odkrivanje in zdravljenje. Za ugotavljanje in potrditev okužbe ter za spremljanje uspešnosti zdravljenja se uporabljajo invazivne in neinvazivne diagnostične metode. Običajno se za eradikacijo *H. pylori* uporabi kombinacija zaviralca protonske črpalke in antibiotikov skladno z nacionalnimi smernicami, ki upoštevajo rezistenco *H. pylori* na antibiotike.

V nalogi smo pregledali in med seboj primerjali sedem neinvazivnih diagnostičnih metod ter rezultate hitrega testa s sečnino in histologije, pridobljene ob gastrokopskem pregledu v skupini 116 pacientov z mediano starosti 48 (10-85) let, med katerimi je bilo 58 % žensk. Specifičnost in občutljivost metod smo grafično predstavili z ROC krivuljo in površino pod krivuljo (AUC) ter ovrednotili glede na dihalni test s sečnino kot referenčno metodo. Pri metodi določitve antigena *H. pylori* v blatu z ELISA metodo smo dobili ROC AUC 0,911 in 83,7 % občutljivost ter 98,4 % specifičnost. Za oba kvalitativna hitra testa za določitev *H. pylori* antigena v blatu smo dokazali ustrezne diagnostične lastnosti (AUC > 0,700) in jih priporočamo pri diagnostiki okužbe s *H. pylori* v kombinaciji z drugimi testi. Test za ureazno aktivnost *H. pylori* v slini ni pokazal ustrezne specifičnosti in občutljivosti (pod 20 %, AUC < 0,600), saj je vzorec odvisen od stopnje ustne higijene in zato ne pokaže vedno prisotnost okužbe s *H. pylori* v želodcu. Določitev specifičnih *H. pylori* protiteles IgG in IgA v serumu se danes za redno diagnostiko *H. pylori* okužbe opušča zaradi nizke specifičnosti testov (pod 60 % v naši nalogi), saj protitelesa vztrajajo v telesu več mesecev po uspešni eradikaciji. Na skupini 22 pacientov mediane starosti 48 (16-78) let je bilo za zdravljenje okužbe s *H. pylori* največkrat (18/22) uporabljena klasična trotirna terapija s kombinacijo zaviralca protonske črpalke in dveh antibiotikov. Ponovitev zdravljenja je bila potrebna le v posameznih primerih (7/22), kjer se je glede na rezultate opazovanih laboratorijskih testov za uspešno pokazala zamenjava makrolidnega antibiotika z nitroimidazolnim. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da lahko z določitvijo antigena *H. pylori* v blatu z ELISA metodo uspešno odkrijemo in spremljamo zdravljenje okužbe s *H. pylori*.

Ključne besede: *Helicobacter pylori*, diagnostika okužbe, sheme eradikacijske terapije, uspešnost zdravljenja

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral bacteria and is the only bacteria adapted to the acidic stomach environment. It is known as the most common bacterial infection in humans with a completely asymptomatic course or diseases as gastritis, gastric or duodenal ulcer, and gastric cancer or MALT lymphoma occur. Therefore a timely detection and early treatment of infection is crucial. Invasive and non-invasive diagnostic methods are used to detect, confirm, and monitor the treatment success of infection. For *H. pylori* eradication a combination of a proton pump inhibitor and antibiotics are usually used in accordance with the national guidelines, which consider the *H. pylori* antibiotic resistance. We examined and compared seven non-invasive diagnostic methods with the results of the rapid urea test and histology obtained during gastroscopy in a group of 116 patients with a median age of 48 (10 - 85) years, of which 58 % were women.

Specificity and sensitivity of methods were presented graphically with ROC curve and area under curve (AUC) and evaluated according to the urea breath test as the reference method. *H. pylori* stool antigen ELISA test gave ROC AUC of 0,911 and 83,7 % sensitivity and 98,4 % specificity. We determined appropriate diagnostic properties (AUC > 0,700) for both qualitative rapid *H. pylori* antigen stool tests, and we recommend their use in the diagnosis of *H. pylori* infection in combination with other tests. The test for *H. pylori* urease activity in saliva has not shown an adequate specificity and sensitivity (less than 20 %, AUC < 0,600), since the sample depends on the oral hygiene level and does therefore not always show the presence of *H. pylori* infection in the stomach. Determination of specific *H. pylori* IgG and IgA levels in serum samples for routine *H. pylori* infection diagnosis are nowadays being abandoned because of the low specificity of the assays (below 60 % in our work) as antibodies persist in the body even several months after eradication treatment. The classical triple therapy, a combination of a proton pump inhibitor and two antibiotics, was most commonly used (18/22) in the observed group of 22 patients with median age 48 (16-78) years. A second treatment was necessary only in individual cases (7/22), where the replacement of a macrolide antibiotic with nitroimidazole proved to be more successful according to laboratory tests results. Based on our results we conclude that *H. pylori* stool antigen ELISA test is a suitable test to detect and monitor *H. pylori* infection treatment.

Key words: *Helicobacter pylori*, infection diagnosis, eradication scheme treatment, treatment success

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC	area under curve – površina pod krivuljo
CV	koeficient variacije
EIA	enzyme immuno assay – encimski imunski test
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay – encimsko imunoadsorpcijski test
<i>H. pylori</i>	bakterija <i>Helicobacter pylori</i>
HCl	klorovodikova kislina
HP-DihT	dihalni test s sečnino Test INFAI [®]
HP-blato 1	hitri test za določitev antigena <i>H. pylori</i> v blatu DIMA [®] MKBio
HP-blato 2	hitri test za določitev antigena <i>H. pylori</i> v blatu H&R [®]
HP-IgA	kvantitativna določitev specifičnih protiteles IgA proti <i>H. pylori</i> v serumu ORION Diagnostica [®]
HP-IgG	kvantitativna določitev specifičnih protiteles IgG proti <i>H. pylori</i> v serumu ORION Diagnostica [®]
HP-blato ELISA	kvalitativni test antigena <i>H. pylori</i> v blatu Liaison [®] DiaSorin
HP-Slina	kvalitativna določitev <i>H. pylori</i> ureaze v slini dBest One Step Saliva Urease [®]
HUT	hitri ureazni test
IQR	interquartile range – interkvartilni razpon
IZ	interval zaupanja
NNV	negativna napovedna vrednost
PNV	pozitivna napovedna vrednost
ZPČ	zaviralec protonske črpalke

1. UVOD

Že od rojstva smo ljudje izpostavljeni široki paleti različnih mikroorganizmov, ki kolonizirajo zunanje in notranje površine telesa ter posledično vplivajo na izoblikovanje našega imunskega sistema. Gastrointestinalni trakt je eden od najbolj gosto z mikroorganizmi naseljen predel v človeškem telesu in ima zato najpomembnejšo vlogo pri izoblikovanju imunskega odziva. Če pride do porušenja mikrobne populacije, lahko pride do pojava bolezni, obratno pa bi lahko bil ustrezen pristop za zmanjšanje bolezenskih procesov vzpostavitve ustrezne mikrobiotske populacije (1, 2).

Kljub kislemu okolju je želodec dom raznoliki mikrobiološki populaciji, katere sestava in funkcija se lahko spreminjata glede na gastrično okolje. Najpoglavitejši predstavnik gastrične mikrobiote je *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), ki lahko brez antibiotičnega zdravljenja doživljenjsko perzistira v gastričnem tkivu (1). Okužba s *H. pylori* spremlja človeštvo skozi njegov celoten razvoj in nastanek ter že vsaj 58.000 let predstavlja najpogostejšo okužbo pri ljudeh; okužena je najmanj polovica človeštva (3, 4, 5, 6). Značilno je, da se okužba s *H. pylori* zgodi v zgodnjem otroštvu, do 10 leta starosti, zato razlika v prekuženosti med starostnimi skupinami ne pomeni, da se s starostjo prekuženost povečuje, ampak predstavlja generacijsko značilnost, ki je odraz socialno-ekonomskih pogojev, bivalnega standarda in osebne higiene v obdobju otroštva posamezne generacije (2, 3, 7). Zaradi višanja higienskih standardov in dostopnosti antibiotičnega zdravljenja se prekuženost s *H. pylori* v razvitih in manj razvitih deželah zmanjšuje (1, 7, 5). Kljub temu, da gre za visoko prenosljivo okužbo, katere bolezni imajo lahko visoko umrljivost, zdravstvene organizacije še niso vzpostavile meril (npr. presejalne teste za določene starostne skupine ljudi) za zmanjševanje okužbe s *H. pylori* in njenega razširjanja (8).

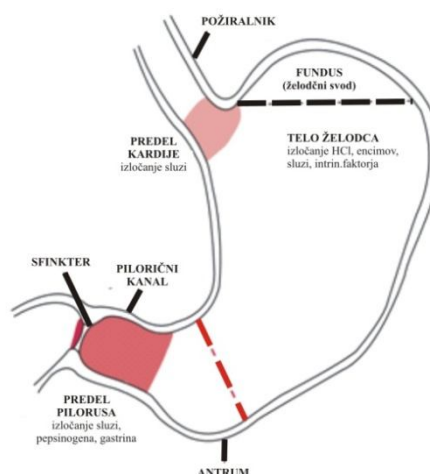
1.1 ANATOMIJA IN FIZIOLOGIJA ŽELODCA

Želodec (gr.*gaster*, lat.*ventriculus*) je eden izmed organov prebavnega trakta in leži med požiralnikom in dvanajstnikom levo v trebušni votlini. Ima obliko črke J, vendar se lahko oblika in velikost močno spreminjata glede na vsebnost hrane in lego telesa, od 200 – 300 mL v praznem do 1 – 1,5 L v polnem stanju. Želodec sodeluje pri prebavi hrane tako, da hrano pomeša z želodčnim sokom, kar omogoči razgradnjo beljakovin na manjše peptidne

molekule in pripravo hrane za nadaljnjo prebavo in absorpcijo v črevesju. Prav tako lahko želodec deluje kot skladišče hrane (oz. himusa) dokler ni črevesje prazno oziroma pripravljeno na prebavo (5 , 9).

Želodec je mišičast, votel razširjen del prebavne cevi na katerem ločujemo malo in veliko želodčno krivino. Želodec anatomsko delimo na 5 odsekov, ki imajo različno zgradbo ter funkcijo v želodčni prebavi (5 , 9):

Zgornji del imenujemo kardia, ki ločuje požiralnik in telo želodca, ob katerem je spodnji ezofagalni sfinkter, ki preprečuje vračanje želodčne vsebine nazaj v požiralnik. Fundus (želodčni svod) leži višje od kardije, korpus (telo želodca) je največji, osrednji del želodca, antrum je najnižje ležeči del želodca, ki se na spodnjem delu zaključuje s pilorusom (gr. vratar), ki je močan sfinkter in ločuje želodec z dvanajstnikom ter nadzira prehod primerne količine himusa iz želodca v dvanajstnik (5 , 10).



Slika 1: Shematični prikaz želodca s poglobljenimi anatomskimi predeli (povzeto po (10)).

Histološko stena želodca sestoji iz štirih plasti (5 , 9):

-želodčne sluznice (*Tunica mucosa gastrica*) z epitelijskimi celicami in vezivnim tkivom (*lamina propia*) ter tanko plastjo gladkomišičnih celic (*muscularis mucosae*). Lamina propia obdaja žleze, ki se ugrezajo navzdol do mišične plasti. Visokoprizmatški epitel sestavljajo površinske mukusne celice in ima življenjsko dobo en teden.

-podsluznične plasti (*Tunica submucosa gastrica*), kjer se nahaja Meissnerjev pleksus ter sestoji iz vezivnega tkiva, številnih kapilar, ven in mezgovnic. Ločuje sluznico od mišične plasti želodca. Tu se nahajajo skupki limfocitov, ki sestavljajo MALT (mucosal associated lymphoid tissue) in mastociti. Ko je želodec prazen sta sluznična in podsluznična plast nabrani v vzdolžne gube, ko se pa želodec napolni, se gube zravnavajo.

-mišične plasti (*Tunica muscularis gastrica*) iz gladkega mišičnega tkiva, ki je značilno samo za želodec in je oblikovano v treh plasteh: notranja poševna, srednja krožna ter zunanja vzdolžna mišična plast. Med zunanjo in srednjo plastjo se nahaja mienterični pleksus (oz. t.i. Auerbachov pleksus), ki je odgovoren za oživčenje obeh mišičnih plasti in s tem tvori peristaltiko in mešanje želodčne vsebine;

-serozne – vezivne mreže (*Tunica serosa*), ki prekriva želodec znotraj trebušne votline.

Žleze z notranjim in zunanjim izločanjem se nahajajo na različnih predelih želodca in jih zato ločimo po imenu na razvejane in zvižugane žleze kardie, pilorične žleze in žleze fundusa (oksidacijske žleze), ki zajemajo pretežni del kislino-producirajočega dela želodca. Celice, ki sestavljajo žleze, so epitelne, sluznične, parietalne, pepsinske in enteroendokrine. Epitelne celice so specializirane in se med seboj razlikujejo glede na predel želodca, kjer se nahajajo. Apikalna membrana epitelnih celic ima številne mikrovile, ki povečajo funkcionalno površino želodca. Mukusne celice, ki proizvajajo sluz in bikarbonat, se nahajajo na površini vseh želodčnih žlez. Največ jih je v predelu antruma in fundusa. Parietalne celice se nahajajo le v žlezah fundusa in korpusa želodca ter izločajo želodčno kislino, intrinzični faktor in leptin. Na svoji apikalni površini imajo mikrovile, v notranjosti pa številne mitohondrije in tubulovezikularni sistem s protonsko črpalko. Glavne (pepsinske) celice, ki izločajo pepsinogen I in gastrično lipazo, se nahajajo izključno v fundusu želodca. Enteroendokrine (APUD) celice se nahajajo v žlezah fundusa, kardije ter pilorusa ter izločajo gastrin (celice G), histamin (celice ECL), endorfin, serotonin (celice EC), holecistokinin in somatostatin (celice D) (5 , 9).

Sluz ščiti želodčno tkivo pred mehanskimi in kemičnimi poškodbami, saj vsebuje karbonat, ki nevtralizira klorovodikovo kislino tik na površini celic. Izloča se neprekinjeno zaradi mehanskih, kemičnih in nevrogenih dražljajev. Sluz je razporejena v dveh slojih – v topni obliki, ki meji na svetlino želodca, ter v netopni obliki, ki pokriva sluznico. Pepsin nenehno razgrajuje sluz, vendar je netopen sloj sluzi neprepusten za pepsin in so sluznične celice zaščitene pred njegovim proteolitičnim delovanjem. Klorovodikova kislina (HCl) ima baktericidno vlogo ter ustvari ustrezen pH za aktivacijo proteaz, nabreka beljakovine ter pospešuje peristaltiko. HCl se izloča pod vplivom acetilholina (po stimulaciji vagusnega živca), gastrina (iz krvnega obtoka) in histamina (iz tkivnih bazofilcev v lamini propii). Med želodčnimi encimi je najpomembnejši pepsin, ki cepi peptidne vezi v beljakovinah. Izloča se kot neaktivna oblika, pepsinogen, pod vplivom acetilholina, histamina in gastrina. Gastrin se sprošča iz želodčnih G-celic kot odgovor na razširitev antruma ter na prisotnost nepopolnoma prebavljene hrane, medtem ko nizek pH (pod 4) in somatostatin inhibirata njegovo sproščanje. Gastrin sproži sekrecijo HCl in pepsinogena ter povečuje motiliteto želodca. Holecistokinin sintetizirajo I-celice mukoznega epitelija dvanajstnika in deluje predvsem na krčenje žolčnika, upočasnjevanje praznjenja želodca ter

spodbuja izločanje pankreatičnega soka, ki nevtralizira himus, ki pride iz želodca v dvanajstnik (5 , 9).

Uravnavanje izločanja želodčnega soka je vzajemen in medsebojno odvisen proces, v katerem sodelujejo mehanizmi, ki se sprožijo po centralni – cefalični (t.j. impulzi iz centralnega živčnega sistema) ali periferni – gastični in intestinalni stimulaciji. Ne glede na mesto nastanka impulza se vedno tvorijo spodbujevalci izločanja želodčnega soka (histamin, gastrin in acetilholin) ter zaviralec somatostatin (5).

Bolus prežvečene hrane pride v želodec skozi požiralnik preko spodnjega ezofagalnega sfinktra, kjer se pomeša z želodčnim sokom, ki vsebuje sluz, klorovodikovo kislino (HCl), nekatere encime in vodo. Hrana se meša z želodčnim sokom in hkrati melje zaradi peristaltičnega gibanja, ki ga omogočajo mišice v steni želodca. S tem se bolusu hrane zmanjša volumen in nastane himus – delno prebavljena hrana. Himus postopoma prehaja preko pilorusa v dvanajstnik, kjer se prebava nadaljuje in začne se absorpcija hranil. Deloma absorpcija poteka tudi v želodcu; iz želodca v krvni obtok se lahko prenesejo manjše molekule kot so voda, aminokislina, do 20% zaužitega etanola, kofein, v vodi topni vitamini ter vodotopne molekule zdravil (npr. acetilsalicilna kislina). Zaradi elastičnosti stene želodca se lahko v želodcu nahaja naenkrat 1 liter hrane, ki se, glede na količino vsebine, prebavi v času med 40 min do nekaj ur (5 , 9).

1.2. BOLEZNI ŽELODCA POVEZANE Z OKUŽBO S *H. PYLORI*

1.2.1. GASTRITIS

Gastritis je vnetje želodčne sluznice. Njegov potek je lahko akuten ali kroničen. Značilna je poškodba epiteljskih celic in regeneracija, ki jo vidimo s histološkim pregledom odvzetega biopsičnega vzorca (5).

- **AKUTNI GASTRITIS**

Pojavi se kot akutna bolečina v žlički, ki jo lahko spremlja bruhanje, slabo počutje in zmanjšan apetit. Sluznica želodca je otekla, lahko se pojavijo tudi erozije in krvavite v sluznici. Izzovejo ga lahko različni dejavniki, kot so okužba s *H. pylori*, začinjena hrana, alkohol, nekatera zdravila (npr. nesteroidna protivnetna zdravila), vroča hrana ali tekočine, obsevanje, bakterijske infekcije (npr. pri sepsi ali zastrupitvi s stafilokoki v hrani). Zdravljenje je simptomatsko: post, antacidi, eradikacija v primeru okužbe (5).

- **KRONIČNI GASTRITIS**

Gre za kronično vnetje, ki ga spremlja propadanje žleznega epitelija in nadomeščanje le-tega z metaplastičnimi celicami. Potek je večkrat asimptomatski ali z blažjimi simptomi (zmanjšan apetit, slabost in bruhanje). Infiltracije limfocitov in plazmatk v zgornjih plasteh sluznice so prisotne pri kroničnemu površinskemu gastritisu, medtem ko so infiltracije limfocitov v globljih plasteh sluznice prisotne pri atrofičnem gastritisu, ko lahko pride tudi do uničenja parietalnih in glavnih celic ali celo do uničenja specifičnih žlez korpusne sluznice (gre za t.i. atrofijo želodčne sluznice) in posledično do nezmožnosti proizvodnje želodčne kisline. Glede na vzrok nastanka poznamo avtoimuni, bakterijski, kemično-toksični, limfocitni, granulomatozni in eozinofilni gastritis (5).

Avtoimuni gastritis je redko kronično vnetje želodčne sluznice, kjer so prisotna protitelesa proti protonski črpalki parietalnih celic in intrinzičnemu faktorju. Kemično-toksični gastritis nastane pri duodeno-gastričnem refluksu zaradi agresivnega delovanja HCl na nezaščiteno sluznico ali zaradi nesteroidnih antirevmatikov. Granulomatozni gastritis se lahko pojavi pri Chronovi bolezni, sarkoidozi, tuberkulozi, sifilisu in histoplazmozi, medtem ko se eozinofilni gastritis pojavi ob malabsorpcijskem sindromu (5).

Z okužbo s *H. pylori* sta povezana bakterijski in limfocitni gastritis. Bakterijski gastritis prizadene predvsem predel antruma. Neznačilne dispeptične težave, ki se pojavijo, lahko začasno tudi izzvenijo, lahko pa se v 15-20 letih razvijejo kronične atrofične spremembe. Zdravljenje je ciljano s kombinacijo antibiotikov in zaviralcev protonske črpalke (ZPČ). Limfocitni gastritis se kaže z značilnimi varioliformnimi erozijami v sluznici korpusa. Povezujejo ga tudi s celiakijo (5).

1.2.2. PEPTIČNA RAZJEDA – ULKUS

Peptična razjeda je najpogostejša bolezen prebavil. Po definiciji je to omejena poškodba stene votlega dela prebavil, ki sega globlje od mišične plasti. Gre za kronično in ponavljajočo se bolezen, ki se najpogosteje pojavi na dvanajstniku, redkeje v želodcu ali požiralniku (ob refluksu želodčne vsebine v požiralnik). Do razjede pride, če se poruši ravnotežje med agresivnimi in zaščitnimi dejavniki želodca v prid agresivnih dejavnikov. Med slednje prištevamo želodčno kislino in pepsin, trombocitni aktivirajoči faktor ter soli žolčnih kislin in lizolecitin, če prideta z refluksom v želodec. Zunanji agresivni dejavniki so nesteroidna protivnetna zdravila, acetilsalicilna kislina, citostatiki, etanol, kajenje ter prisotnost *H. pylori* in stresni dejavniki. Obrambno funkcijo imajo sluz, bikarbonatni ioni,

ki jih izločajo mukusne celice, ter tesno prilegajoče se epiteljske celice, ki onemogočijo redifuzijo vodikovih ionov (5 , 10).

- **RAZJEDA NA ŽELODCU**

Nastane zaradi zmanjšane obrambne sposobnosti želodčnih mehanizmov: slabše prekrvavljenosti želodčne sluznice, počasnejše obnove epiteljskih celic, motene tvorbe sluzi, zmanjšane tvorbe prostaglandinov in motene želodčne motilitete. Bolečina se običajno pojavi kmalu po jedi, zato se bolniki izogibajo hrani in hujšajo. V primeru, ko gre za hkratno razjedo v želodcu in v dvanajstniku, ki nastane zaradi poškodb v piloričnem delu želodca, so lahko znaki podobni kot pri razjedi dvanajstnika (5).

- **RAZJEDA NA DVANAJSTNIKU**

Je 2-3-krat bolj pogosta od razjede v želodcu. Zanj pogosteje zbole vajo moški, 4-krat pogosteje kot ženske, pogosteje se pojavlja tudi med sorodnikih v prvem kolenu. Klinično se kaže s pekočo in glodajočo epigastrično bolečino, ki se pojavi značilno 1 do 2 uri po obroku; izzveni po jedi ali po zaužitju antacidov. Pogosto se pojavlja sezonsko, spomladi in jeseni, lahko traja od nekaj dni do več tednov. Bolečina pod desnim rebrnim lokom in v ledjih, ki ne popušča, lahko kaže na komplikacije, t.j. na penetracijo razjede v trebušno votlino, perforacije ali krvavitve. Ker se razjeda celi z brazgotinjenjem, lahko pride do stenoze, t.j. do zaprtja prehoda skozi pilorus, kar se kaže z bruhanjem vsakršne zaužite vsebine brez slabosti. Z endoskopskim pregledom se predvsem izključi prisotnost dodatnih sprememb želodčne sluznice in potrdi prisotnost okužbe s *H. pylori*. Običajno razjedo na dvanajstniku spremlja antralni gastritis zaradi infekcije s *H. pylori*, lahko pa se pojavi kot posledica zelo velike količine HCl pri določenih boleznih; zaradi nesteroidnih protivnetnih zdravil pa se lahko pojavi bulbus dvanajstnika (5).

1.2.3. NEOPLAZME ŽELODCA

So pogoste bolezni želodca, ki imajo lahko maligni ali benigni potek. Njihova opredelitev poteka vedno s pomočjo gastrokopskih pregledov.

Med benigne tvorbe prištevamo polipe želodca, ki so lahko asimptomatski, vendar njihova prisotnost lahko kaže na povečano nagnjenje sluznice k nekontrolirani proliferaciji. Zdravljenje s kirurško odstranitvijo je nujno pri neoplastičnih spremembah (5).

- **MALIGNI TUMORJI**

Se pogosto razvijejo iz prekanceroznih stanj brez specifičnih klinični znakov, s slabostjo, bruhanjem in epigastrično bolečino ali občutkom teže v žlički. Pri zgodnjem želodčnem raku je rakasto tkivo omejeno na mukozo in submukozo. Lahko raste solitarno,

najpogosteje v spodnji tretjini želodca, ali pa multiplo na različnih delih želodca hkrati. Napredovali želodčni rak označuje prodor rasti raka v globlje plasti želodčne stene. Histološko je viden kot gomoljasta tvorba, ki moli v lumen želodca in lahko ovira pasažo himusa. Najslabšo prognozo ima infiltrativna oblika želodčnega raka, kjer se maligni proces širi difuzno in se želodec spremeni v zoženo, togo cev. Želodčni rak se lahko razširi na sosednja tkiva in organe ter metastazira v regionalne bezgavke. Klinični znaki so odvisni od obsega in lokalizacije raka (5).

1.2.4. FUNKCIONALNE BOLEZNI ŽELODCA

Funkcionalno lahko želodec izloča povečano ali zmanjšano količino želodčnega soka.

- **HIPERSEKRECIJA**

Dnevna količina želodčnega soka lahko naraste tudi do 15 litrov. Primarni vzrok je povečano izločanje gastrina ali histamina zaradi pomanjkanja zaviralnih mehanizmov. Želodčno hipersekrecijo ima 30 – 50 odstotkov bolnikov z razjedo na dvanajstniku, vendar po eradikaciji *H. pylori* izzveni. V primeru, da volumen izločenega želodčnega soka preraste puferno sposobnost duodenalnega in pankreatičnega puferskega sistema, pride do poškodbe sluznice dvanajstnika ter do zmanjšane absorpcije maščob in disaharidov (5).

- **HIPOSEKRECIJA - AKLORHIDRIJA**

Nastane kot posledica številnih bolezni ali po operacijah in uživanju zdravil. Zaradi zmanjšanega baktericidnega delovanja želodčne kisline grozi razrast *H. pylori* in malabsorpcija (5).

1.2.5. MOTILITETNE MOTNJE ŽELODCA

Motiliteto prebavne cevi omogoča gladka muskulatura v steni prebavne cevi, ki je pod nevrohormonalno regulacijo. Z motiliteto mora biti usklajena tudi sekrecija prebavnih sokov vzdolž celotne prebavne cevi, tako da je omogočena prebava in absorpcija hranil. Okvare fizioloških procesov želodca lahko nastanejo kot posledica prizadetosti živčevja ali mišic v steni želodca ali hormonalnega nadzora. Retropulzija (obrnjena smer peristaltike) se lahko kaže z bruhanjem in zgago, pospešen prehod kot dumping sindrom ali driska, zapozneli prehod pa kot gastropareza ali zaprtje. Ob motnjah motilitete se svetuje večje število manjših obrokov ter simptomatsko zdravljenje in zdravljenje primarne motnje oz. vzroka (5).

- **DISPEPSIJA**

Pomeni slaba ali boleča prebava in se kaže najpogosteje po jedi z motnjo shranjevanja himusa v želodcu ali s hitrim ali prepočasnim praznjenjem želodca. Običajno so prisotni občutek hitre sitosti, napihnenosti, spahovanje po jedi in slabost. Dispepsija se lahko pojavi tudi ob infekciji s *H. pylori* in kroničnim gastritisom. Neulkusno in ulkusno dispepsijo spremlja pekoča bolečina v žlički, ki se odpravi s hrano oziroma antacidi (5).

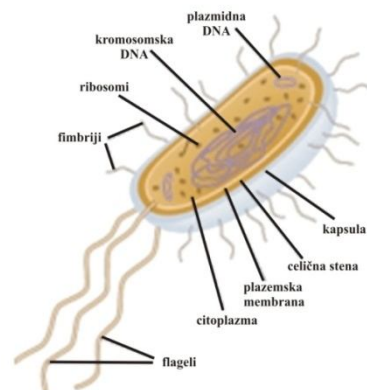
1.3. *HELICOBACTER PYLORI*

Odkritje bakterije *H. pylori* sega v leto 1979, ko sta Avstralca Barry Marshall in Robin Warren ugotovila prisotnost neznane vijačne bakterije pri bolnikih z želodčno razjedo in gastritisom. O njej sta poročala leta 1983 pod imenom *Campylobacter pyloridis* in 2005 za to odkritje dobila Nobelovo nagrado. S tem odkritjem se je za področje gastroenterologije začela nova doba, saj do takrat še ni bilo znanega vzroka številnih bolezni želodca in dvanajstnika. Ime bakterije se je kasneje spremenilo v *Helicobacter pylori*, glede na njene značilnosti (2 , 5 , 11).

H. pylori je po Gramu negativna bakterija. Najdemo jo predvsem v zgornjih prebavilih, v antrumu želodca in v dvanajstniku v predelih z gastrično metaplazijo. Pojavi se pri kroničnem in akutnem gastritisu, peptičnimi razjedami in pri funkcionalni dispepsiji. Bakterija je pripeta na celice sluznice, v celice ne vstopa, vendar ima možnost prenosa vsebine iz svoje celice v gostiteljevo (2 , 5 , 11).

Helicobacter pylori je edina predstavnica družine *Helicobacter* (s poznanimi vsaj 28 različnimi sevi), ki je prilagojena za življenje v želodcu. Je spiralna, mikroaerofilna bakterija z 2-7 polarno ležečimi bički in meri od 3 do 5 x 0,5 μm (2 , 5 , 11).

Glavni prilagoditveni sistem *H. pylori* predstavlja encim ureaza, ki s pomočjo prisotne klorovodikove kisline v želodčnem soku cepi sečnino in tako ustvari primerno okolje z ustreznim pH za življenje v želodcu. Poleg ureazne aktivnosti vsebuje katalazo, ki je



Slika 2: Shematični prikaz strukture celice *H. pylori* (povzeto po Alila Medical Media)

močan antioksidant in razgradi proste kisikove radikale, ki se sproščajo ob prisotnosti nevtrofilnih levkocitov ob nastanku vnetja v želodčni sluznici. Gibanje *H. pylori* skozi mukus omogočijo spiralna oblika z bički ter proteaze, ki cepijo beljakovine v mukusu na površini epitelnih celic želodca (12). Bakterije z genskim zapisom za CagA protein (s citotoksinom povezani gen A) sodijo med najbolj virulentne oblike *H. pylori*; VacA citotoksin (vakuolizirjoči citotoksin A) se tvori le, če ima celica zapis za cagA in tvori pore tako v membrani celic kot tudi v membrani mitohondrijev in tako poruši integriteto medceličnih stikov, močno inhibira aktivacijo T celic, r lahko pa tudi aktivira apoptozo celic (13). Prisotnost cagA pri *H. pylori* v Evropi je ocenjena na 70% (14). *H. pylori* ima na svoji površini lipopolisaharidne antigene, ki so podobni antigenom krvnih skupin s katerimi se poskuša izogniti telesnemu imunskemu nadzoru (15). Bakterija se lahko pripne na epiteljske celice želodca s pomočjo adhezinov in lahko prodre v medcelične prostore (2, 6, 16).

Okužba s *H. pylori* lahko poteka popolnoma asimptomatsko, lahko pa ima različne posledice, ki so odvisne od posameznikovega imunskega odziva na bakterije, od starosti gostitelja, vplivov okolja na virulenco bakterije ter od seva, ki je okužil gostitelja (1, 5). Okužbo s *H. pylori* lahko spremlja vnetje z okvaro epiteljskih celic ter sistemski imunski odgovor z nastankom protiteles proti bakteriji ter celo razvojem avtoprotiteles proti parietalnim celicam. Okužba na začetku poteka akutno, v nekaj dneh pa preide v nevtrofilni pangastritis in prehodno aklorhidrijo, ki traja od 50 do 250 dni. V nadaljevanju okužbe se lahko bakterija razporedi po vsem želodcu in povzroči blagi pangastritis, kjer bolniki nimajo težav (t.j. prva pot). Če se bakterija razširi predvsem v antralnem delu, se zniža izločanje somatostatina in posledično nastane hipersekrecija. Tretja pot razvoja okužbe sledi po razrastu *H. pylori* v korpusu, kjer se zniža izločanje HCl ter nastanejo želodčne razjede (5).

Zaradi okužbe s *H. pylori* se lahko razvijejo gastritis ter razjede želodca in dvanajstnika; pri 20% okuženih pa se pojavi želodčni rak ali MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) limfom z visoko stopnjo umrljivosti. Zato je zgodnje odkrivanje in zdravljenje okužbe s *H. pylori* zelo pomembno (1, 5, 6).

Kljub temu, da velja *H. pylori* za patogeno bakterijo, so se pojavile študije, ki nakazujejo pozitiven vpliv okuženosti s *H. pylori* proti gastroesofagalni refluksni bolezni (GERD),

esofagalnemu raku, nekaterim alergijam (8), na preprečevanje zgodnjega pojava astme ter gastrointestinalnih in sistemskih okužb (1).

1.4. DIAGNOSTIKA OKUŽBE S *H. PYLORI*

Okužbo s *H. pylori* lahko diagnosticiramo z invazivnimi metodami, ki zahtevajo endoskopijo in biopsijo, ter z neinvazivnimi metodami. Izbira testa je odvisna od klinične slike, razpoložljivosti testov ter od stroškov testiranja. Že na primarni zdravstveni ravni se priporoča uporaba neinvazivnih metod, predvsem dihalnega testa s sečnino ali določitev antigena *H. pylori* v blatu, saj so ti testi relativno poceni ter zanesljivi v smislu občutljivosti in specifičnosti. Invazivne metode izvaja izključno specialist gastroenterolog in se uporabijo v primerih, če so prisotne krvavitve iz želodca, izguba teže, pri starejših pacientih z dispepsijo, pri bolnikih, kjer je večja verjetnost za rakave spremembe želodca, ter pri pacientih, pri katerih eradikacijska terapija ni bila uspešna in je potrebna izbira terapije po antibiogramu, oziroma če se diagnoza postavlja prvič. Trenutno noben od testov ne pokaže neposredno stopnjo kolonizacije *H. pylori* v želodcu, zato se, če je mogoče, priporoča uporaba kombinacije vsaj dveh testov (14 , 17).

Uspeh zdravljenja je potrebno preveriti mesec ali več po zaključenem zdravljenju. Pred tem bolnik en mesec ne sme jemati antibiotikov, 14 dni pred tem pa ne ZPČ. Kot najboljšo metodo ugotavljanja uspeha zdravljenja se svetuje dihalni test s sečnino (18), razen v primerih z razjedo želodca in MALT limfomom, ko je potrebna endoskopska kontrola s histološko analizo biopta (11 , 18).

1.4.1. NEINVAZIVNE DIAGNOSTIČNE METODE

To so metode, ki niso povezane z endoskopijo zgornjih prebavil in so zato bolnikom prijaznejše (14). Delimo jih na direktne, kjer neposredno določamo *H. pylori* oziroma bakterijske antigene, in na indirektne, kjer merimo metabolit ali beljakovino, ki nastane kot odziv telesa na prisotnost *H. pylori* (5 , 10 , 19).

- **SEROLOŠKE PREISKAVE:**

So bile prve neinvazivne tehnike za določitev specifičnih protiteles proti *H. pylori*. Prednost seroloških preiskav je v njihovi preprosti in hitri izvedbi ter nizki ceni. Določanje specifičnih protiteles IgG in IgA v serumu ne pokaže, ali gre za trenutno ali preteklo okužbo, saj protitelesa vztrajajo v krvi dlje časa. V primeru, da pacient v preteklosti ni

prejemal antibiotične terapije, lahko ob prisotnosti imunoglobulinov sklepamo, da gre za persistentno okužbo (19). Njihova koncentracija se običajno po uspešnem zdravljenju zmanjša (20). Največ se uporabljajo pri epidemioloških raziskavah in pri presejanju bolnikov z dispeptičnimi težavami, vendar se zaradi nizke natančnosti testov za določitev serumskih *H. pylori* IgG in IgA protiteles njihova uporaba v klinično-laboratorijski diagnostiki opušča (14). Novost na tržišču predstavlja pojem multipleksne serološke preiskave, kjer se uvajajo novi, občutljivejši in specifični serološki testi za določitev protiteles proti CagA, VacA in helikobacterskega s cisteinom bogatega proteina C (HcpC) (14 , 21). Uporabnost pepsinogena I in pepsinogena II ter gastrina 17 pri opredelitvi atrofičnih sprememb želodca zaradi okužbe s *H. pylori* še ni potrjena, saj je njihova koncentracija odvisna od starosti in spola okuženega ter od stanja okužbe (17 , 21).

- **DIHALNI TEST S SEČNINO:**

Določa se ureazna aktivnost *H. pylori* tako, da se meri količina izotopsko označenega CO₂ (¹³C ali ¹⁴C) v izdihanem zraku, ki nastane pri encimski razgradnji z izotopom označene sečnine. Dihalni test s sečnino se uporablja za odkrivanje okužbe s *H. pylori* in za ocenjevanje uspešnosti zdravljenja okužbe. Za ¹⁴C-dihalni test s sečnino je potrebna relativno dostopna oprema (scintilograf), vendar se zaradi radioaktivnosti izotopa ¹⁴C njegova uporaba ne priporoča pri otrocih in nosečnicah. ¹³C je neradioaktiven izotop ogljika in zato varnejši za uporabo v klinično-biokemijski diagnostiki, vendar je za njegovo detekcijo potreben masni spektrofotometer, kar omejuje uporabo tega testa na raziskovalne centre in laboratorije s terciarne zdravstvene ravni (14). Zanesljivost dihalnega testa se poveča z dodatkom citronske kisline pred aplikacijo vsaj 75 mg ¹³C-sečnine in z merjenjem izdihanega zraka ne prej kot po 15 minutah po vnosu reagenta sečnine (17 , 19 , 21).

- **DOKAZOVANJE *H. PYLORI* V BLATU:**

Je ena izmed novejših diagnostičnih metod za določitev specifičnih antigenov, ki se po okužbi s *H. pylori* pojavijo v blatu. V testih se uporabljajo ali poliklonska ali monoklonska protitelesa proti *H. pylori* (14), ki se po vezavi z antigenom določijo z encimsko-immunsko metodo (EIA) ali z imuno-kromatografsko metodo. Monoklonska protitelesa uporabljajo novejši testi in so usmerjena proti specifičnim delom *H. pylori*, npr. flagelu. Metode določanja antigena v blatu so obetavne, saj so cenovno dostopne ter zagotavljajo visoko specifičnost, občutljivost in natančnost. Evropska študijska skupina za helikobakter (European Helicobacter Study Group) priporoča uporabo teh testov enakovredno z

dihalnim testom s sečnino pri odkrivanju okužbe, medtem ko je za spremljanje uspešnosti eradikacije njihova uporaba možna kot nadomestna metoda (17 , 22).

- **DOKAZOVANJE *H. PYLORI* V SLINI:**

V slini lahko določimo protitelesa proti *H. pylori*, njeno DNA in ureazo s pomočjo molekularnih tehnik (PCR, PCR-denaturacijska gradientna gelska elektroforeza) ter s pomočjo HUT, imunohistokemije in PNA-FISH (fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes). Te preiskave večinoma ne dajejo dobrih rezultatov so pa zanimive zaradi enostavnega odvzema vzorca (17 , 23).

1.4.2. INVAZIVNE DIAGNOSTIČNE METODE

Te metode so vezane na endoskopski pregled zgornjega dela prebavil in imajo prednost, da lahko poleg ugotavljanja okužbe tudi makroskopsko opredelijo okužbo (14). Tehnologija endoskopskega preiskovanja se večinoma poslužuje svetlobne mikroskopije z belo svetlobo, vendar se dandanes uporabljajo novejšje tehnike kot je ozko-pasovno slikanje s povečevalno endoskopijo (narrow band microscopy coupled with magnifying endoscopy), i-scan (image enhanced endoscopy system; slikovno ojačena endoskopija) in kontrastna barvila (22) ter avtofluorescenca, s katerimi se lahko detektira tudi obseg atrofičnih sprememb v želodcu (21). Porazdelitev *H. pylori* na želodčni sluznici je večinoma neenakomerna, zato se priporoča odvzem vsaj dveh bioptičnih vzorcev iz različnih delov želodčnega antruma in korpusa, da se z zanesljivostjo potrdi oziroma zavrže prisotnost okužbe (5 , 14 , 17).

- **HITRI BIOPTIČNI UREAZNI TEST (HUT):**

Temelji na ureazni aktivnosti bakterije *H. pylori* tako kot dihalni test s sečnino. Test je odvisen od števila bakterij v vzorcu, zato je ključno pravilno vzorčenje med gastrokopijo. Lažno negativne rezultate lahko dobimo pri pacientih s krvavitvami v želodcu, z aklorhidrijo ter ob uporabi ZPČ zaradi zvišanja pH v želodcu v okolici bakterije. HUT velja za osnovni test za dokazovanje okužbe s *H. pylori* pri endoskopskih preiskavah zgornjih prebavil, je hiter, visoko občutljiv in specifičen ter poceni (14 , 17).

- **FAZNO-KONTRASTNA MIKROSKOPIJA:**

S pomočjo fazno-kontrastnega mikroskopa se lahko že brez barvanja, takoj po odvzemu bioptičnega vzorca, prepričamo o prisotnosti bakterije na želodčni sluznici.

- **HISTOLOŠKA PREISKAVA BIOPTA:**

Poleg ugotavljanja prisotnosti bakterije omogoča tudi ugotavljanje vrste, stopnje in intenzivnosti bolezenskih sprememb. Občutljivost te metode je odvisna od subjektivne

ocene gastroenterologa glede izbora predela za vzorčenje. Vzorec biopta se lahko obarva po različnih metodah, npr. s hematoksilin-eozinom ali srebrovim nitratom po Warthin-Starryju ali s fuksinom in malahit zelenim po Gimenezu ali po Genti. Največkrat se uporabljata modificirana metoda barvanja po Giemsi ali imunohistokemična metoda, ki velja za zlati standard pri določanju *H. pylori* (14).

- **BAKTERIJSKA KULTURA:**

Omogoča spremljanje rasti bakterije na gojišču (na klasičnih agaroznih ploščah, v krvnem gojišču ali na sintetičnem mediju) (22). To metodo se izkorišča za določanje občutljivosti bakterije za posamezne antibiotike pred uvedbo ciljne terapije po neuspešni antibiotični terapiji. Velja za eno izmed treh metod zlatega standarda, uporablja pa se tudi pri epidemioloških raziskavah (14).

- **MOLEKULARNE TEHNIKE:**

Molekularne tehnike so uporabne predvsem v raziskovalne namene, pri epidemioloških študijah in določanju seva *H. pylori* v izolatih ter za določitev prisotnosti *cagA* in *vacA* gena ter mutacij, ki doprinejo k odpornosti *H. pylori* na antibiotike (7 , 14). Uporabljajo se predvsem verižna reakcija s polimerazo (PCR, polymerase chain reaction), verižna reakcija s polimerazo v realnem času (real-time PCR), fluorescenčna in situ hibridizacija peptida nukleinske kisline (PNA-FISH, peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization), metoda reverzne hibridizacije (reverse hybridisation assay) in molekularno tipizacijske metode. Vzorec je poleg biopta lahko tudi blato, iz katerega se izolira DNA *H. pylori* (21 , 22).

Trenutno ne obstaja idealen test za diagnozo okužbe s *H. pylori*. Splošno velja, da je izbira testa odvisna od kliničnih znakov ter dostopnosti in cene testa. Priporoča se uporaba vsaj dveh različnih testov za odkrivanje okužbe ter enega za opredelitev uspešnosti zdravljenja (7 , 14), vendar Evropska študijska skupina za helikobakter priporoča za začetno diagnozo okužbe s *H. pylori* uporabo ali dihalnega testa s sečnino ali določitev antigenov v blatu (19). Pozornost je potrebna pri interpretaciji rezultatov, saj na večino diagnostičnih metod negativno vplivajo zdravila, ki zatirajo bakterijsko populacijo. Zato velja, da se antibiotike preneha jemati vsaj 4 tedne in ZPČ vsaj 1 teden pred testiranjem (24).

1.5. ZDRAVLJENJE OKUŽBE S *HELICOBACTER PYLORI*

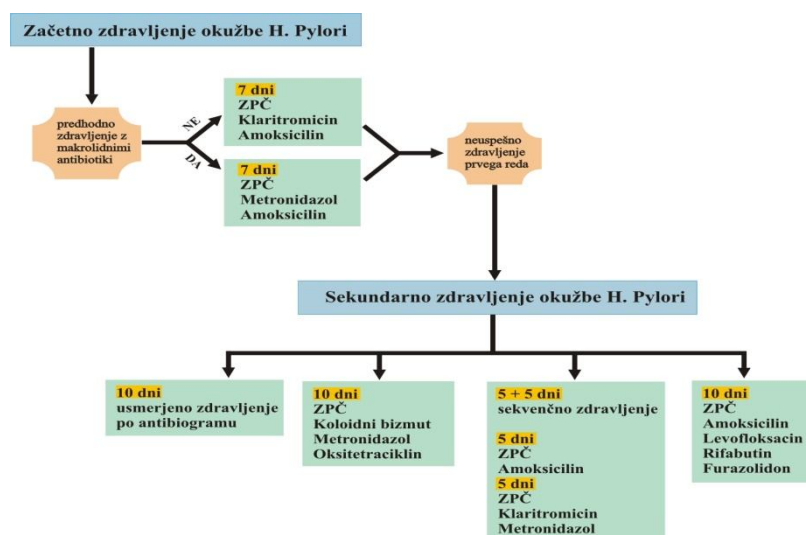
Zdravljenje okužbe *H. pylori* je kompleksno in poteka po priporočenih shemah, ki zajemajo kombinacijo zaviralca protonske črpalke (ZPČ) in antibiotikov. Uspeh zdravljenja z neko antimikrobno shemo je odvisen od rezistence *H. pylori* na antibiotike in sodelovanja bolnika pri zdravljenju ter od njegovega indeksa telesne teže in kajenja (17 , 25).

Prva priporočila za zdravljenje okužbe s *H. pylori* so bila sprejeta 1994 na konferenci Ameriškega nacionalnega zdravstvenega inštituta, vendar so šele od 1996, s sprejemom Maastrichtskih priporočil, v veljavi Evropska priporočila, na katerih so osnovane posamezne nacionalne smernice. Leta 1997 je Slovensko združenje za gastroenterologijo in hepatologijo sprejelo prva priporočila glede zdravljenja okužbe *H. pylori* (11). Druga dopolnjena priporočila so bila sprejeta 2010 zaradi vse večje odpornosti *H. pylori* na antibiotike (26).

Splošna priporočila navajajo kot terapijo prvega reda klasično trotirno terapijo (ZPČ in 2 antibiotika: amoksisicilin in klaritromicin ali metronidazol ali tinidazol), oziroma sekvenčno zdravljenje (ZPČ, amoksisicilin in nato ZPČ, klaritromicin, metronidazol ali tinidazol 10 dni) ali štiriterno zdravljenje (ZPČ, klaritromicin, amoksisicilin, metronidazol 10 dni). V primeru neuspešnega zdravljenja s terapijo prvega reda se kot drugo zdravljenje lahko svetuje štiriterno zdravljenje z bizmutom (ZPČ, koloidni bizmut subcitrat, oksitertraciklin, metronidazol 10 dni) ali zdravljenje po antibiogramu. V primeru, da tudi drugi poizkus zdravljenja ni uspešen, se kot tretjo shemo predlaga trotirno terapijo z levofloksacinom (ZPČ, amoksisicilin, levofloksacin) (17 , 18 , 25 , 27).

Zaradi različne uspešnosti zdravljenja in prisotnosti rezistence na antibiotike še ni dorečeno, katero zdravljenje je idealno. V državah, kjer je rezistenca *H. pylori* na klaritromicin višja kot 15–20 %, se klasična trotirna shema s klaritromicinom naj ne bi več uporabljala oziroma se klaritromicin nadomesti z drugim antibiotikom (metronidazolom). V primeru rezistentnosti na metronidazol več kot 40 %, se njegova uporaba odsvetuje. V primeru alergije na penicilin, pa je potrebno amoksisicilin zamenjati z metronidazolom oziroma klaritromicinom (26). Zato je pomembno, da se v vsaki državi spremlja rezistenca *H. pylori* na antibiotike (18 , 27). V Evropi je ocenjena rezistenca na klaritromicin med 1 in 21,3 %, na metronidazol pa med 14,4 in 38 % (26). V Sloveniji se je rezistenca *H. pylori* na antibiotike v zadnjih desetih letih povečala; leta 1999 je bilo na klaritromicin

rezistentnih 3,7 % in na metronidazol 18,5 % bakterije, medtem ko je leta 2009 že 17,5 % *H. pylori* odpornih na klaritromicin in 18,6 % na metronidazol (26). Po zadnjih objavljenih podatkih za Slovenijo iz leta 2012 je rezistenca *H. pylori* na klaritromicin 16 %, za metronidazol 29 % in za levofloksacin 10 % (18). Zaradi tega je Slovensko združenje za gastroenterologijo in hepatologijo leta 2010 sprejelo nove smernice za zdravljenje okužbe s *H. pylori*, ki so povzete na sliki 3.



Slika 3: Shematični prikaz uporabe shem za zdravljenje okužbe s *H. pylori* v Sloveniji (povzeto po (26)).

Ocenjujejo, da je uspešnost zdravljenja po terapiji prvega izbora med 57 in 80 % (18 , 26), zaradi vse večje rezistence bakterije na antibiotike in (ne)sodelovanja bolnika pri doslednem sledenju terapije (26). Uspešnost zdravljenja je možno izboljšati z zvišanjem odmerka ZPČ (tudi do 6-10 %) ali s podaljšanjem trajanja zdravljenja (za 4 % za 10-dnevno zdravljenje in za 5-6 % za 14-dnevno zdravljenje) (18). Kljub temu se še vedno v Evropi in na Japonskem priporoča 7-dnevno zdravljenje po shemi prvega reda, medtem ko v ZDA priporočajo 10 do 14 dnevno zdravljenje (17). V Italiji uporabljajo sekvenčno zdravljenje kot terapijo prvega izbora, s katero so dosegli uspešnost do 91,3 %, saj je dokazano uspešnejša terapija od klasične trotirne pri rezistenci *H. pylori* na klaritromicin (26).

Kljub uspešni eradikaciji *H. pylori* obstaja še vedno možnost reinfekcije ter razvoj dolgoročnih posledic okužbe (gastritis, ulkus, želodčni rak), zato se dandanes raziskujejo možnosti razvoja cepiva. S cepivom bi se lahko zaščitilo otroke pred 15 letom starosti in se s tem preprečila okužba oziroma tudi pozdravila obstoječa okužba, če je že prisotna. V ta namen se razvijajo cepiva, ki vključujejo ustrezni bakterijski antigen (ureazni antigen ali

CagL protein) in varen sluznični adjuvans, ki sproži nastanek protiteles v sluznici (ogljikohidrat iz toksina Clorele, proteini toplotnega šoka (HSP, heat shock proteins). Za mesto aplikacije takega cepiva se preučuje možnost oralne, sublingvalne ali respiratorne aplikacije (28 , 29). Težave z razvojem cepiv so se pokazale pri proučevanju imunskega odziva otrok, ki je drugačen kot pri odraslih, ter z dokazi, da *H. pylori* cepivo lahko vpliva na učinek drugih cepiv (28).

Poznani pa so tudi poizkusi zdravljenja okužbe s *H. pylori* z uporabo naravnih sestavin z antimikrobnimi lastnostmi oziroma uporabo le-teh kot prehrabni dodatek ob terapiji z antibiotiki. Najuspešnejše delovanje proti-*H. pylori* imata črna kumina (s protivnetnim, antimikrobnim, antikancerogenim ter izrazito antiulceroznim delovanjem) in prunus mume (japonska marelica), ki zmanjša gibljivost bakterije in zato deluje preventivno ter omejuje migracijo in kolonizacijo *H. pylori* v želodcu. Ostali naravni produkti, ki jih je človek uporabljal že v zgodovini pri lajšanju gastrointestinalnih težav, kot so kurkuma, cimet, propolis, brusnice, brokoli in olivno olje, nimajo še jasno določenega mehanizma delovanja in je njihova učinkovitost različna glede na doze in čas jemanja (30). Učinek probiotikov dokazano zmanjša vnetne procese ob okužbi s *H. pylori* ter manjša obseg kolonizacije bakterije ter omili stranske učinke eradikacijske terapije. Zato se priporoča jemanje probiotikov na daljši rok ob težavah pri okužbi ali kot dodatek med eradikacijsko terapijo (25 , 31). Poznani so tudi rastlinski ekstrakti z inhibitornim učinkom na ureazo (česen, čebula, por, brstični ohrovt, sladki koren, kumina itd.) in se preučujejo kot potencialna nadomestna zdravljenja oziroma v preventivi pri razvoju bolezenskih sprememb zaradi okužbe s *H. pylori* (32).

2. NAMEN DELA

Namen naloge je pregled vseh neinvazivnih testov, ki se uporabljajo pri spremljanju bolnikov, okuženih s *H. pylori* in se izvajajo v laboratorijih Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, ter njihova medsebojna primerjava. Pregledali bomo dosedanje ugotovitve v objavljenih študijah, kjer so primerjali posamezne diagnostične teste med seboj, ter preverili, ali se rezultati skladajo tudi v skupini pacientov, ki smo jo proučevali v magistrski nalogi. Kot referenčne bomo uporabili rezultate dihalnega testa s sečnino in hitrega ureaznega testa ter preverili primerljivost, specifičnost in občutljivost določitve antigena *H. pylori* v blatu, antigena v slini in serološke določitve protiteles v krvi.

Na opazovani skupini pacientov bomo poskusili določiti, kateri laboratorijski testi za določitev okužbe s *H. pylori* so najbolj zanesljivi, katera je najboljša metoda za diagnozo okužbe s *H. pylori* oziroma ali je potrebno uporabiti več testov hkrati in opredeliti, katera kombinacija testov nam bo dala ustrezen rezultat.

Na opazovani skupini pacientov bomo preverili tudi katere eradikacijske sheme se uporabljajo pri zdravljenju v Sloveniji, katera je najpogosteje uporabljena ter ali se njihova uporaba sklada s priporočili Slovenskega združenja za gastroenterologijo in hepatologijo (18). Nadalje bomo preverili učinkovitost eradikacije glede na opravljene laboratorijske teste ob kontrolnem pregledu pacienta.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORČENJE IN PRIDOBIVANJE PODATKOV

Zbrali smo rezultate pacientov, ki so bili med leti 2010 in 2012 obravnavani na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in so imeli laboratorijske analize izvedene v laboratorijih Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo. Obravnavo pacientov je odobrila komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje RS št. 120 04/10: Primerjava neinvazivnih metod pri ugotavljanju okužbe s *Helicobacter pylori*; 19. maj 2010.

Vsi pacienti niso bili obravnavani enako, zato pri vseh opazovanih primerih nimamo podatkov za vse laboratorijske teste. Ne glede na to smo vrednotili paciente kot pozitivne glede na priporočila za zlati standard ter glede na rezultate dihalnega testa s sečnino.

Retrospektivno smo pridobili podatke o uporabljeni terapiji in spremljali rezultate laboratorijskih preiskav za opredelitev uspešnosti eradikacijske terapije pri nadaljnjih pregledih.

3.2. UPORABLJENE DIAGNOSTIČNE METODE

Pri našem delu smo opazovali rezultate osmih različnih diagnostičnih testov, ki se uporabljajo v diagnostiki okužbe s *H. pylori*. Hitri ureazni test je edini med opazovanimi, ki se izvede s pridobitvijo vzorca med gastroskopijo, in je v naši nalogi skupaj z rezultati histologije in dihalnega testa s sečnino predstavljal referenčni test. Dihalni test s sečnino je v Sloveniji široko uporabljan pri odkrivanju in spremljanju uspešnosti eradikacije *H. pylori*, vendar je zaradi zahtevne tehnologije in visoke cene težje dostopen laboratorijem na primarni zdravstveni ravni. Določitev antigena v blatu je vse bolj uporabljana metoda z enostavno pridobitvijo biološkega vzorca za analizo. Opazovali smo dva hitra kvalitativna testa in semiavtomatizirani kvalitativni test določitve antigena *H. pylori* v blatu. Določitev ureazne aktivnosti v slini je hiter in enostaven test, vendar se dandanes še ni uveljavil v rutinski laboratorijski diagnostiki. Analiza specifičnih serumskih protiteles je hiter in

enostaven laboratorijski test, vendar se danes njegova uporaba opušča, saj so na tržišču prisotni bolj specifični in občutljivejši testi za spremljanje in določitev okužbe s *H. pylori*.

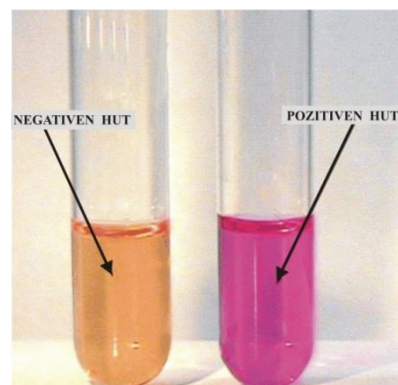
3.2.1. HITRI UREAZNI TEST BIOPTA PO GASTROSKOPIJI

Helicobacter pylori Quick Test proizvajalca BIOHIT OYJ (Finska) je hitri ureazni test za kvantitativno diagnostiko okužbe s *H. pylori*. Temelji na sposobnosti bakterijskega encima ureaze, da razgradi sečnino prisotno v testnem gelu, ob tem pa poraste pH vrednosti medija in posledično se spremeni barva indikatorja fenol rdeče iz rumene v rožnato. Hitrost reakcije je premosorazmerna koncentraciji *H. pylori* v vzorcu (33).

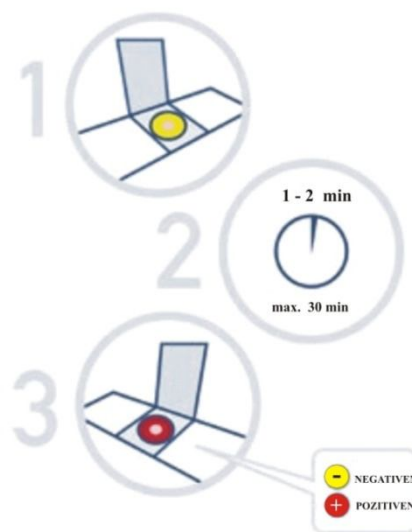
Testni komplet vsebuje 50 že pripravljenih testnih ploščic za analizo in vdolbino z rumenim indikatorskim gelom (33).

Biopsijski vzorec se odvzame iz antruma želodca, vendar se za zagotavljanje večje občutljivosti testa priporoča testiranje več biopsijskih vzorcev. Pred izvedbo testa je potrebno vzorec sluznice nežno obrisati s sterilno gazo, da se odstrani kri, ki bi lahko motila potek reakcije. V vdolbino na ploščici se nanese vzorec sluznice in inkubira 1 do 2 minuti pri sobni temperaturi. Spremembo barve se oceni s pomočjo legende na ploščici: če pride do spremembe barve iz rumene v intenzivno rožnato, je test pozitiven, v nasprotnem primeru nadaljujemo z inkubacijo še 30 minut. Če se tudi v tem času ne razvije rožnata barva, je test negativen. Lažno negativni rezultati se lahko pojavijo, če je bolnik jemal antibiotike ali zaviralce protonske črpalke še 2 do 4 tedne pred izvedbo testa (33).

Proizvajalec navaja, da je specifičnost testa 88 %, občutljivost 94 %, PNV 89% in NNV 93% glede na rezultate histologije in bakterijske kulture pri 120 primerih (33).



Slika 4: Slikovni prikaz pozitivne in negativne reakcije medija za dokaz ureazne aktivnosti biopta.



Slika 5: Shematski prikaz ploščice za HUT (povzeto po (33)).

3.2.2. DIHALNI TEST S SEČNINO

Helicobacter Test INFAI[®] proizvajalca INFAI GmbH (Nemčija) temelji na sposobnosti *H. pylori*, da lahko z encimom ureaza razgrajuje sečnino. Je neinvaziven in neradioaktiven test za odkrivanje infekcij z bakterijo *H. pylori*, saj uporablja reagent sečnine, označen z izotopom ¹³C, in je zato primeren tudi za nosečnice in otroke. Test se praviloma opravlja vsaj 4 tedne po končani eradikacijski terapiji, saj v nasprotnem primeru dobimo lažno negativne rezultate (35 , 34).



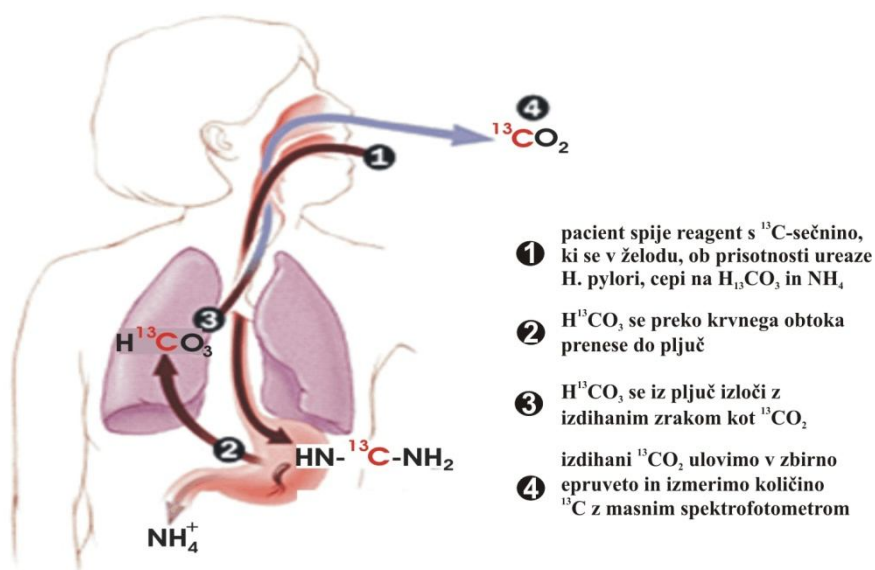
Slika 6: Slikovni prikaz testnega kita Test INFAI[®] (povzeto po (34)).

Pacient mora pred začetkom testa zaužiti 200 mL 100% pomarančnega soka ali 1 g citronske kisline v 200 mL vode, da se upočasni praznjenje želodca, kar poveča kontaktni čas med bakterijo in označeno sečnino ter omogoči optimalno razporeditev reagenta sečnine po želodcu. V vodi raztopimo 75 mg praška sečnine (oziroma 45 mg za otroke med 3 in 11 letom). Pri celotnem postopku vzorčenja je pomembno, da se epruveta z zbirnim izdihanem zrakom zamaši takoj, saj če ostane odprta več kot 30 sekund, bo izid testa lahko napačen. Obvezno je, da pacient vsaj 6 ur ne uživa nobene hrane ter vsaj 4 tedne ne prejema antibiotikov in 2 tedna zaviralcev protonske črpalke. Porast izotopa ¹³C v izdihanem zraku določimo z masnim spektrometrom (IRMS – isotope ratio mass spectrometry). Masni spektrometer mora imeti možnost večkratne ponovitve analize istega vzorca, nastavitev razmerja med ¹³C in ¹²C glede na standard PDB (Pee Dee Belemnite) ter mora ustrezati zahtevam za linearnost ($\leq 0,5 \text{ ‰}$ za vzorce izdihanega zraka v različnih koncentracijah med 1 % in 7 % CO₂), stabilnost ($\leq 0,2 \text{ ‰}$ pri 10 zaporednih pulzih) in natančnost meritev ($\leq 0,3 \text{ ‰}$ pri običajni naravni prisotnosti ¹³C, z uporabo 10 mL epruvete s 3 % CO₂ v izdihanem zraku) (35 , 34).

Označena sečnina se po zaužitju razširi v želodčno sluznico. Ob prisotnosti *H. pylori* se ¹³C-sečnina presnovi z ureazo, ki jo izloča bakterija. Ogljikov dioksid, ki nastane, preide v kri ter se od tu v obliki hidrogenkarbonata prenese v pljuča in sprosti v izdihanem zraku kot ¹³CO₂. Razmerje med ¹³C in ¹²C-ogljikovimi izotopi se znatno spremeni ob prisotnosti *H. pylori*, zato kot rezultat podamo razliko med koncentracijo ¹³C pred in 30 minut po zaužitju testne raztopine. V odsotnosti bakterijske ureaze se bo vsa količina zaužite sečnine

po absorpciji iz prebavil presnovila enako kot endogena sečnina. Amonijak, ki nastane z bakterijsko hidrolizo, se vključi v presnovo v cikel sečnine v obliki NH_4^+ . Normalno je v izdihanem zraku prisoten 1 % ^{13}C glede na celoten izdihan CO_2 . Sečnina s ^{13}C izotopom je telesu znana snov. Količina ^{13}C izotopa v človeškem telesu je približno 2 g/kg, povprečen vnos pa 2-3 g/dan. Zato vnos 100 mg s ^{13}C označene sečnine, ki je ekvivalentna 21 mg ^{13}C izotopa, predstavlja le 1 % dnevnega vnosa ^{13}C izotopa. Prav tako je 100 mg s ^{13}C označene sečnine malo glede na dnevno sintezo sečnine v organizmu, ki je 20-30 g/dan. Sečnina je v takšnih količinah netoksična. Tudi količina amonijaka, ki nastane, je premajhna, da bi povzročala toksične učinke. Tako ^{13}C kot ^{13}C sečnina sta normalno v telesu prisotna v veliko večji količini kot se uporabljata v tem testu. Absorpcija in porazdelitev $^{13}\text{CO}_2$ sta hitrejši od reakcije ureaze, zato je razkroj ^{13}C -sečnine z bakterijsko ureazo stopnja, ki omejuje hitrost celotnega postopka (35 , 34).

Mejna točka za razločevanje na *H. pylori* negativen ali pozitiven test je določena kot $\Delta\delta$ -vrednost 4 ‰ (35 , 34).



Slika 7: Shematski prikaz metabolizma ^{13}C -sečnine pri dihalnem testu s sečnino za dokaz okužbe s *H. pylori*.

Testni komplet Helicobacter Test INFAT[®] vsebuje: 10 mL-kozarček s 75 mg praška s ^{13}C -sečnine, označeni stekleni (ali plastični) epruveti za zbiranje, shranjevanje in prenašanje vzorcev izdihanega zraka za analizo, upogljivo slamico za zbiranje vzorcev izdihanega zraka, spremni list za dokumentacijo bolnika in navodilo za uporabo (35), (34).

Test je visoko občutljiv in specifičen, saj ima ureazno sposobnost v želodcu le *H. pylori*.

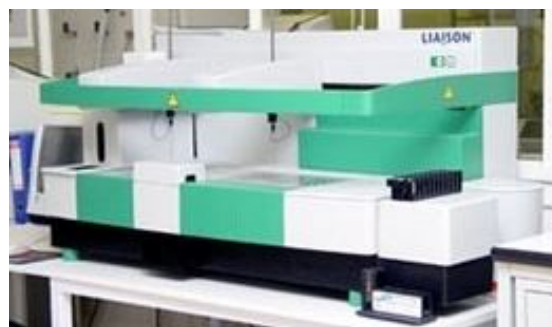
V primerjavi z bioptično diagnostiko okužbe s *H. pylori* je dihalni test v kliničnih preizkušanjih na 457 bolnikih dosegel občutljivost od 96,5 % do 97,9 % (95 % interval zaupanja, IZ: 94,05 % - 99,72 %) in specifičnost od 96,7 % do 100 % (95 % IZ: 94,17 % - 103,63 %) (35 , 34).

3.2.3. KVALITATIVNI TEST DOLOČITVE ANTIGENA *H. PYLORI* V BLATU Z ELISA METODO

Liaison[®] *H. pylori* test proizvajalca DiaSorin (Italija) je kemiluminiscentni test, namenjen za kvalitativno določitev *H. pylori* v človeškem blatu na analizatorju Liaison[®] Analyzers. Test se uporablja pri diagnozi in spremljanju okužbe s *H. pylori*, za njegovo interpretacijo pa je potrebno upoštevati tudi druge klinične in laboratorijske podatke (36).

Gre za modificiran dvostopenjski, dvostranski sendvič test, v katerem so uporabljena monoklonska protitelesa proti *H. pylori*. Vzorec se po odvzemu v primeren vsebnik prenese v epruveto za ekstrakcijo z diluentom. Vzorec blata se lahko shrani do 3 dni pri 2 - 8 °C oziroma pri -20 °C za dlje časa. 200 µL centrifugirane vzorčne mešanice se prenese na analizator, kjer poteče vezava antigena *H. pylori* iz vzorca na lovilna protitelesa, vezana na paramagnetne delce. Po inkubaciji se dodajo z izoluminolom označena protitelesa, usmerjena proti *H. pylori* antigenom iz vzorca. Po drugi

inkubaciji se vsa nevezana protitelesa sperejo, da se zmanjša vpliv motečih substanc. Z dodatkom starter reagenta se sproži kemiluminiscentna reakcija. Nastala svetloba se meri na fotopomnoževalki v relativnih svetlobnih enotah (RLU – relative light units) in je premosorazmerna s koncentracijo *H. pylori* antigena v vzorcu blata. Pred izvedbo analize je potrebno izvesti analizo kontrolnih vzorcev, da se zagotovi ustrezen potek analizne reakcije. Kalibracija testa se izvede vsakič, ko se uporabi novo serijo reagenčnih integralov, ko rezultati kontrolnih vzorcev izpadejo iz priporočenega območja ali po servisnih posegih na analizatorju. Analizator po opravljeni meritvi analize sam izračuna

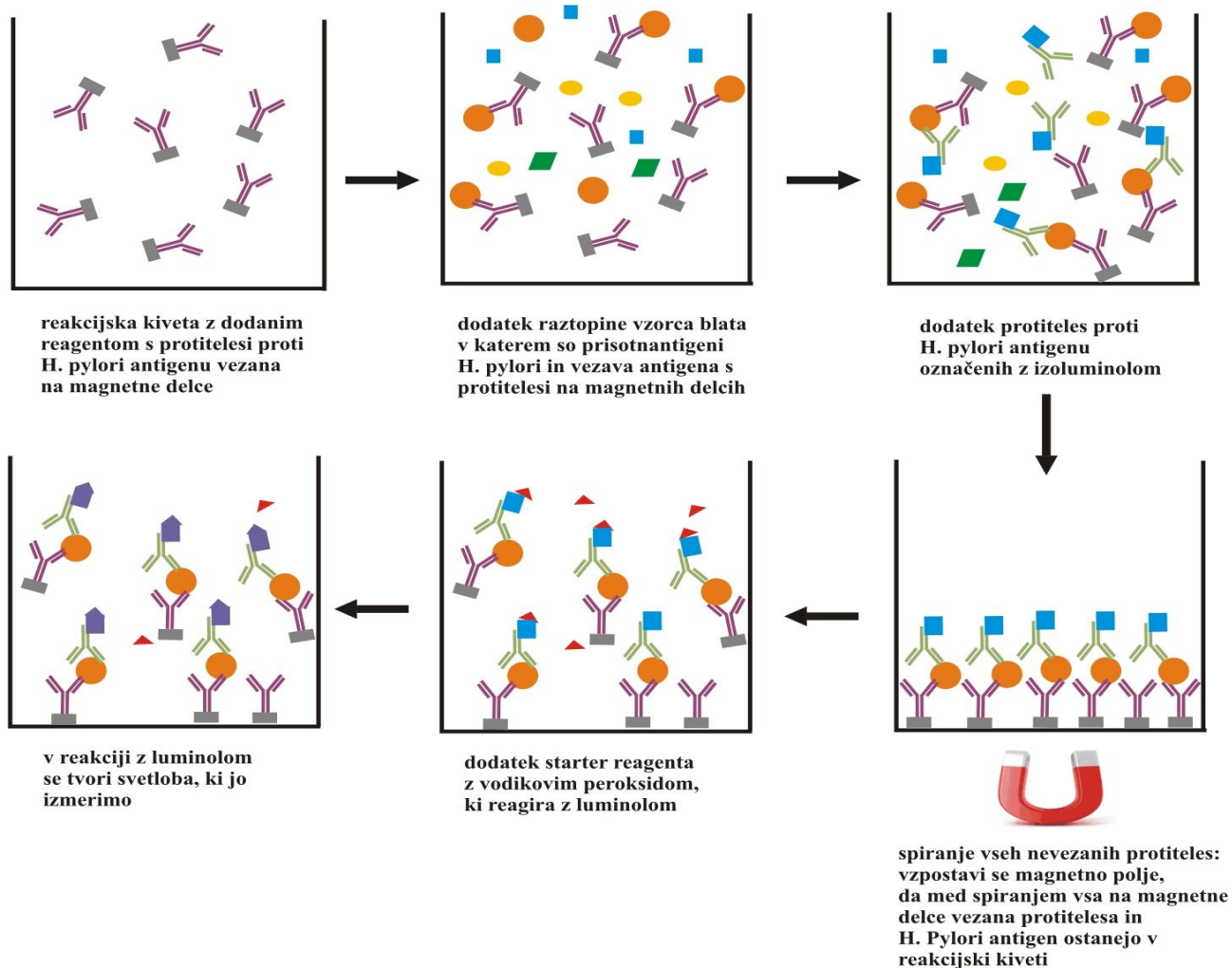


Slika 8: Analizator Liaison[®] (DiaSorin) (povzeto po <http://www.diasorin.com>).



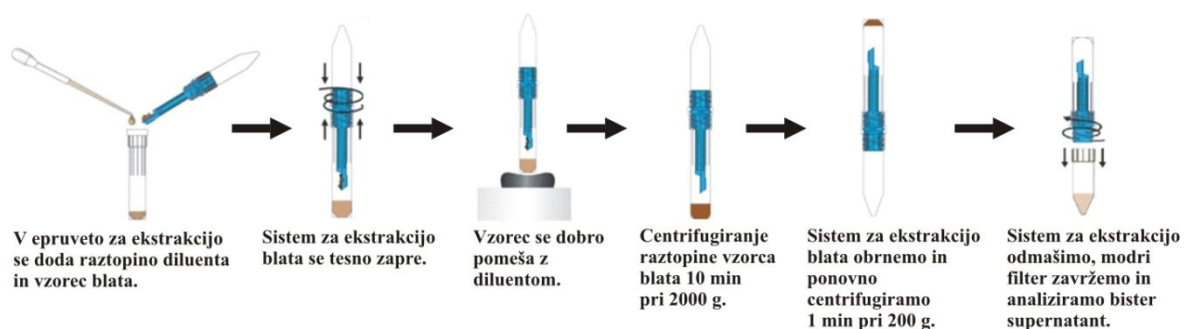
Slika 9: Reagenčni integral, ki vsebuje mešanico magnetnih delcev s protitelesi proti antigenu *H. pylori* (povzeto po <http://www.diasorin.com>).

vrednost rezultata kot indeks. Razmejitvena vrednost med pozitivnim in negativnim rezultatom je 1,0 (vzorcem z vrednostjo indeksa $\geq 1,0$ je s tem testom dokazana prisotnost *H. pylori* antigenov) (36).



Slika 10: Shematski prikaz vezave protiteles in antigena pri določitvi *H. pylori* protiteles v vzorcu blata s *H. pylori* Liaison reagenčnim kitom.

Za izvedbo analize z Liaison[®] *H. pylori* test so potrebni: reagenčni integral z raztopino magnetnih delcev prekritih z monoklonskimi protitelesi proti *H. pylori* antigenu iz blata in konjugatom monoklonskih protiteles z izoluminolom, kalibracijski raztopini, kontrolni vzorci, raztopina za redčenje vzorca blata, Liaison[®] ekstrakcijske epruvete, navodila za delo ter sistemski reagenti za analizo na Liaison[®] analizatorju. Pred uporabo reagenčnega integrala je potrebno magnetne delce resuspendirati z rahlim mešanjem, da se prepreči nastanek pen v reagentu (36).



Slika 11: Priprava vzorca blata z DiaSorin Liaison[®] sistemom za ekstrakcijo blata (povzeto po (36)).

Karakteristike testa je proizvajalec testiral v sklopu 201 italijanskih pacientov, ki so bili endoskopsko pregledani pred in po eradikacijski terapiji. Pred eradikacijo so določili celokupno napovedno vrednost 97,0 % (95 % IZ: 93,6 % - 98,6 %), po eradikaciji pa 96,7 % 895 % IZ: 88,7 % - 99,0 %). Primerjava Liaison[®] *H. pylori* testa z drugim ELISA testom za določitev antigena *H. pylori* v blatu je pokazala celokupno napovedno vrednost 99,7 % (95 % IZ: 99,7 % - 99,9 %). Ponovljivost testa znotraj serije je definirana s 3 % CV (koeficientom variacije) za negativne ter z 2 % CV za pozitivne vzorce znotraj serije oziroma 8 % CV za negativne ter s 4 % CV za pozitivne vzorce, analizirane med serijami (36).

3.2.4. HITRI TEST ZA DOLOČITEV ANTIGENA *H. PYLORI* V BLATU I

Test DIMA[®] *H. pylori* Rapid Test Device proizvajalca MKBio (Nemčija) je enostaven in hiter imunokromatografski test za kvalitativno določanje *H. pylori* antigena v človeškem blatu. Prisotnost antigenov *H. pylori* se zazna s pomočjo specifičnih protiteles proti *H. pylori*, ki so nanesena na reagenčnem nosilcu. Test DIMA[®] pokaže hitre spremembe prisotnosti okužbe s *H. pylori*, zato je primeren za uporabo pri določitvi že prisotne ali ponovne infekcije ali pri spremljanju uspešnosti eradikacije (37).

Po dodatku vzorca blata v pufru se specifična, barvno označena protitelesa vežejo na prisotne bakterije *H. pylori* v vzorcu. Ti kompleksi potujejo po membrani po principu kapilarnega vleka in se vežejo z drugimi specifičnimi protitelesi, ki so nanešena na indikatorskem polju. Če v vzorcu ni prisotne *H. pylori*, se barvno označeno protitelo ne more vezati na območje indikatorskega polja in ni vidne pozitivne reakcije. V kontrolnem polju se mora vedno prikazati obarvano polje, saj služi kot notranja kontrola reagenta kot dokaz, da je bila dodana zadostna količina vzorca in da je bil dosežen zadosten kapilarni vlek v nosilcu (37).

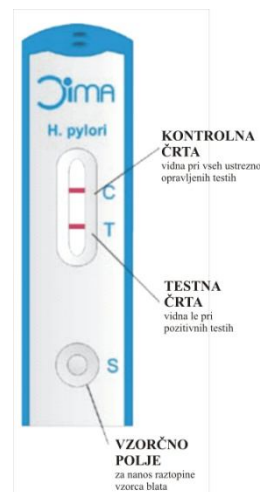
Testni komplet DIMA[®] vsebuje testne ploščice, zbiralne posodice za vzorce blata s pufrom za redčenje in navodila za uporabo (37).

Ob vzorčenju mora pacient paziti, da vzorec blata ne pride v stik z vodo v straniščni školjki, da se prepreči razredčitev vzorca ali kontaminacija z detergenti. Vzorec se odvzame z žličko, umeščeno v pokrovčku zbiralnega vsebnika na vsaj treh različnih mestih fekalne mase. Napolni se približno polovica zbiralne posodice, nato se jo dobro zatesni ter pretrese, da se vsebina zmeša s pufrom. Vzorec se lahko hrani na hladnem 1 – 2 dni, pred analizo pa ga postavimo na sobno temperaturo. Na okroglo vzorčno polje testne ploščice se nanese 2 do 3 kapljice raztopine vzorca z nežnim pritiskom na stene zbiralne posodice. Izogniti se je potrebno nanosu zračnih mehurčkov, če so prisotni v raztopini vzorca. Rezultat se odčita po 10 minutah (po daljšem času je interpretacija testa neustrezna) in sicer po spodnji shemi (37):

- pozitiven rezultat: na membrani se pojavita dve različno obarvani črti, ena v kontrolnem polju C in druga v testnem polju T,
- negativen rezultat: v reakcijskem polju se pojavi ena kontrolna črta v kontrolnem polju C, medtem ko testno polje, označeno s črko T, ostane neobarvano,
- neveljaven rezultat: popolna odsotnost obarvane kontrolne črte ne glede na prisotnost testne črte.

Intenziteta barve v testnem polju T variira odvisno od koncentracije *H. pylori* antigenov, ki so prisotni v vzorcu, vendar tega rezultata ni moč kvantitativno ovrednotiti. Tudi sama odsotnost barve v testnem polju še ne izključuje okužbe s *H. pylori*, zato je potrebno pri interpretaciji rezultatov DIMA[®] *H. pylori* testa vedno upoštevati celostno klinično sliko in rezultate ostalih laboratorijskih preiskav. Antibiotiki, zaviralci protonske črpalke in bizmutovi pripravki inhibirajo rast *H. pylori*. Negativni testni rezultati, pridobljeni med ali takoj po eradikacijski terapiji, so lahko nezanesljivi, ker se lahko količina bakterij preveč zmanjša za detekcijo s testom. V tem primeru je dobro *H. pylori* test ponoviti dva tedna po končani terapiji (37).

V klinični študiji so primerjali DIMA[®] *H. pylori* test s komercialno dostopnim ELISA testom in dobili naslednje karakteristike: za diagnostično občutljivost 82,1 %, diagnostično



Slika 12: Slikovni prikaz reagenčne ploščice hitrega testa DIMA[®] (povzeto po (37)).

specifičnost 96,9 %, pozitivno napovedno vrednost 91,4 %, negativno napovedno vrednost 93,1 % in ponovljivost 92,6 % (37).

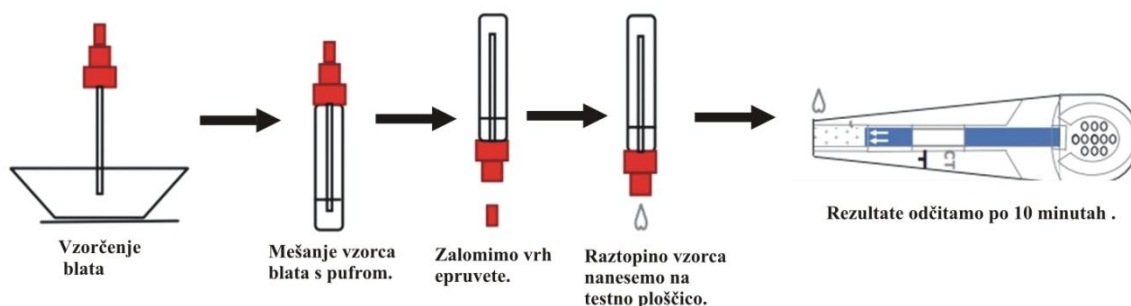
3.2.5. HITRI TEST ZA DOLOČITEV ANTIGENA *H. PYLORI* V BLATU 2

Test H&R[®] *Helicobacter pylori* v blatu proizvajalca Vegal Farmaceutica S.L. (Španija) je hiter enostopenjski test, namenjen za diagnostične ali raziskovalne namene za kvalitativno določanje antigena *H. pylori* v človeškem blatu. Test temelji na principu imunokromatografije in deluje po principu kapilarnega vleka (38).

V nosilni ploščici je vstavljena vpojna blazinica, ki ima testno območje prekrito z monoklonskimi protitelesi proti antigenu *H. pylori*. Po dodatku raztopine vzorca in pufra le-ta potuje s pomočjo kapilarnega vleka po reagenčni blazinici. V primeru, da so v vzorcu prisotni antigeni *H. pylori*, se bodo vezali z anti – *H. pylori* protitelesi ter obarvali indikatorsko področje. Ob testnem področju je še kontrolno področje, ki služi kot kontrolna reakcija med vzorcem in protitelesi na ploščici kot dokaz, da je bila dodana zadostna količina vzorca, in potrdilo, da je bil dosežen pravilen kapilarni vlek v testni ploščici (38).

Testni komplet H&R[®] *H. pylori* v blatu vsebuje vse komponente za izvedbo enkratne analize: testne ploščice, navodila za uporabo, epruvete za odvzem, ekstrakcijo in nanos vzorca in raztopino pozitivne kontrole (38).

Za izvedbo H&R[®] testa je potrebno zagotoviti zadostno količino vzorca blata, t.j. 1-2 g oziroma 1 mL tekočega blata, ki je odvzeto v čisto, suho posodico, brez konzervansov ali transportnega medija. Vzorci se lahko pred analizo hranijo od 1 do 2 dni pri temperaturi od 2 do 4 °C ali pri -20 °C za dlje časa, vendar jih je pred analizo potrebno pustiti, da dosežejo sobno temperaturo. V epruveto za ekstrakcijo in nanos je potrebno prenesti zadostno količino vzorca (okoli 250 mg) z žličko, ki je pritrjena na zamašku epruvete oziroma tekoče vzorce se aspirira s kapalko. Vzorce se v epruveti dobro pomeša z 250 µL pufra in nato se nastalo raztopino nanese na vzorčno polje testne ploščice (4 kapljice oziroma 100 µL).



Slika 13: Shematski prikaz postopka priprave vzorca blata in analize s H&R[®] testom (povzeto po (38)).

Rezultate odčitamo 10 minut po aplikaciji raztopine vzorca in interpretiramo po spodnji shemi (38):

- pozitiven rezultat: na testni ploščici se pojavita dve rdeči črti - v testnem polju, označenem s črko T, in v kontrolnem polju, označenem s črko C,
- negativen rezultat: na testni ploščici se pojavi le ena rdeča črta v kontrolnem polju, označenem s črko C,
- neveljaven rezultat: popolna odsotnost rdeče kontrolne črte ne glede na prisotnost rdeče testne črte zaradi nezadostne količine vzorca, nepravilnega postopka izvedbe testa ali razpada reagenta.

Prevelika količina vzorca lahko povzroči napačne rezultate (pojav pasov rjave barve) in jih je potrebno razredčiti s pufrom ter ponoviti test. Negativen rezultat v nobenem primeru ne izključuje možnosti okužbe s *H. pylori* (38).

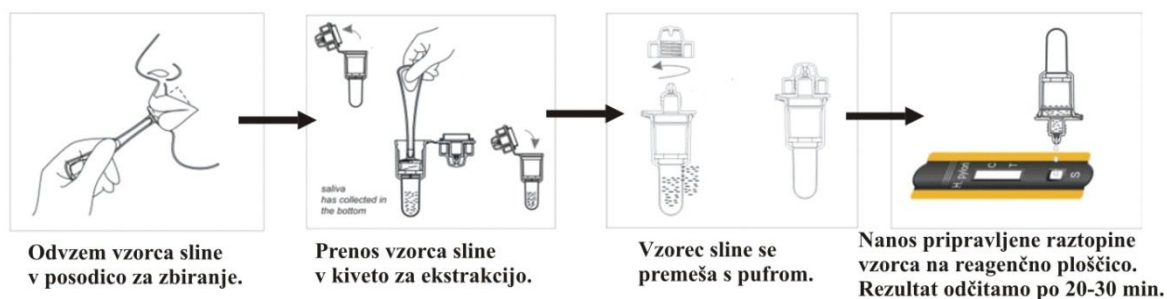
S H&R[®] testom ni mogoče določiti kvantitativne vrednosti prisotnih antigenov *H. pylori* v vzorcu ali stopnje spremembe količine *H. pylori* antigena v vzorcu. Rezultate H&R[®] *H. pylori* testa je potrebno vedno vrednotiti skupaj s kliničnimi znaki in v kombinaciji z drugimi diagnostičnimi testi (38).

H&R[®] *H. pylori* test so primerjali z različnimi metodami za določanje okužbe s *H. pylori* (bakterijska kultura, dihalni test s sečnino in hitri ureazni test) in ugotovljena je bila več kot 92 % točnost. Primerjava z EIA testi je dala več kot 99% občutljivost in več kot 99% specifičnost (38).

3.2.6. KVALITATIVNA DOLOČITEV *H. PYLORI* UREAZE V SLINI

dBest One Step *H. pylori* Saliva Test Disk je enostaven, enostopenjski imunokromatografski test za hitro, kvalitativno detekcijo ureaze prisotne ob infekciji s *H. pylori* v endoskopski biopsiji ali slini. Test uporablja specifična protitelesa za selektivno identifikacijo *H. pylori* ureaze (39).

Testni set sestoji iz kompleta za enkratno analizo enega vzorca: HP-Saliva testna ploščica, posodica za zbiranje sline in navodila za uporabo (39).



Slika 14: Shematski prikaz postopka odvzema in analize vzorca sline z dBest One Step *H. pylori* Saliva testom (povzeto po (39)).

Vsaj eno uro pred odvzemom vzorca sline pacient ne sme zaužiti pijače ali hrane. Sline zbere pacient v čistem vsebniku in jo analiziramo do 5 minut po odvzemu (39).

Vzorec sline se prenese s kapalko (4 kapljice) v posebno kivetico, v katero dodamo 2 kapljici pufru. 4 kapljice tako pripravljenega vzorca se prenese na vzorčno polje na reagenčni ploščici. V približno 30 sekundah se vijolična barva premakne skozi reagenčno okno na sredini ploščice, sicer pa je potrebno dodati še dodatni 2 kapljici raztopine z vzorcem v vzorčno polje. Pojav obarvanega pasu v kontrolnem (C) delu reagenčnega okna ploščice kaže, da test deluje pravilno ne glede na pojav obarvanega pasu v testnem (T) delu ploščice. Rezultat interpretiramo po 20 do 30 minutah, vendar ne kasneje kot po 30 minutah (39):

- pozitiven rezultat: prisotnost dveh obarvanih trakov (T in C) znotraj testnega okna ne glede na to, kateri trak se pojavi prvi,
- negativen rezultat: prisotnost samo enega vijolično obarvanega traku znotraj testnega okna,
- neveljaven rezultat: če po izvedbi testa ni viden noben trak, se priporoča ponovitev analize.

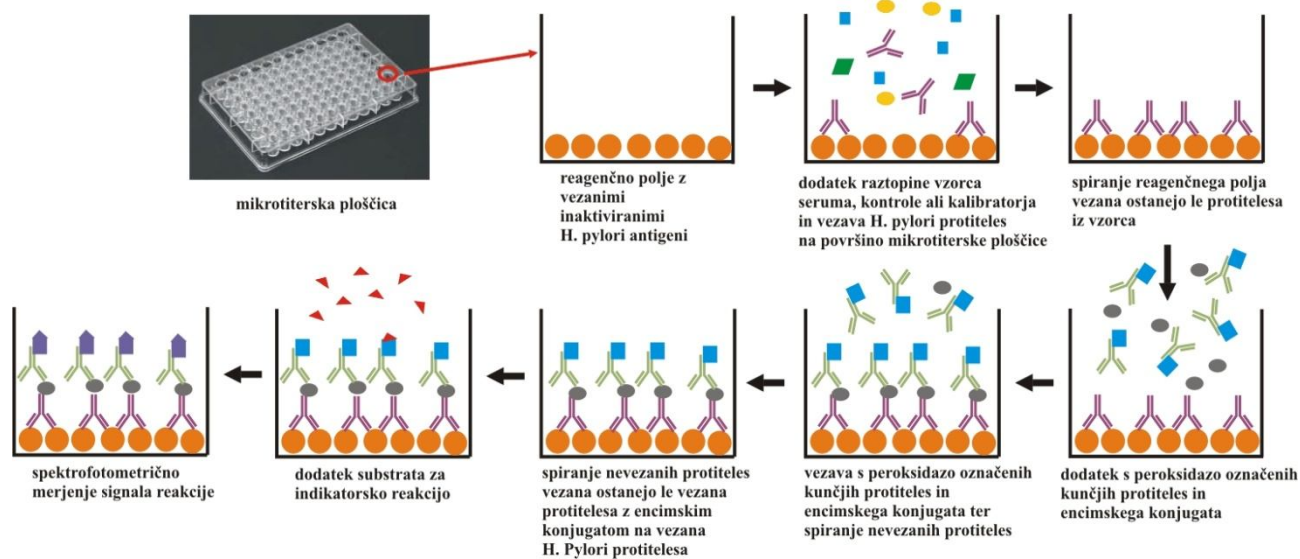
Višja je raven analita v vzorcu, močnejša je obarvanost testnega polja. Kljub temu, da je test zelo natančen za detekcijo ureaze, lahko pride do lažno negativnih rezultatov, zato je potrebna interpretacija dBest One Step *H. pylori* Saliva Test Disk skupaj s kliničnimi znaki pacienta. Študije so pokazale, da daje eradikacijska terapija mešane rezultate pri oralni kolonizaciji s *H. pylori* (39).

3.2.7. KVANTITATIVNA DOLOČITEV SPECIFIČNIH PROTITELES IgA IN IgG PROTI *H. PYLORI* V SERUMU

Test Pyloriset EIA-A III proizvajalca ORION Diagnostica (Finska) se uporablja za določanje specifičnih IgA in IgG protiteles proti *H. pylori* v humanem serumu pri bolnikih z gastrointestinalnimi simptomi. Gre za encimsko imunski test, kjer se protitelesa iz vzorca seruma vežejo s specifičnimi antigeni *H. pylori* na površino mikrotitrne ploščice. Po spiranju se encimski konjugat (peroksidaza, konjugirana z anti-humanimi Ig) veže na antigen-protitelo kompleks. Nevezan konjugat speremo in po inkubaciji s substratom prekinemo encimsko reakcijo z žveplovo kislino. Z merjenjem intenzivnosti absorbance se s pomočjo kalibracijske krivulje določi koncentracija protiteles IgA in IgG proti *H. pylori* v vzorcu. Analiza poteka semiavtomatizirano na analizatorju BioChem Immunosystems proizvajalca Personal LAB (Texas, ZDA) (40).

Pyloriset EIA-A III kit vsebuje: mikrotitrsko ploščo z 12 vrsticami (8 x 12 reagenčnih polj), prevlečeno z inaktiviranimi *H. pylori* antigeni, pufer za redčenje seruma, pufer za spiranje, encimski konjugat, peroksidaza konjugirana s kunčjimi anti-humanimi IgA in IgG protitelesi, kalibracijski serumi različnih koncentracij, TMB (3, 3', 5, 5' f – tetrametilbenzidin) substrat v koncentraciji 1,25 mmol/L in stop reagent (0,5 mmol/L žveplova kislina) (40).

Na mikrotitrsko ploščico se odpipetira po 100 µL kalibracijskih, kontrolnih in razredčenih pacientovih vzorcev in inkubira 30 minut na sobni temperaturi in stresanju 700 – 1000 rpm. Po spiranju s puferno raztopino se doda encimski konjugat ter ponovno inkubira. Ves nevezan encimski konjugat se spere s puferom za spiranje ter doda TMB substrat za indikatorsko reakcijo. Po 10 minutni inkubaciji se ustavi indikatorsko reakcijo s stop reagentom ter izmeri absorbanco pri 450 nm v roku 10 minut. Rezultate podajamo v enotah kIU/L. Razmejivna vrednost med pozitivnim in negativnim rezultatom je 20 kIU/L. V primeru, da so izmerjene koncentracije IgA nad 320 kIU/L oziroma IgG nad 640 kIU/L, moramo vzorec seruma razredčiti s puferom za redčenje. Vzorce seruma se lahko hrani pred analizo do 7 dni pri 4 do 8 °C oziroma pri –20 °C za daljši čas. Odmrznjenih vzorcev se ne sme ponovno zamrzovati. Močno lipemični ali hemolizirani vzorci lahko dajo napačne rezultate (40).



Slika 15: Shematski prikaz vezave protiteles in antigena pri določitvi *H. pylori* protiteles v vzorcu seruma s Pyloriset EIA-A III kitom.

Analiza IgA in IgG protiteles proti *H. pylori* je bila dolgo uporabljana za odkrivanje okužbe s *H. pylori* ter za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja po antibakterijski terapiji. Zaradi počasne spremembe protiteles v telesu (tudi do 6 mesecev), se ta analiza opušča in jo zamenjujeta ureazni dihalni test ter kvantitativno določanje antigena *H. pylori* v blatu. V primeru analize serumskih specifičnih imunoglobulinov je nujno potrebno počakati 3 do 6 tednov po zaključku antibiotične terapije (40).

Proizvajalec navaja 96,1 % občutljivost in 91,5 % specifičnost analize IgA protiteles proti *H. pylori* ter 100 % občutljivost in 94,3 % specifičnost analize IgG protiteles proti *H. pylori* v primerjavi z rezultati mikrobiološke kulture histoloških vzorcev (40).

3.3. STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV

Kvantitativne in semikvantitativne rezultate smo predstavili z mediano in interkvartilnim območjem (IQR), medtem ko smo kvalitativne rezultate opisali z deležem.

Neinvazivne diagnostične teste smo ovrednotili z občutljivostjo, specifičnostjo, natančnostjo ter pozitivno in negativno napovedno vrednostjo. Rezultate smo predstavili z ROC (receiver operating characteristic) krivuljo. Kvantitativne in semikvantitativne teste smo med seboj primerjali in ugotavljali, ali med njimi obstaja korelacija.

Vrednotenje uspešnosti zdravljenja smo opazovali pri pacientih, za katere smo imeli podatke laboratorijskih preiskav ob prvem in vsaj še enem kontrolnem pregledu. Rezultate

smo predstavili kot deleže in statistično ovrednotili s t-testom za homogeno varianco oziroma Wilcoxonovim testom pri ne-homogeni skupini rezultatov ter postavili 0,05 vrednost za verjetnost sprejema oziroma zavrnitve hipoteze.

Pri izračunu smo uporabili statistični program Medcalc in Microsoft Excelov urejevalnik tabel.

- **OBČUTLJIVOST**

Opređeljuje delež resnično pozitivnih rezultatov (oziroma bolnih preiskovancev) med vsemi resnično bolnimi t.j. med seštevkom resnično pozitivnih in lažno negativnih rezultatov.

Občutljivost kaže na sposobnost testa, da napove dejansko število bolnih v primeru pozitivnega rezultata. Visoka občutljivost testa pomeni, da prevladujejo pravilno oz. resnično pozitivni rezultati in da je napačno oz. lažno negativnih rezultatov malo (41).

$$OBČUTLJIVOST = \frac{RP}{(RP + LN)}$$

Enačba 1: Izračun občutljivosti testa.
RP – resnično pozitivni; *LN* – lažno negativni

- **SPECIFIČNOST**

Je merilo, ki določa delež zdravih pacientov (oziroma resnično negativnih rezultatov) v odnosu do vseh resnično zdravih t.j. med seštevkom resnično negativnih in lažno pozitivnih rezultatov testa.

Specifičnost kaže na sposobnost negativnega rezultata testa, da napove dejansko stanje brez bolezni. Visoka specifičnost pomeni, da prevladujejo pravilno negativni rezultati in malo število napačno pozitivnih rezultatov (41).

$$SPECIFIČNOST = \frac{RN}{(RN + LP)}$$

Enačba 2: Izračun specifičnosti testa.
RN – resnično negativni; *LP* – lažno pozitivni

Pojma specifičnost in občutljivost označujeta sposobnost testov, da zaznajo bolezen v prvem oziroma da zaznajo odsotnost bolezni v drugem primeru. Med občutljivostjo in specifičnostjo nekega testa obstaja antagonizem, kar pomeni, da se pri izboljševanju občutljivosti zmanjšuje specifičnost in obratno. Če želimo zajeti čim več bolnih, povečamo

občutljivost, vendar s tem tvegamo več lažno pozitivnih rezultatov, zaradi česar se zmanjša specifičnost. Obratno izboljšamo specifičnost, če želimo zajeti čim večje število zdravih preiskovancev, s čimer tvegamo več lažno negativnih rezultatov in zato manjšo občutljivost (41).

Napovedna vrednost dopolnjuje občutljivost in specifičnost, saj opiše prevalenco nekega parametra (npr. bolezni ali odsotnosti bolezni) v populaciji (41).

- **POZITIVNA NAPOVEDNA VREDNOST**

Je določena kot delež resnično bolnih preiskovancev med vsemi preiskovanci s pozitivnimi rezultati na testu t.j. med resnično pozitivnimi in lažno pozitivnimi. Govori o zanesljivosti pozitivnega rezultata testa.

Pozitivna napovedna vrednost ni odvisna samo od uporabljene metode, ampak je tudi funkcija prevalenca bolezni in opazovanega znaka. Pri enaki občutljivosti pozitivna napovedna vrednost raste z višanjem prevalenca bolezni in pada s prevalenco znaka (41).

$$PNV = \frac{RP}{(RP + LP)}$$

Enačba 3: Izračun pozitivne napovedne vrednosti testa.

PNV – pozitivna napovedna vrednost; *RP* – resnično pozitivni; *LP* – lažno pozitivni

- **NEGATIVNA NAPOVEDNA VREDNOST**

Nam pove, koliko se lahko zanesemo na negativen rezultat testa in je podana z razmerjem med resnično zdravimi preiskovanci in vsemi preiskovanci z negativnimi izvidi na testu t.j. med resnično negativnimi in lažno negativnimi (41).

$$NNV = \frac{RN}{(RN + LN)}$$

Enačba 4: Izračun negativne napovedne vrednosti testa.

NNV – negativna napovedna vrednost; *RN* – resnično negativni; *LN* – lažno negativni

Napovedna vrednost testa je odvisna od prevalenca bolezni in od opazovanega znaka. Tako je pozitivna napovedna vrednost pri enaki občutljivosti testa večja ob večji prevalenci bolezni in manjši prevalenci znaka. Napovedna moč negativne vrednosti (ob odsotnosti

znaka) pa je večja ob redkem pojavu bolezni in pogostem pojavljanju znaka med preiskovanci (41).

- **NATANČNOST**

Je merska značilnost dihotomnega diagnostičnega testa, izračunljiva kot količnik vsote števil pravilno pozitivnih in pravilno negativnih rezultatov ter vsote števil vseh rezultatov (41).

- **TOČNOST**

Dihotomni diagnostični test lahko ovrednotimo tudi s točnostjo, ki je opredeljena z razmerjem med številom pravilnih določitev oz. z vsoto pravilnih pozitivnih in pravilnih negativnih rezultatov in številom vseh določitev oz. z vsoto števil vseh rezultatov (41).

$$TOČNOST = \frac{(RP + RN)}{(RP + LP + RN + LN)}$$

Enačba 5: Izračun pozitivne napovedne vrednosti testa.

RP – resnično pozitivni; *RN* – resnično negativni; *LP* – lažno pozitivni; *LN* – lažno negativni

Oprelitev opisanih količin zahteva poznavanje dejanskega stanja oseb glede na proučevano bolezen. V praksi se poslužujemo referenčnih diagnostičnih metod ali pa med vsemi opazovanimi opredelimo eno metodo kot referenčno in v odnosu z le-to izračunamo število resnično pozitivnih (*RP*), resnično negativnih (*RN*), lažno pozitivnih (*LP*) in lažno negativnih (*LN*) rezultatov. Referenčne diagnostične metode so dober približek realnega stanja; idealna referenčna metoda kaže dejansko stanje glede prisotnosti obolenja oziroma odsotnosti bolezni in je 100 % občutljiva ter 100 % specifična (41), (18).

- **ROC KRIVULJA**

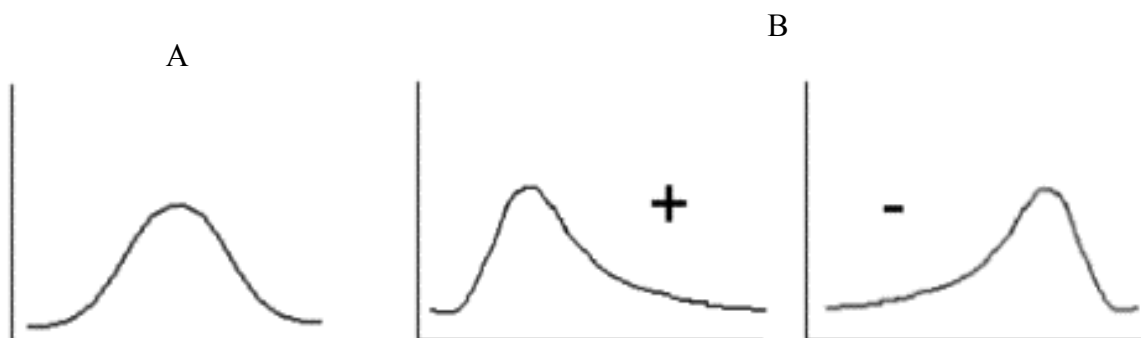
ROC (receiver operating characteristic) krivulja je grafični prikaz razmerja med deležem resnično pozitivnih (*RP*) in lažno pozitivnih (*LP*) rezultatov. Na X-osi so nanizani lažno pozitivni (1-specifičnost), na Y-osi pa resnično pozitivni (občutljivost) rezultati. S površino pod ROC krivuljo (*AUC*; area under curve) lahko določimo za kakšno stopnjo ujemanja med rezultati oziroma med metodami gre:

0,9 – 1,0 odlično ujemanje, 0,8 – 0,9 dobro ujemanje, 0,7 – 0,8 ustrezno ujemanje, 0,6 – 0,7 zmerno ujemanje med rezultati; vrednost *AUC* pod 0,6 pa smo vrednotili kot slabo ujemanje med metodama (41).

- KORELACIJA MED METODAMI - LINEARNA REGRESIJA

Korelacija je vsako statistično razmerje med dvema slučajnima spremenljivkama ali dvema nizoma podatkov in predstavlja moč povezanosti dveh spremenljivk. Opredeljena je s korelacijskim koeficientom (41).

Pri vsaki statistični obravnavi rezultatov je potrebno najprej opredeliti porazdelitev podatkov; normalna (Gaussova) ali ne-Gaussova porazdelitev. V primeru, da imamo veliko skupino rezultatov (nad 100), lahko sklepamo, da gre za veliko skupino, ki predstavlja populacijo ter jo obravnavamo, da se porazdeljuje normalno. Normalno porazdeljujoče vzorce opišemo s Pearsonovim koeficientom korelacije. V nasprotnem primeru, ko se podatki ne porazdeljujejo po Gaussovi krivulji, opredelimo korelacijo s Spearman-ovim korelacijskim koeficientom. V obeh primerih moč korelacije ovrednotimo z verjetnostnim faktorjem (p) in s stopnjo signifikantnosti α 0,05.



Slika 16: Shematični prikaz A – normalne (Gaussove) distribucije in B – ne-Gaussove distribucije podatkov.

Korelacijo med metodami prikažemo grafično, ko na ordinato nanese odvisno spremenljivko, na absciso pa neodvisno. Vsaka enota je predstavljena z eno točko. Na osnovi grafične odvisnosti lahko ugotovimo ali sta primerjani metodi v linearni korelaciji in jih opišemo z enačbo linearne regresije oziroma katera matematična funkcija najboljše opiše odvisnost spremenljivke Y od spremenljivke X (41).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

V naši nalogi smo opazovali skupino 116 pacientov z mediano starosti 48 (10 – 85) let, med katerimi je bilo 58 % žensk in 42 % moških. V tabeli [Tabela I](#) smo povzeli statistični opis podatkov, zbranih za vsak opazovani diagnostični test.

Tabela I: Statistični opis metod za določanje okužbe s *H. pylori*

DIAGNOSTIČNI TEST	ŠTEVILO	STATISTIČNI OPIS	
		POZITIVNI / NEGATIVNI	MEDIANA (IQR)
HUT	65	64 / 1	/
histologija	55	47 / 8	
HP-DihT	161	66 / 94	1,4 (0,70-15,75) ‰
HP-blato ELISA	113	38 / 75	0,6 (0,42-4,16) index
HP-blato 1	98	31 / 67	/
HP-blato 2	128	54 / 74	/
HP-Slina	116	21 / 95	/
HP-IgG	129	93 / 36	52 (16,0-179,2) kIU/L
HP-IgA	129	64 / 65	20 (14,0-43,0) kIU/L

Med 116 pacienti jih je 42 prišlo na vsaj še en kontrolni pregled. Rezultate vseh 170 klinično-laboratorijskih pregledov smo zbrali empirično v tabeli [Tabela III](#).

Med 70 pacienti, za katere smo imeli podane rezultate metod zlatega standarda (histologija, HUT in dihalni test s sečnino), je bilo 62 pozitivnih (88,6 % okuženih) in 8 negativnih primerov. V 2 primerih (2/62) je bil histološki pregled negativen, vendar sta bila dihalni test s sečnino in določitev antigena *H. pylori* v blatu z ELISA testom pozitivna in v 4 primerih (4/8) histološki pregled in dihalni test s sečnino negativna, medtem ko je bil HUT pozitiven.

Tabela II: Empirična predstavitev rezultatov detekcije *H. pylori* z devetimi različnimi metodami pri opazovani skupini 116 pacientov.

HISTOLOGIJA	HUT	HP-DihT	HP-blato ELISA	HP-blato 1	HP-blato 2	HP-Slina	HP-IgG	HP-IgA	ŠT. PRIMEROV	HISTOLOGIJA	HUT	HP-DihT	HP-blato ELISA	HP-blato 1	HP-blato 2	HP-Slina	HP-IgG	HP-IgA	ŠT. PRIMEROV
+	+	+	+	+	+	+	+	+	1	ni	ni	-	-	-	+	+	-	+	1
+	+	+	+	+	+	-	+	+	4	ni	ni	+	ni	-	-	-	+	-	1
+	+	+	+	ni	+	+	+	+	1	ni	ni	-	+	-	-	-	+	+	1
ni	+	+	+	+	+	+	+	+	2	ni	ni	+	-	-	-	-	+	+	1
+	+	+	+	+	+	-	+	-	1	ni	ni	+	-	-	-	ni	+	+	3
+	+	+	ni	+	+	-	+	+	1	ni	ni	-	-	-	-	+	+	+	1
+	+	+	+	-	-	+	+	+	1	ni	ni	+	ni	-	-	ni	+	+	1
+	+	+	+	ni	+	-	+	+	1	ni	ni	+	+	ni	+	v	v	+	1
-	+	+	+	+	+	-	+	+	2	ni	ni	-	-	ni	ni	+	+	+	1
ni	+	+	+	+	+	-	+	+	3	ni	ni	-	-	ni	ni	+	+	+	1
+	+	+	+	ni	+	-	+	-	1	ni	ni	+	ni	ni	ni	-	+	+	1
+	+	+	-	ni	+	-	+	+	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2
ni	+	+	+	+	+	-	+	-	1	+	+	-	ni	-	-	-	-	-	1
ni	+	+	ni	+	+	-	+	+	1	+	-	-	ni	-	-	-	-	-	2
ni	+	+	+	ni	+	-	+	+	1	+	+	ni	ni	-	-	-	-	-	1
ni	ni	+	+	+	+	-	+	+	1	+	+	ni	ni	ni	-	ni	ni	ni	1
ni	ni	+	+	+	+	-	+	+	2	-	ni	-	-	-	+	-	-	+	1
ni	ni	+	+	+	+	ni	+	+	2	ni	+	-	ni	-	+	-	-	-	1
+	+	-	ni	-	+	-	+	+	2	ni	+	-	-	-	-	-	+	-	1
+	+	+	-	-	-	-	+	+	1	ni	+	+	ni	-	-	ni	ni	ni	1
+	+	-	-	ni	+	-	+	+	1	ni	+	+	ni	ni	ni	ni	ni	ni	1
-	ni	+	+	-	+	-	+	+	1	ni	ni	-	ni	+	-	-	+	-	2
-	ni	+	+	ni	+	+	+	-	1	ni	ni	-	-	-	+	-	-	+	1
ni	+	+	+	ni	+	-	+	-	1	ni	ni	-	-	-	-	-	+	+	5
ni	ni	+	+	+	+	-	+	-	2	ni	ni	-	ni	-	-	+	+	-	1
ni	ni	+	+	+	+	ni	+	-	1	ni	ni	-	ni	-	-	-	+	+	1
ni	ni	+	ni	+	+	-	+	+	1	ni	ni	-	-	ni	-	-	+	+	2
ni	ni	+	+	-	+	-	+	+	2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
ni	ni	+	+	ni	+	+	+	-	1	-	ni	-	-	-	-	-	-	+	1
+	+	-	-	-	+	+	-	-	1	ni	-	-	ni	-	-	-	+	-	1
+	+	-	-	-	+	-	-	+	1	ni	ni	-	-	-	+	-	-	-	2
+	+	-	-	-	-	+	+	-	2	ni	ni	-	-	-	-	ni	+	-	1
+	+	-	-	-	-	-	+	+	4	ni	ni	-	ni	-	-	+	-	-	1
+	+	-	ni	-	-	+	-	+	1	ni	ni	-	ni	-	-	-	+	-	1
+	+	-	-	ni	-	+	+	-	1	ni	ni	-	ni	-	-	ni	+	-	2
+	+	-	-	ni	-	-	+	+	3	ni	ni	-	-	-	ni	ni	-	+	1
ni	ni	-	-	+	+	+	+	-	1	ni	ni	ni	+	ni	ni	ni	ni	ni	1
ni	ni	-	-	-	+	+	+	+	1	ni	ni	+	-	ni	ni	ni	ni	ni	1
ni	ni	+	ni	-	+	ni	+	+	1	ni	ni	+	ni	ni	ni	ni	ni	ni	12
ni	ni	+	+	ni	+	-	+	-	1	-	ni	-	-	-	-	-	ni	ni	1
+	+	-	-	-	-	-	+	-	1	ni	ni	-	-	-	-	-	-	-	5
+	+	-	-	-	-	-	-	+	1	ni	ni	-	-	-	-	-	ni	ni	1
+	+	-	-	-	-	-	-	+	1	ni	ni	-	-	-	-	ni	-	-	2
+	+	-	-	ni	-	-	+	-	6	ni	ni	-	ni	-	-	ni	-	-	1
+	+	+	ni	ni	ni	ni	ni	ni	2	ni	ni	-	-	-	ni	ni	-	-	1
+	+	ni	ni	ni	ni	+	ni	ni	1	ni	ni	-	-	ni	-	-	-	-	4
ni	+	-	-	-	-	-	+	+	1	ni	ni	-	ni	ni	-	-	-	-	1
ni	ni	-	-	+	-	ni	+	+	1	ni	ni	ni	-	ni	ni	ni	ni	ni	5
ni	ni	-	ni	+	-	-	+	+	1	ni	ni	-	ni	ni	ni	ni	ni	ni	12

Legenda: + pozitiven rezultat - negativen rezultat ni analiza s tem testom ni bila opravljena

4.1. STATISTIČNO OVREDNOTENJE REZULTATOV

Diagnostične lastnosti (občutljivost in specifičnost) preučevanih testov smo predstavili z ROC (receiver operating characteristic) krivuljo ter površino pod njo (AUC, area under curve). Gre za grafični prikaz razmerja med deležem resnično pozitivnih (RP) in lažno pozitivnih (LP) rezultatov oziroma med občutljivostjo in specifičnostjo.

Pri izboru laboratorijskega testa za opredelitev neke bolezni ali okužbe stremimo k čim bolj občutljivemu in čim bolj specifičnemu testu. Torej si želimo, da bi pozitiven rezultat opazovanega testa pokazal stanja z boleznijo (100 % občutljivost) brez oziroma s čim nižjim številom lažno negativnih primerov in da bi z negativnim rezultatom zajeli le zdrave (100 % specifičnost) brez lažno pozitivnih primerov. V praksi redkokdaj najdemo 100 % občutljiv in 100 % specifičen test. Napovedna vrednost govori o zanesljivosti rezultata in je odvisna od prevalence bolezni oziroma opazovanega znaka. Gre za verjetnost, da če dobimo pozitiven rezultat, je bolezen resnično prisotna (PNV) in obratno pri NNV (41).

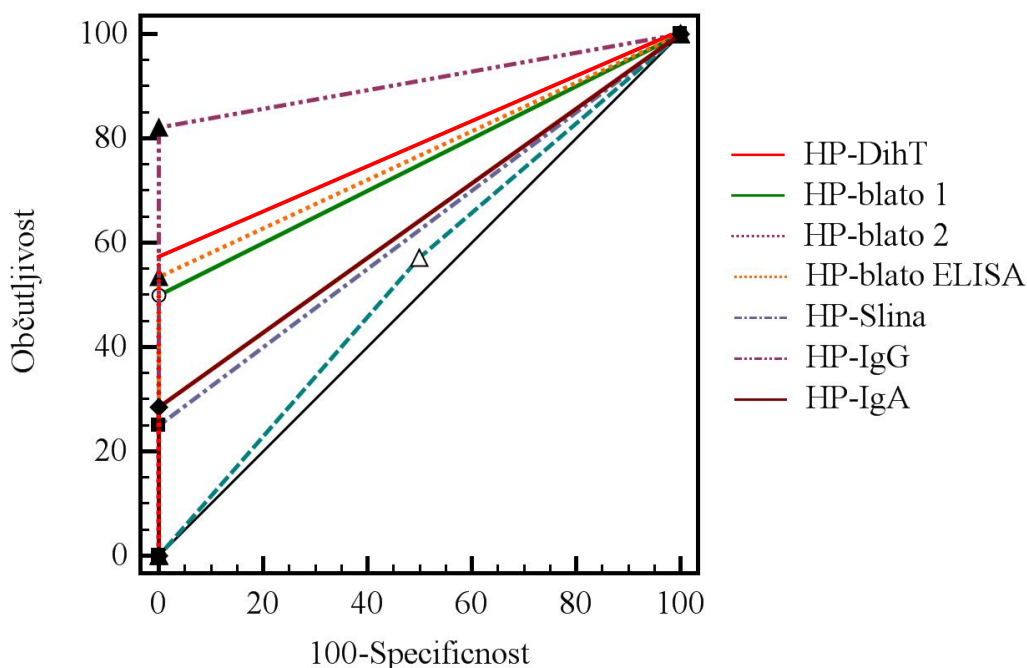
Opazovane metode smo primerjali s t. i. metodo zlatega standarda, kjer smo okužbo potrdili, če sta bila dva izmed treh testov histološkega pregleda, hitrega ureaznega testa biopta in dihalnega testa s sečnino pozitivna. Rezultate diagnostičnih lastnosti opazovanih metod smo zbrali v tabeli [Tabela IIIH](#) ter jih grafično predstavili v ROC krivulji na sliki 17.

Prisotnost ali odsotnost okužbe je mogoče tudi empirično opredeliti glede na rezultate vseh opazovanih metod; za vsakega posameznega pacienta se pogleda število pozitivnih in negativnih rezultatov ter glede na HUT in histopatološki pregled opredeli, ali je okužba s *H. pylori* prisotna ali ne (42).

Iz ROC krivulje lahko vizualno ocenimo diagnostično točnost testa in primerjamo različne teste med seboj. Pri testih z visoko diagnostično točnostjo se ROC krivulja približa levemu zgornjemu kotu, kjer imamo veliko število resnično pozitivnih rezultatov in majhno število lažno pozitivnih rezultatov. Prav tako lahko s površino pod ROC krivuljo (AUC) opredelimo ujemanje metod z resničnimi rezultati; pri našem delu smo dobili najboljše ujemanje pri HP-DihT (0,750) ter ustrezno ujemanje pri HP-Liason (0,724) in HP-blato 1 (0,722).

Tabela III: Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost ter površina pod krivuljo (AUC) ROC glede na zlati standard (histologija, HUT in dihalni test s sečnino) kot referenčno metodo (95 % intervalom zaupanja).

	OBČUTLJIVOST [%]	SPECIFIČNOST [%]	AUC	PNV [%]	NNV [%]
HP-DihT	50,0 (36,8-63,2)	100,0 (63,1-100,0)	0,750 (0,630-0,847)	100,0 (88,4-100,0)	21,1 (9,6-37,3)
HP-blato ELISA	44,9 (30,7-59,8)	100,0 (54,1-100,0)	0,724 (0,587-0,836)	100,0 (83,9-100,0)	18,2 (7,0-35,5)
HP-blato 1	44,4 (27,9-61,9)	100,0 (63,1-100,0)	0,722 (0,567-0,846)	100,0 (79,4-100,0)	28,6 (13,2-48,7)
HP-blato 2	50,9 (37,3-64,4)	75,0 (34,9-96,8)	0,629 (0,501-0,746)	93,5 (78,6-99,2)	17,6 (6,8-34,5)
HP-Slina	20,7 (11,2-33,4)	100,0 (63,1-100,0)	0,603 (0,475-0,722)	100,0 (73,5-100,0)	14,8 (6,6-27,1)
HP-IgG	82,1 (69,6-91,1)	57,1 (18,4-90,1)	0,696 (0,568-0,806)	93,9 (83,1-98,7)	28,6 (8,4-58,1)
HP-IgA	60,7 (46,8-73,5)	57,1 (18,4-90,1)	0,598 (0,458-0,712)	91,9 (78,1-98,3)	15,4 (4,4-34,9)



Slika 17: Grafični prikaz ROC krivulje vseh opazovanih metod glede na zlati standard (histologija, HUT in dihalni test s sečnino) kot referenčno metodo.

Številne študije navajajo različne diagnostične vrednosti za metode, ki se uporabljajo za odkrivanje in spremljanje okužbe s *H. pylori*. Zato smo pregledali objave z meta analizami in s primerjavami metod ter povzeli povprečno občutljivost in specifičnost metod. V primerjavi z zlatim standardom ali kombinacijo več testov hkrati je za dihalni test s sečnino

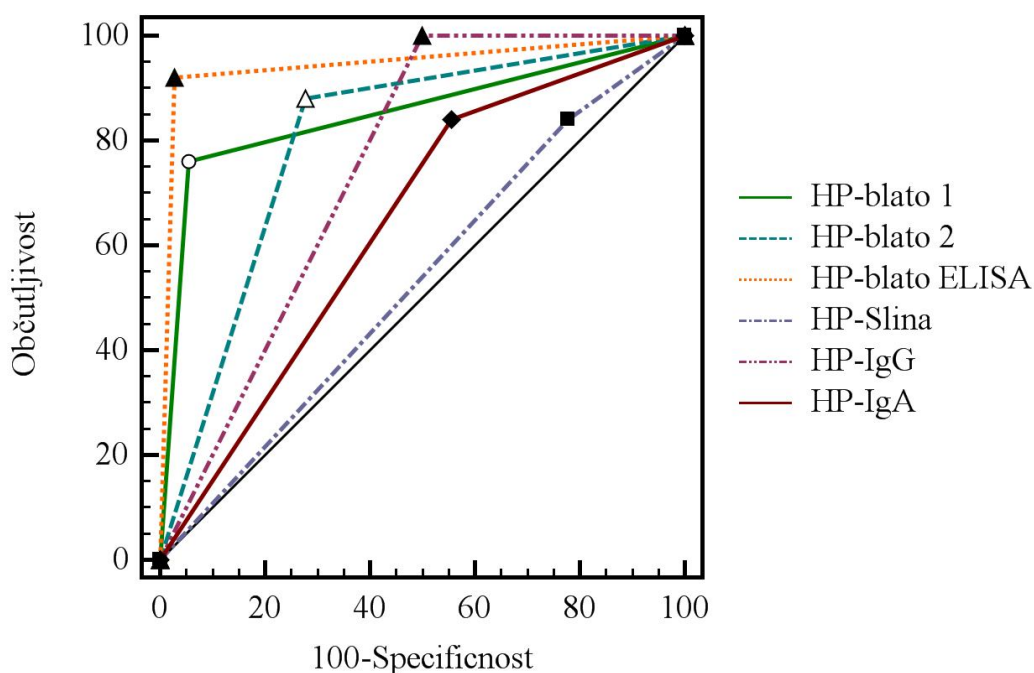
opredeljena 95 – 100 % občutljivost in 93 – 100 % specifičnost, za metode določitve antigena *H. pylori* v blatu 88 – 93 % občutljivost in 78 – 100 % specifičnost, za določitev ureazne aktivnosti v slini 56 – 81 % občutljivost in 55 – 73 % specifičnost ter za serološke teste specifičnih imunoglobulinov 85 – 100 % občutljivost in 72 – 79 % specifičnost (14 , 19 , 21 , 23 , 43 , 44 , 45 , 46 , 47 , 48).

Pri našem delu smo v primerjavi z zlatim standardom med opazovanimi metodami, dokazali 100% specifičnost za HP-DihT, HP-blato ELISA, HP-blato 1 in HP-Slina, zato lahko sklepamo, da z njimi lahko z zanesljivostjo opredelimo odsotnost okužbe s *H. pylori*. Občutljivost opazovanih metod je bila okoli 50 %, t.j. nižja kot je navedena v literaturi, razen za test določitve specifičnih IgG, ki je dosegla 82,1 % in je primerljiva z zgoraj navedenimi literaturnimi izsledki. Naši rezultati se ujemajo z objavljeno raziskavo skupine Slovenskih raziskovalcev, ki so v analizi 48 pacientov primerjali 3 invazivne in 4 neinvazivne metode za določanje okužbe s *H. pylori*. Opredelili so občutljivost in specifičnost za: dihalni test s sečnino 100 % in 100 %, določitev antigena *H. pylori* v blatu 57,9 % in 78,9 %, določitev ureazne aktivnosti v slini 56,3 % in 66,7 %, ter serološki test specifičnih imunoglobulinov IgG in IgA 94,7 % in 63 % (49). Pri primerjavi smo upoštevali, da so za pozitivno okužbo opredelili pacienta, ki je imel pozitivno kulturo ali pa histološki pregled oziroma vsaj dva pozitivna testa izmed HUT in neinvazivnimi testi, medtem ko smo pri našem delu vrednotili rezultate glede na histološki pregled, HUT in dihalni test s sečnino.

Vse opazovane laboratorijske teste smo med seboj primerjali glede na rezultate metode dihalnega testa s sečnino, ki se dandanes uporablja pri odkrivanju oziroma potrjevanju suma okužbe s *H. pylori*. Za slednjo je v literaturi podana najvišja stopnja občutljivosti in specifičnosti za odkrivanje in spremljanje zdravljenja okužbe s *H. pylori* glede na opazovane teste. Prav tako je dihalni test s sečnino, v primerjavi z bioptično diagnostiko okužbe s *H. pylori*, v kliničnih preskušanjih na 457 bolnikih pokazal obseg občutljivosti od 96,5 % do 97,9 % in specifičnosti od 96,7 % do 100 % (34 , 35). V literaturi so navedene študije, v katerih so prav tako primerjali različne diagnostične teste z dihalnim testom s sečnino (19), zato smo pri našem delu prav tako ovrednotili vse opazovane metode glede na dihalni test s sečnino in jih zbrali v tabeli [Tabela IVIV](#) ter grafično prikazali v ROC krivulji na sliki 18.

Tabela IV: Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost ter površina pod krivuljo (AUC) ROC glede na dihalni test s sečnino kot referenčna metoda (95 % intervalom zaupanja).

	OBČUTLJIVOST [%]	SPECIFIČNOST [%]	AUC	PNV [%]	NNV [%]
HP-blato ELISA	83,7 (69,3-93,2)	98,4 (91,6-100,0)	0,911 (0,840-0,957)	97,3 (85,8-99,9)	90,0 (80,5-95,9)
HP-blato 1	65,8 (48,6-80,4)	90,0 (79,5-96,2)	0,779 (0,684-0,857)	80,6 (62,5-92,5)	80,6 (69,1-89,2)
HP-blato 2	81,6 (68,0-91,2)	82,3 (72,1-90,0)	0,820 (0,742-0,882)	74,1 (60,3-85,0)	87,8 (78,2-94,3)
HP-Slina	82,9 (67,9-92,8)	17,8 (9,8-28,5)	0,504 (0,408-0,599)	36,2 (26,5-46,7)	65,0 (40,8-84,6)
HP-IgG	98,0 (89,1-99,9)	43,8 (32,7-55,3)	0,709 (0,622-0,785)	51,6 (41,0-62,1)	97,2 (85,5-99,9)
HP-IgA	73,5 (58,9-85,1)	57,5 (45,9-68,5)	0,655 (0,566-0,736)	51,4 (39,2-63,6)	78,0 (65,1-87,8)



Slika 18: Grafični prikaz ROC krivulje vseh opazovanih metod glede na dihalni test s sečnino kot referenčno metodo.

Najboljše rezultate je dala metoda semiavtomatizirane določitve antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom (HP-blato ELISA), najslabše pa test določitve ureazne aktivnosti v slini (HP-Slina).

Pri našem delu smo določili najvišjo občutljivost pri testu določitve IgG v serumu (HP-IgG), antigena *H. pylori* v blatu s semiavtomatizirano metodo (HP-blato ELISA) in s hitro metodo HP-blato 2 ter pri testu za kvalitativno določitev *H. pylori* ureaze v slini (HP-Slina). Vendar smo pri slednjem določili izredno nizko specifičnost, kar omejuje njegovo uporabo v diagnostiki. Za najbolj specifične so se izkazali vsi trije testi določitve antigena *H. pylori* v blatu.

V literaturi je lahko zaslediti veliko študij o primerjavi različnih testov za določitev antigena v blatu z dihalnim testom s sečnino. Študije navajajo 89 – 90 % občutljivost in 87 – 99 % specifičnost (14), vendar sta za hitre teste, ki uporabljajo poliklonska protitelesa, občutljivost (69 – 92 %) in specifičnost (76 – 90 %) nižja (21).

V najnovjšem prispevku iz leta 2016 Ramírez-Lázaro (44) vrednoti semiavtomatizirani kemiluminiscenčni test, ki smo ga uporabili v naši nalogi, v primerjavi z zlatim standardom za diagnozo *H. pylori*, t.j. ujemanje HUT, histologije in dihalnega testa s sečnino na 252 pacientih pred eradikacijo. Njihovi rezultati (90,1 % občutljivost, 92,4 % specifičnost, 91,6 % PNV in 90,1 % NNV) (44) se ujemajo z našimi ugotovitvami. Proizvajalec testa DiaSorin navaja rezultate primerjave le z drugim ELISA testom za določitev antigena *H. pylori* v blatu (36), zato ne moremo neposredno primerjati teh navedb. Neposredno pa se naši rezultati ujemajo z na kongresu objavljenimi rezultati, kjer so primerjali rezultate HP-blato ELISA z HP-DihT dobljenih pri 15 pacientih: 89,6 % občutljivost in 98,5 % specifičnost (50).

Prav tako prednost testa predstavlja njegova avtomatiziranost detekcije z enostavno laboratorijsko opremo, ki je dostopna tudi laboratorijem na primarni zdravstveni ravni.

Veliko študij o uporabnosti hitrih testov za določitev okužbe s *H. pylori* je narejenih s poliklonskimi testi za določanje antigena *H. pylori* v blatu. V primerjavi z dihalnim testom s sečnino imajo 91 % občutljivost in 93 % specifičnost s 92 % PNV in 87 % NNV pri odkrivanju okužbe. Spremljanje diagnostične vrednosti testa določanja antigena v blatu po eradikaciji pa je dalo 96 % občutljivost, 97 % specifičnost, 96 % PNV in 97 % NNV. Monoklonski testi antigena *H. pylori* v blatu so natančnejši kot poliklonski tako pred kot po zdravljenju z določeno občutljivostjo 84 % in specifičnostjo 98 %, 97 % PNV ter 89 % NNV (19).

Proizvajalec hitrega testa HP-blato 2 je primerjal njegovo uporabnost z EIA testi in navaja več kot 99 % občutljivost in več kot 99 % specifičnost (38). Proizvajalec hitrega testa HP-blato 1 pa navaja 82,1 % občutljivost, 96,9 % specifičnost, 91,4 % PNV in 93,1 % NNV ter ponovljivost 92,6 % za svoj test določitve antigena *H. pylori* v blatu v primerjavi s komercialno dostopnim ELISA testom (37). Pri našem delu proizvajalčevih navedb nismo mogli potrditi. Vendar glede na to, da smo dokazali ustreznost diagnostičnih opisnih parametrov, se oba testa lahko uporablja v kombinaciji z drugo diagnostično metodo pri ugotavljanju okužbe s *H. pylori* ali pa v presejevalne namene.

Najslabše rezultate smo dobili pri primerjanju testa določitve ureazne aktivnosti *H. pylori* v slini (HP-Slina). Slina velja v zadnjih 15 letih za perspektiven biološki material za laboratorijsko analizo, saj je njeno vzorčenje enostavno in neinvazivno. V študijah preizkušeni testi določitve prisotnosti *H. pylori* v slini niso pokazali ustreznih rezultatov za širšo uporabo v diagnostiki in spremljanju zdravljenja. Ti testi so običajno enostavni, hitri, cenovno ugodni, zato se njihova uporaba priporoča v epidemioloških in populacijskih študijah prevalence *H. pylori*. Nizko specifičnost določanja prisotnosti *H. pylori* v slini pripisujejo nehomogeni prisotnosti bakterije pri okuženih pacientih: bakterija je lahko prisotna v ustnih plakih kljub temu, da pacient nima znakov okužbe ali pa celo *H. pylori* ni prisotna v sluznici želodca. Sklepajo, da prisotnost bakterije v ustih predstavlja skladišče in vir okužbe ali pa vir reinfekcije po uspešni eradikaciji. Ustrezna ustna higiena (čiščenje medzobnih površin in uporaba ustne vodice) lahko uniči ustno bakterijo in s tem pripomore k uspešnejši eradikaciji želodčne bakterije (23).

Med kvantitativnima testoma določitve specifičnih protiteles v serumu smo boljše rezultate dobili pri določanju IgG protiteles, vendar nikakor nismo mogli doseči podatkov, ki jih navaja proizvajalec testa (96,1 % občutljivost in 91,5 % specifičnost analize IgA ter 100 % občutljivost in 94,3 % specifičnost analize IgG primerjavi z rezultati mikrobiološke kulture histoloških vzorcev) (40), saj nismo imeli podatkov za kulturo histoloških vzorcev. Težava, da protitelesa v serumu vztrajajo tudi več let po okužbi, ne omogoča njihove uporabo za hitro spremljanje uspešnosti terapije ter za odkrivanje novonastalih okužb (19). Kljub temu se njihov titer ob uspešni eradikaciji zniža in se uspešnost eradikacije lahko potrdi, če se nivo protiteles po zdravljenju zniža za 25 % glede na nivo protiteles pred uvedbo eradikacijske terapije (43). Dandanes se njuna uporaba za odkrivanje okužb s *H. pylori*

opušča, vendar ostajata zaradi njune nizke cene in enostavne laboratorijske opreme pomembna testa v epidemioloških in populacijskih študijah (19).

4.2. KORELACIJA MED KVANTITATIVNIMI IN SEMIKVANTITATIVNIMI METODAMI

Dihalni test s sečnino ter titer protiteles IgG in IgA proti *H. pylori* v serumu so kvantitativne metode. Z dihalnim testom s sečnino dobimo kot rezultat delež med ^{13}C in ^{12}C v izdihanem zraku, izraženim v promilih. Razmejitvena vrednost med pozitivnim in negativnim rezultatom je 4 ‰. Količini IgG in IgA protiteles proti *H. pylori*, določenih z encimskim imunskim testom, se podajajo v mednarodnih enotah na liter vzorca (IU/L); mednarodna enota je merilo za količino snovi glede na njeno biološko aktivnost oziroma učinek. Razmejitvena vrednost med pozitivnim in negativnim rezultatom imunoglobulinov je 20 IU/L. Rezultat semiavtomatiziranega testa določitve antigenov *H. pylori* v blatu z encimsko imunsko metodo je podan kot indeks med vrednostjo relativnih svetlobnih enot reakcije s preiskovanim in slepim vzorcem. Vzorci z vrednostjo indeksa 1,0 ali nad 1,0 so pozitivni.

Kljub vrednotenju metod z metodo ROC smo pri našem delu iskali korelacijsko zvezo med štirimi testi; tremi kvantitativnimi in enim semikvantitativnim. Grafično so rezultati za vse 4 opazovane teste zbrani v grafu na sliki 19.

Korelacijo med testi smo ovrednotili s korelacijskim koeficientom (r) ter rezultate interpretirali le, če je bila vrednost signifikantnosti $P < 0,05$ kot: »zelo dobro do odlično« za korelacijski koeficient med 0,75 in 1,00, kot »zmerno do dobro korelacijo« za korelacijski koeficient med 0,50 in 0,74 ter kot »slabo korelacijo« v primeru, da je bil korelacijski koeficient med 0,25 in 0,49. Za vrednosti korelacijskega koeficienta pod 0,24 pa smo obravnavali, da med metodama ni korelacije. Rezultati so zbrani v tabelama [Tabela VV](#) in [Tabela VI](#).

Distribucija opazovanih testov je po ne-Gaussovi krivulji, zato smo za oceno korelacije uporabili Spearmanov korelacijski koeficient.

Tabela V: Spearmanov korelacijski koeficient med opazovanimi metodami in dihalnim testom s sečnino kot neodvisnim testom.

P - Signifikantnost korelacije z upoštevano razmejitevno vrednostjo α 0,05.

	ρ	P	N
HP-blato ELISA	0,661	<0,0001	107
HP-IgG	0,532	<0,0001	129
HP-IgA	0,404	<0,0001	129

Tabela VI: Spearmanov korelacijski koeficient med opazovanimi metodami in semikvantitativnim testom testa določitve antigenov *H. pylori* v blatu z encimsko imunsko metodo kot neodvisnim testom.

P - Signifikantnost korelacije z upoštevano razmejitevno vrednostjo α 0,05.

	ρ	P	N
HP-DihT	0,661	<0,0001	107
HP-IgG	0,456	0,0146	104
HP-IgA	0,239	<0,0001	104

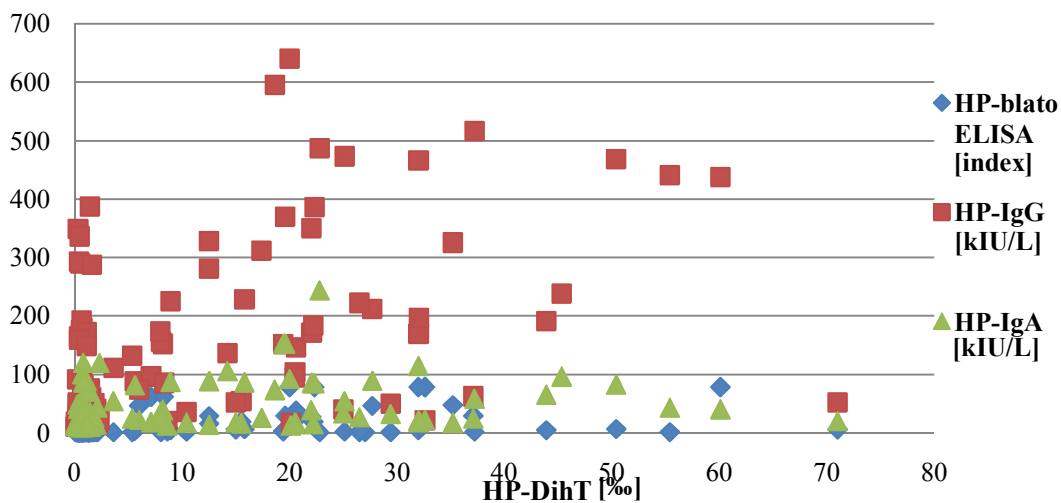
Odlične korelacije med testi nismo ugotovili. Statistično signifikantna »zmerna do dobra« korelacija obstaja med dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in semikvantitativnim testom določitve antigenov *H. pylori* v blatu z ELISA metodo (HP-blato ELISA). Ugotovili smo statistično signifikantno »zmerno« korelacijo med dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in določitvijo antigena IgG v serumu (HP-IgG) ter statistično signifikantno »slabo« korelacijo med dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in določitvijo antigena IgA v serumu (HP-IgA). Med semikvantitativnim testom določitve antigenov *H. pylori* v blatu z ELISA metodo in določitvijo antigena IgA v serumu ni korelacije.

S Passing-Bablokovim regresijskim testom smo preverili linearnost med metodami.

Rezultati so zbrani v tabeli [Tabela VII-VII](#). Linearno zvezo med metodama smo dokazali med dihalnim testom s sečnino in določitvijo IgG protiteles.

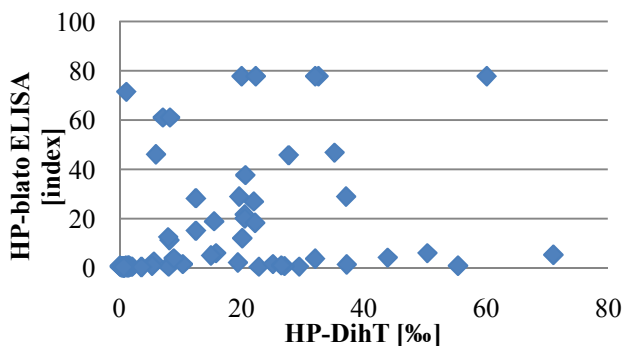
Tabela VII: Passing-Bablokov test linearnosti med metodami in dihalnim testom s sečnino.

	enačba regresijske premice	P
HP-blato ELISA	$y = -0,2045 + 2,0455 \cdot x$	<0,05
HP-IgG	$y = 0,09481 + 0,04635 \cdot x$	>0,1
HP-IgA	$y = -1,1889 + 0,1556 \cdot x$	<0,01

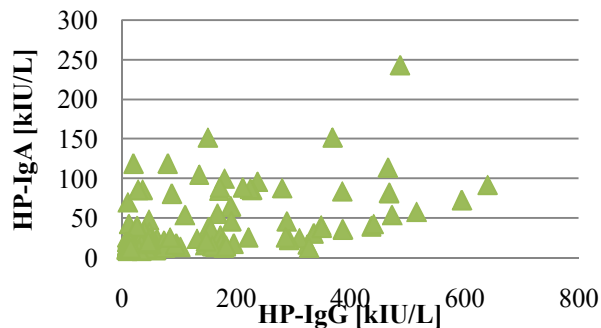


Slika 19: Korelacijski graf med dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) ter serumskimi imunoglobulini IgG (HP-IgG), IgA (HP-IgA) in semikvantitativno določitvijo antigena *H. pylori* v blatu (HP-blato ELISA).

Glede na literaturne podatke, da je mogoče uporabiti določitev antigena *H. pylori* v blatu namesto dihalnega testa s sečnino, smo korelacijo med njima grafično prikazali na sliki 20.



Slika 20: Korelacijski graf med dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in semikvantitativno določitvijo antigena *H. pylori* v blatu (HP-blato ELISA).



Slika 21: Korelacijski graf med serumskimi imunoglobulini proti *H. pylori* IgG (HP-IgG) in IgA (HP-IgA).

Imunoglobulini IgG in IgA se običajno določajo sklopljeno, zato smo preverili ali obstaja zveza tudi med njima v grafu na sliki 21. S Passing-Bablokovim testom linearnosti lahko opišemo linearno zvezo med metodama z enačbo $y = 11,7591 + 0,1241 \cdot x$, $P > 0,10$.

Ujemanje med pozitivnimi in negativnimi rezultati opazovanih testov smo ovrednotili s Cochranovim Q testom. Ta test primerja med seboj pare rezultatov, zato se iz statističnega vrednotenja izločijo vsi vzorci z manjkajočim rezultatom. Delež pozitivnih rezultatov

glede na skupino 61 vzorcev je zbran v tabeli [Tabela VIII](#), kjer smo navedli tudi kateri testi se med seboj signifikantno razlikujejo ($P < 0,005$).

Formatted
spelling on

Tabela VIII: Delež pozitivnih rezultatov glede na skupino 61 parov vzorcev po Cochranovem Q testu.

	ŠTEVILO POZITIVNI / NEGATIVNI	DELEŽ POZITIVNIH [%]	SIGNIFIKANTNA RAZLIKA Z
HP-DihT	25/36	41,0	HP-IgG, HP-IgA
HP-blato ELISA	24/37	39,3	HP-IgG, HP-IgA
HP-blato 1	21/40	34,4	HP-IgG, HP-IgA
HP-blato 2	32/29	52,5	HP-Slina
HP-Slina	12/49	19,7	HP-IgG, HP-IgA, HP-blato 2
HP-IgG	43/18	70,5	HP-DihT, HP-blato ELISA, HP-blato 1 HP-Slina
HP-IgA	41/18	67,2	HP-DihT, HP-blato ELISA, HP-blato 1 HP-Slina

Rezultati dihalnega testa s sečnino in semikvantitativnega testa določitve antigenov *H. pylori* v blatu z ELISA metodo se najmanj razlikujejo. Statistično ni signifikantne razlike med njima. Razliko med testi smo določili z McNemarovim testom in ugotovili, da je razlika med:

- dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in semikvantitativnim testom določitve antigenov *H. pylori* v blatu z ELISA metodo (HP-blato ELISA) 5,61 % ($P=0,0703$);
- dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in kvalitativnim hitrim testom HP-blato 1 7,41 % ($P=0,1671$);
- dihalnim testom s sečnino (HP-DihT) in kvalitativnim hitrim testom HP-blato 2 3,91 % ($P=0,4049$);
- semikvantitativnim testom določitve antigenov *H. pylori* v blatu z ELISA metodo (HP-blato ELISA) in kvalitativnim hitrim testom HP-blato 1 2,67 % ($P=0,7266$).

4.3. USPEŠNOST ERADIKACIJSKE TERAPIJE

22 pacientov, ki so po eradikacijski terapiji ponovno prišli na klinično-laboratorijski pregled, smo vključili v evalvacijo za učinkovitost uporabljene terapije. Med njimi je bilo 17 žensk in 5 moških mediane starosti 48 (16 – 78) let.

Vsi pacienti so bili zdravljeni za s HUT dokazano okužbo s *H. pylori* ob gastrokopskem pregledu. V 18 primerih je bila uporabljena klasična trotirna eradikacijska terapija, ki je bila v 12 primerih predpisana za čas 1 tedna ter v dveh primerih po 10 dni in 14 dni. V 4 primerih ni bilo uporabljeno zdravljenje po priporočenih shemah Slovenskega združenja za gastroenterologijo in hepatologijo; v dveh primerih sta bila predpisana klaritromicin in amoksicilin brez ZPČ, v enem primeru ZPČ s klaritromicinom ter v enem primeru le ZPČ. Največkrat se je kot trotirna terapija predpisala kombinacija ZPČ s klaritromicinom in amoksicilinom (11/18), manjkrat pa shema z ZPČ, klaritromicinom in metronidazolom (5/18). V dveh primerih je bil poleg ZPČ in amoksicilina predpisan cefalosporinski oziroma tetraciklinski antibiotik.

V 7 primerih je bilo zdravljenje s terapijo prvega reda neuspešno. Za zdravljenje drugega reda se je v petih primerih uporabila trotirna terapija z zamenjavo makrolidnega antibiotika (klaritromicina) z amoksicilinom ali metronidazolom ali florokinolinskim (levofloksacin) antibiotikom. V enem primeru se je kot sekundarno zdravljenje uporabil le levofloksacin brez kombinacije drugih zdravil. V treh primerih (3/7) je bilo sekundarno zdravljenje glede na rezultate dihalnega testa s sečnino uspešno.

Zaradi majhnega števila opazovanih primerov (pod 30) in ne-Gaussovo porazdelitvijo rezultatov smo za statistično ovrednotenje signifikantnosti spremembe laboratorijskega testa med prvim in kontrolnim obiskom uporabili Wilcoxonov test s stopnjo signifikantnosti α 0,05. Rezultate smo zbrali v tabeli [Tabela IXX](#).

Tabela IX: Število primerov pri katerih smo zaznali znižanje vrednosti laboratorijskega testa med prvim in kontrolnim pregledom pri 22 pacientih, za katere je bila shema zdravljenja znana. Rezultati so predstavljeni glede na skupno število opazovanih primerov (N).

P - Signifikantnost razlike med prvim in kontrolnim obiskom.

	št. / N	P
HP-DihT	18 / 20	0,0002
HP-blato ELISA	10 / 11	0,0049
HP-blato 1	5 / 11	0,0625
HP-blato 2	11 / 14	0,0010
HP-Slina	1 / 2	/
HP-IgG	11 / 16	0,0654
HP-IgA	10 / 16	0,1205

Med rezultati določitve serumskih protiteles proti *H. pylori* smo opazili znižanje vrednosti, vendar ne pod razmejitveno mejo, pri vseh 11 primerih za IgG ter v 4 primerih pri IgA.

Le v 4 primerih (od 7) smo lahko spremljali uspešnost ponovljene eradikacijske terapije z laboratorijskimi testi: le v enem primeru se je pokazala zamenjava makrolidnega antibiotika z nitroimidazolnim uspešna, v ostalih treh primerih ni bilo mogoče določiti uspešnost eradikacije z opravljenimi laboratorijskimi testi. Statistično smo potrdili razliko med rezultati med prvim in kontrolnim pregledom za dihalni test s sečnino, semikvantitativno določitvijo antigena v blatu z ELISA metodo in kvalitativno določitvijo antigena v blatu s HP-blato 2 metodo.

Zaradi majhnega števila preiskovancev v opazovani skupini smo pregled uspešnosti eradikacije razširili na vseh 42 pacientov mediane starosti 48 (16 – 78) let, ki so prišli na vsaj še en kontrolni pregled. Glede na to, da smo za vse paciente iz te skupine imeli podatek o potrjeni okužbi s *H. pylori* z vsaj enim od treh testov zlatega standarda, smo pregledali, ali je prišlo do signifikantnega upada vrednosti posameznega laboratorijskega testa med prvim in kontrolnim pregledom. Uporabili smo t-test parov za parametrične rezultate (HP-DihT, HP-blato 1, HP-blato 2, HP-Slina, HP-IgG) in Wilcoxonov test za neparametrične teste (HP-blato ELISA, HP-IgA) s stopnjo signifikantnosti α 0,05.

Rezultate smo zbrali v tabeli [Tabela XX](#) in primerjali ugotovitve s skupino 22 pacientov opisanih v tabeli [Tabela XIX](#).

Tabela X: Število primerov pri katerih smo zaznali znižanje vrednosti laboratorijskega testa med prvim in kontrolnim pregledom pri 42 pacientih, za katere sheme zdravljenja nismo poznali pri vseh primerih. Rezultati so predstavljeni glede na skupno število opazovanih primerov (N).

P – Signifikantnost razlike med prvim in kontrolnim obiskom.

	št. / N	P
HP-DihT	25 / 33	0,0001
HP-blato ELISA	7 / 10	0,0015
HP-blato 1	7 / 13	0,0625
HP-blato 2	15 / 17	0,0005
HP-Slina	2 / 3	/
HP-IgG	27 / 34	0,0569
HP-IgA	26 / 34	0,1167

Rezultati iz skupine 42 pacientov, za katere sheme zdravljenja nismo poznali pri vseh primerih, se skladajo z ugotovitvami na manjši skupini.

V študiji, kjer so opazovali uspešnost eradikacije *H. pylori* z dihalnim testom, so dokazali 71,2 % uspešnost zdravljenja s trotirno terapijo (51). Njihove ugotovitve so bile osnovane na 132 bolnikih, ki so imeli narejen dihalni test s sečnino na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo med leti 2001 in 2009 in so za njih dobili podatke o predpisanem zdravljenju. Naši rezultati potrjujejo ugotovitve raziskave (51), čeprav je bila opazovana skupina bolnikov manjša (22 oziroma 42).

Tudi po navedbah iz literature je uspešnost zdravljenja s trotirno terapijo do 80 % oziroma v nekaterih Evropskih državah tudi pod 70 % (18). V naši nalogi smo dokazali uspešnost trotirne terapije med 70 in 75 % (podatki iz tabele [Tabela XX](#)), kar opozarja na iskanje drugih bolj učinkovitih shem zdravljenja. Uspešnost sekvenčnega zdravljenja in širitirnega zdravljenja bi se lahko uporabili kot terapija prvega izbora, kot so to povzele nekatere druge države, vendar je za spremembo Slovenskih priporočil bilo potrebno počakati na rezultate prospektivne multicentrične raziskave Slovenskega združenja za gastroenterologijo in hepatologijo, objavljene junija 2016 (52). Prikazano je bilo, da je

uspešnost eradikacije v Sloveniji 83,6 % za trotirno terapijo, 94,2 % pri sekvenčnem zdravljenju in 91,7 % pri uporabi štiriterne terapije. Uporaba štiriterne terapije je bila boljše izbira v primerih, ko je bila prisotna rezistenca na klaritromicin (52). Z uspešnejšo terapijo dosežemo manjše število neuspešnih eradikacijskih zdravljenj in zato manjkrat obremenimo bolnika z dodatnimi antibiotičnimi pripravki in s tem zmanjšamo možnost nastanka rezistence bakterij na antibiotike. Zato v prihodnje pričakujemo dopolnitev Slovenskih priporočil za zdravljenje okužbe s *H. pylori*.

V Sloveniji velja priporočilo, da prvo zdravljenje s trotirno terapijo (ZPČ, klaritromicin, metronidazol) traja 1 teden (5), medtem ko so nekatere države podaljšale trajanje prvega zdravljenja na 14 dni. V opazovani skupini obravnavanih pacientov je 16 bolnikov prejelo trotirno terapijo 1 teden, 4 10 dni in v 2 primerih 14 dni. S podaljšanjem časa trajanja terapije se poveča tudi uspešnost eradikacije (17, 25, 27), vendar se hkrati obremeni bolnika z antibiotiki in omogoči bakterijam razvoj rezistence.

Uspešnost zdravljenja se ugotavlja z dihalnim testom s sečnino ali z določitvijo *H. pylori* antigena v blatu po 4 tednih po zaključku terapije (5). V našem primeru so bili pacienti napoteni na ponovitev laboratorijskih preiskav v povprečju po 8 tednih. Preverjanje uspešnosti eradikacije je pomembno, saj v prvem letu po zdravljenju lahko pride do ponovitve okužbe. Ocenjujejo, da se okužba ponovi v 3,4 % v razvitem svetu in v 8,7 % v nerazvitem svetu; običajno kot posledica predpisovanja manj učinkovite terapije (ali samo ZPČ ali v kombinaciji z enim antibiotikom) in ne kot posledica nove okužbe (53).

Iz ugotovitev lahko zaključimo, da lahko z dihalnim testom s sečnino in semiavtomatizirano metodo določitve antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom s statistično zanesljivostjo spremljamo uspešnost zdravljenja okužbe s *H. pylori*.

4.4. FINANČNI VPOGLED V KLINIČNO LABORATORIJSKO DIAGNOSTIKO OKUŽBE S *H. PYLORI*

Endoskopija je invazivna metoda, neprijetna za pacienta in draga. Študije so pokazale, da je pristop »testiraj in zdravi«, ki se izvede že na primarni zdravstveni ravni pri pacientih pod 45 let z dispepsijo brez komplikacij, varen in učinkovit pristop klinične obravnave

(19 , 42). S tem se lahko zmanjša število dragih endoskopij tudi za 62 % (19). Nedvomno pristop »išči in zdravi«, ko pacient pristopi h gastroenterologu, je neizogiben pri pacientih z dispepsijo nad 45 let ali ob prisotnosti alarmantnih kliničnih znakov (42).

»Testiraj in zdravi« pomeni, da se pacienta testira z enim ali kombinacijo dveh neinvazivnih diagnostičnih testov za dokaz okužbe s *H. pylori* in ob pozitivnem rezultatu se uvede eradikacijska terapija brez napotitve h gastroenterologu (5 , 42). Preverili smo, kolikšen je strošek obravnave pacienta z gastroskopijo v Sloveniji v primerjavi z uporabo dveh neinvazivnih testov s pristopom »testiraj in zdravi« ter jih primerjali s podatki iz literature. V tabeli **Tabela XIXI** smo zbrali podatke za cene posegov in laboratorijskih preiskav v Kliničnem centru Ljubljana ter jih primerjali z navedbami v literaturi.

Tabela XI: Statistični opis metod za določanje okužbe s *H. pylori*.

	CENA [€]	
	SLOVENIJA	
	(Univerzitetni klinični center Ljubljana) (54)	LITERATURA (19)
gastroskopija	302,66	594,57
biopsija s HUT		
HP-DihT	60,89	97,78
HP-blato ELISA	22,80	65,56
HP-IgG	13,19	42,00
HP-IgA	13,19	

V literaturi navajajo, da je strošek obravnave pacienta po pristopu »testiraj in zdravi« skoraj za polovico manjši (302,46 €) kot je cena gastroskopije (19). V našem primeru je cena za testiranje skupaj z dihalnim testom s sečnino in določitvijo antigena *H. pylori* v blatu skoraj 4-krat nižja od cene gastroskopije s HUT.

Kljub temu, da so serološki testi IgG in IgA ter hitri testi ob pacientu za določitev antigena *H. pylori* v blatu cenovno še dostopnejši od dihalnega testa s sečnino in laboratorijske določitve antigena *H. pylori* v blatu, sta slednja zaradi višje natančnosti stroškovno bolj učinkovita pri obravnavi pacienta (19), zato se dandanes v klinično-laboratorijski obravnavi serološka testa IgG in IgA za namen opredelitve okužbe s *H. pylori* opuščata.

Formatted
spelling on

Tudi mednarodne skupine gastroenterologov (European Society for Primary care Gastroenterology, Maastricht 4 Consensus Report, American Gastroenterological Association) so podale smernice za pristop »testiraj in zdravi« za paciente pod 45 ali 55 let in brez prisotnih alarmantnih znakov kot so anemija, izguba teže, disfagija, otipljiva zatrdlina ali malabsorpcija (5, 19). Kljub smernicam ne smemo spregledati slabosti strategije »testiraj in zdravi«, saj se velikokrat zdravi bolnike z dispepsijo, katerim znaki po zdravljenju ne izzvenijo. Poleg tega se ob večji uporabi antibiotikov večja tudi rezistenca bakterij. Slaba stran pristopa »išči in zdravi« so visoki stroški za diagnostične namene ter podaljševanje čakalnih dob za gastrokopijo. Gastroenterologi so na konferenci leta 1998 sprejeli konsenz, da kljub ekonomskim in mednarodnim priporočilom bolnike s težavami podvržejo endoskopiji in ciljano zdravijo (5).

V nalogi bi opozorili na prakso, da je pozitiven HUT test zadostno merilo za uvedbo eradikacijske terapije (7). V naši nalogi postavljamo to priporočilo pod vprašaj, saj smo med 70 pacienti, za katere smo imeli podane rezultate metod zlatega standarda (histologija, HUT in dihalni test s sečnino), imeli 4 primere, ko je bil HUT pozitiven, medtem ko rezultat histološkega pregleda in ostalih neinvazivnih testov niso potrdili okužbe s *H. pylori*. Ali se v takih primerih predpiše eradikacijska terapija ali je potrebno opraviti še dodaten test za potrditev okužbe? Zasedili smo tudi primere (niso vključeni v nalogi), ko je bil HUT negativen, dihalni test s sečnino pa je pokazal obsežno okužbo s *H. pylori*. Nedvomno bi bilo za potrditev okužbe priporočljivo uporabiti ob diagnostiki z invazivnimi metodami tudi neinvazivno.

Strateško prednost pri obravnavi okužbe s *H. pylori* lahko predstavlja tudi presejevanje populacije v obdobju med 20 in 30 letom starosti. S tem bi se lahko ugotovila asimptomatska, skrita okužba, ki bi se lahko kasneje razvila v za zdravstvo obremenjujoče bolezni (kronični atrofični gastritis in metaplazije želodca) in ulkusne razjede. Ocenjujejo, da je tak program sicer finančno obremenjujoč v prvih letih izvedbe, vendar bi se v desetih letih zmanjšalo število gastrokopij ter dragega zdravljenja metaplastičnih obolenj želodca. Priporočila za presejanje in zdravljenje je Slovensko združenje za gastroenterologijo in hepatologijo sprejelo že leta 2009, medtem ko je Evropsko združenje za raziskavo *H. pylori* vključilo priporočila za presejevanje v Maastricht IV smernicah leta 2012 (18).

SKLEPI

Najboljše rezultate za opis diagnostičnih lastnosti za opredelitev okužbe s *H. pylori* smo dobili pri semiavtomatiziranem določanju antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom, najslabše pa pri določanju ureazne aktivnosti v slini.

Dokazali smo, da je metoda semiavtomatizirane določitve antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom primerljiva z dihalnim testom s sečnino, ki se trenutno uporablja pri odkrivanju in spremljanju zdravljenja okužbe s *H. pylori*.

Uporaba hitrih testov za kvalitativno določitev antigena *H. pylori* v blatu, test ureazne aktivnosti v slini ter opredelitev titra protiteles IgG in IgA niso metode prvega izbora za spremljanje zdravljenja okužbe s *H. pylori*, so pa zaradi njihove enostavnosti in nizke cene uporabni pri presejevanju in epidemioloških študijah ali v kombinaciji z dihalnim testom s sečnino ali semiavtomatizirano določitvijo antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom pri odkrivanju okužbe s *H. pylori*.

Statistično smo potrdili, da so dihalni testi s sečnino, semikvantitativna določitev antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom in kvalitativna določitev antigena v blatu HP-blato 1 ustrezni za spremljanje zdravljenja okužbe s *H. pylori*.

Med dihalnim testom s sečnino in semiavtomatizirano metodo za določitev antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom smo dokazali, da korelacija med metodama obstaja.

Dokazali smo, da se za zdravljenje okužbe s *H. pylori* največkrat uporablja klasična trotirna terapija, ki zajema kombinacijo zaviralca protonske črpalke in dveh antibiotikov. Ponovitev zdravljenja je bila potrebna le v posameznih primerih, kjer se je za uspešno pokazala zamenjava makrolidnega antibiotika iz klasične trotirne terapije z nitroimidazolnim antibiotikom.

Iz rezultatov naše naloge predlagamo, da se metoda semiavtomatizirane določitve antigena *H. pylori* v blatu z encimsko imunskim testom uporablja enakovredno kot dihalni test s sečnino za odkrivanje in spremljanje zdravljenja okužbe s *H. pylori*.

LITERATURA

1. Kienesberger S, Cox LM, Livanos A, Zhang XS, Chung J, Perez-Perez GI, Gorkiewicz G, Zechner EL, Blaser MJ. Gastric *Helicobacter pylori* Infection Affects Local and Distant Microbial Populations and Host Responses. *Cell Rep.* 16. Feb 2016, *Zv.* 14, 6, str. 1395-407.
2. Walker MM, Talley NJ. Review article: bacteria and pathogenesis of disease in the upper gastrointestinal tract--beyond the era of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* Apr 2014, *Zv.* 39 (8), str. 767-79.
3. Webb PM, Knight T, Greaves S, Wilson A, Newell DG, Elder J, Forman D. Relation between infection with *Helicobacter pylori* and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life. *BMJ.* Mar 1994, *Zv.* 19 308(6931), str. 750-3.
4. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature.* 22. Feb 2007, *Zv.* 445 (7130), str. 915-8.
5. Markovič S, Štabuc B. Bolezni na želodcu in dvanajstniku. [avt. knjige] Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M Košnik M. *Interna medicina.* Ljubljana : Založba Littera Picta, d. o. o.; Slovensko medicinsko društvo, 2011, str. 535-59.
6. De Falco M, Lucariello A, Iaquinto S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular Mechanisms of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *J Cell Physiol.* Aug 2015, *Zv.* 230 (8), str. 1702-7.
7. Tonkic A, Tonkic M, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* Sep 2012, *Zv.* 17 Suppl 1, str. 1-8.
8. Axon A. *Helicobacter pylori* and public health. *Helicobacter.* Sep 2014, *Zv.* 19 Suppl 1, str. 68-73.
9. Allegretti N et all. *Medicinska fiziologija.* [avt. knjige] Guyton CA. *Textbook of medical physiology.* 4. hrvatsko izdanje. Beograd - Zagreb : W. B. Saunders Company, 1976, str. 861-914.
10. Hill PG, Path FRC. Gastric, Pancreatic, and Intestinal Function. [avt. knjige] Ashwood E R, Bruns D E Burtis C A. *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics.* 5th. s.l. : Elsevier Inc., 2012, 51, str. 1695-732.
11. Tepeš B. *Helicobacter pylori.* *Krka Med. Farm.* 1999, *Zv.* 20, Suppl 1.
12. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Washington (DC) : ASM Press, 2001. Bookshelf ID: NBK2468.
13. Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol.* Feb 2004, *Zv.* 6 (2), str. 143-54.

-
14. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* Mar 2002, *Zv.* 16 Suppl.1, str. 16–23.
 15. Appelmelk BJ, Monteiro MA, Martin SL, Moran AP, Vandenbroucke-Grauls CM. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol.* Dec 2000, *Zv.* 8(12), str. 565-70.
 16. Wadström T, Hirno S, Borén T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther.* Apr 1996, *Zv.* 10 Suppl 1, str. 17-27.
 17. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* Aug 2007, *Zv.* 102(8), str. 1808-25. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology.
 18. Tepeš B. *Helicobacter pylori* – priporočila za zdravljenje, diagnostika, rezistenca, kancerogeneza, rak želodca. *Gastroenterolog.* 2013, *Zv.* 17 Suppl.1, str. 5-10.
 19. Thomas R, De Sousa JC. Screening for *Helicobacter pylori*. *Rev Port Clin Geral.* 2006, *Zv.* 22, str. 585–9.
 20. Mičetić Turk D, Urlep D, Krajnc M, Knehtl M. Diagnostična vrednost neinvazivnih testov pri okužbi s *Helicobacter pylori* v otroški dobi. *Med razgl.* 2006, *Zv.* 45, str. 79–89.
 21. Calvet X, Lehours P, Lario S, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* Sep 2010, *Zv.* 15 Suppl 1, str. 7-13.
 22. Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* Sep 2014, *Zv.* 19 Suppl 1, str. 6-10.
 23. Yang BL, Yeh C, Kwong WG, Lee SD. A novel one-step *Helicobacter pylori* saliva antigen test. *J Chin Med Assoc.* Feb 2015, *Zv.* 78 (2), str. 96-100.
 24. Stenström B, Mendis A, Marshall B. *Helicobacter pylori*--the latest in diagnosis and treatment. *Aust Fam Physician.* Aug 2008, *Zv.* 37 (8), str. 608-12.
 25. O'Connor A, Vaira D, Gisbert JP, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2014. *Helicobacter.* Sep 2014, *Zv.* 19 Suppl 1, str. 38-45.
 26. Tepeš B, Štabuc B. Priporočila Slovenskega združenja za gastroenterologijo in hepatologijo za zdravljenje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*. *Zdrav Vestn.* Sept 2011, *Zv.* 80, str. 647-56.
 27. Sierra F, Forero JD, Rey M. Ideal treatment for *Helicobacter pylori*: a systematic review. *Rev Gastroenterol Mex.* Jan-Mar 2014 Jan-Mar, *Zv.* 79 (1), str. 28-49.
 28. D'Elis MM, Czinn SJ. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* Sep 2014, *Zv.* 19 Suppl 1, str. 19-26.
 29. Sutton P, Lee A. Review article: *Helicobacter pylori* vaccines--the current status. *Aliment Pharmacol Ther.* Sep 2000, *Zv.* 14 (9), str. 1107-18.
 30. Murali MR, Naveen SV, Son CG, Raghavendran HRB. Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some commonly known natural products: bench to bedside. *Integr Med Res.* 2014, *Zv.* 3 (3), str. 111-8.
-

-
31. Patel A, Shah N, Prajapati JB. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection--a brief review. *J Microbiol Immunol Infect.* Oct 2014, *Zv.* 47 (5), str. 429-37.
32. Modolo LV, de Souza AX, Horta LP, Araujo DP, de Fátima Â. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. *J Adv Res.* Jan 2015, *Zv.* 6 (1), str. 35-44.
33. Navodila proizvajalca *Helicobacter pylori* Quick Test, BIOHIT OYJ (Finska). <http://www.biohithealthcare.com>.
34. Navodila proizvajalca *Helicobacter Test INFAI*. [Elektronski] INFAI UK Ltd. <http://www.infai.co.uk/products/helicobacter.php>.
35. Navodila proizvajalca *Helicobacter Test INFAI*. http://www.infai.co.uk/documents/en_6p_web.pdf.
36. Navodila proizvajalca LIAISON *H. pylori* Stool Test; Dia Sorin. www.diasorin.com.
37. Navodila proizvajalca DIMA Gesellschaft für Diagnostika mbH, Inc: *Helicobacter pylori* Ag. Rapid test for the detection of *H. pylori* antigen in human stool samples. Goettingen : s.n., 2010.
38. Navodila proizvajalca Vegal Farmaceutica S.L., Inc: H&R *H. pylori*. One step *H. pylori* Antigen Test Device. Madrid : s.n., 2007.
39. Navodila proizvajalca dBest One Step *H. pylori* Saliva Test Disk For Saliva or Endoscopy Biopsy. Jan 2008.
40. Navodila proizvajalca Orion Diagnostica, Pyloriset EIA-A III. May 2007.
41. Linnet K, Boyd JC. Selection and Analytical Evaluation of Methods—With Statistical Techniques. [avt. knjige] Ashwood ER, Bruns DE, Burtis CA. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 5th. s.l. : Elsevier Inc., 2012, 2, str. 7-48.
42. Osredkar J. Dihalni test s sečnino - njegovo mesto v diagnostiki. *Zdrav vestn.* Jan 2004, *Zv.* 73 (1), str. 13-17.
43. Bergey B, Marchildon P, Peacock J, Mégraud F. What is the role of serology in assessing *Helicobacter pylori* eradication? *Aliment Pharmacol Ther.* 15. Sep 2003, *Zv.* 18 (6), str. 635-9.
44. Ramírez-Lázaro MJ, Lite J, Lario S, Pérez-Jové P, Montserrat A, Quílez ME, Martínez-Bauer E, Calvet X. Good diagnostic accuracy of a chemiluminescent immunoassay in stool samples for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia. *J Investig Med.* Feb 2016, *Zv.* 64 (2), str. 388-91.
45. Abdel-Salam Ibrahim E, Abdel-Moghny Moustafa M, Monis W. Comparison between phenol red chromo-endoscopy and a stool rapid immunoassay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in patients with gastritis. *J Microsc.* Dec 2015, *Zv.* 3 (4), str. 175–180.
46. Lee YC, Tseng PH, Liou JM, Chen MJ, Chen CC, Tu CH, Chiang TH, Chiu HM, Lai CF, Ho JC, Wu MS. Performance of a one-step fecal sample-based test for diagnosis of *Helicobacter pylori*
-

infection in primary care and mass screening settings. *J Formos Med Assoc.* Dec 2014, Zv. 113 (12), str. 899-907.

47. Mégraud F, Bessède E, Lehours P. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* Sep 2014, Zv. 19 Suppl 1, str. 6-10.

48. Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergey B, Barberis C, Talby P, Roux D, Shouler L, Goldfain D, Lamouliatte H, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol.* Feb 2001, Zv. 96 (2), str. 353-8.

49. Mrevlje Ž, Plut S, Jeverica S, Osredkar J, Stabuc B. Comparison of success rates of noninvasive and invasive methods in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* Sept 2012, str. 94. XXVth International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer.

50. Finderle P, Suhadolc K, Osredkar J. Determination of *Helicobacter pylori* antigen in stool in comparison to breath test. *Biochimica clinica, Abstracts of Scientific Sessions.* 19-23. May 2013, Izv. 37, spec. suppl. 20 th IFCC - EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 45 th Congress of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC), .

51. Fic A. Uspešnost eradikacije okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* merjene z dihalnim testom. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo. Ljubljana : s.n., 2010.

52. Tepeš B, Vujasinović M, Šeruga M, Stefanovič M, Forte A, Jeverica S. Randomized clinical trial comparing 10-day sequential, 7-day concomitant and 7-day standard triple therapies for *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* Jun 2016, Zv. 28 (6), str. 676-83.

53. Gisbert JP, Luna M, Gómez B, Herrerías JM, Monés J, Castro-Fernández M, Sánchez-Pobre P, Cosme A, Olivares D, Pajares JM. Recurrence of *Helicobacter pylori* infection after several eradication therapies: long-term follow-up of 1000 patients. *Aliment Pharmacol Ther.* Mar 2006, Zv. 23 (6), str. 713-9.

54. Cenik storitev UKC Ljubljana. 17. 05 2016. Zv. 69. TAB UKCL EP 0002.