

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA OZMEC

PRIMERJAVA RAZLIČNIH NEINVAZIVNIH TESTOV ZA
ODKRIVANJE OKUŽBE S HELICOBACTER PYLORI

COMPARISON OF THE DIFFERENT NONINVASIVE TESTS
FOR DETECTING THE INFECTION WITH HELICOBACTER
PYLORI

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika. Dihalni test s sečnino in ostale neinvazivne teste so opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani.

Zahvaljujem se mentorju za pomoč pri pisanju diplomske naloge in mojim staršem za podporo skozi celotni študij.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

Diplomantov lastnorocni podpis

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK IN TABEL	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1 ŽELODEC	2
1.1.1 ZGRADBA ŽELODCA IN DVANAJSTNIKA TER FUNKCIJA ŽELODCA	2
1.1.2 ŽELODČNA SEKRECIJA IN IZLOČANJE ŽELODČNE KISLINE	4
1.1.3 IZLOČANJE VAROVALNE SLUZI	6
1.1.4 POGOSTEJŠE BOLEZNI ŽELODCA IN DVANAJSTNIKA	7
1.1.4.1 Gastritis	7
1.1.4.2 Akutni gastritis	7
1.1.4.3 Kronični gastritis	7
1.1.4.4 Gastritis s <i>H. pylorijem</i>	7
1.1.4.5 Peptična razjeda	8
1.1.4.6 Razjeda na dvanajstniku	8
1.1.4.7 Razjeda na želodcu	8
1.2 HELICOBACTER PYLORI	8
1.2.1 UVOD	8
1.2.2 LASTNOSTI HELICOBACTER PYLORI	8
1.2.3 EPIDEMIOLOGIJA	11
1.2.4 PRILAGODITVENI MEHANIZMI BAKTERIJE IN MOŽNI IZHODI OKUŽBE	12
1.2.5 PATOGENEZA	13
1.2.6 ZDRAVLJENJE H. PYLORI INFEKCIJE	14
1.2.6.1 SVETOVNA PRIPOROČILA	16
1.2.6.2 KAKO ZDRAVITI OKUŽBO V SLOVENIJI	17
1.2.7 RAZLOGI ZA NEUSPEH ZDRAVLJENJA	18
1.2.7.1 Slabo sodelovanje bolnika	19
1.2.7.2 Odpornost <i>H. pylori</i> na antibiotike	19
1.2.7.3 Odpornost <i>H. pylori</i> na antibiotike v Sloveniji	19
1.2.7.4 Nizek pH želodčnega soka	20
1.2.7.5 Velika količina bakterije <i>H. pylori</i>	20
1.2.7.6 Drugi redkejši vzroki za neuspeh zdravljenja	21
1.2.8 DIAGNOSTIKA	22
2. NAMEN DELA	26

3. MATERIALI IN METODE DE LA	27
3.1 PRIDOBIVANJE PODATKOV	27
3.2 PROUČEVANE DIAGNOSTIČNE METODE	27
3.2.1 DIHALNI TEST S SEČNINO	27
3.2.2 ANTIGEN V BLATU	34
3.2.2.1 H&R Helicobacter pylori v blatu- test za določanje Helicobacter pylori antigena na testni ploščici	34
3.2.2.2 DIMA Helicobacter pylori v blatu	36
3.2.3 DOLOČEVANJE H. PYLORI UREAZE V SLINI	39
3.2.4 DOLOČEVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES IgG IN IgA PROTI H. PYLORI V SERUMU	41
3.2.4.1 Določevanje IgA protiteles proti H. pylori	41
3.2.4.2 Določevanje IgG protiteles proti H. pylori	44
3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	45
4. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	47
4.1 Rezultati neinvazivnih preiskav pacientov	47
4.1.1 Test H&R za določanje antigena v blatu	49
4.1.2 DIMA test za določanje H. pylori antigena v blatu	50
4.1.3 Določanje vrednosti IgG in IgA v serumu	51
4.1.4 Test določanja <i>H. pylori</i> v slini	52
4.2 Uspešnost ozdravitve in primerjava serologije in dihalnega testa s sečnino	53
5. RAZPRAVA	58
6. SKLEP	65
7. VIRI IN LITERATURA	67

KAZALO SLIK IN TABEL

Slika 1 – Shematski prikaz želodca.....	2
Slika 2 – Endoskopski izgled antruma želodca in piloričnega kanala	3
Slika 3 – Shematski prikaz izločanja želodčne kisline v parietalni celici	5
Slika 4 – Bakterija <i>Helicobacter pylori</i> pod elektronskim mikroskopom	9
Slika 5 – Bakterija <i>Helicobacter pylori</i> pod elektronskim mikroskopom	9
Slika 6 – Ultra tanki preseki sevov <i>H. pylori</i>	10
Slika 7 – Možni izidi okužbe z bakterijo <i>H. pylori</i>	14
Slika 8 – Test INFAI	28
Slika 9 – Pot sečnine pri okuženih po zaužitju	29
Slika 10 – Postopek testiranja dihalnega testa s sečnino.....	33
Slika 11 – Rezultati testa H&R	49
Slika 12 – Rezultati testa DIMA	50
Slika 13 – Rezultati testa v serumu IgG	51
Slika 14 – Rezultati testa v serumu IgA	52
Slika 15 – Rezultati testa v slini	52
Slika 16 – Uspešnost ozdravitve po eradikacijski terapiji.....	53
Slika 17 – Vrednosti posameznih neinvazivnih testov pri bolnikih, pred in po eradikacijski terapiji.....	55-57
Enačba I – Presnova ¹³ C sečnine z ureazo	28
Tabela I – Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antibiotikov za zdravljenje okužbe s <i>H. pylori</i> glede na pH želodčnega soka	20
Tabela II – Rezultati neinvazivnih preiskav pacientov, narejenih na KIKKB.....	47
Tabela III – Rezultati neinvazivnih preiskav pacientov, narejenih na KIKKB, ki so neinvazivne teste opravili večkrat.....	53
Tabela IV – Diagnostične vrednosti različnih neinvazivnih testov za odkrivanje okužbe s <i>H. pylori</i>	58

POVZETEK

Helicobacter pylori (*H. pylori*) povzroča okužbo, ki ima lahko različne posledice. Zato ima njeno zdravljenje in zgodnje odkrivanje velik pomen. Metode s katerimi lahko potrdimo okužbo s *H. pylori* so invazivne in neinvazivne diagnostične metode.

Z namenom ovrednotiti diagnostično uporabnost neinvazivnih testov, smo zbrali podatke o 103 pacientih v starosti od 11 do 86 let. Ugotavljali smo diagnostično vrednost (specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter natančnost) testu določanja antigena proti *H. pylori* v blatu, testu za identifikacijo *H. pylori* ureaze v slini ter testu za določanje vrednosti IgG in IgA v serumu. Dihalni test s sečnino smo vzeli kot zlati standard. Z njim smo preverili uspešnost zdravljenja okužbe pri bolnikih, ki so prišli na ponovno kontrolo po predpisani eradikacijski terapiji.

Na naši skupini pacientov smo odkrili, da je občutljivost H&R testa za določanje antigenov *H. pylori* v blatu 91,3 %, njegova specifičnost pa 80,5 %. Pozitivna napovedna vrednost je 72,41 %, negativna napovedna vrednost 94,29 % in natančnost 84,38 %. Boljšo diagnostično uporabnost smo ugotovili pri DIMA testu za določanje antigenov *H. pylori* v blatu. Njegova občutljivost je 92,86 %, njegova specifičnost pa 96,29 %. Pozitivna napovedna vrednost je 92,86 %, negativna napovedna vrednost 96,29 % in natančnost 95,12 %. Občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgG proti *H. pylori* je 97,29 %, njegova specifičnost 49,06 %. Pozitivna napovedna vrednost je 57,14 %, negativna napovedna vrednost 96,30 % in natančnost 68,89 %. Pri določanju protiteles IgA pa je občutljivost testa v serumu 67,57 % in njegova specifičnost 58,49 %. Pozitivna napovedna vrednost je 53,19 %, negativna napovedna vrednost 72,09 % in natančnost 62,22 %. Slabo diagnostično uporabnost pa je pokazal test za identifikacijo *H. pylori* ureaze v slini. Občutljivost testa v slini je 18,92 %, njegova specifičnost pa 85,45 %. Pozitivna napovedna vrednost je 46,67 %, negativna napovedna vrednost 61,04 % in natančnost 58,70 %. 39 pacientov od 103, ki so imeli pozitiven dihalni test s sečnino, smo povabili na ponovno testiranje. Takih, ki so prišli po eradikacijski terapiji na ponovni pregled, je bilo 19. Uspešnost zdravljenja ne glede na predpisano shemo je znašala 63,16 %.

Testi za določanje antigenov *H. pylori* v blatu se najbolj približajo zanesljivosti ter specifičnosti in občutljivosti dihalnega testa s sečnino. Vrednosti IgG in IgA protiteles so bile na ponovnem pregledu, po eradikacijski terapiji, še vedno pozitivne, vendar je njihova koncentracija padla. Uspešnost eradikacije pa je bila spodnji meji, kot smo pričakovali.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) causes an infection, that can have different effects. Treatment of *H. pylori* infection and early detection is of major importance. Methods which can confirm the *H. pylori* infection, are invasive and noninvasive diagnostic methods.

With the aim to evaluate diagnostic value of tests determining the antigen in stool samples and saliva, and IgG and IgA antibodies against *H. pylori* in serum, we selected information about 103 patients aged 11 to 86. We studied diagnostic value (specificity, sensitivity, positive and negative predictive value and accuracy) of test determining the antigen against *H. pylori* in saliva and faeces, the test for determining the levels of IgG and IgA antibodies in serum. Urea breath test was taken as a gold standard. With ¹³C urea breath test, we verified the effectiveness of treatment infection with patients, who have come to re-inspection after the prescribed eradication therapy.

In our patient population we detected, that the sensitivity of H&R test for detecting antigens of *H. pylori* in faeces is 91,3 % and specificity 80,5 %. Positive predictive value is 74,41 %, negative predictive value of 94,29 % and accuracy of 84,38 %. DIMA test for detecting *H. pylori* antigens in faeces showed better diagnostic value. Its sensitivity is 92,86 % and specificity is 96,29 % with positive predictive value of 92,86 %, negative predictive value of 96,29 % and accuracy of 95,12 %. Sensitivity of test in serum to determining IgG antibodies against *H. pylori* is 97,29 %, its specificity is 49,06 % with positive predictive value of 57,14 %, negative predictive value of 96,30% and accuracy of 68,89 %. In determining IgA antibodies against *H. pylori* sensitivity of the test is 67,57 %, and its specificity is 58,49 %. Positive predictive value is 53,19 %, negative predictive value is 72,09 % and accuracy is 62,22 %. Test determining *H. pylori* antigens in saliva showed poor diagnostic utility. Its sensitivity is 18,92 %, specificity is 85,45 %, with positive predictive value of 46,67 %, negative predictive value of 61,04 % and accuracy of 58,70 %. 39 of 103 patients, who had a positive urea breath test, were invited to do a retest. 19 patients came after the eradication therapy for its review. The eradication rate is 63,16 %, whatever the prescribes scheme was.

Tests for determining *H. pylori* antigens in stool samples are the closest to the reliability, specificity and sensitivity of urea breath test. Levels of IgG and IgA antibodies are on re-examination, after eradication therapy, still positive, but their concentration dropped. The eradication rate was in the lower limit, as we expected.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcH – acetilholin

ATP – adenzotriofosfat

CagA – citotoksični protein (rastnemu faktorju podobna snov)

CCK – holecistokinin

CLO -Campylobacter-like organism test (test Campylobacter-podobnim organizmov)

COX – ciklooksigenaza

DNA – deoksiribonukleinska kislina

H. pylori – *Helicobacter pylori*

HUT – hitri ureazni test

ECL – enterokromafinim celicam podobne celice

EGDS – ezofagogastroduodenoskopijo

ELISA (EIA) – (enzyme linked immunosorbent assay) encimski imunski test

GRP – (Gastrin-releasing peptide) gastrin sproščujoči hormon

IL – interlevkin

IRMS – (isotope ratio mass spectrometry) spektrometrična metoda določanja razmerja mase izotopov

IZ – interval zaupanja

KIKKB – klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

MALT – (Mucosa associated lymphoid tissue) nizkomaligni B-celičnim limfom želodca

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

NF – nukleizirajoči faktor

NSAID – (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) nesteroidna protivnetna zdravila

NSAR – nesteroidna antirevmatska zdravila

PCR – (Polymerase chain reaction) verižna reakcija s polimerazo

PG – prostaglandin

RNA – ribonukleinska kislina

Rp – recept

SPZ – spodnji požiralnikov zažemek

Th1/Th2 – imunski odgovor z celicami T – pomagalkami, tip 1 ali 2

UDT – urea dihalni test

Vac – vakuolizirajoči eksotoksin

ZPČ – zaviralec protonske črpalke

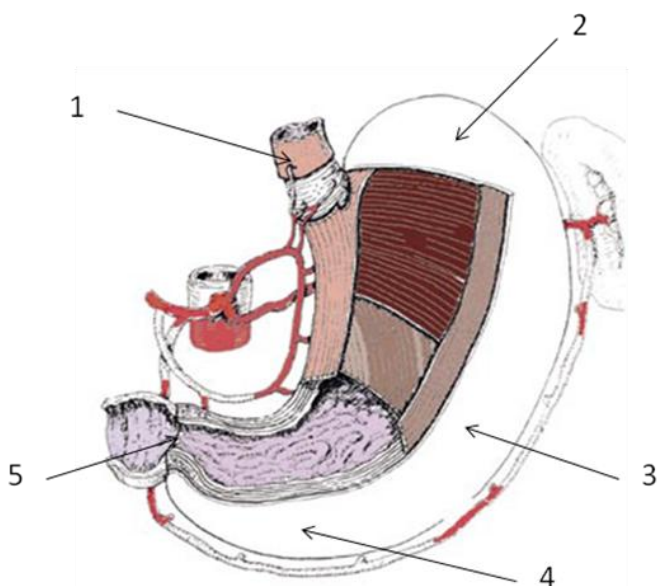
1.UVOD

Avstralca Barry Marshall in Robin Warren sta odkrila bakterijo *Helicobacter pylori* leta 1979. O odkritju sta poročala leta 1983 v reviji Lancet.(1) Ugotovila sta, da se pri polovici bolnikov z želodčno razjedo in gastritisom pojavljajo neznane vibaste bakterije.(2) Bakterijo sta poimenovala *Campylobacter pyloridis* in za odkritje leta 2005 dobila Nobelovo nagrado. Ime bakterije so glede na značilnosti mikroba kmalu spremenili v *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). (3,4) Z odkritjem *H. pylori* se je pričela v gastroenterologiji nova doba.(3,5) Kmalu so razvili laboratorijske teste za odkrivanje okužbe pri ljudeh. Med njimi je najbolj znan in diagnostično pomemben dihalni test.(4) Test temelji na encimski pretvorbi z radioizotopom ^{14}C ali izotopom ^{13}C označene sečnine v ogljikov dioksid in amoniak. Ker ima bakterija *H. pylori* od znanih bakterij v želodcu edina encim ureazo, velja test za specifičnega, dokaz z radioizotopom ^{14}C ali ^{13}C označenega CO_2 pa za patognomonični znak okužbe.(6) Praktično hkrati z ureaznim testom so razvili tudi teste za odkrivanje protiteles proti bakteriji *H. pylori* v krvi okuženih ljudi (7) in nekoliko pozneje še za odkrivanje antigena bakterije *H. pylori* v blatu.(8,9) Za odkritje okužbe pri dispeptičnih bolnikih trenutno priporočajo izvedbo dihalnega testa in določitev antigena v blatu, ponekod pa tudi ureazni test na bioptičnih vzorcih želodčne sluznice.(6,10) Določanje protiteles je smiselno v epidemioloških študijah in je za odkrivanje okužbe zaradi velike prekuženosti prebivalstva manj pomembno.(11) *H. pylori* ima najpomembnejšo vlogo pri patogenezi ulkusne bolezni dvanajstnika, želodca in pri kroničnem gastritisu, pomembno vlogo pri nizko malignem B limfomu tipa MALT in nastanku raka želodca, s čimer je povezan tudi pomen odstranitve te bakterije. Po podatkih iz literature ima do 95 % bolnikov z ulkusom dvanajstnika in do 75 % bolnikov z ulkusom želodca prisoten *H. pylori*. *H. pylori* je mikroaerofilna po Gramu negativna bakterija, dobro prilagojena življenju v kislem okolju, kakršno je v človeškem želodcu. Domneven način širjenja okužbe je fekalno-oralni, oralno-oralni, gastrooralni (možen prenos z gastroskopom). Študije pa poročajo tudi o tem, da je okužba pogostejša pri članih družine. Znano je, da je naravni rezervoar za *H. pylori* človeški želodec. Obstajajo tudi hipoteze, da je pomemben rezervoar okužbe lahko tudi ustna votlina: zobni plak, gingiva, slina. *H. pylori* so osamili v bioptičnih vzorcih želodčne sluznice, v blatu, slini, gingivi, zobnem plaku, najden je tudi pri aterosklerotičnem plaku aortne anevrizme in pri kolorektalnem raku. Epidemiološki dejavniki, kot so starost bolnikov, socialnoekonomski status in bivalne razmere so dejavniki tveganja za okužbo s *H. pylori*. Prisotnost bakterije lahko dokazujemo z različnimi invazivnimi in neinvazivnimi metodami.(12)

1.1 ŽELODEC

1.1.1 ZGRADBA ŽELODCA IN DVANAJSTNIKA TER FUNKCIJA ŽELODCA

Želodec služi za skladiščenje zaužite hrane, sočasno pa s sproščanjem encimov in klorovodikove kisline omogoča začetno razgradnjo beljakovin. Sproščanje želodčnih prebavnih sokov, ki ga sprožita vonj in okus hrane, poteka preko različnih želodčnih refleksnih krogov. Poznavanje delovanja želodca omogoča razumevanje nastanka večine želodčnih bolezní in razvoj različnih oblik njihovega zdravljenja.



Slika 1: Shematski prikaz želodca: 1 - požiralnik, 2 - fundus želodca, 3 - korpus želodca, 4 - antralni del želodca, 5 - pilorus

Želodec je vrečast organ, ki leži v zgornjem levem delu trebuha tik pod trebušno prepono (abdominalno diafrago). Leži vzdolž prebavne cevi med požiralnikom in dvanajstnikom. Po zaužitju večje količine hrane se lahko raztegne, kar omogoča skladiščenje hrane za obdobje večih ur. Zaužit grizljaj potuje kot bolus skozi požiralnik in vstopi v želodec skozi kardijo, stičišče med požiralnikom in želodcem, nad katero leži tudi spodnji požiralnikov zažemek (SPZ, angl.: *low esophageal sphincter*, LES). SPZ preprečuje vračanje želodčne vsebine med peristaltičnimi valovi želodca. Osrednji del želodca tvorijo svod ali fundus, telo ali korpus in del pred vratarjem ali antrum. V tem delu se hrana skladišči, sluznica pa izloča želodčne sokove. Na izstopišču želodca se nahaja vratar ali pilorus, ki ga tvori močan gladkomišični zažemek, katerega naloga je prepuščanje manjših količin delno prebavljene hrane oziroma himusa v dvanajstnik in tanko črevo.(13)

Dvanajstnik delimo na štiri dele. Prvi je zgornji horizontalni del (dolga približno 2,5 cm), imenovan bulbus. Horizontalni del prehaja v descendentni del dvanajstnika, v katerem se skozi skupno izvodilo (papila major) izlivata žolčevod in glavni vod trebušne slinavke. Dvanajstnik se nadaljuje v spodnji horizontalni del in nato ascendentni del, ki prehaja v jejunum.

Dvanajstnik leži pretežno retroperitonealno.(14)

Želodčna stena je sestavljena iz treh plasti. Na notranji strani se nahaja želodčna sluznica, ki izloča želodčne sokove, vmesno plast tvorijo gladke mišice in omogočajo krčenje želodca oziroma ritmične peristaltične valove ter s tem mešanje himusa in praznjenje želodca, na zunanji strani pa se nahaja serozna ovojnica, s katero je želodec učvrščen v trebušni votlini na svojem mestu. Na sliki 2 je prikazan endoskopski izgled spodnjega dela želodca med ezofagogastroduodenoskopijo (EGDS), obliko endoskopske preiskave zgornjega dela prebavil.



A

B

Slika 2: Endoskopski izgled antruma želodca in piloričnega kanala (A - korpus želodca, B - antrum in pilorus)

Želodec opravlja številne naloge:

Je skladišče zaužite hrane in tekočine ter izločkov, ki jih sam ustvarja.

V želodcu se začne priprava hrane na absorbcijo. Hrana se meša s prebavnimi sokovi in pilorus jo v majhnih odmerkih spušča naprej v črevo, kjer se prebava nadaljuje in poteka absorbcija.

Želodec izloča kislino, ki ima baktericidno delovanje; potrebna je tudi za normalno absorbcijo železa in omogoča pretvorbo pepsinogena v aktivni pepsin, ki razgrajuje beljakovine.

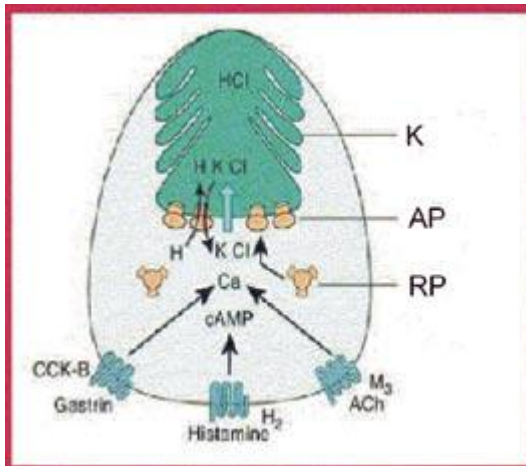
Glavne celice korpusa izločajo pepsinogen, ki je pomemben pri razgradnji beljakovin in intrinzični faktor, ki je potreben za absorpcijo vitamina B12.

Želodec sodeluje tudi pri regulaciji občutka lakote in sitosti. (14)

1.1.2 ŽELODČNA SEKRECIJA IN IZLOČANJE ŽELODČNE KISLINE

Želodec je najbolj poznan po izločanju klorovodikove ali solne kisline, ki jo v praksi imenujemo kar želodčna kislina. Želodčna kislina je le eden od štirih pomembnih sekretijskih proizvodov želodčnega epitelija oz. sluznice, ki sodelujejo v začetnih procesih prebave ali regulaciji delovanja želodca, med katere sodijo še sluz, neaktivne oblike encimov za razgradnjo beljakovin (proteazi - pepsin in himozin), in regulacijski hormon gastrin. Pri tem sodelujejo različne celice želodčnega epitelija, med najpomembnejšimi so **glavne celice**, ki izločajo pepsinogen, in **parietalne celice**, ki izločajo želodčno kislino. Ločimo še **G-celice**, ki izločajo gastrin, **D-celice**, ki izločajo somatostatin, **enterokromafine celice** ali mastocite, ki izločajo histamin, in najštevilnejše **mucinske celice**, ki izločajo z hidrogenkarbonatom bogato sluz.

Sposobnost želodca izločati kislino je neposredno odvisna od števila parietalnih celic, kar je znano na podlagi številnih raziskav. Pentagastrin ali histamin v fizioloških razmerah stimulirata parietalne celice, da izločajo kislino s koncentracijo 160 mmol/l oz. 25 mmol/h kar odgovarja vrednosti pH 0,8 želodčnega soka ob sočasni sekreciji skoraj 2,5 l vode v 24 urah. Kislina se sprošča v globoke kanale plazemske membrane parietalne celice, ki imajo neposredni izhod v želodčno votlino. Zaužiti obrok sproži izločanje kisline, kar privede do številnih sprememb na plazemski membrani parietalne celice. Na njeni površini se bistveno poveča število molekul **protonske črpalke** in *kalijevih ter kloridnih* kanalčkov. Protonska črpalka je ključni dejavnik pri izločanju kisline, ki ob hidrolizi molekul adenzintrifosfata (ATP) sprošča energijo iz energijsko bogatih fosfatnih vezi, potrebno za aktivni transport vodikovih ionov (H^+). Protonsko črpalko zaradi svojega črpanja H^+ ionov v zameno za K^+ ione ob porabi energije iz molekule ATP imenujemo H^+/K^+ -ATP-aza, njeno delovanje pa je odvisno od prisotnosti magnezijevih ionov. H^+ se v parietalni celici sproščajo iz vode, reakcijo pa pospešuje encim **anhidraza ogljikove kisline**, ki iz molekul vode in ogljikovega dioksida katalizira sproščanje hidrogenkarbonatnega in vodikovega iona. Reakcijo prikazuje enačba: $H_2O + CO_2 \leftrightarrow (H_2CO_3) \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$. Hidrogenkarbonatni ion se nato v zameno za kloridni ion sprosti v krvni obtok, kar blago zveča pH vrednost krvi, pojav pa je znan pod imenom »alkalna plima«. Mehanizem vzdržuje koncentracijo H^+ v parietalni celici, ki je 3 milijon krat večja od serumske.



Slika 3: Shematski prikaz izločanja želodčne kisline v parietalni celici; (*K* - kanalček parietalne celice, *AP* - delujoča protonska črpalka na plazemski membrani, *RP* - citoplazemska mirujoča protonska črpalka, *CCK-B* - adenilat-ciklaza z gastrinskim receptorjem, *H₂* - histaminski receptor *H₂*, *M₃* - muskarinski receptor *M₃*, *ACh* - acetilholin, *HCl* - klorovodikova (želodčna kislina), *Cl* - kloridni ion, *K* - kalijev ion, *Ca* - kalcijev ion, *cAMP* - ciklični adenozinmonofosfat)

Regulacijo izločanja želodčne kisline omogočajo trije različni nevrološki in humoralni prenašalci dražljajev s sinergističnim delovanjem preko svojih receptorjev:

Acetilholin (ACh), ki ga sproščajo parasimpatični živčni končiči živca klateža, se veže na muskarinske receptorje. Sprožilni dejavnik sta vonj in okus hrane.

Gastrin, ki ga sproščajo G-celice antralne stene in se veže na receptor parietalne celice in vzpodbuja izločanje želodčne kisline in rast celice ter na gastrinski receptor enterokromafinih celic, kjer sproži izločanje histamina; sprožilni dejavniki so raztezanje želodca, prisotnost aminokislin v vsebini želodca in dvig vrednosti pH želodčne vsebine.

Histamin, ki se sprošča iz enterokromafinih celic lamine propriae oziroma mastocitov v steni korpusa želodca in se veže na histaminske receptorje *H₂*; med glavne sprožilne dejavnike spadata histamin in ACh.

Izločanje želodčne kisline poteka v treh fazah:

CEFALIČNA FAZA: poteka preko parasimpatičnega živca klateža in je odgovorna za sekrecijo 15-10 % želodčnega soka. Sprožijo jo pogled na hrano, okus in vonj po hrani, žvečenje in požiranje.

GASTRIČNA FAZA: raztezanje želodčne stene med obrokom preko mehanoreceptorjev oz. prisotnost aminokislin v želodčni vsebini preko kemoreceptorjev sprožita izločanje Ach in gastrina, končni rezultat pa je sprožitev izločanja želodčne kisline in pepsinogena. Na ta način se izloči več kot 50 % želodčnega soka.

INTESTINALNA FAZA: prisotnost vsebine v dvanajstniku preko mehanoreceptorjev (raztezanje) in kemoreceptorjev (aminokislina, osmolarnost) pripomore k izločanju približno 5 % želodčnega soka.

Večina zaviralnih mehanizmov izločanja želodčne kisline se preko negativne povratne regulacijske zanke vključi v homeostazo kislosti želodca v dvanajstniku. Med glavne fiziološke zaviralce sproščanja želodčne kisline preko receptorjev na parietalni celici pa spadajo prostaglandin E₂ (PGE₂), sekretin in somatostatin (iz celic D v želodčni steni).

1.1.3 IZLOČANJE VAROVALNE SLUZI

Najštevilčnejše celice želodčnega epitelija (sluznice) so mucinske celice, ki izločajo s hidrogenkarbonatom (HCO_3^-) obogateno citoprotektivno varovalno sluz. Nevtralna varovalna sluz (pH 6,8-7) v obliki gela prekriva celotno sluznico in jo ščiti pred uničujočimi učinki želodčne kisline in pepsina. Njena glavna naloga na površini sluznice je torej nevtralizacija kisline, ki z difuzijo vdira v njo. Sluz sestoji iz 95 % vode in 5 % iz glikoproteinov, njegova debelina je približno 100 μm (mikronov). V fizioloških razmerah izločanje sluzi in hidrogenkarbonata vzpodbuja Ach oz. parasimpatično živčevje, zavirajo pa ga alfa-adrenergični učinki simpatičnega živčevja. V regulaciji izločanja sluzi pomembno sodelujejo tudi prostaglandini, katerih delovanje pa zavirajo acetilsalicilna kislina in druga nesteroidna zdravila s protivnetnimi in protibolečinskimi učinki. Za nemoteno izločanje alkalne varovalne sluzi so potrebni dobra prekrvavitev želodca, normalna sinteza prostaglandinov in gradbenih elementov plazemske membrane epiteljskih celic ter ohranjeno obnavljanje želodčne sluznice. (13)

1.1.4 POGOSTEJŠE BOLEZNI ŽELODCA IN DVANAJSTNIKA

1.1.4.1 Gastritis

Gastritis je vnetje želodčne sluznice. Gastritise delimo na akutne, kronične in posebne vrste, kronične pa nadalje v atrofične in neatrofične gastritise.

Endoskopska razvrstitev upošteva najprej anatomsko lokalizacijo vnetja v želodcu in razvršča gastritise v:

- pangastritis, kjer vnetje zajema celoten organ
- antralni gastritis, v katerem je vnetje omejeno na antrum
- korpusni gastritis ima vnetje omejeno na korpus.

Endoskopist opiše še vidne spremembe na sluznici in tako k anatomskemu opisu doda še naslednje: erimatozni, eksudativni, površinski ali elevirani erozivni, atrofični, hemoragični, refluksni ali hiperplastični gastritis. Za primerno oceni je potrebno pet bioptičnih vzorcev iz različnih mest želodčnega antruma in korpusa.

1.1.4.2 Akutni gastritis

Akutni gastritis je posledica akutno nastale poškodbe sluznice, ki ga lahko povzročijo alkohol, začimbe, zdravila, stres, vroča hrana ali tekočine, obsevanje, bakterijske infekcije, nekateri virusi. Akutno vnetje lahko povzroči tudi okužba s *H. pylori*. Gastritis, povzročen s to bakterijo, lahko izzveni ali pa preide v kronično vnetje.

1.1.4.3 Kronični gastritis je kronično vnetje želodčne sluznice, ki ga označuje kronična vnetna infiltracija z limfociti in s plazmatkami. Nad 80 % primerov ga povzroči okužba s *H. pylori*, preostale oblike so redki avtoimuni ali drugi tipi gastritisov. Medtem ko je gastritis s *H. pylori* lokaliziran pretežno v antrumu, je avtoimuni gastritis značilno lokaliziran v želodčnem korpusu.

1.1.4.4 Gastritis s *H. pylorijem*

Gastritis s *H. pylori* povzroča bakterija, ki prizadene predvsem antrum (kronični antralni gastritis). To je najpogostejša bakterijska okužba na svetu. Čeprav je kronični gastritis s to bakterijo klinično navadno asimptomatičen, je močno povezan z nastankom peptičnih razjed na želodcu in dvanajstniku, z nastankom želodčnega raka in nizkomalignega želodčnega limfoma (MALToma). Kronični gastritis zaradi okužbe s *H. pylori* ima od 50 % do 90 % bolnikov z želodčno in 95 % bolnikov z duodenalno razjedo.

1.1.4.5 Peptična razjeda

Peptična razjeda (ulkus) je omejena poškodba stene votlega dela prebavil, ki sega globlje od muskularisa mukoze. Je kronična in rekurentna bolezen. Največkrat se pojavi v dvanajstniku, redkeje v želodcu ali požiralniku. Najpogostejši povzročitelj so *H. pylori* in nesteroidna protivnetna zdravila.

1.1.4.6 Razjeda na dvanajstniku

Razjeda na dvanajstniku naj bi bila kar v 95 % povezana z okužbo s *H. pylori*. Najpogostejši simptom je epigastrična bolečina, ki je pekoča ali glodajoča. Značilno je, da se pojavlja eno do dve uri po jedi.

1.1.4.7 Razjeda na želodcu

Razjeda na želodcu je manj pogosta od dvanajstnikove. Bolniki z razjedo na želodcu imajo pogosto kronični gastritis. 75 % bolnikov je okuženih z bakterijo *H. pylori*. Poglavitni simptom želodčne razjede je bolečina, ki se lahko pojavi kmalu po jedi. Bolniki z razjedo v piloričnem delu bruhamo in imajo podobne bolečine, kot spremljajo razjedo na dvanajstniku. (15)

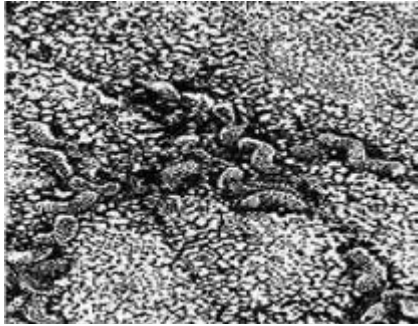
1.2 HELICOBACTER PYLORI

1.2.1 UVOD

Odkritje prisotnosti okužbe s *H. pylori* je povzročilo velik napredek pri raziskovanju bolezni zgornjega dela prebavnega sistema. Prve podatke o obstoju spiralnih mikroorganizmov v želodcu psa in mačke sta dala Bizzozero leta 1893 in Salomon leta 1896. (16, 17)

1.2.2 LASTNOSTI HELICOBACTER PYLORI

H. pylori je ena od najmanj 28 znanih članov družine Helicobacter, ki je prilagojena na človeški želodec. *H. pylori* je spiralna, mikroaerofilna, po Gramu negativna bakterija z 2-7 unipolarnimi bički, ki meri $0,3 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ do $5 \mu\text{m}$. Prilagojena je izključno na življenje v kislem okolju želodca (in želodčnih metaplastičnih spremembah v požiralniku, dvanajstniku in Meckelovem divertiklu). (18) V najvišjih koncentracijah so jo dokazali v antralni regiji želodca. (19) Gibljivost ji omogoča, da se umesti v sloj med mukusom in epitelijem.



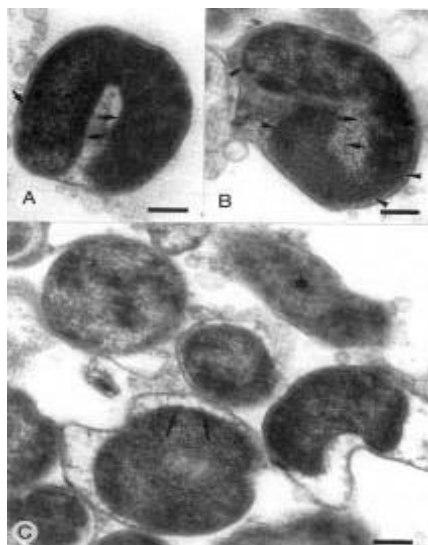
A



B

Sliki 4 in 5: Bakterija Helicobacter pylori pod elektronskim mikroskopom (A - kolonija bakterij na sluznici, B - oblika posamezne bakterije).

V odsotnosti ogljika in dušika v okolju, v katerem se nahaja, kot je v primeru delovanja antibiotikov, oksigenacije, temperaturnega in drugih dejavnikov stresa, spiralna replikativna oblika *H. pylori* lahko preide, skozi različne faze preoblikovanja, v manj aktivno kokoidno obliko. Zato se smatra, da je to programiran odziv bakterije, a ne prosto degenerativni. V študiji kislinsko-glicinskih ekstrahiranih površinskih beljakovin spiralnih in kokoidnih oblik *H. pylori* s tehniko enodimenzionalne in dvodimenzionalne gelske elektroforeze, kot tudi imunoblot tehniko, je bilo ugotovljeno, da je 85 proteinov skupnih obema oblikama *H. pylori*. Kokoidne oblike so vsebovale približno 120 peptidov, ki niso bili vidni v spiralnih oblikah, medtem ko so spiralne oblike vsebovale okoli 46 peptidov, ki niso bili najdeni v kokoidnih oblikah *H. pylori* (20).



Slika 6: Ultra tanki preseki sevov *H. pylori*, starih 4 dni, kažejo različne transformacijske faze do polne kokoidne oblike. (A) intermediarna C oblika s intaktno plazemsko membrano. (B) kasnejši stadij intermediarne C oblike z akumuliranim gostim materialom v periplazemskem prostoru. Plazemska membrana je intaktna samo na eni strani mikroorganizma. (C) tri polne kokoidne oblike skupaj s intermediarno in spiralno obliko (zvezdica). (L. P. Andersen in sodelavci)

Kokoidna oblika vsebuje kromosomsko DNA in polifosfate. Njeni oksidativni encimi so aktivni dlje časa, vendar je vezava na celice in zunajcelični matriks manj učinkovita od replikativne oblike. Zgodnji stadij kokoidne oblike lahko vsebuje migetalke in ima sposobnost gibanja kot spiralna oblika *H. pylori*. Polarna membrana kokoidne oblike ustreza bazalni obliki migetalk spiralne oblike *H. pylori* (slika 6). Ni znano, ali ima kokoidna oblika sposobnost da znova preide v replikativno obliko.(21-23)

H. pylori lahko prehodno kolonizira ustno votlino zaradi refluxa želodčne vsebine. Podatki o pogostosti *H. pylori* v ustni votlini z metodo PCR so različni, od odsotnosti do visoke frekvence, kar negotovo kaže na značaj oralno-oralne poti prenosa.(24-27)

Na fekalno-oralno pot prenosa kažejo podatki o povečanem tveganju za okužbo s *H. pylori* pri uživanju nekuhane zelenjave, kot tudi obstoj *H. pylori* v blatu. Potencialna nevarnost za onesnaženje vrtnin s *H. pylori* obstaja v kontaminirani vodi za namakanje, v kateri se nahajajo le kokoidna oblika *H. pylori*. Onesnažene vode so lahko vir okužbe s *H. pylori*, še posebej, če je možen prehod kokoidne v spiralno obliko.(28-30)

Širjenje okužbe *H. pylori* z onesnaženim endoskopom je primer iatrogenega prenosa. Tveganje za okužbo z endoskopom je zelo majhno, če je instrument mehansko očiščen in

zatem opran v stroju po vsakem pregledu.(31,32)

Na področjih s slabo higieno je mogoča kontaminacija živil z insekti, kar kaže na to, da je možen vektorski način prenosa *H. pylori*.(24)

1.2.3 EPIDEMIOLOGIJA

Okužba s *H. pylori* spremlja človeštvo skozi njegov nastanek in razvoj, vsaj že 58 000 let in predstavlja najpogostejšo okužbo pri ljudeh. Ocenjuje se, da *H. pylori* naseljuje vsaj polovico svetovnega prebivalstva.(33) Prevalenca bolezni v posamezni državi je odvisna od ekonomske razvitosti, ki pogojuje sanitarno higienske in bivalne razmere, v katerih živijo ljudje.

Pridobitev okužbe je odvisna tudi od tega, ali je okužena mati, koliko otrok je v družini, koliko jih živi v isti sobi. Prekuženost narašča s starostjo in je odraz predvsem slabših življenjskih razmer starejših v njihovem otroštvu, ko se zgodi večina okužb. V devetdesetih letih dvajsetega stoletja je bila v razvitem svetu prekuženost v starosti do 40 let od 20 % do 40 %, pri najstarejši skupini prebivalcev pa še dodatnih 60 %. V nerazvitih državah je prevalenca okužbe že v prvih desetih letih življenja med 40 % in 90 %. V Sloveniji so leta 1990 izvedli testiranje navzočnosti protiteles proti *H. pylori* pri 242 zdravih preiskovancih in ugotovili, da je imelo 51,6 % preiskovancev protitelesa proti *H. pylori*. V skupini 0-29 let je bilo pozitivnih 38 % testiranih, največja je bila prevalenca v starostni skupini od 30 do 39 let (73,5 %).

Okužba z bakterijo *H. pylori* je najpogostejša okužba pri ljudeh, vendar se prevalenca okužbe v razvitem delu sveta znižuje zaradi boljših higienskih in bivalnih razmer ter zdravljenja okužbe pri bolnikih z izraženimi kliničnimi težavami. V raziskavi so na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani želeli ugotoviti, kolikšna je bila pogostost okužbe v Sloveniji v letu 2005. Kot merilo so izbrali navzočnost protiteles proti bakteriji *H. pylori* v serumu preiskovancev. Pregledali so serume 1045 preiskovancev, starih od 0 do 90 let, od tega je bilo 624 (59,7 %) vzorcev žensk in 421 (40,3 %) vzorcev moških. Z metodo ELISA so določili protitelesa razredov IgG in IgA proti *H. pylori*. Pozitivne so bile vrednosti, višje od 20 enot/ml.

V raziskavi so ugotovili, da je bilo med 1045 preiskovanci 262 pozitivnih na *H. pylori*, kar je 25,1 % delež. Največji delež preiskovancev s pozitivnimi protitelesi IgG (54 %) je bil v starostnem obdobju od 60 do 69 let. V starostnih skupinah 0-19 let je bilo 9,4 % pozitivnih, v starostnih skupinah med 20 in 49 let pa je imelo pozitivne vrednosti 29,6 % preiskovancev. Med desetletnimi starostnimi skupinami je razlika v deležu pozitivnih statistično značilna ($p < 0,001$, Fisherjev eksaktni test).(34)

Nižja prevalenca je bila ugotovljena v ZDA, Angliji, Avstraliji in Franciji. V državah razvitega sveta prevalenca okužbe s *H. pylori* v zadnjih desetletjih upada. Znižanje prekuženosti je zaznati predvsem pri generacijah, rojenih po letu 1960. Razlog za to so najverjetneje boljše higienske razmere (tekoča voda kontrolirane kakovosti, izboljšane sanitarije, zavedanje pomena osebne higiene) in boljše razmere za bivanje (manjše družine, po eden otrok v sobi). Manjša prekuženost mlajših starostnih skupin s *H. pylori* gre vzporedno z manjšo prekuženostjo z drugimi črevesnimi patogeni, npr. šigelo.

Prišli so do zaključka, da se je prevalenca oseb s protitelesi proti bakteriji *H. pylori* v Sloveniji v zadnjih 15 letih močno zmanjšala, še vedno pa jih najdemo pri več kot četrtini prebivalcev Slovenije, mlajših od 45 let. To je pomemben podatek za izbiro pristopa k zdravljenju okužbe s to bakterijo. (34)

H. pylori je bakterija, ki jo najdemo samo na sluznici želodca. Bakterija se lahko pripne na epiteljske celice želodca (na antigene krvnih skupin Lewis) s pomočjo adhezinov (BabA, OipA, AlpA). Približno 20 % bakterij je pripetih na epitel, nekatere *H. pylori* pa so sposobne prodreti v medcelične prostore in tudi v same celice. (35)

1.2.4 PRILAGODITVENI MEHANIZMI BAKTERIJE IN MOŽNI IZHODI OKUŽBE

Bakterija *H. pylori* se je v tisočletjih svojega obstoja zelo dobro prilagodila na življenje v človeškem želodcu. Glavni prilagoditveni mehanizmi so predvsem sledeči: encim ureaza razgradi sečnino in pri tem nastane tudi hidrogenkarbonat, ki pomaga ustvarjati višji pH v okolici bakterije. Proteaze cepijo beljakovine v mukusu in omogočajo bakteriji lažje premikanje. Katalaza je močan antioksidant, ki omogoča pretvorbo kisikovih radikalov, ki jih sproščajo predvsem nevtrofilci ob nastanku vnetja v želodčni sluznici. (36)

H. pylori ima spiralno obliko z bički in s proteolitičnimi encimi, kar ji omogoča svedrasto gibanje skozi mukus na površini epitelnih celic. Gibanje bakterije je negativno kemotaktično od medija z nižjim pH proti mediju z višjim pH. Kolonizacijska gostota lahko doseže vrednosti do 100 milijonov bakterij na ml mukusa želodca. (37) *H. pylori* ima način, da pride do hranil, vpliva pa tudi na zmanjšanje T celične imunske odzivnosti. To naredi z VacA (vakuolizirajoči citotoksin A), ki je zapis za 87 kilodaltonski protein, ki ga celica proizvaja le, kadar je prisoten tudi zapis za cagA (z citotoksinom povezani gen A). VacA citotoksin tvori pore v membrani celic in tudi v mitohondrijski membrani, poruši lahko integriteto medceličnih stikov, je močan inhibitor aktivacije T celic in vitro, prav tako je sposoben aktivirati apoptozo celice. Pomembne razlike so v zapisu za amino del proteina, to je za

signalni del (s), in za centralni del proteina (m). Znano je, da so najbolj patogeni sevi z zapisom s1m1.(38) CagA je protein, za katerega imajo zapis najbolj virulentni sevi *H. pylori*. Okužba s takšnim sevom je bolj pogosta pri bolnikih z razjedo na dvanajstniku in pri bolnikih z rakom na želodcu. Možnost za nastanek slednjega je večja pri okuženih bolnikih vsaj za dva do trikrat, po nekaterih raziskavah pa tudi za 28,4 krat.(39) Takšna aktivna oblika cagA vpliva na celično sintezo, citoskelet in adhezijo med celicami. Poznano je tudi, da cagA močno poveča vnetni odgovor gostitelja preko povečane tvorbe IL-8 in aktivacije NF-κB.(40)

Tudi nekateri drugi bakterijski geni (cagE, iceA, babA2, oipA) so v večji meri povezani z nastankom razjed raka želodca.

Ob okužbi s *H. pylori* se aktivira tako celični kot tudi humoralni imunski odgovor. Izraziteje je prisoten imunski odgovor po Th1 tipu, ki pa ne uspe odstraniti okužbo. Bakterija *H. pylori* ima na svoji površini lipopolisaharidne antigene, ki so podobni antigenom krvnih skupin in se tako poskuša izogniti imunskemu nadzoru. *H. pylori* proizvaja tudi snovi, ki delujejo imunomodulatorno.(41)

1.2.5 PATOGENEZA

Okužbe z bakterijo *H. pylori* lahko razvrstimo v akutne in kronične. Od 80 % do 90 % primerov gastritisa povzroča okužba z bakterijo *H. pylori*.(42) Med boleznimi, povezanimi z okužbo z bakterijo *H. pylori*, sodijo razjeda na dvanajstniku (95 %)(43), ulcus ventriculi (90 %)(44) in limfom MALT (Mucosa Associated Lymphatic Tissue) (60 %–70 %).(45)

Pri osebah, ki imajo kronično okužbo z bakterijo *H. pylori*, je verjetnost, da bodo zboleli za limfomom MALT, šestkrat večja kot pri zdravih osebah.(46)

Od razširjenosti in intenzivnosti gastritisa je v veliki meri odvisen klinični potek okužbe. Ločimo tri glavne oblike:

1.2.5.1 Enostavni ali benigni gastritis

Zanj je značilen blagi pangastritis z malo vpliva na izločanje želodčne kisline. Večina okuženih ljudi ima to obliko gastritisa, ki ne povzroči resne klinične bolezni.

1.2.5.2 Fenotip razjede dvanajstnika

Ta oblika se pojavi pri približno 15 % okuženih bolnikov. Zanje je značilen gastritis s prizadetostjo antruma in z blago prizadetostjo korpusa želodca. Ti bolniki izločajo večje količine gastrina in želodčne kisline. Razlog za to je okvara povratne zanke izločanja

kislina (gastrin- kislina- somatostatin- blokada izločanja gastrina), ki je posledica zmanjšane števila celic D zaradi poškodb antralne sluznice. Okuženi bolniki s tem fenotipom gastritisa imajo razjede dvanajstnika in prepilorične regije.

1.2.5.3 Fenotip raka želodca

To je najbolj resna oblika gastritisa, za katero je značilna težja stopnja gastritisa korpusa želodca z razvojem multifokalne atrofije, hipo- in aklorhidrije, intestinalne metaplazije, displazije in rak želodca. To obliko gastritisa najdemo pri 1 % okuženih bolnikov, v zahodni Evropi in ZDA. Pogosteje pa jo srečamo v azijskih državah, kjer je rak želodca tudi pogostejši. Pri teh bolnikih je izločanje kisline majhno, ali ga ni, vrednosti gastrina so nizke, nižje so vrednosti pepsinogena I. in razmerje pepsinogen I. / pepsinogen II.(47)

Na to v katero smer bo šla histološka in tudi klinična slika okužbe, vpliva več dejavnikov : značilnosti bakterijskega seva *H. pylori*, genetske predispozicije gostitelja ter vplivi okolja.



Slika 7: Možni izidi okužbe z bakterijo *H. pylori*.

1.2.6 ZDRAVLJENJE H. PYLORI INFEKCIJE

Okužba z bakterijo *H. pylori* ostaja pomemben vzrok obolevnosti in smrtnosti po vsem svetu. Poskusi z razvijanjem cepiva niso obrodili sadov, zato se za zdaj klinični zdravniki osredotočajo na zdravljenje okužbe. Popolno izkoreninjenje bakterije *H. pylori* lahko prepreči ponavljajočo se ulkusno bolezen na želodcu, ozdravi nekatere omejene limfome z želodčno sluznico povezanega limfoidnega tkiva in prepreči ulkusno bolezen, povezano z jemanjem nesteroidnih antirevmatikov (NSAID) pri bolnikih, ki pravkar začinjajo dolgotrajno zdravljenje z NSAID.(48)

V zadnjih letih se je stopnja neuspešnosti zdravljenja z uveljavljenimi protokoli zdravil izrazito povečala.

Osnova zdravljenja je kombinacija zaviralcev protonske črpalke z dvema antibiotikoma. Rezistenca bakterije za najpogostejše antibiotike pa nas sili v iskanje novih možnosti zdravljenja. (49)

Poročila večdržavnega programa nadzora v Združenih državah Amerike za obdobje med letoma 1999 in 2002 navajajo, da je bila odpornost na klaritromicin pri bolnikih, okuženimi z bakterijo *H. pylori* med 10 % in 12 %, medtem ko je bila odpornost na metronidazol prisotna v 25,1 %. Gojišče in testiranje na občutljivost za *H. pylori* nista vedno dosegljiva, pa tudi kadar sta, rezultati nimajo vedno kliničnih koristi. Na primer, čeprav je občutljivost bakterije *H. pylori* na ampicilin in vitro zelo visoka, je zdravilo neučinkovito in vivo. V nasprotju s tem je amoksicilin učinkovit in vivo in organizem tudi zelo redko razvije odpornost nanj, čeprav je amoksicilin za zdravljenje drugih okužb zelo uporabljan. Testiranje na občutljivost in vitro dovolj zanesljivo napove, ali bodo zdravila na podlagi klaritromicina neuspešna, medtem ko je napoved neuspešnosti zdravil na podlagi metronidazola manj zanesljiva. (48)

Evropsko združenje za raziskave *H. pylori* je postavilo priporočila za zdravljenje že leta 1997, temu pa smo hitro sledili tudi v Sloveniji. Zaradi specifične ekološke niše, v kateri biva *H. pylori*, in želodčne kisline, ki neugodno vpliva na biološko razpoložljivost antibiotikov, uporabljamo pri zdravljenju kombinacijo treh zdravil, dveh antibiotikov in zaviralca protonske črpalke ali ranitidin bizmutov citrat. Zdravila predpišemo dvakrat dnevno v trajanju najmanj teden dni. V 90. letih prejšnjega stoletja je bilo zdravljenje proti *H. pylori* uspešno v 90 ali več odstotkih. Ta odstotek uspešnosti zdravljenja pa je v zadnjih letih padel in se giblje v razponu med 65,5 % in 83,8 %. (49)

1.2.6.1 SVETOVNA PRIPOROČILA

Evropsko združenje za raziskave *H. pylori* je na 2. konsenzus konferenci v Maastrichtu predlagalo kot zdravljenje izbire sedemdnevno shemo:

Shema 1. izbora (trotirno zdravljenje)

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke ali ranitidin bizmutov citrat	2 x standardni odmerek
klaritromicin	2 x 400mg
amoksicilin ali metronidazol	2 x 500mg
	2 x 1000mg
	2 x 400 / 500 mg

Priporočena shema izbire je klaritromicin in amoksicilin zaradi potencialno boljših rezultatov zdravljenja v primerjavi z drugo shemo, v kateri je metronidazol, če slednji ni bil uporabljen že v prvi shemi zdravljenja. Če smo neuspešni s prvo shemo zdravljenja, priporočila iz Maastrichta svetujejo drugo najmanj sedemdnevno shemo:

Shema 2. izbora (štiritirno zdravljenje)

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke	2 x standardni odmerek
ranitidin bizmutov citrat	2 x 400mg
metronidazol	2 x 400 / 500 mg
oksitetraciklin	4 x 500mg

V državah, kjer bizmuta ni na voljo, se kot druga terapevtska shema predpiše tritirno, antimikrobno zdravljenje z ZPČ, amoksicilinom in metronidazolom. V primeru neuspeha po prvih dveh shemah naj nadaljnje možnosti zdravljenja določi specialist gastroenterolog na osnovi antibiograma oz. možnih antibiotikov, ki so v posamezni državi na voljo.

V zadnjem času se uveljavljata predvsem dva nova antibiotika, in sicer: rifabutin in furazolidon. Na rifabutin *H. pylori* zaenkrat še ni razvil klinično pomembne rezistence. Furazolidon je priporočen predvsem kot zamenjava za nitroimidazole v primeru, da je bakterija nanje odporna. (50, 51)

V ZDA uporabljajo antimikrobno zdravljenje v trajanju 14 dni, čeprav ni veliko dokazov, da bi podaljšanje zdravljenja povečalo uspeh.(49)

1.2.6.2 KAKO ZDRAVITI OKUŽBO V SLOVENIJI

Okužbo s *H. pylori* je potrebno zdraviti le pri tistih bolnikih, ki izpolnjujejo merila za zdravljenje. Prekuženost s *H. pylori* v Sloveniji je velika, in sicer 51,6 %, klinično pomembne posledice pa se razvijejo le pri približno 20 % okuženih.

Glede na to, da v Sloveniji nimamo na voljo pripravkov bizmutovega subcitrata/subsalicilata, smo glede na možnosti zdravljenja zelo omejeni.

Priporočena sedemdnevna shema izbire (št. 1) je:

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke	2 x standardni odmerek
klaritromicin	2 x 500 mg
amoksicilin	2 x 1000mg

V primeru neuspeha priporočamo sedemdnevno shemo (št. 2):

ZDRAVILO	DNEVNI ODMEREK
zaviralec protonske črpalke	2 x standardni odmerek
klaritromicin	2 x 500 mg
metronidazol	2 x 500 mg

Uspeh zdravljenja je glede na slabše rezultate potrebno preveriti predvsem zaradi pomena neuspešnega izkoreninjenja *H. pylori* za možnost kasnejše ponovitve bolezni. Kontrolo uspešnosti zdravljenja izvedemo mesec dni po zdravljenju, najbolje s ¹³C-sečnino dihalnim testom, ki je metoda izbire. Lahko pa uporabimo tudi določanje antigena v blatu. Izjema od tega pravila je, če obstaja medicinska indikacija za ponovno endoskopijo zgornjih prebavil (razjeda želodca, peptična razjeda z zapleti, limfom MALT).

Testiranje na *H.pylori* iz krvi je nesmiselno, ker ne pokaže realnega rezultata, njena povišana vrednost je lahko odraz že prebolele okužbe in gre le za prisotnost protiteles.

Bolniki mesec dni pred kontrolo uspeha zdravljenja ne smejo jemati antibiotikov, vsaj 2 tedna pred kontrolo pa tudi ne ZPČ ali blokatorjev H2. Nadaljevalno zdravljenje z ZPČ po

enotedenskem antimikrobnem zdravljenju je potrebno le pri bolnikih z razjedo želodca ali z razjedo z zapleti. V primeru aktivne razjede dvanajstnika in v primeru ostalih indikacij za zdravljenje pa nadaljevalno zdravljenje ZPČ ni potrebno.(49)

V primeru neuspešnega zdravljenja s shemama 1 in 2 sodi tak bolnik k specialistu gastroenterologu. Glede na nedosegljivost preparatov bizmuta v Sloveniji so nadaljnje možnosti zdravljenja sorazmerno omejene. Najbolj pomembno vprašanje pred izbiro naslednje možnosti zdravljenja je vsekakor, ali je bakterija občutljiva za makrolidne antibiotike. Odgovor nam lahko da le kultura in antibiogram. Če odpornost za makrolide ni prisotna, lahko uporabimo shemo ZPČ, klaritromicin in ciprofloksacin. Če pa obstaja rezistenca za makrolide, je možno bolnike zdraviti z visokimi odmerki ZPČ in amoksicilina (ZPČ 3 × 40 mg, amoksicilin 3 × 1000 mg). Učinek amoksicilin je zelo odvisen od pH želodčnega soka, zato se predpišejo višji odmerki ZPČ. (49)

Sekvenčno zdravljenje je novejši pristop zdravljenja okužbe z bakterijo *H. pylori* in je sestavljeno iz 10-dnevnega zdravljenja s ZPČ in amoksicilina za prvih pet dni, nato pa v naslednjih petih dneh kombinacija klaritromicina in tinidazola (okvir). Sekvenčno zdravljenje temelji na ugotovitvah, dobljenih v času, ko je bilo dvojno zdravljenje (ZPČ + amoksicilin) standardno za obravnavo okužb z bakterijo *H. pylori*.(48)

1.2.7 RAZLOGI ZA NEUSPEH ZDRAVLJENJA

Uspešna odstranitev *H. pylori* je možna le, če antibiotiki na mestu okužbe dosežejo koncentracijo, ki presega minimalno baktericidno koncentracijo in se takšno stanje zadržuje zadosti dolgo.

Glavni razlogi za neuspešno zdravljenje so:

slabo sodelovanje bolnika;

odpornost bakterije za predpisane antibiotike;

učinkovitost antibiotika je zmanjšana zaradi nizkega pH želodčnega soka;

koncentracija antibiotikov ni zadostna zaradi velikih količin bakterije.

Drugi redkejši vzroki za neuspeh zdravljenja so:

bakterija se zadržuje intracelularno;
bakterija preživi kot kokoidna oblika;
motnja imunskega odgovora gostitelja;
zgodnja ponovna okužba.

1.2.7.1 Slabo sodelovanje bolnika

Trotirne antimikrobne kombinacije povzročajo stranske učinke pri približno 30 %-50 % bolnikov. Najpogostejši stranski učinki so: driska, kovinski občutek v ustih in bolečine v zgornjem delu trebuha. V novejših raziskavah, v katerih so objektivno merili redno jemanje zdravil, so ugotovili, da je kar 11,5 % bolnikov predčasno zaključilo sedemdnevno zdravljenje. Od tega sta dve tretjini zdravljenje zaključili zaradi sopojavov. Zato je toliko bolj pomembna vloga zdravnika, da bolnika opozori na možne sopojave in mu natančno razloži pomen rednega jemanja zdravil za končni uspeh zdravljenja.

1.2.7.2 Odpornost *H. pylori* na antibiotike

H. pylori postane odporen na antibiotike zaradi kromosomske mutacije, redkeje pa zaradi genske izmenjave med bakterijami, npr. transformacije. Mutacije nastanejo spontano med delitvijo bakterij ali pa so posledica vpliva, npr. metronidazola na DNA bakterije.

Najpomembnejša odpornost v klinični praksi je odpornost za makrolidne antibiotike. Nastane zaradi točkovne mutacije na enem od dveh baznih parov, ki sta odgovorna za vezavo makrolida na ribosom. Odpornost *H. pylori* za makrolidne antibiotike pred antimikrobnim zdravljenjem je v svetu že do 20 %.

Odpornost za nitroimidazolne antibiotike nastane zaradi mutacije v genu *rdxA* ali *frxA*, ki imata genetski zapis za nitroreduktaze. Slednje so potrebne za aktivacijo nitroimidazola v reducirano obliko, ki je klinično aktivna oblika zdravila. V Evropi je odpornost za nitroimidazole od 10 % do 60 %, v Afriki pa tudi že 90 %.

Odpornost na antibiotike iz skupine kinolonov je od 0 % do 10 %, zdravila te skupine pa v zdravljenju *H. pylori* niso posebej učinkovita.

Odpornost za amoksicilin in za tetracikline je prisotna le izjemoma.

1.2.7.3 Odpornost *H. pylori* na antibiotike v Sloveniji

Na 5. kongresu ICMASKO v Seville leta 2000 so objavili rezultate raziskave primarne

odpornosti za antibiotike pri 27 izolatih *H. pylori*. Odpornost za makrolide je bila v 3,7 %, na nitroimidazole pa v 18,5 %. Na amoksisilin in ciprofloksacin niso odkrili primarne odpornosti preiskanih sevov.

Drugi podatek o odpornosti *H. pylori* na antibiotike v Sloveniji pa imamo iz študentske raziskovalne naloge. V njej so avtorji analizirali odpornost 41 sevov *H. pylori*, ki so jih uspeli kultivirati po odmrznitvi sevov. Tako dobljeni sevi *H. pylori* pa so izhajali od bolnikov tako pred zdravljenjem kot tudi po neuspešnem zdravljenju. Za makrolide je bilo odpornih 34 % sevov, za nitroimidazole pa 39 % z E-testom oz. 56 % z agar-dilucijsko metodo. Določanje občutljivosti z E-testi je danes pri nas standardna metoda za določanje občutljivosti *H. pylori* proti vsem antimikrobnim sredstvom.

1.2.7.4 Nizek pH želodčnega soka

Minimalna inhibicijska koncentracija antibiotikov, ki jih uporabljamo v zdravljenju okužbe s *H. pylori*, je odvisna od pH želodčnega soka (Tabela 1). Bolniki, ki izločajo več kot 15 mmol želodčne kisline na uro in imajo ob tem normalno koncentracijo gastrina, so hipersekretorji in imajo lahko ob standardnem odmerku zaviralca protonske črpalke (ZPČ) nizek pH v želodcu, ki je lahko krivec za neuspešnost zdravljenja *H. pylori*. To posebej velja v primeru dvotirnega zdravljenja z ZPČ in amoksisilinom.

Tabela I. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antibiotikov za zdravljenje okužbe s *Helicobacter pylori* glede na pH želodčnega soka.

Antibiotik (Agent)	MIK (MIC) 90 (mg/l)		
	pH 7,5	pH 6,0	pH 5,5
Penicilin (Penicillin)	0,03	0,5	0,5
Ampicilin (Ampicillin)	0,06	0,25	0,5
Cefaleksin (Cefalexin)	2	16	32
Eritromicin (Erythromycin)	0,06	2	8
Klaritromicin (Clarithromycin)	0,03	0,06	0,25
Ciprofloksacin (Ciprofloxacin)	0,12	0,5	2
Tetraciklin (Tetracycline)	0,12	0,25	0,5
Nitrofurantoin	1	2	2
Metronidazol (Metronidazole)	2	2	2
Bizmutov subcitrát (Bismuth subcitrate)	16	8	–

Vir: Tepeš et al., 2004, str. 504.

1.2.7.5 Velika količina bakterije *H. pylori*

Več študij je potrdilo slabšo uspešnost antimikrobnega zdravljenja v primeru velike količine bakterij v želodcu. Kot semikvantitativno metodo za ugotavljanje velike količine bakterij navajajo delta vrednost pri dihalnem testu s ¹³C-sečnino preko 35 promil.

1.2.7.6 Drugi redkejši vzroki za neuspeh zdravljenja

Teoretično obstaja možnost, da bi bakterija *H. pylori* lahko preživela antimikrobno zdravljenje, če bi bila skrita intracelularno. To velja predvsem za dvotirno terapijo z amoksicilinom, ki ne prodre v celice.

Kokoidne oblike bakterije *H. pylori* nastanejo, če je bakterija v zanjo neugodnem okolju. Takšna oblika je odporna na antimikrobno zdravljenje. V raziskavah na miših je uspelo s kokoidnimi oblikami, ki jih niso uspeli kultivirati, ponovno okužiti miške. Nekateri drugi avtorji pa menijo, da so kokoidne oblike le degenerativne oblike bakterije *H. pylori*, pri katerih pride že do degradacije bakterijske DNA in RNA.

Danes vemo, da človek kot gostitelj *H. pylori* ne odgovori vedno z enakim imunskim odgovorom na okužbo. Bolniki s slabše izraženim Th-2 lokalnim imunskim odgovorom naj bi imeli tudi slabši uspeh pri antimikrobnem zdravljenju okužbe s *H. pylori*.

Možnost ponovne okužbe s *H. pylori* v štirih tednih po končanem zdravljenju so zgolj teoretične. V primeru pozitivne kontrole štiri tedne po antimikrobnem zdravljenju gre v glavnem za relaps osnovnega seva in ne za ponovno okužbo. V Sloveniji je možnosti za ponovno okužbo po uspešnem zdravljenju *H. pylori* le 0,5 % letno.(52)

1.2.8 DIAGNOSTIKA

Prvo pravilo je, da pri bolniku ugotavljamo prisotnost okužbe s *H. pylori* samo v primeru, ko so izpolnjeni kriteriji za zdravljenje v primeru pozitivnega izvida. Slovenska priporočila za zdravljenje so bila sprejeta 1997 leta na Otočcu in z manjšimi spremembami še danes veljajo.(53)

Diagnostične metode razdelimo na:

- **neinvazivne** (serologija, urea dihalni test - UDT, ter test dokazovanja *H. pylori* v blatu in slini).

Serološki testi omogočajo ugotavljanje protiteles v krvi (ELISA). UDT temelji na delovanju bakterijske ureaze na sečnino. Bolnik popije z izotopom označeno raztopino sečnine. V izdihanem zraku merimo CO₂.

- **invazivne**, za izvedbo katerih je potrebna gastroskopija (hitri ureazni test – HUT, histološke preiskave, kultura, genetske preiskave).

HUT, temelji na spremembi barve indikatorja ob spremembi pH medija. Biopsijski vzorec iz sluznice damo v raztopino sečnine. Reakcija je pozitivna, kadar raztopina spremeni barvo.

Histološka preiskava želodčne sluznice - pri barvanju po Giemsi lahko *H. pylori* vidimo.

Bakteriološka kultura iz biopsijskega vzorca omogoča tudi antibiogram. Polimerazna verižna reakcija (PCR) je najbolj zanesljiva. Danes jo uporabljamo le v raziskovalne namene.

Neinvazivne diagnostične preiskave

Uporabljajo se zlasti za spremljanje učinkovitosti zdravljenja. Pomen neinvazivnih testov je tudi v epidemioloških študijah pojavnosti, pogostosti okužbe s *H. pylori* v pediatrični populaciji, poleg tega pa tudi načina prenosa okužbe ter možnosti spontane ozdravitve in preprečevanja okužbe. Neinvazivni testi naj bi bili enostavni, poceni in diagnostično zanesljivi.(54, 55, 56)

Serološke preiskave (določanje protiteles IgA in IgG proti *H. pylori*) temeljijo na dokazovanju protiteles proti *H. pylori* v krvi, želodčnem soku, slini ali blatu z različnimi metodami (aglutinacijo, reakcijo vezave komplemента, najpogosteje pa z ELISO). Preiskave so poceni in enostavne. Okužba s *H. pylori* povzroči lokalno in sistemsko tvorbo protiteles. Prehodnemu dvigu IgM sledi dvig protiteles IgG in IgA. Humoralni odziv je polimorfen. Prepoznali so številne antigene, proti katerim se tvorijo protitelesa (CagA, UreA, UreB, lipopolisaharide in podenote flagelina). Antigenske lastnosti sevov *H. pylori* se razlikujejo

med posameznimi etničnimi in geografskimi populacijami, zato je potrebno serološke teste standardizirati za vsako populacijo posebej in hkrati prilagoditi cut-off vrednosti. Najboljši so testi, ki so usmerjeni proti multiplim antigenom. Cut-off vrednosti naj bi bile za otroke tudi posebej prirejene zaradi drugačnosti imunskega odziva v otroškem obdobju. Nekateri avtorji navajajo manjšo zanesljivost seroloških testov pri otrocih glede na odrasle. Večina komercialnih testov ni prilagojena za otroško populacijo.(57)

Danes je med vsemi neinvazivnimi testi najbolj v uporabi **urea dihalni test (UDT) oz. dihalni test s sečnino (označeno s ^{13}C ali ^{14}C)**, ki je enostaven in natančen. Temelji na isti biokemični reakciji kot hitri ureazni test. Test je enostaven, varen in neboleč, velja za visoko specifičnega in občutljivega. S testom se določa celokupna encimska aktivnost ureaze. Bolnik v poskusnem obroku popije predpisano količino sečnine, ki ima namesto ^{12}C v molekuli ^{13}C ali ^{14}C . Označen ogljik iz sečnine, ki jo razgradi ureaza *H. pylori*, se pojavi v hidrogenkarbonatnem anionu, ki se absorbira v kri in se kot $^{13}\text{CO}_2$ ali $^{14}\text{CO}_2$ izloči v izdihanem zraku. Pred testom in določen čas po testu se (s pomočjo spektrometrične, infrardeče spektroskopske metode ali z lasersko asistirano analizo razmerij) izmeri razmerje med ^{12}C in ^{13}C , ki se ob prisotnosti bakterije značilno spremeni. Če je razmerje povečano za več kot 0,4 %, je rezultat pozitiven (nekateri avtorji priporočajo cut-off vrednost 0,25 %, 0,3 % oziroma 0,35 %). Izotop ^{13}C je povsem neškodljiv, zato je primeren za uporabo pri otrocih. Slabost testa je njegova visoka cena in težja izvedba pri manjšem otroku. Raziskave kažejo, da je občutljivost nižja pri nižji starostni skupini otrok. Pri otrocih uporabljamo 50 mg sečnine, pri odraslih 75–100 mg.(57)

Občutljivost UDT je med 88 % in 95 %, specifičnost pa med 95 % in 100 %. Občutljivost testa je možno izboljšati s tem, da bolnik 1 mesec pred preiskavo ne uživa antibiotikov ali preparatov bizmuta, 10-14 dni pred preiskavo pa ne jemlje zaviralcev protonske črpalke (ZPČ) ali H₂ blokatorjev.(58) V Sloveniji je njegova dosegljivost za bolnike dobra.

Dokazovanje H. pylori v blatu temelji na dokazu specifičnih antigenov *H. pylori* v blatu, ki se pojavijo po okužbi, običajno s pomočjo EIA-metode. Poliklonska protitelesa, adsorbirana na površini testne ploščice, se specifično vežejo na antigene *H. pylori* iz vzorca blata.

Z encimom konjugirano poliklonalno protitelo omogoča po dodatku substrata za encim

barvno reakcijo, ki se kvantitativno oceni spektrofotometrično. Prednost testa je v neinvazivnosti in enostavnosti odvzema vzorca. Zelo pomembno je diagnostično ovrednotenje testa za posamezne etnične skupine in geografska območja. Japonski raziskovalci menijo, da ima test ustrezno diagnostično vrednost v vseh starostnih skupinah otroštva.(57)

Dokazovanje *H. pylori* v blatu, predvsem z novejšim monoklonalnim testom se približuje rezultatom UDT, vendar ga uporabljamo predvsem takrat, ko UDT ni na voljo.(59)

Dokazovanje *H. pylori* v slini je imunokromatografski test, ki uporablja edinstvena protitelesa za selektivno določitev ureaze *H. pylori* v slini.

Invazivne diagnostične preiskave

Zanje je značilno, da so vezane na gastrokopijo in odvzem vzorcev želodčne sluznice.

Hitri ureazni test temelji na razgradnji sečnine z ureazo v amonijev ion in hidrogenkarbonat–reakcija se kaže s spremembo pH, kar zaznamo s pomočjo pH-indikatorja. Rezultat je lahko lažno negativen, če je število bakterij majhno oz. je razporeditev bakterij žariščna, kar je problem predvsem pri otrocih. Test se opravi ob EGDS na bioptu želodčne sluznice.

Bistvena prednost testa je v tem, da je hiter, preprost in poceni, glavna pomanjkljivost pa je prav v nizki občutljivosti, še posebej pri otrocih. Večinoma se uporabljajo komercialni testi, npr. CLO. Občutljivost metode je odvisna od števila bioptičnih vzorcev, mesta odvzema bioptov, bakterijske gostote in predhodne uporabe antibiotikov in inhibitorjev

protonske črpalke.(57) Hitri ureazni test (HUT) je standardna diagnostična metoda pri gastrokopiji, katere senzitivnost je med 90 % in 95 %, specifičnost pa med 95 % in 100 %.

Nižja občutljivost je pri vseh tistih bolnikih, ki jemljejo ZPČ, H2 blokatorje, ali so v zadnjem mesecu jemali antibiotike, ali bizmutove preparate. HUT je primerna metoda tudi za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja, v kolikor je indicirana kontrolna gastrokopija, npr. pri bolnikih z razjedo želodca.(60) Histologija se kot rutinska metoda danes zaradi svoje cene ne uporablja. Histologijo kot diagnostično metodo za ugotavljanje okužbe uporabljamo le v raziskovalne namene. Na točnost rezultatov pa vpliva tudi subjektivnost ocenjevanja.(61)

Bioptični vzorec se lahko brez barvanja pregleda s **faznokontrastnim mikroskopom**.

Bakterijska kultura je visoko specifična diagnostična metoda in metoda zlatega standarda, njena občutljivost pa je odvisna od mikrobiološke obdelave vzorca, števila in mesta odvzema bioptov. Njen pomen je predvsem v možnosti testiranja občutljivosti bakterije

na antibiotike. Metoda dokazovanja bakterije temelji na biokemični zaznavi različnih bakterijskih encimov (ureaze, oksidaze, katalaze, gamaglutamil transpeptidaze) in morfoloških lastnosti.(57)

PCR – verižna reakcija s polimerazo je visoko občutljiva genetska metoda dokazovanja bakterijske DNA, ki jo lahko dokazujemo v bioptičnem vzorcu želodčne sluznice, želodčnem soku, žolču, slini in blatu. Uporabna je tudi za ugotavljanje občutljivosti na antibiotike. Najpogosteje temelji na genu *UreC* kot specifični sondi.(57)

Histološka preiskava biopta je metoda z visoko občutljivostjo. Zdravnik pri gastroskopiji odvzame vzorec na dveh različnih mestih. Te vzorce obarvamo s posebnimi barvili in jih pregledamo pod mikroskopom.

Kultura je ob histološki preiskavi in dihalnem testu ena od treh metod, ki jih imenujemo »zlati standard«. Odvzeti košček sluznice naneseemo na gojišče in v 3-14 dneh dobimo rezultat. Ta test je uporaben za ugotavljanje rezistence bakterije na *H. pylori*.(62)

H. pylori sodi med mikroorganizme, katerih vzgoja v kulturi je nekoliko težja. Odvzemki bioptov želodčne sluznice za kulturo so upravičeni pri tistih bolnikih, ki so bili vsaj dvakrat neuspešno zdravljeni, ali v raziskovalne namene, za ugotavljanje stopnje lokalne rezistence *H. pylori* na antibiotike.(63)

Genetske analize vzorcev se uporabljajo v raziskovalne namene in za določanje antimikrobne rezistence *H. pylori*.

2. NAMEN DELA

Odkritje, da gastritis v večini primerov povzroča okužba s *H. pylori*, je pomembno vplivalo na razvrščanje in zdravljenje bolezni želodca. Zaradi možnega razvoja neoplastičnih sprememb je smiselno zgodnje odkrivanje in zdravljenje okužbe s *H. pylori*.

V diplomski nalogi želimo ugotoviti uspešnost zdravljenja okužb z bakterijo *H. pylori*. Naša študija je potekala tako, da smo pri bolnikih, pri katerih obstaja sum na okužbo s *H. pylori*, določali okužbo s *H. pylori* v blatu, slini, serumu in izvedli dihalni test. Neinvazivne preiskave so bile narejene na KIKKB. Po izvedenih preiskavah je bila predpisana eradikacijska terapija. Po 8 tednih od prvega dne eradikacijske terapije so bili bolniki ponovno klicani na izvedbo neinvazivnih testov.

Prvič je naš cilj primerjati posamezne neinvazivne diagnostične teste (v serumu, slini in blatu), glede na dihalni test s sečnino in zatem pogledati specifičnost in občutljivost ter pozitivno in negativno napovedno vrednost posameznega testa.

Namen raziskave je tudi izračunati uspešnost terapije, glede na priporočila - dihalni test in primerjati z rezultati antigena in izračunati padec koncentracij seroloških markerjev. Poleg tega bomo samo pogledali kako je s slino.

Pričakovati je, da bodo vrednosti seroloških markerjev še vedno pozitivne, vendar, da bo koncentracija padla. Glede na zmanjševanje uspešnosti eradikacije v zadnjih letih iz podatkov v literaturi pričakujemo, da bo uspešnost eradikacije na spodnji meji, torej okoli 60 %.

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 PRIDOBIVANJE PODATKOV

Bolniki, pri katerih je obstajal sum za okužbo s *H. pylori*, so bili povabljeni v raziskavo. Določali smo okužbo v blatu, slini, serumu in izvedli dihalni test. V kolikor so bolniki soglašali s sodelovanjem v raziskavi, so prejeli navodila, posodico za shranitev blata in napotnico za KKIB, na kateri je bilo napisano: prosimo za izvedbo dihalnega testa in določitev protiteles v serumu in testa s slino. Bolnik je nato v gastrokopirnici prejel datum, kdaj naj se javi v laboratorij na ljubljanski polikliniki. Bolnik je nato v laboratoriju prejel Rp - e za eradikacijsko terapijo, ki jih je napisal zdravnik ob gastrokopiji in jih je priložil napotnici. Po tem, ko je bolnik opravil prve neinvazivne teste, so mu v laboratoriju dali napotnico za drugi pregled. To je približno po 8 tednih od prvega dne eradikacijske terapije.

Sprva smo neinvazivne teste izvedli na vzorcu 103 pacientov. Pacienti so bili stari od 11 do 86 let, med njimi je bilo 46 moških in 57 žensk. Povprečna starost preiskovancev je bila 46,74 let.

3.2 PROUČEVANE DIAGNOSTIČNE METODE

3.2.1 DIHALNI TEST S SEČNINO

Dihalni test temelji na sposobnosti bakterije, da z encimom ureazo razgrajuje sečnino. Pri testu se uporablja sečnina, označena s ^{13}C ali ^{14}C izotopom.

^{13}C dihalni test je neinvaziven in neradioaktiven test za odkrivanje infekcij z bakterijo *H. pylori*. Primeren je tudi za nosečnice in otroke. Ima visoko občutljivost in specifičnost.

Test se praviloma opravlja vsaj 4 tedne po končani terapiji za eradikacijo *H. pylori*, saj v nasprotnem primeru dobimo lažno negativne rezultate. Testni obrok največkrat predstavlja 200 ml 0,1 N citronske kisline. Namen je dvojen: upočasni praznjenje želodca, kar poveča kontaktni čas med bakterijo in označeno sečnino ter omogoči optimalno razporeditev sečnine po želodcu. Porast izotopa ^{13}C v izdihanem zraku določimo z masnim spektrometrom (IRMS – isotope ratio mass spectrometry).

Na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo za ugotavljanje okuženosti z bakterijo *H. pylori* uporabljajo dihalni test s sečnino 'Helicobacter Test INFAI, 75 mg prašek za peroralno raztopino' ter 'Helicobacter Test INFAI za otroke v starosti 3–11 let, 45 mg prašek za peroralno raztopino'.



Slika 8 – Test INFAI

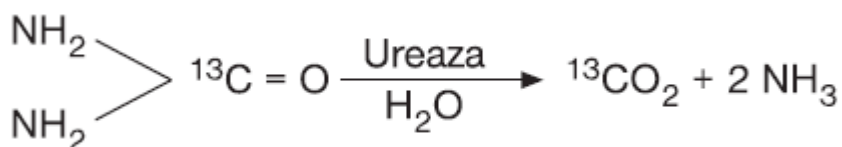
Test Helicobacter INFAI je dihalni test za enkratno uporabo. Uporabljam ga za *in vivo* diagnosticiranje gastroduodenalne okužbe s *H. pylori* pri odraslih in mladostnikih, pri katerih obstaja verjetnost peptične razjede.

Da bo test učinkovit, morajo bolniki zaužiti 200 ml 100 % pomarančnega soka ali 1 g citronske kisline v 200 ml vode (obrok, zaužit pred testom) ter navadno vodo, v kateri raztopimo prašek s ^{13}C -sečnino. Bolnik se mora prej postiti vsaj 6 ur, najbolje čez noč. Postopek testiranja traja približno 40 minut. Da se izognemo lažno negativnemu rezultatu, moramo test opraviti vsaj štiri tedne po zadnji sistemski terapiji z antibiotiki in dva tedna po zadnjem odmerku zaviralcev izločanja želodčne kisline. Obe skupini zdravil lahko vplivata na status *H. pylori*. To je še posebej pomembno po eradikacijski terapiji te bakterije. V enem odmerku je le 75 mg ^{13}C -sečnine, zato ne pričakujemo možnosti prevelikega odmerjanja.

FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

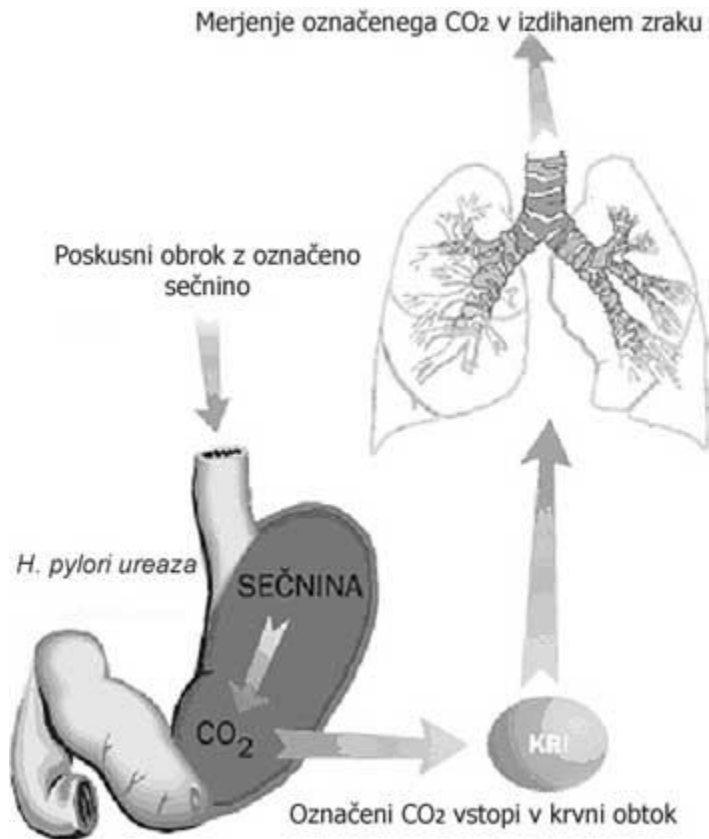
Za količino 75 mg ^{13}C -sečnine, ki se uporabi za dihalni test, farmakodinamični učinki niso opisani.

Označena sečnina se po zaužitju razširi v želodčno sluznico. V prisotnosti bakterije *H. pylori* se ^{13}C -sečnina presnovi z ureazo, ki jo izloča ta bakterija.



Enačba 1 – Presnova ^{13}C -sečnine z ureazo

Ogljikov dioksid preide v krvne žile. Od tam se v obliki hidrogenkarbonata prenese v pljuča in se sprosti v izdihanem zraku kot $^{13}\text{CO}_2$. (64)



Slika 9 – Pot sečnine pri okuženih po zaužitju

V prisotnosti bakterijske ureaze se razmerje med ^{13}C in ^{12}C -ogljikovimi izotopi znatno spremeni. Delež $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku je določen s spektrometrično metodo določanja razmerja mase izotopov (IRMS, isotope ratio mass spectrometry) in predstavljen kot absolutna razlika (vrednost $\Delta\delta$) med 00-minutnimi in 30-minutnimi vrednostmi.

Ureazo v želodcu proizvajajo samo *H. pylori*. V želodčni flori so zelo redko našli druge bakterije, ki proizvajajo ureazo. Mejna točka za razločevanje na *H. pylori* negativne in pozitivne bolnike je določena kot $\Delta\delta$ -vrednost 4 ‰. To pomeni, da povečanje $\Delta\delta$ -vrednosti za več kot 4 ‰ pomeni okužbo. V primerjavi z bioptično diagnostiko okužbe s *H. pylori* je dihalni test v kliničnih preskušanjih na 457 bolnikih dosegel obseg občutljivosti 96,5 % do

97,9 % [95 %-interval zaupanja, IZ: 94,05 % - 99,72 %] in obseg specifičnosti od 96,7 % do 100 % [95 %-IZ: 94,17 % - 103,63 %].

V odsotnosti bakterijske ureaze se bo vsa količina zaužite sečnine po absorpciji iz prebavil presnovila enako kot endogena sečnina. Amoniak, ki nastane z bakterijsko hidrolizo (kot je opisano zgoraj), se vključi v presnovo v obliki NH_4^+ .

FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Zaužita ^{13}C -sečnina se presnovi v ogljikov dioksid in amoniak ali se vključi v cikel sečnine v telesu. Povečanje količine $^{13}\text{CO}_2$ merimo z izotopno analizo. Absorpcija in porazdelitev $^{13}\text{CO}_2$ sta hitrejši od reakcije ureaze. Torej je razkroj ^{13}C -sečnine z bakterijsko ureazo tista stopnja, ki omejuje hitrost celotnega postopka. Samo pri bolnikih, ki so pozitivni na *H. pylori*, 75 mg označene sečnine povzroči znatno povečanje $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku v prvih 30 minutah po zaužitju.

Testni komplet vsebuje naslednje sestavine:

- kozarček (prostornina 10 ml, iz polistirena s polietilenskim pokrovčkom), ki vsebuje 75 mg ^{13}C -sečnine praška za peroralno raztopino;
- označeni stekleni (ali plastični) epruveti za zbiranje, shranjevanje in prenašanje vzorcev za analizo: čas vzorčenja: 00-minutna vrednost in čas vzorčenja: 30-minutna vrednost;
- upogljiva slamica za zbiranje vzorcev izdihanega zraka v ustrezne vsebnike;
- podatkovni list za dokumentacijo bolnika;
- navodilo za uporabo;
- list z etiketami s črtno kodo in nalepka;

POSTOPEK

Postopek pričnemo z zbiranjem vzorcev za določitev začetne vrednosti (00-minutne vrednosti):

1. Izpolnimo formular s pacientovimi podatki.

2. Iz kompleta vzamemo slamico in dve epruveti z napisom: "Čas vzorčenja: 00-minutna vrednost". Z epruvete odstranimo zamašek, odvijemo slamico in jo vstavimo v epruveto. Bolnik naj počasi izdihuje skozi slamico, dokler se notranja površina epruvete ne zarosi. Medtem ko bolnik neprekinjeno izdihuje, izvlečemo slamico in takoj zapremo epruveto s priloženim zamaškom. (Če ostane odprta več kot 30 sekund, bo izid testa morda napačen.) Epruveto držimo pokonci in nanjo prilepimo črtno kodo z napisom "00-minutna vrednost" tako, da so črte v vodoravnem položaju.

3. Po enakem postopku napolnimo z izdihanim zrakom še drugo epruveto (Oznaka: "Čas vzorčenja: 00-minutna vrednost").

4. Takoj po tem mora bolnik popiti 200 ml 100 %-pomarančnega soka ali 200 ml vode z 1 g citronske kisline.

5. Sledi priprava raztopine:

Iz kompleta vzamemo plastenko z napisom "¹³C-sečnina prašek", jo odpremo in do $\frac{3}{4}$ napolnimo z navadno vodo. Platenko zapremo in jo previdno stresamo, dokler se prašek ne raztopi. Prelijemo vsebino v kozarec. Platenko do roba napolnimo z vodo še drugič in tretjič in dodamo to vsebino v kozarec (celotna količina vode mora biti približno 30 ml).

6. Raztopino mora bolnik popiti takoj. Zapišemo si točen čas zaužitja.

7. Trideset minut po zaužitju testne raztopine zberemo vzorca 30-minutnih vrednosti v preostala vsebnika (Oznaka: "Čas vzorčenja: 30-minutna vrednost"), kot je opisano v korakih 2. in 3. Za ta vzorca uporabimo nalepki z napisom »30-minutna vrednost«.

8. Ustrezno nalepko s črtno kodo nalepimo tudi na bolnikov podatkovni list. Na koncu zapečatimo paket z nalepko.

9. Epruvete pripravimo za merjenje na aparatu. Sledi analiza vzorcev.

PODROBNOSTI TESTIRANJA IN ANALIZE VZORCEV IZDIHANEGA ZRAKA

Vzorci izdihanega zraka, zbrane v 10 ml steklenih ali plastičnih epruvetah, analiziramo s spektrometrično metodo določanja razmerja mase izotopov (IRMS). Analiza razmerja med ¹³C in ¹²C v izdihanem ogljikovem dioksidu je sestavni del diagnostičnega postopka Testa

Helicobacter INFAI. Natančnost testa je močno odvisna od kakovosti analize izdihanega zraka. Podroben opis parametrov analize zraka – linearnost, stabilnost (natančnost referenčnega plina) ter natančnost meritev – sta bistvena pogoja za točnost testnih rezultatov.

Specifikacije za določitev razmerja med ^{13}C in ^{12}C :

Koncept testa izdihanega zraka je zasnovan na uporabi s ^{13}C specifično označene sečnine, katere porabo v presnovi nadzorujemo z merjenjem $^{13}\text{CO}_2$ v izdihanem zraku.

Masni spektrometer mora imeti naslednje funkcije:

Večkratna ponovitev analize: Vsaj tri zaporedne analize istega vzorca.

Zavarovan dostop: Shranjevanje delovnih parametrov in rezultatov z varovanim dostopom, da se prepreči poznejše spreminjanje podatkov.

Nastavitev: Razmerje med ^{13}C in ^{12}C glede na standard PDB (Pee Dee Belemnite).

Zanka za vzorec: $< 200 \mu\text{l}$.

Glavni testi, s katerimi preverimo specifikacije, so linearnost, stabilnost (natančnost referenčnega plina) in natančnost meritev. Vsi masni spektrometri za analizo izdihanega zraka morajo ustrezati naslednjim specifikacijam:

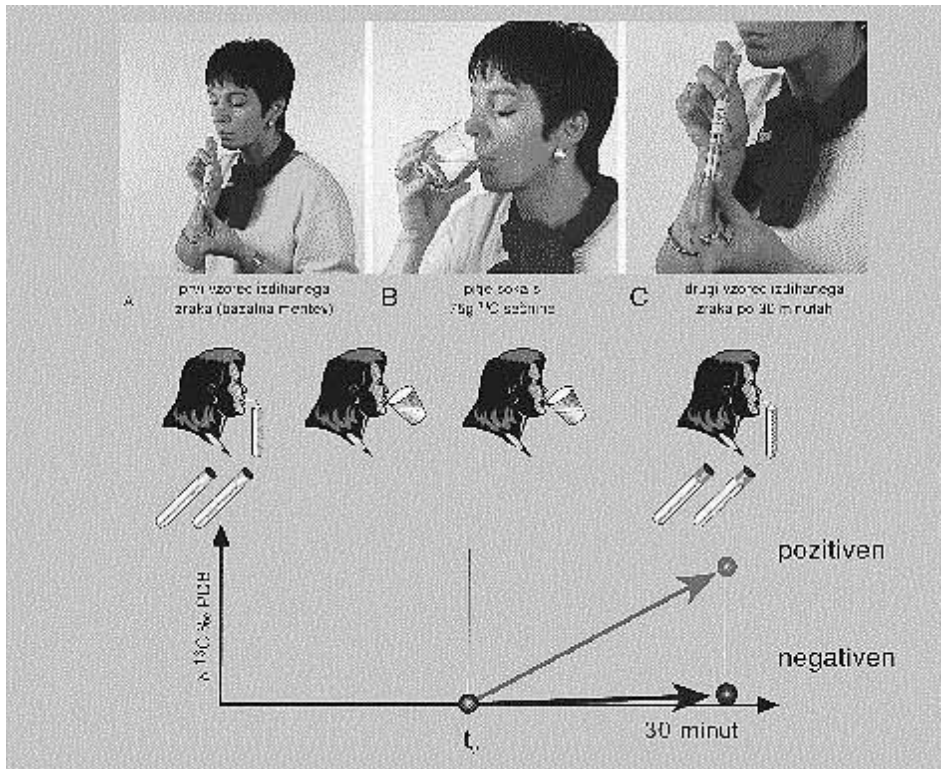
Linearnost: $\leq 0,5 \text{ ‰}$ za vzorce izdihanega zraka v različnih koncentracijah med 1 % in 7 % CO_2 .

Stabilnost: $\leq 0,2 \text{ ‰}$ pri 10 zaporednih pulzih.

Natančnost meritev: $\leq 0,3 \text{ ‰}$ pri običajni naravni prisotnosti ^{13}C , z uporabo 10 ml epruvete s 3 % CO_2 v izdihanem zraku.

Okužba s *H. pylori* je prisotna, če razlika $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ med osnovno vrednostjo in 30- minutno vrednostjo presega 4,0 ‰. Uporabimo lahko tudi kakšno drugo primerno, validirano metodo, ki jo izvede usposobljen laboratorij.

Pri otrocih je postopek enak, le da dobijo 45mg sečnine in popijejo 100ml pomarančnega soka.



Slika 10 – Postopek testiranja dihalnega testa

TOKSIKOLOGIJA ^{13}C

Že normalno je v izdihanem zraku 1% ^{13}C od vsega izdihanega CO_2 . Sečnina z ^{13}C izotopom je telesu znana snov. Količina ^{13}C izotopa v človeškem telesu je približno 2g/kg, povprečen vnos pa 2-3g/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 20-30g/dan. Sečnina je netoksična v takšnih količinah. Tudi količina amoniaka, 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. (65)

3.2.2 ANTIGEN V BLATU

3.2.2.1 H&R *Helicobacter pylori* v blatu- test za določanje *Helicobacter pylori* antigena na testni ploščici

Gre za hitri diagnostični, enostopenjski test za kvalitativno določanje *H. pylori* antigena v človeškem blatu. Namenjen je strokovni uporabi v *in vitro* diagnostične namene.

H&R FOB test je hitra imunokromatografska metoda (neinvazivna) za kvalitativno določanje *H. pylori* antigena v človeškem blatu. Temelji na principu kapilarneka vleka. Vpojna blazinica, ki je vstavljena v ploščico, ima območje testne črte prekrito z monoklonalnimi protitelesi proti *H. pylori* antigenu. Po dodatku vzorca le-ta reagira z delci na vpojni blazinici, ki so prekrite z anti-*H. pylori* protitelesi. Rastopina potuje navzgor po vpojni blazinici po principu kapilarneka vleka. V primeru pozitivnega rezultata bodo specifična protitelesa na vpojni blazinici reagirala z rastopino konjugata in povzročila nastanek obarvane črte v testnem polju. Rdeče obarvana črta se vedno prikaže v kontrolnem polju in služi kot notranja kontrola reagenta, kot dokaz da je bila dodana zadostna količina vzorca in da je bil dosežen pravilen kapilarni vlek.

KOMPONENTE TESTA:

- Testne kasete;
- Navodila za uporabo;
- Epruvete za odvzem, ekstrakcijo in nanos vzorca;
- Pozitivna kontrola.

Potreben dodatni material:

- Posodice za odvzem vzorca;
- Rokavice za enkratno uporabo;
- Štoparica.

PRIPRAVA VZORCA IN POSTOPEK IZVEDBE TESTA

Zberemo zadostno količino vzorca blata (1-2 g ali ml za tekoče vzorce). Vzorci blata morajo biti odvzeti v čiste, suhe posodice, brez konzervansov ali transportnega medija. Vzorci se pred uporabo lahko hranijo 1 do 2 dni v hladilniku (2-4 °C). Za daljše hranjenje vzorca, morajo le

ti biti zamrznjeni na -20 °C. Pred uporabo je potrebno vzorce odmrzniti in počakati, da dosežejo sobno temperaturo.

Za vsak vzorec uporabimo novo epruveto za odvzem, ekstrakcijo in nanos vzorca. Odvijemo zamašek in konec paličice, pritrjene na zamašek potopimo v blato na dveh mestih (odvzeti moramo veliko količino vzorca, cca 250 mg, za primerjavo pri testu za okultno kri v blatu moramo odvzeti 50 do 100 mg vzorca). Pri tekočih vzorcih blata aspiriramo vzorec s kapalko, in nato dodamo 250 µl v stekleničko s pufrom. Zamašek z vzorcem vstavimo nazaj v epruveto in ga tesno privijemo. Epruveto z vzorcem in s pufrom dobro premešamo.

Pred pričetkom izvajanja testa morajo testna ploščica, blato in epruvete s pufrom doseči sobno temperaturo (15-30 °). Ovoja posamezne testne ploščice ne odpiramo do same izvedbe testa.

- Odstranimo ovoj s testne H&R *H. pylori* ploščice in jo uporabimo takoj, ko je mogoče.
- Dobro premešamo epruveto z vzorcem in pufrom. Odlomimo konec epruvete.
- Za vsak vzorec uporabimo novo testno ploščico. V vzorčno polje dodamo točno 4 kapljice ali 100 µl in vključimo štoparico.
- Odčitamo rezultat znotraj 10 minut po dodatku raztopine v vzorčno polje.

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitiven rezultat:

Na testni kaseti se pojavita dve rdeči črti - v testnem polju, označenem s črko T, in v kontrolnem polju, označenem s črko C.

Negativen rezultat:

Na testni kaseti se pojavi le ena rdeča črta, in sicer v kontrolnem polju, označenem s črko C.

Neveljaven rezultat:

Popolna odsotnost rdeče kontrolne črte ne glede na prisotnost rdeče testne črte pomeni neveljaven rezultat. Najpogostejši možni razlogi za odsotnost kontrolne črte so nezadostna količina vzorca, nepravilen postopek izvajanja testa ali razpad reagenta.

OMEJITVE TESTA

S tovrstnim kvalitativnim testom ni mogoče določiti kvantitativne vrednosti ali stopnje porasta *H. pylori* antigena v vzorcu. Prevelika količina vzorca lahko povzroči napačne rezultate (pojav pasov rjave barve). V tem primeru je potrebno vzorec razredčiti s pufrom in ponoviti test. Določeni vzorci blata lahko zmanjšajo intenziteto barve kontrolne črte. Negativen rezultat v nobenem primeru ne izključuje možnosti okužbe s *H. pylori*. Tako H&R *H. pylori* test zagotavlja verjetno diagnozo infekcije s *H. pylori* in se rezultati vedno interpretirajo ob upoštevanju celostne klinične slike in ob rezultatih ostalih laboratorijskih preiskav. H&R *H. pylori* test je bil primerjan z različnimi metodami, kot so kultura, dihalni test s sečnino in Ureaza test - ugotovljena je bila več kot 92 % točnost. (66)

3.2.2.2 DIMA *Helicobacter pylori* v blatu

DIMA *H. pylori* je imunokromatografski test za kvalitativno določanje *H. pylori* antigena v človeškem blatu. Ta metoda je natančna, lahka za izvedbo, in hitra, saj nam da rezultate v nekaj minutah.

V tem testu je *H. pylori* zaznana s pomočjo specifičnih protiteles proti *H. pylori*. Po dodatku vzorca (blato razredčeno v pufri) se specifična, barvno označena protitelesa vežejo na bakterije, če so le te navzoče v vzorcu. Ko ti kompleksi potujejo navzgor po membrani po principu kapilarnega vleka, so ujeti s pomočjo drugih specifičnih protiteles na testnem polju. Nastane rdeča črta v testnem polju. Če ni prisotnih bakterij, se barvno označeno protitelo ne more vezati na območju testnega polja. Takrat ne nastane rdeča črta. Torej prisotnost rdeče črte v testnem polju kaže pozitiven rezultat, medtem ko njena odsotnost kaže na negativen rezultat.

Obarvana črta se vedno pojavi v kontrolnem polju in služi kot notranja kontrola reagenta, kot dokaz da je bila dodana zadostna količina vzorca in da je bil dosežen pravilen kapilarni vlek.

KOMPONENTE TESTA:

- Testne kasete;
- Navodila za uporabo;
- Zbiralne posodice za blato, s pufrom za razredčevanje vzorca;
- Papir za odvzem vzorca.

Potreben dodatni material:

- Papir za odstranitev konice tube s pufrom;
- Štoparica.

VZOREC IN POSTOPEK IZVEDBE TESTA

Zbiranje vzorca in priprava pacienta

Za zbiranje vzorca blata dobi pacient posodico za blato in papir za zbiranje blata. Pacient mora paziti, da se vzorec blata zbere tako, da ne pride v stik z vodo v straniščni školjki, da se prepreči razredčevanje vzorca ali kontaminacija z detergenti. Pacient drži posodico za blato vertikalno in vzorec odvzame z žličko, nameščeno v pokrovu plastične posodice za blato. Vzorec odvajamo z žličko iz vsaj treh različnih strani vzorca. Napolnimo približno polovico posodice in dobro zatesnimo pokrov. Zbiralno posodico za blato pretresemo, da se zmeša vzorec blata in pufer za razredčevanje. Vzorec damo v plastično vrečko in ga shranimo v hladnem prostoru. Vzorec v posodici moramo vrniti zdravniku v roku naslednjih 24-48-ih ur.

Posodica za zbiranje blata mora biti opremljena s pacientovim imenom za identifikacijske namene. Vzorec mora biti uporabljen v naslednjih 24 urah. Vzorce shranjujemo v hladilniku (2 °-8 °C) do uporabe. Kratka izpostavitve visokim temperaturam do 30°C normalno ne vpliva na vzorec. Kljub temu, naj bodo te izpostavitve čim krajše. Tik preden je vzorec uporabljen za analizo mora biti na sobni temperaturi.

Izvedba testa

- Testna naprava in razredčeni vzorec blata morata doseči sobno temperaturo (15-30°C) pred testiranjem.
- Testno napravo vzamemo iz torbice, ko smo nared za izvedbo testa. Testna naprava mora doseči sobno temperaturo, da se izognemo kondenzaciji vlage na membrani. Napravo označimo s pacientovo ali kontrolno identifikacijo.
- Z uporabo papirnatega robčka odstranimo konico zbiralne posodice s sukajočim gibanjem. Zbiralno posodico držimo vertikalno in dodamo 2-3 kapljice raztopine v okroglo vzorčno polje testne naprave z nežnim pritiskom na stene zbiralne posodice. Izogniti pa se je potrebno zračnim mehurčkom v vzorcu.

- Vključimo štoparico in ko test začne delovati, vidimo rdeče obarvano tekočo linijo, ki se pomika po membrani.
- Počakamo, da se pojavijo rdeče črte. Rezultat lahko odčitamo po 10 minutah. Rezultatov ne smemo interpretirati po 20 minutah.

INTERPRETACIJA REZULTATOV

Negativen rezultat:

V kontrolnem polju C se pojavi samo ena obarvana črta. V testnem polju, označenem s črko T pa se črta ne pojavi. Odsotnost črte v testnem polju kaže na to, da ni prisotnih *H. pylori* antigenov.

Pozitiven rezultat:

Na membrani se pojavita dve različno obarvani črti. Ena obarvana črta nastane v kontrolnem polju C in druga v testnem polju T. Ta rezultat kaže na prisotnost *H. pylori* antigenov.

(Intenziteta barve v testnem polju T variira odvisno od koncentracije *H. pylori* antigenov prisotnih v vzorcu. Tako katerikoli odtenek barve v testnem polju kaže na to, da so bili detektirani antigeni *H. pylori*. Vendar tega rezultata ne moremo kvantitativno ovrednotiti, saj gre za kvalitativni test.)

Neveljaven rezultat:

Popolna odsotnost obarvane kontrolne črte. Ne glede na prisotnost kontrolne črte to pomeni neveljaven rezultat.

OMEJITVE

Tako kot pri vseh hitrih diagnostičnih testih *H. pylori* se rezultati vedno interpretirajo ob upoštevanju celostne klinične slike in ob rezultatih ostalih laboratorijskih preiskav.

Antibiotiki, zaviralci protonske črpalke in bizmutovi pripravki inhibirajo *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.

LASTNOSTI TESTA

V klinični študiji so primerjali DIMA *H. pylori* Ag testno napravo proti komercialno dostopni ELISA in prikazali naslednje karakteristike:

Diagnostična občutljivost: 82,1 %;

Diagnostična specifičnost: 96,9 %;

Pozitivna napovedna vrednost: 91,4 %;

Negativna napovedna vrednost: 93,1 %;

Reproducibilnost: 92,6 % (67).

3.2.3 DOLOČEVANJE *H. PYLORI* UREAZE V SLINI

dBest One Step *H. Pylori* Saliva Test Disk

The one step *H. pylori*-Saliva-Urease (HPS) test je enostaven enostopenjski imunokromatografski test za hitro, kvalitativno detekcijo ureaze z infekcijo s *H. pylori* v endoskopski biopsiji ali slini.

Enostopenjski *H. pylori* test s slino je imunokromatografski test, ki uporablja edinstvena protitelesa za selektivno identifikacijo *H. pylori* ureaze v slini ali endoskopskih biopsijah.

KOMPONENTE TESTA

- HP-Saliva testna kasete;
- Posodica za zbiranje sline;
- Navodila za uporabo.

OPOZORILA

Enostopenjski HP-Saliva testna naprava mora biti shranjena pri sobni temperaturi 4 °-30 °C. Testna naprava je občutljiva na vlago kot tudi na vročino. Test izvedemo takoj, ko testno napravo vzamemo iz folijaste torbice. Vsi vzorci sline morajo biti testirani takoj ali po znotraj petih minut zbiranja vzorca.

PRIPRAVA VZORCA IN POSTOPEK IZVEDBE TESTA

Za vzorec sline pacient ne sme zaužiti hrane ali pijače eno uro pred testom.

Postopek testiranja:

- Testno napravo vzamemo iz torbice in jo položimo na ravno in suho površino. Sline zbiramo v čisti vsebnik (cca 1ml).
- Sline prenesemo s priloženo kapalko v posebno kiveto, in sicer 4 kapljice sline. V kiveto dodamo še 2 kapljici pufra.
- Spet uporabimo kapalko, da pripravimo mešanico v testni posodici.
- Z isto kapalko dodamo 4 kapljice mešanice v vzorčno polje na ploščici.
- V približno 30 sekundah se vijolična barva premika skozi rezultatsko okno v center testne naprave, če ne, pa dodamo še dodatni 2 kapljici v vzorčno polje.
- Rezultat interpretiramo po 20-30 minutah. Testa ne smemo interpretirati po 30 minutah.

INTERPRETACIJA TESTA

Ko testna naprava začne delovati, se pojavi barvni trak v levem delu rezultatskega okna, kar nam kaže da test deluje pravilno. Ta trak je kontrolni trak (C). Desni del rezultatskega okna nam kaže rezultat testa. Če se pojavi dodatno obarvani trak v desnem delu rezultatskega okna, je ta trak testni trak (T).

Pozitiven rezultat

Prisotnost dveh obarvanih trakov (T in C) znotraj rezultatskega okna ne glede na to, kateri trak se pojavi prvi, kaže na pozitivni rezultat. (Višja je raven analita v vzorcu, močnejša je barva T traku. Ko pa je raven analita v vzorcu blizu, vendar še vedno znotraj občutljivostne meje testa, je barva T traku zelo šibka.)

Negativen rezultat

Prisotnost samo enega vijolično obarvanega traku znotraj rezultatskega okna kaže na negativen rezultat.

Neveljaven rezultat

Če po izvedbi testa ni viden noben trak, je rezultat neveljaven. Priporoča se, da se test ponovno izvede.

OMEJITVE

Kljub temu, da je test zelo natančen pri detekciji ureaze, lahko pride do nizke pojavnosti napačnih rezultatov. Če so pridobljeni negativni ali vprašljivi rezultati, so zahtevani ostali klinično dostopni testi.

Študije so pokazale, da ima eradikacijska terapija *H. pylori* kolonizacije želodca mešane rezultate pri *H. pylori* oralni kolonizaciji.(68)

3.2.4 DOLOČEVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES IgG IN IgA PROTI H. PYLORI V SERUMU

3.2.4.1 Določevanje IgA protiteles proti *H. pylori*

Test uporabljamo za določanje specifičnih IgA protiteles *H. pylori* v humanem serumu pri bolnikih z gastrointestinalnimi simptomi. Namenjen je za odkrivanje okužbe z bakterijo *H. pylori* in ugotavljanje uspešnosti zdravljenja po antibakterijski terapiji. Do padca protiteles pride 3-6 tednov po terapiji. Vzorec je serum.

Princip metode

Pyloriset EIA-A III je encimskoimunski test za določanje specifičnih protiteles razreda Ig A proti *H. pylori*. Protitelesa iz serumskega vzorca se vežejo s specifičnimi antigeni *H. pylori* na površino mikrotitrne plošče. Po spiranju se encimski konjugat (peroksidaza konjugirana z anti-humanimi IgA) veže na antigen-protitelo kompleks. Nevezan konjugat speremo. Po inkubaciji s substratom prekinemo encimsko reakcijo z žveplovo kislino in izmerimo absorbanco. Intenzivnost obarvanja je sorazmerna koncentraciji specifičnih IgA protiteles *H. pylori* v vzorcu.

REAGENTI, KALIBRATORIJI, KONTROLE

Vsebina Pyloriset EIA-A III kita, ORION Diagnostica:

- Mikrotitrna plošča z 12 stripi (8 x 12 luknjic), prevlečena z inaktiviranimi *H. pylori* antigeni.
- Pufer za razredčevanje seruma (zelene barve), že pripravljen.
- Pufer za spiranje: 10 x koncentriran.
- Encimski konjugat (rdeče barve), že pripravljen: peroksidaza konjugirana s kunčjimi anti-humanimi IgA protitelesi.
- Kalibracijski serum 1, 2, 3 in 4 (humani), že pripravljeni.
- TMB-substrat, že pripravljen: 3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidin (1,25 mmol/L).

- Stop reagent: 0,5M žveplova kislina (H₂SO₄).

Reagenti, hranjeni v hladilniku pri 2 °–8 °C so uporabni do datuma natisnjene na embalaži. Odprta vrečka s stripi mora biti dobro zaprta in je stabilna 2 meseca, če jo hranimo pri 2 °–8 °C. TMB-substrat mora biti hranjen zaščiten pred svetlobo.

INSTRUMENTI IN OPREMA

- Vsebina Pyloriset EIA-A III kita;
- pipete 10 µL, 100 µL in 1-2 mL;
- analizator Personal LAB, BioChem Immunosystems.

KALIBRACIJA

Ob vsaki seriji uporabimo vse 4 kalibratorje. Analizator naredi umeritveno krivuljo iz koncentracij štirih kalibratorjev in odčita vrednost v kIU/L. Test moramo ponoviti, če je absorbanca kalibratorja 1 večja od 0,200 ali kalibratorja 4 manjša od 0,800. Analizator na to opozori sam (Test Validity failed).

DELOVNI POSTOPEK

Priprava reagentov in vzorcev:

- Pred uporabo ogrejemo reagente na sobno temperaturo (18 °–25 °C).
- Pufer za spiranje (Washing Buffer) razredčimo v razmerju 1+ 9. Npr.: 100 mL pufera + 900 mL redestilirane vode. Razredčen pufer je stabilen 4 mesece, če ga hranimo v hladilniku pri 2 °–8 °C.
- Encimski konjugat (Enzyme Conjugate) je že pripravljen; za en strip potrebujemo 1,0 mL konjugata.
- TMB-substrat je že pripravljen. Če se modro obarva, ga ne smemo več uporabljati.
- Kalibracijski serumi 1 do 4 so že razredčeni in pripravljeni za uporabo.
- Analizator sam razredči vzorce! V analizator vstavimo epruvete za dvakratno razredčitev. Serum razredči s pufrom za razredčevanje (Serum Diluting Buffer) od 1 do 201 (npr. 10µL seruma + 2,0mL pufera za razredčenje).

Postopek:

- Pipetiramo:
 - kalibracijske serume 1-4 100 μ L;
 - razredčen vzorec seruma 100 μ L.

- Inkubiramo na sobni temperaturi (18 °–25 °C) in stresamo (700-1000 rpm) 30 minut.
- Spiramo 3 X s 400 μ L pufra za spiranje.
- Pipetiramo 100 μ L encimskega konjugata v vse luknjice mikrotitrne plošče.
- Ploščo inkubiramo na sobni temperaturi (18 °–25 °C) in stresamo (700–1000 rpm) 30 minut.
- Speremo 3 X s 400 μ L pufra za spiranje.
- Pipetiramo 100 μ L substrata v vse luknjice.
- Ploščo inkubiramo pri sobni temperaturi (18 °–25 °C) in stresamo (700-1000 rpm) 10 minut.
- Dodamo 100 μ L Stop reagenta v vse luknjice, da ustavimo encimsko reakcijo.
- Izmerimo absorbanco pri 450 nm, najpozneje v 10 minutah po zaustavitvi encimske reakcije.

Če je vrednost nad 320 kIU/L moramo vzorec seruma razredčiti s pufrom za razredčevanje (zelene barve) v razmerju 1+1: 250 μ L seruma + 250 μ L pufra. Pazimo, da se ne peni!

Ponovimo ves postopek analize in rezultat pomnožimo z 2, da dobimo končni rezultat.

Opozorila:

- Pazimo, da se reagenti ne kontaminirajo z mikroorganizmi! Stekleničko z reagentom po uporabi vedno takoj dobro zapremo!
- Ne smemo mešati reagentov različnih "lotov", razen pufra za razredčevanje seruma, TMB-substrata, pufra za spiranje in stop reagenta.
- Vzorce, ki jih ne moremo analizirati takoj, hranimo v hladilniku do 7 dni. Za daljše obdobje hranimo vzorce v zamrzovalniku pri –20 °C. Odmrznjenih vzorcev ne smemo ponovno zamrzovati.

- Močno lipemičnih ali hemoliziranih vzorcev ne smemo testirati, ker lahko dajo napačne rezultate.

PODAJANJE REZULTATOV

Rezultate podajamo v enotah kIU/L. Cut-off je 20 kIU/L.

- Rezultat pod 20 kIU/L pomeni: 0 (negativno), protitelesa *H. pylori* razreda IgA niso prisotna.
- Rezultati ≥ 20 kIU/L pomenijo prisotnost protiteles *H. pylori* razreda IgA.

VZDRŽEVANJE SISTEMA

Čiščenje igle na analizatorju BioChem Immunosystems:

Iglo snamemo in jo namakamo 20 minut v raztopini 100 mL 0,1% NaOCl (0,8 mL 13 % NaOCl + 99,2 mL redestilirane vode). Preden začnemo z delom iglo spiramo na analizatorju 2 minuti.

VALIDACIJA in ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

Proizvajalec navaja 96,1 % občutljivost in 91,5 % specifičnost analize v primerjavi z rezultati mikrobiološke kulture histoloških vzorcev.

Vključeni smo v mednarodno kontrolo kakovosti Instand 2 X letno s po dvema vzorcema.

3.2.4.2 Določevanje IgG protiteles proti *H. pylori*

Postopek je praktično enak, kot pri določanju IgA protiteles. Razlika je le ta, da pri tem testu gledamo, če je rezultat nad 640 kIU/L, moramo vzorec seruma razredčiti s pufrom za razredčevanje.

VALIDACIJA in ZAGOTAVLJANJE KAKOVOSTI

Proizvajalec navaja 100 % občutljivost in 94,3 % specifičnost analize v primerjavi z rezultati mikrobiološke kulture histoloških vzorcev. (69, 70)

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Neinvazivne diagnostične teste smo ovrednotili tako, da smo izračunali njihovo občutljivost, specifičnost, natančnost ter pozitivno in negativno napovedno vrednost.

Občutljivost in specifičnost: Občutljivost (enačba 1) je razmerje oseb s pozitivnim rezultatom do vseh oseb, ki so resnično bolne (resnično pozitivne in lažno negativne). Na simetrični način pa je specifičnost (enačba 2) merilo, ki nam pove delež tistih, ki smo jih na osnovi testa spoznali za zdrave v odnosu do vseh, ki so resnično brez bolezni (resnično negativni in lažno pozitivni). Pojma specifičnost in občutljivost označujeta torej sposobnost testov, da zaznajo bolezen v prvem oz. da zaznajo nebolezen v drugem primeru. Izračunavanja specifičnosti in občutljivosti zahteva poznavanje dejanskega stanja oseb glede na proučevano bolezen. V praksi se poslužujemo referenčnih diagnostičnih metod, ki so zelo blizu pravemu stanju in oba parametra izračunamo v odnosu do teh referenčnih vrednosti. Referenčna diagnostična metoda je v našem primeru dihalni test s sečnino. Število lažno negativnih pomeni pomanjkanje občutljivosti. Število lažno pozitivnih pomeni pomanjkanje specifičnosti.

S premikanjem vrednosti praga v desno lahko izboljšamo specifičnost in zmanjšamo občutljivost, s premikanjem v levo pa dosegamo ravno obratno. Če želimo zajeti čim več bolnih, povečamo občutljivost. S tem povzročimo, da imamo veliko lažno pozitivnih. (71)

$$\text{OBČUTLJIVOST} = \frac{RP}{RP+LN} \quad (1)$$

$$\text{SPECIFIČNOST} = \frac{RN}{RN+LP} \quad (2)$$

Napovedna vrednost: Občutljivost in specifičnost označujeta vrednost neke metode merjenja določenega parametra glede na referenčno metodo. Dobljene vrednosti niso v povezavi s prevalenco iskanega parametra v populaciji. To pomanjkljivost do neke mere popravlja napovedna vrednost. Pozitivna napovedna vrednost (enačba 3) je merilo razmerja vseh resnično bolnih do vseh, ki so bili razvrščeni v skupino z boleznijo (resnično pozitivni in lažno pozitivni). Negativna napovedna vrednost (enačba 4) pa je razmerje med vsemi brez bolezni z vsemi, ki so bili razvrščeni v skupino brez bolezni (resnično negativni in lažno negativni). 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 prevalence bolezni in pada s prevalenco znaka. Ali z drugimi besedami, napovedna moč pozitivnega znaka je boljša, če je bolezen pogosta in znak redek. Analogno velja za negativno napovedno vrednost. Njena napovedna moč (ob odsotnosti znaka) je torej boljša, če je bolezen redka in znak pogost.

$$\text{Pozitivna napovedna vrednost} = \frac{RP}{RP + LP} \quad (3)$$

$$\text{Negativna napovedna vrednost} = \frac{RN}{RN + LN} \quad (4)$$

Natančnost: merska značilnost dihotomnega diagnostičnega testa, izračunljiva kot količnik vsote števil pravilno pozitivnih in pravilno negativnih rezultatov ter vsote števil vseh rezultatov (enačba 5)

$$\text{Natančnost} = \frac{RP + RN}{RP + LP + RN + LN} \quad (5)$$

Legenda:

Resnično pozitivni rezultati (RP): pozitiven dihalni test s sečnino in pozitiven rezultat testa s slino, serumom ali z blatom

Resnično negativni rezultati (RN): negativen dihalni test s sečnino in negativen rezultat testa s slino, serumom ali z blatom

Lažno pozitivni rezultati (LP): negativen dihalni test s sečnino in pozitiven rezultat testa s slino, serumom ali z blatom

Lažno negativni rezultati (LN): pozitiven dihalni test s sečnino in negativen rezultat testa s slino, serumom ali z blatom

4. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

4.1 Rezultati neinvazivnih preiskav pacientov

Tabela II. Rezultati neinvazivnih preiskav pacientov, narejenih na KIKKB.

Pacient	H&R test v blatu	DIMA test v blatu	Dihalni test s sečnino (%)	Test v slini	Test določanja IgG protiteles (kIU/L)	Test določanja IgA protiteles (kIU/L)
1	0	0	0,4	1	35	9
2	1	1	37,1	1	62	24
3	1	1	43,9	0	191	65
4	0	1	0,8	0	30	22
5	1	1	60,1	0	437	40
6		0	0,5	0	23	17
7	1	1	32	0	169	21
8	0	0	5,6	1	88	81
9			8,6	0	20	12
10		1	12,5	0	281	88
11	0	0	1,3	0	13	25
12	0	1	0,2	1	11	20
13	1	1	20	0	640	92
14	0	0	0,8	0	81	119
15		0	1,6	0	10	14
16	0	0			487	243
17		1	25,1	1	473	54
18		1	7,1	0	96	18
19	0	0	0,1	0	10	15
20	0	0	55,4	0	441	43
21			13,5	1	54	16
22		1	20,6	1	146	16
23		0	1,3	0	28	11
24		0	0,7	0	24	20
25	0	0	0,3	1	14	23
26	0	0	1,7	0	20	13
27	1	1	8,2	0	152	39
28			1,5	1	60	10
29	0	0	1,3	0	26	20
30		0	8		156	36
31		1	15,8	0	228	86
32		0	0,3	0	35	16
33		0	0,5	0	289	46
34	0	1			18	10
35	0	1	1,6	0	16	25
36		1	29,4	0	49	32
37	0	1	1	0	11	23
38	0	0	0,7	0	12	12
39	0	0	0,8	0	10	13
40				0		
41	0	0	0,5	0		
42	1	1	22,05	0	171	85
43	0	0	0,9	0	14	18
44	1	1	71	0	52	20
45	1	1	0,4	1	10	26

46	1	1	32,6	0	21	22
47	0	0	0,9	1	26	10
48		1	20,5	0	103	14
49		0	0,2	0	91	15
50	0	0	0,5	0	10	12
51	0	0			132	24
52	0	0	0,3	0	14	16
53		0	0,7	0	180	100
54	1	1	35,2	0	325	17
55	0	0	2,1	0		
56		0	0,1	0	19	16
57	1	1	22,3	1	386	84
58	0	0	0,5	0	13	11
59	0	1	0,3	1	11	10
60	1	1	7,98	0	173	28
61	0	1			30	22
62		0	0,4	0	293	23
63	1	1	12,5	0	328	13
64	1	1			41	14
65	0	1	1,4	0	11	70
66		0	0,9	0	9	11
67	0	0	0,3	1	24	16
68	1	1	25	0	40	33
69		0	0,1	0	10	13
70	0	0	1,1	0	172	89
71		0	0,3	0	52	17
72		0	0,9	0	10	15
73	0	0	1	0	37	86
74	0	0	1,8	0	50	25
75		0	1,1	0	11	13
76		1	20,1	0	17	12
77	0	1	19,4	0	151	152
78		0	1,4	0	76	13
79	1	1	22	0	350	38
80	0	1	0,7	0	14	12
81	0	1	19,6	0	369	152
82		1	10,4	0	35	17
83				1		
84			0,6			
85		0	0,8	0	29	86
86			1,3	0	31	10
87			27,02			
88	0	1	32,05	0	196	18
89		0	1,2	0	12	10
90	0	1	1,51	0	13	13
91	0	1	2,3	0	21	119
92	1	1	15	0	52	18
93	0	1	8,9	0	225	87
94	1	1	22,2	0	183	15
95	0	0	0,7	0	47	20
96	0	0	0	0	11	17
97	1	1	32	0	466	114
98	1	1	27,7	1	212	89
99		1	3,6	0	111	54
100	0	0	0,7	0	85	26

101	0	0	1,19	0	16	18
102		0	1,2	0	16	12
103			15,7	0		

Pri pacientih, pri katerih podatek v okencu ni naveden, pomeni, da tega testa niso opravili.

H&R test, DIMA test in test v slini- okužba s *H. pylori* je verjetno prisotna, če imamo vrednost 1.

Dihalni test s sečnino- okužba s *H. pylori* je prisotna, če razlika med $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ presega 4,0 ‰.

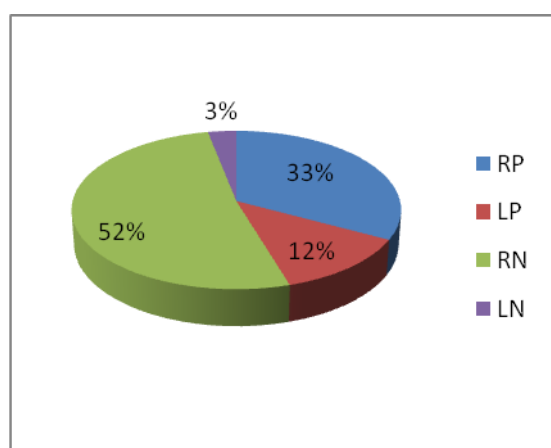
Test določanja IgG in IgA protiteles proti *H. pylori*- rezultati ≥ 20 kIU/L pomenijo prisotnost protiteles *H. pylori* razreda IgG ali IgA.

4.1.1 Test H&R za določanje antigena v blatu

Podatke za H&R test določanja antigena *H. pylori* v blatu smo pridobili v 64 primerih.

Rezultate smo primerjali z rezultati dihalnega testa s sečnino. Na podlagi tega smo izračunali njegovo občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter natančnost.

Rezultat testa H&R	Število
Resnično pozitiven (RP)	21
Lažno pozitiven (LP)	8
Resnično negativen (RN)	33
Lažno negativen (LN)	2
Skupaj	64



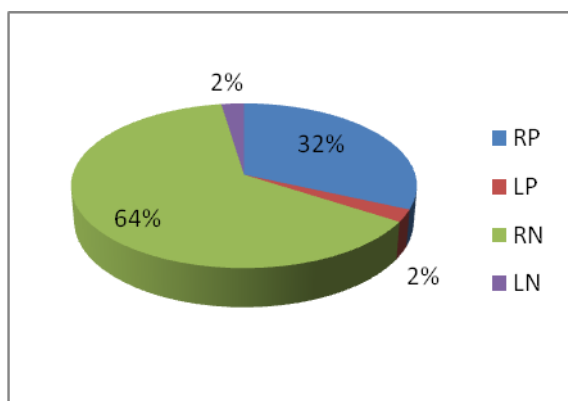
Slika 11: Rezultati testa H&R

Na podlagi teh rezultatov smo izračunali, da je občutljivost H&R testa za določanje antigenov *H. pylori* v blatu 91,3 %, njegova specifičnost pa 80,5 %. Pozitivna napovedna vrednost je 72,41 %, negativna napovedna vrednost 94,29 % in natančnost 84,38 %.

4.1.2 DIMA test za določanje *H. pylori* antigena v blatu

Podatke za DIMA test določanja *H. pylori* antigena v blatu smo pridobili v 41 primerih. Rezultate smo primerjali z rezultati dihalnega testa s sečnino. Na podlagi tega smo izračunali njegovo občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter natančnost.

Rezultat testa DIMA	Število
Resnično pozitiven (RP)	13
Lažno pozitiven (LP)	1
Resnično negativen (RN)	26
Lažno negativen (LN)	1
Skupaj	41



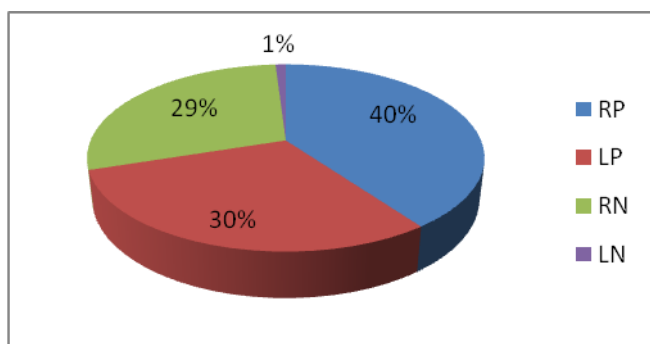
Slika 12: Rezultati testa DIMA

Na podlagi teh rezultatov smo izračunali, da je občutljivost DIMA testa za določanje antigenov *H. pylori* v blatu 92,86 %, njegova specifičnost pa 96,29 %. Pozitivna napovedna vrednost je 92,86 %, negativna napovedna vrednost 96,29 % in natančnost 95,12 %.

4.1.3 Določanje vrednosti IgG in IgA v serumu

Podatke za določanje protiteles IgG in IgA v serumu proti *H. pylori* smo pridobili v 89 primerih. Rezultate smo primerjali z rezultati dihalnega testa s sečnino. Na podlagi tega smo izračunali njegovo občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter natančnost. Najprej smo pogledali vrednosti IgG protiteles proti *H. pylori*.

Rezultati testa v serumu (IgG)	Število
Resnično pozitiven (RP)	36
Lažno pozitiven (LP)	27
Resnično negativen (RN)	26
Lažno negativen (LN)	1
Skupaj	90

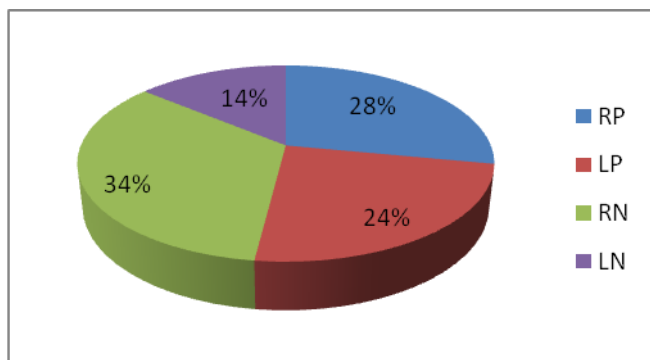


Slika 13: Rezultati testa v serumu IgG

Na podlagi teh rezultatov smo izračunali, da je občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgG proti *H. pylori* 97,29 %, njegova specifičnost pa 49,06 %. Pozitivna napovedna vrednost je 57,14 %, negativna napovedna vrednost 96,30 % in natančnost 68,89 %.

Nato smo pogledali še vrednost IgA protiteles proti *H. pylori* v serumu.

Rezultati testa v serumu (IgA)	Število
Resnično pozitiven (RP)	25
Lažno pozitiven (LP)	22
Resnično negativen (RN)	31
Lažno negativen (LN)	12
Skupaj	90



Slika 14: Rezultati testa v serumu IgA

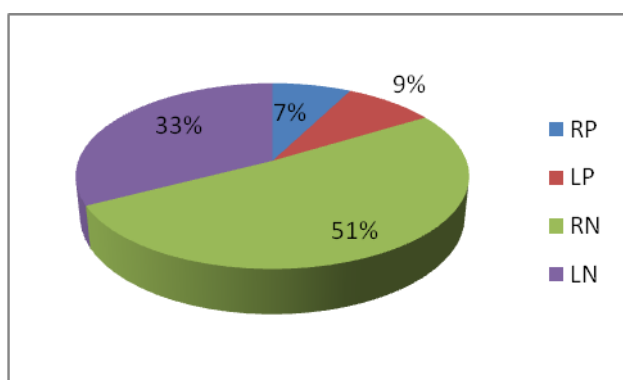
Na podlagi teh rezultatov smo izračunali, da je občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgA proti *H. pylori* 67,57 %, njegova specifičnost pa 58,49 %. Pozitivna napovedna vrednost je 53,19 %, negativna napovedna vrednost 72,09 % in natančnost 62,22 %.

4.1.4 Test določanja *H. pylori* v slini

Podatke za test določanja *H. pylori* v slini smo pridobili v 92 primerih. Rezultate smo primerjali z rezultati dihalnega testa s sečnino. Na podlagi tega smo izračunali njegovo občutljivost, specifičnost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter natančnost.

Rezultat testa v slini	Število
Resnično pozitiven (RP)	7
Lažno pozitiven (LP)	8
Resnično negativen (RN)	47
Lažno negativen (LN)	30
Skupaj	92

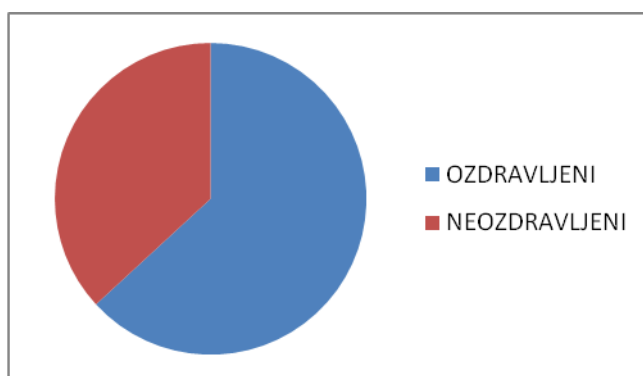
Na podlagi teh rezultatov smo izračunali, da je občutljivost testa v slini za določanje protiteles proti *H. pylori* 18,92 %, njegova specifičnost pa 85,45 %. Pozitivna napovedna vrednost je 46,67 %, negativna napovedna vrednost 61,04 % in natančnost 58,70 %.



Slika 15: Rezultati testa v slini

4.2 Uspešnost ozdravitve in primerjava serologije in dihalnega testa s sečnino

Nato smo pogledali uspešnost terapije glede na rezultate dihalnega testa s sečnino. 39 pacientov, ki so imeli pozitiven dihalni test s sečnino, smo povabili na ponovno testiranje. Takih, ki so prišli po eradikacijski terapiji na ponovni pregled, je bilo 19 bolnikov. 12 jih je bilo na ponovnem testiranju negativnih, ostali so bili še vedno pozitivni. Uspešnost zdravljenja ne glede na predpisano shemo je znašala torej 63,16 %.



Slika 16 - Uspešnost ozdravitve po eradikacijski terapiji

Potem smo pogledali vrednosti posameznih neinvazivnih testov pri bolnikih, pred in po eradikacijski terapiji.

Tabela III. Rezultati neinvazivnih preiskav pacientov, narejenih na KIKKB, ki so neinvazivne teste opravili večkrat.

Pacienti, ki so prišli dvakrat ali celo trikrat na kontrolo	H&R test v blatu	DIMA test v blatu	Dihalni test s sečnino (%)	Test v slini	Test določanja IgG protiteles (kIU/L)	Test določanja IgA protiteles (kIU/L)
1.	1	1	71	0	52	20
	0	0	1,28	0	40	13
2.	1	1	35,2	0	325	17
	0	0	0,4	0	164	14
3.	1	1	22,3	1	386	84
	0	0	0,47	0	336	31
4.	1	1	7,98	0	173	28
	0	0	0,6	0	175	18
5.	1	1	12,5	0	328	13
	1	0	0,7	0	179	13

6.	1	1	25	0	40	33
	1	0	0,63	0	192	46
7.	1	1	22	0	350	38
	1	0	0,4	0	159	15
8.			27,02			
	0	0	0,79	0	27	40
9.	0	1	32,05	0	196	18
	0	1	32,0	0	196	18
10.	1	1	43,9	0	191	65
	0	0	45,32		238	96
11.	1	1	60,1	0	437	40
	1	1	50,4	0	468	82
12.	0	0	5,6	1	88	81
	0	0	0,26	1	48	48
13.	0	1	12,5	0	281	88
	0	0	0,6	1	168	56
14.	1	1	20	0	640	92
	0	0	18,61	0	595	73
	0	0	1,4	0	387	36
15.	1	1	25,1	1	473	54
	1	1	37,2	0	516	58
	0	0	0,3	0	349	41
16.	1	1	7,1	0	96	18
	1	1	6	0	74	22
	1	1	8,3	0	85	23
17.	0	0	8	0	156	36
	0	0	8,04	0	156	36
18.	1	1	32	0	466	114
	0	0	1,6	0	287	26
19.	1	1	27,7	1	212	89
	1	0	1,1	0	148	21

- rezultati neinvazivnih testov pred eradikacijsko terapijo

- rezultati neinvazivnih testov po eradikacijski terapiji

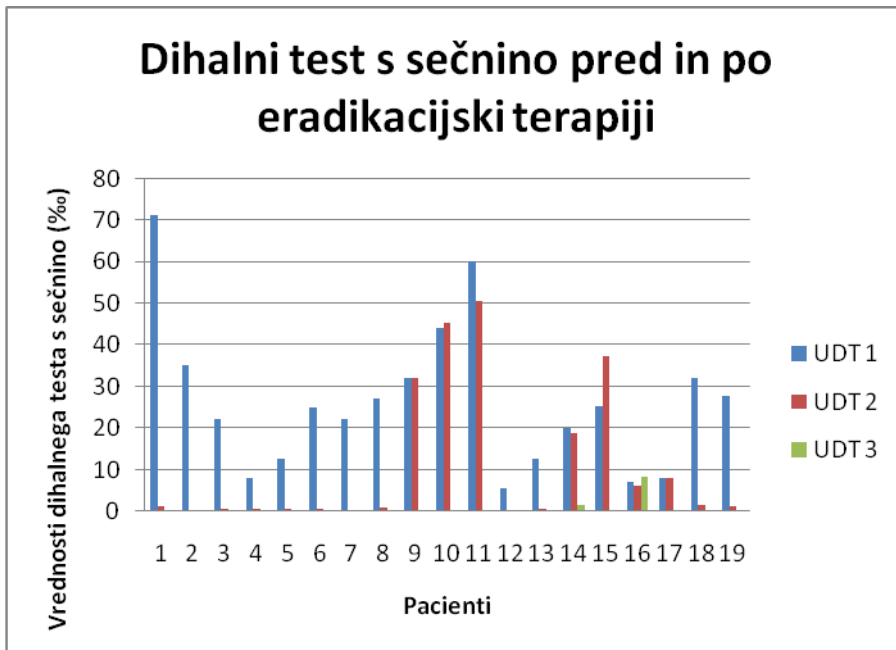
Pri pacientih, pri katerih podatek v okencu ni naveden, pomeni, da tega testa niso opravili.

H&R test, DIMA test in test v slini- okužba s *H. pylori* je verjetno prisotna, če imamo vrednost 1.

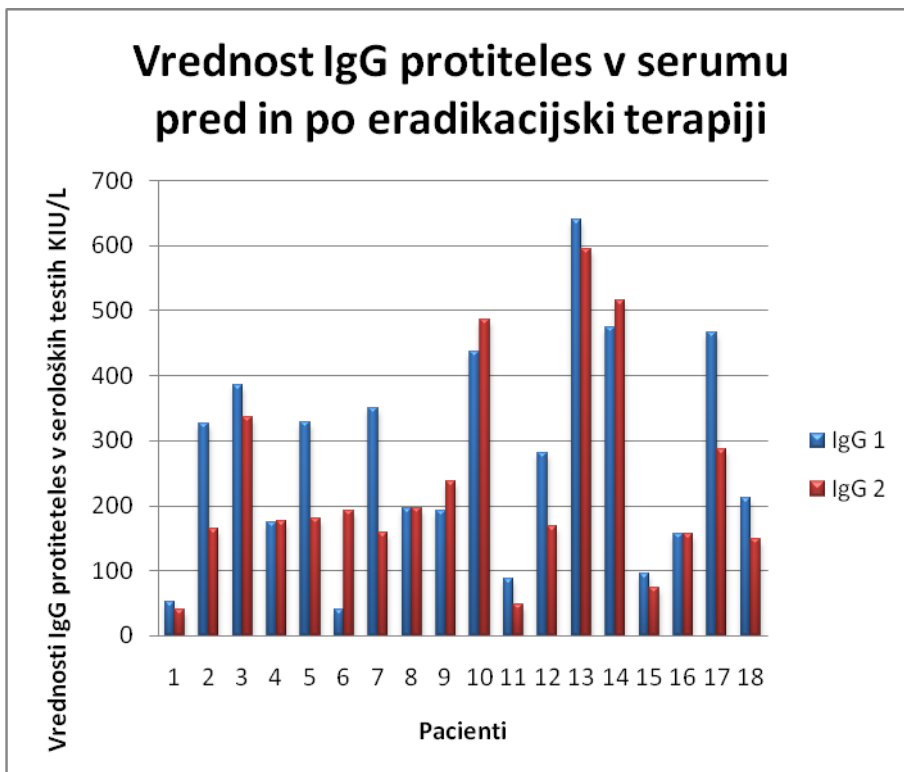
Dihalni test s sečnino- okužba s *H. pylori* je prisotna, če razlika med $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ presega 4,0 ‰.

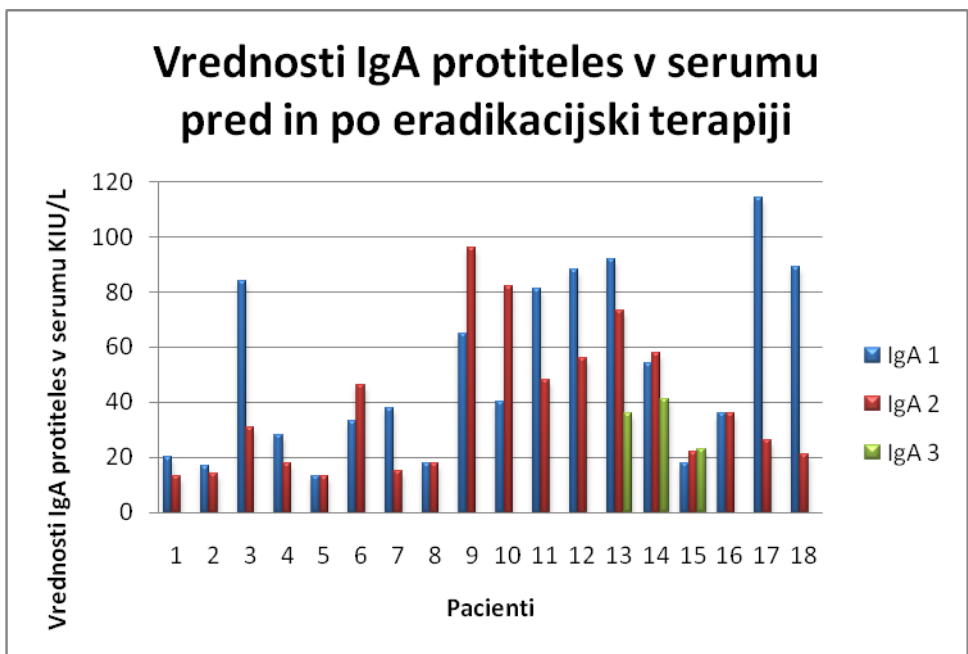
Test določanja IgG in IgA protiteles proti *H. pylori*- rezultati ≥ 20 kIU/L pomenijo prisotnost protiteles *H. pylori* razreda IgG ali IgA.

Dihalni test s sečnino:

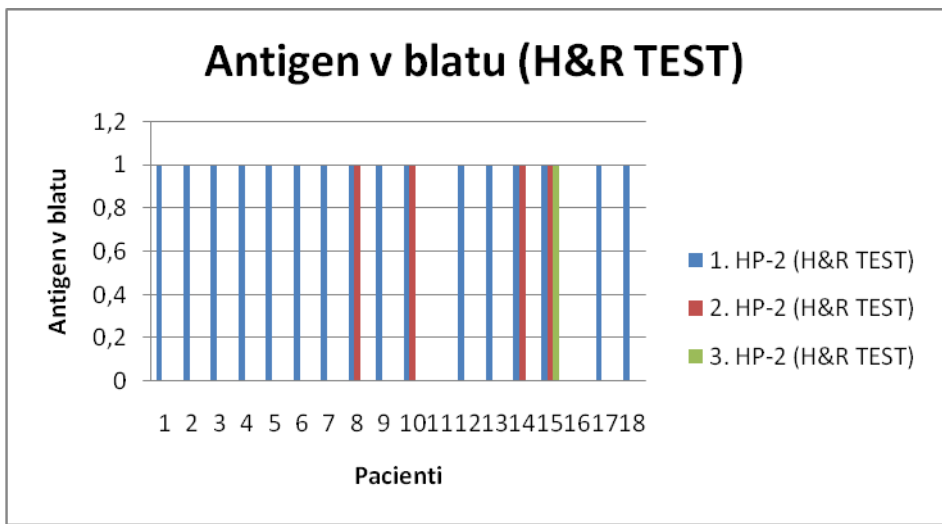
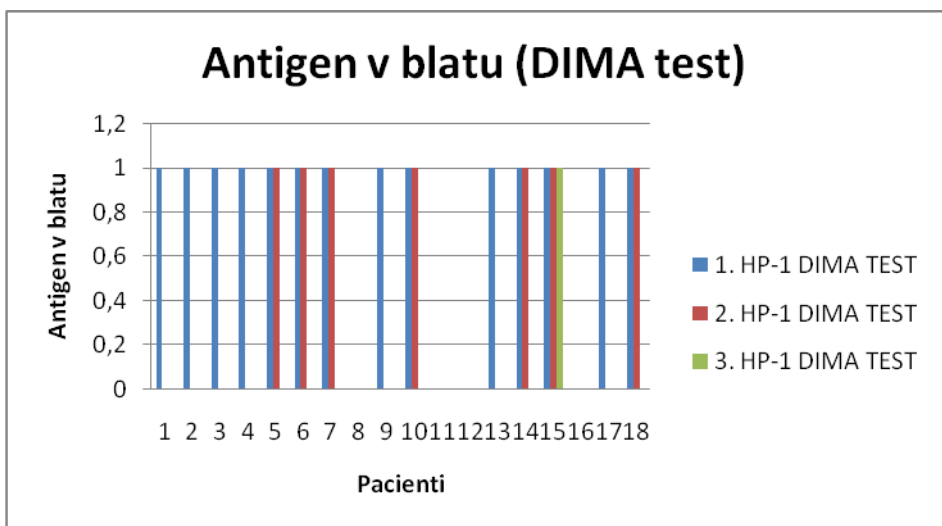


Vrednosti seroloških markerjev IgG in IgA:

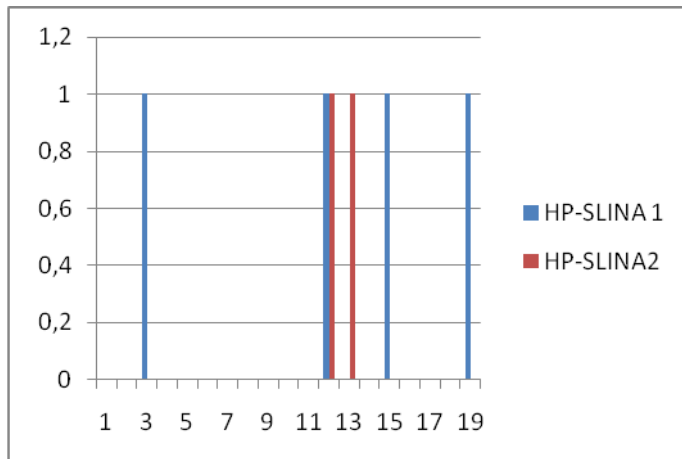




Rezultati antigena v blatu:



Test v slini:



Slika 17: Vrednosti posameznih

neinvazivnih testov pri bolnikih, pred in po eradikacijski terapiji.

Primerjali smo dihalni test s sečnino in serologijo. Na prvem testiranju, so imeli vsi bolniki pozitivna IgG protitelesa proti *H. pylori*, IgA protitelesa proti *H. pylori* pa so bila pod mejno vrednostjo pri dveh pacientih. Na drugem testiranju je bilo še 7 pacientov pozitivnih na dihalni test s sečnino in 12 negativnih. Od sedmih pozitivnih na UDT so bili vsi pozitivni na serološke teste, razen 1 pacient je imel IgA vrednost pod mejno vrednostjo. Od 12 negativnih na UDT, so bili vsi pozitivni na IgG protitelesa proti *H. pylori*, pri IgA testu pa je bilo 6 negativnih. Bolniki so bili na prvem testiranju večinoma pozitivni na test določanja antigenov *H. pylori* v blatu, na ponovnem testiranju pa je bil ta delež občutno manjši. Pri testu H&R smo imeli štiri pozitivne bolnike od 18 (pri enem bolniku ni bilo podatka za prvo testiranje), pri DIMA testu pa je bilo več pozitivnih.

5. RAZPRAVA

H. pylori kolonizira človeški želodec skozi otroštvo in preživi v človeškem želodcu skozi celotno življenje prenašalca. Pri večini posameznikov je okužba s *H. pylori* asimptomatska, ki povzroča kronični gastritis. Pri okoli 20-30 % okuženih posameznikov se lahko razvijejo peptične razjede in pri manj kot 2 % želodčni rak.(72) Gastrointestinalna endoskopija se na široko izvaja za bolezni prebavil in za diagnoze okužb s *H. pylori*. Dihalni test s sečnino, testi antigena v blatu in serološki testi z visoko natančnostjo so neinvazivni testi, ki bi jih lahko uporabljali za diagnozo *H. pylori* infekcije.(73)

Za eradikacijsko kontrolo, v najboljšem primeru po treh mesecih zdravljenja, dihalni test hitro potrdi izkoreninjenje *H. pylori* (74), za razliko od tehnik določanja protiteles v serumu, ki potrebujejo dalj časa za potrditev izkoreninjenja. Temu je tako, ker titri protiteles lahko padejo šele po šestih mesecih od eradikacijske terapije. Torej testov določanja protiteles ni moč takoj uporabiti za oceno učinkovitosti izkoreninjenja *H. pylori* kmalu po zdravljenju.(75)

Tabela IV: Diagnostične vrednosti različnih neinvazivnih testov za odkrivanje okužbe s *H. pylori*

Metoda	Občutljivost	Specifičnost	PPV %	NPV%	Natančnost
<i>DIMA test v blatu</i>	92,86	96,29	92,86	96,29	95,12
<i>H&R test v blatu</i>	91,3	80,5	72,41	94,29	84,38
<i>Test določanja IgG protiteles proti H. pylori v serumu</i>	97,29	49,06	57,14	96,30	68,89
<i>Test določanja IgA protiteles proti H. pylori v serumu</i>	67,57	58,49	53,19	72,09	62,22
<i>Test določanja antigena proti H. pylori v slini</i>	18,92	85,45	46,67	61,04	58,70

Testi za določanje antigenov v blatu se lahko izvedejo s konvencionalnimi imunskimi testi (EIA) z uporabo poliklonalnih protiteles, ki imajo občutljivost od 88,9 % do 98,3 % in specifičnost od 77,8 % do 98,4 %, in s hitrimi imunokromatografskimi metodami na principu kapilarnega vleka z uporabo monoklonalnih protiteles, ki predstavljajo 52,5-94,6 % občutljivost, 55,5-98,4 % specifičnost, 94,6 % pozitivno napovedno vrednost in 98,4 % negativne napovedne vrednosti.(76, 77, 78, 79) Imunokromatografska metoda na principu

kapilarnega vleka je uporabna za majhne laboratorije, ki nimajo opreme za izvajanja EIA, in imajo opravka le z nekaj vzorci. Imunokromatografska metoda je hitrejša od konvencionalne EIA, pri kateri potrebujemo več kot dve uri za izvedbo; poleg tega, je cut-off vrednost še vedno stvar debate.(80)

Testirali smo hitro imunokromatografsko metodo na principu kapilarnega vleka z določanjem antigenov *H. pylori* v blatu, z uporabo dihalnega testa s sečnino kot zlatega standarda. Izračunali smo, da je občutljivost H&R testa za določanje antigenov *H. pylori* v blatu 91,3 %, njegova specifičnost pa 80,5 %, kar predstavlja dobro skladnost z dihalnim testom s sečnino v skladu s prej omenjenimi podatki. Občutljivost nam skoraj zagotovo kaže na okužbo s *H. pylori*. Specifičnost je nekoliko slabša, saj traja dlje časa da se vzpostavi normalno stanje; to je odsotnost *H. pylori*. Občutljivost DIMA testa za določanje antigenov *H. pylori* v blatu pa je znašala 92,86 %, njegova specifičnost pa 96,29 %, kar predstavlja še boljšo skladnost, vendar moramo upoštevati, da smo pri DIMA testu imeli manj podatkov bolnikov kot pri testu H&R.

Vzrok lažno negativnim rezultatom je lahko začasno inhibiranje rasti, če se pacienti niso izogibali uporabi zaviralcev protonske črpalke najmanj deset dni pred preizkusom. Nizka kolonizacija bakterije v želodcu in posledično nizka koncentracija *H. pylori* antigenov v blatu, ni zadostna, da bi reagirala s testom, kar povzroča lažno negativne teste. Negativni testni rezultati pridobljeni med ali takoj po eradikacijski terapiji, so torej lahko nezanesljivi. Kokoidna oblika *H. pylori* lahko pojasni lažno pozitivne rezultate; to je morfološko manifestacijo odmrlih bakterijskih celic in ne pomeni možnosti ponovne okužbe. Čeprav so imeli pacienti naročeno, da zbirajo vzorce blata v sterilno vialo, pridobljeno iz laboratorija, ne moremo izključiti možnosti zunanje kontaminacije. Druga možnost je tudi navzkrižna reakcija med poliklonalnimi protitelesi iz črevesne flore s testom antigena bakterije.

Krausse et. al. (2008) so ocenili imunokromatografsko metodo na principu kapilarnega vleka in ugotovili, da je inkubacijski čas pomemben dejavnik pri odčitavanju rezultatov.(78)

Sklepamo, da se hitri test določanja antigenov v blatu, na principu kapilarnega vleka, lahko uporablja kot alternativa dihalnemu testu s sečnino, še posebno v državah v razvoju, vendar se rezultati vedno interpretirajo ob upoštevanju celostne klinične slike in ob rezultatih ostalih laboratorijskih preiskav.

Serološki (imunološki) testi za odkrivanje protiteles proti bakteriji *H. pylori* so se že takoj pokazali za zelo učinkovite, zanesljive in po ceni ugodne.(81) Prva poročila pričajo o tem, da

so uporabni predvsem za odkrivanje povezav med okužbo in boleznimi, pri katerih bi lahko bila soudeležena bakterija *H. pylori*. Tako so npr. ugotovili, da je okužba s *H. pylori* pomembno povezana s krvavitvijo iz peptičnega ulkusa in pojavom osrednje serozne horioretinopatije, da je s *H. pylori* povzročeni gastritis zelo redek pri bolnikih s Crohnovo boleznijo, značilno več (od 69 % do 94 %) pa je okužb pri bolnikih, ki imajo želodčnega raka.(82) Bolniki z rozaceo in dispepsijo imajo v 81 % navzoča specifična protitelesa razreda IgG proti bakteriji *H. pylori* in v 75 % proti antigenu CagA, bolniki brez dispepsije pa samo v 16 %.(83)

Za razliko od testov, ki se zanašajo na bakterijsko aktivnost ureaze, se lahko preiskave protiteles opravljajo pri bolnikih, ki jemljejo zaviralce protonske črpalke ali antibiotike, vendar niso neposredno uporabljene v neposrednem spremljanju eradikacijske terapije.

V literaturi se pojavlja več študij, ki podpirajo klinično uporabnost IgA serologije. V dveh študijah so imeli nekaj bolnikov s potrjeno okužbo *H. pylori* in z samo IgA protitelesi. Aromaa et al poročajo, da protitelesa IgA in nizke stopnje pepsinogena I povečajo tveganje za želodčnega raka. Poleg tega se lahko IgA protitelesa pojavijo prej kot IgG protitelesa pri bolnikih, pri katerih pride do ponovne okužbe. Kosunen et al so opisali podskupino *H. pylori* okuženih pacientov, ki so bili pozitivni na IgA, vendar negativni na IgG protitelesa proti *H. pylori*, tako je bila ocena titra IgA protiteles edina metoda serološke potrditve zdravljenja.(84)

Serumska protitelesa proti *H. pylori*, IgG in IgA, manj pogosto IgM razred protiteles, odkrijemo v okuženih posameznikih. IgM protitelesa je mogoče zaznati kmalu po pridobitvi okužbe, toda IgG in IgA titer protiteles kaže na kronično infekcijo. Serološko diagnosticiranje okužb z bakterijo *H. pylori* se opravlja v glavnem z določanjem protiteles IgG. Drugi analitični parameter pri seroloških preiskavah je določanje protiteles IgA proti bakteriji *H. pylori*. Določanje protiteles IgA v kombinaciji z analizo protiteles IgG omogoča diagnosticiranje akutne okužbe z bakterijo *H. pylori*. Zaradi kroničnega poteka bolezni je določanje protiteles IgM pri odraslih nepotrebno. Določanje protiteles IgG proti bakteriji *H. pylori* se uporablja za nadzor zdravljenja po eradikaciji bakterije.

Izračunali smo, da je občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgG proti *H. pylori* 97,29 %, njegova specifičnost pa 49,06 %. Pozitivna napovedna vrednost je 57,14 %, negativna napovedna vrednost 96,30 % in natančnost 68,89 %. Občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgA proti *H. pylori* pa znaša 67,57 % in specifičnost 58,49 %. Pozitivna

napovedna vrednost je 53,19 %, negativna napovedna vrednost 72,09 % in natančnost 62,22 %. Na splošno bi lahko pričakovali, da ima IgA diagnostika nižje vrednosti občutljivosti, kot IgG diagnostika, ker večina posameznikov kaže pretežno IgG imunski odziv na *H. pylori*. (84) To so nam naši rezultati tudi potrdili, specifičnost pa je boljša pri IgA testu. Razlog nizke specifičnosti pri obeh testih protiteles proti *H. pylori* je v počasnem povišanju oz. upadanju protiteles. Ocenjena občutljivost IgA je bila manjša kot pri določanju protiteles IgG. Možen vzrok je ta, da je odziv protiteles IgA usmerjen predvsem proti proteinoma CagA in ureazi B bakterije *H. pylori*. V nasprotju s tem protitelesa IgG reagirajo z mnogimi drugimi beljakovinami povzročitelja. Vzroki so lahko razlike med odzivom protiteles IgA in IgG ter dejstvo, da je beljakovina ureaza B glavni vzrok nespecifičnega vezanja protiteles. (85) Kot smo že prej omenili, so nekateri raziskovalci odkrili, da ima približno 2 % pacientov IgA imunski odziv v odsotnosti IgG imunskega odziva. V naši populaciji je bilo 6 (6,7 %) od 89 pacientov IgA pozitivnih in IgG negativnih. Metoda dokazovanja IgA protiteles je torej manj občutljiva kot določanje IgG protiteles. Zaradi počasnega povišanja oz. počasnega upadanja vrednosti protiteles metoda ni povsem primerna za spremljanje uspešnosti zdravljenja.

Pozitivne rezultate seroloških preiskav je treba vedno tolmačiti skupaj z bolnikovo anamnezo in klinično sliko, ker z njimi ne moremo vedno ločiti aktivne bolezni in serološke prisotnosti brez kliničnih znakov. Negativni rezultat pomeni serološko negativni status bolnika. To ne izključuje aktivne okužbe s kliničnimi bolezenskimi znaki, ker je bil serum morda odvzet prezgodaj. Pri seroloških preiskavah bakterije *H. pylori* se ne smemo osredotočiti le na določanje protiteles IgG, ker je lahko 2–7 % bolnikov z akutno okužbo z bakterijo *H. pylori* negativnih na protitelesa IgG in pozitivnih na IgA. (84) Po drugi strani 15 %–35 % bolnikov z akutno okužbo z bakterijo *H. pylori* ne izdeluje specifičnih protiteles IgA, tako da lahko pri seroloških preiskavah določamo le druge razrede imunoglobulinov. Zato je treba serološke preiskave za bakterijo *H. pylori* opraviti hkrati za protitelesa IgG in IgA. (86)

Serologija torej ni metoda za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja okužbe, razen če istočasno primerjamo nivoje protiteles iz vzorcev krvi pred in 6 mesecev po zdravljenju. V velikih raziskavah so potrdili visoko občutljivost (90 % do 100 %), toda različno specifičnost (76 % do 96 %). Natančnost serologije se giblje med 83 % in 98 %. (87) Vidimo, da se s temi podatki sklada le občutljivost določevanja IgG protiteles proti *H. pylori* v serumu v našem vzorcu bolnikov.

Eno prvih raziskav o vplivu ustne *H. pylori* na okužbo želodca je izvedla Miyabayashi et. al. (2000).(88) Ta študija je potrdila povezavo med gastritisom, ki ga povzroča okužba s *H. pylori*, in ustno kolonizacijo bakterije. Poleg tega so ti avtorji skušali osvetliti odpornost ustne *H. pylori* proti tipični trojni anti-*H. pylori* terapiji, ki se uporabljajo za eradikacijo bakterije iz želodca. Ugotovili so, da so bolniki z ustno *H. pylori* imeli precej večje tveganje za ponovno okužbo želodca po uspešnem zdravljenju. Tako je ta raziskava poudarila jasno povezavo med prisotnostjo *H. pylori* v ustni votlini in vnetjem želodčne sluznice.(89) Prva oseba ki je izolirala *H. pylori* iz zobnih oblog, kmalu po tem, ko sta jih odkrila R. Warren in B. Marshall, je bil Krajden leta 1989.(90)

Nekatere študije kažejo, da je ustna votlina prehodna ali trajna lokacija za *H. pylori* zlasti pri bolnikih s kroničnim vnetjem dlesni ali parodontalno boleznijo.(91) Poleg tega se lahko odkritje *H. pylori* v ustih pojavi neodvisno od kolonizacije želodca, kar bi lahko pomenilo, da človeška ustna votlina predstavlja pomemben izven gastrični rezervoar za *H. pylori*. Prav zanimivo je raziskovanje tudi drugih ekoloških niš za *H. pylori* od ustne votline do želodca, kot je požiralnik.(92)

Po drugi strani, je Oshowo et. al. (93) v svoji študiji pokazal, da čeprav je ponovna okužba v želodcu z bakterijami iz ustne votline možna, se to pojavlja precej redko in ima majhen vpliv na ponovno okužbo želodca.

Zdi se torej zelo verjetno, da v primeru okužbe želodca s *H. pylori* ustna votlina služi kot vrata za prenos *H. pylori* do GIT (prenos iz osebe na osebo). Vendar pa ni jasno, kakšna je vloga te bakterije v ustni votlini pri postopku prenosa. Ni razjasnjeno, ali je bakterija le prehodno shranjena v ustih, ko gre v želodec, ali pa je ustna votlina pravi bakterijski rezervoar, kjer se lahko *H. pylori* pomnožuje, dosega dovolj visoko število za vstop v želodec in njegovo okužbo.

Izračunali smo, da je občutljivost testa za selektivno identifikacijo *H. pylori* ureaze v slini 18,92 %, njegova specifičnost pa 85,45 %. Pozitivna napovedna vrednost je 46,67 %, negativna napovedna vrednost 61,04 % in natančnost 58,70 %. Kljub temu da je ta test neinvaziven, njegova natančnost ni sprejemljiva v prisotnosti boljših alternativ.

Potem smo pogledali tudi rezultate 19 bolnikov od 39, ki so bili pozitivni na dihalni test s sečnino na prvi kontroli in ki so prišli na ponovno kontrolo. Glede na zmanjševanje uspešnosti

eradikacije v zadnjih letih smo pričakovali, da bo uspešnost eradikacije na spodnji meji, torej okoli 60 %, kar je tudi skladno z našimi rezultati, kjer znaša uspešnost 63,2 %.

Posebej smo določali vrednosti protiteles razreda IgG in IgA. Pozitivne so bile vrednosti, višje od 20 enot/ml. Delež pozitivnih rezultatov in absolutna višina ravni protiteles IgG je bila višja od protiteles IgA, kar je bilo pričakovano, saj so IgA protitelesa sekrecijska in prisotna predvsem lokalno na sluznici. Kot smo predvidevali, so vrednosti seroloških markerjev padle, vendar bile še vedno pozitivne, saj se količina protiteles skoraj zagotovo značilno zmanjša šele po šestih mesecih. Upoštevati moramo tudi to možnost, da so naši pacienti lahko že v preteklosti bili na eradikacijski terapiji proti *H. pylori* in je višja vrednost protiteles v serumu samo odraz počasnega padanja titra protiteles, medtem ko bakterija z dihalnim testom s sečnino ni več zaznana.

Ko smo pregledali rezultate drugega testiranja pri vzorcih blata, ki so bili prvič pozitivni, smo ugotovili, da je vzorec drugič ni bil vedno negativen. Sklepamo lahko, da v obdobju od prvega testiranja do drugega antigen ni izginil iz prebavil preiskovanca. Podobno je tudi glede količine protiteles. Pri drugem testiranju količina protiteles ni bila vedno manjša. Tudi ta rezultat kaže na to, da v obdobju od prvega do drugega testiranja po vsej verjetnosti bakterija ni izginila iz prebavil preiskovanca. Iz ugotovljenega torej ne moremo zaključiti, da imunološki testi izpolnjujejo svojo nalogo in povedo, da je bilo zdravljenje preiskovanca učinkovito. Vsak antigen torej sproži v okuženem organizmu imunski odziv, ki se kaže s tvorbo specifičnih protiteles. Z izginitvijo antigena iz organizma se imunski odziv za določeni antigen zmanjša oziroma izgine. Zato se količina specifičnih protiteles zmanjšuje tako, da lahko v razpolovnem času, ki je značilen za posamezni imunoglobulinski razred, pričakujemo približno polovico manj protiteles kot ob kulminaciji odziva.(94) Zaradi različnih vplivov se lahko količina protiteles zmanjšuje počasneje. Zato je verjetno boljše, da meritev upada količine specifičnih protiteles opravimo najprej mesec dni po klinični ugotovitvi, da okužbe ni več.(95) Razpolovni čas za protitelesa razreda IgG je namreč 21 dni. Preiskavo pa je smotrno ponoviti še čez 6 mesecev, ko se količina protiteles skoraj zagotovo značilno zmanjša. Pri tretji kontroli, na katero bodo prišli naši pacienti, lahko že pričakujemo znaten upad koncentracij IgA in IgG protiteles proti *H. pylori*, kar je bilo zaznati pri dveh naših pacientih, ki sta prišla že na tretjo kontrolo. Pri ugotavljanju antigena v blatu je negativen izvid drugega odvzema po zaključenem zdravljenju skoraj zanesljivo znak uničenja bakterije. V primerih, ko je bakterija na zdravljenje odporna ali ob možni ponovni okužbi, to seveda ne velja. Zato

je pozitiven izid testa več mesecev po prvi ugotovitvi antigena bakterije *H. pylori* v blatu znak neuspešnega zdravljenja.

Ob pravilnem obravnavanju bolnika, ki mora po zdravljenju na kontrolni pregled, lahko pričakujemo, da bosta zmanjšanje količine specifičnih protiteles razreda IgG in odsotnost antigena potrdila odstranitev bakterije iz prebavil. Po analogiji pa seveda navzočnost protiteles v nespremenjeni količini ali celo povečanje in navzočnost antigena kažeta na neuspešnost zdravljenja. Seveda pa ni vse tako preprosto. Takrat, ko zdravljenje ni uspešno, je na mestu natančnejše preučevanje konkretnega bakterijskega seva. Bakterija ima na voljo celo vrsto dejavnikov, ki ji omogočajo preživetje in povzročanje težav pri določenem bolniku.

Določanje specifičnih protiteles proti bakteriji *H. pylori* v krvi in antigena v blatu je torej koristno. Prednosti imunološkega testiranja pred drugimi uveljavljenimi testi za odkrivanje okužbe z bakterijo *H. pylori* in uspešnosti eradikacije so, da so imunološki testi preprosti, nenevarni in poceni, rezultati pa zanesljivi in uporabni. Nevarnost pri imunoloških testih pa je, da jih uporabljamo nenačrtno, narobe in brez potrebnega preverjanja. Iz tega verjetno izvira napačno tolmačenje izvidov, iz napačnega tolmačenja pa napačno sklepanje, da imunološki testi za odkrivanje specifičnih protiteles in antigena *H. pylori* niso specifični, občutljivi, relevantni in zanesljivi.

Zaradi določenih pomanjkljivosti seroloških testov bi se v večji meri priporočala dva testa, in sicer dihalni test s sečnino in določanje protiteles v blatu. Oba testa sta pokazala dovolj visoko občutljivost in specifičnost, da sta primerna za ugotavljanje prisotnosti okužbe. V državah Evropske unije se po priporočilih »Maastrichta 2« uporabljata oba testa, tako dihalni test s sečnino kot test antigena v blatu. Določanje protiteles v serumu se torej lahko uporabi za nadzor zdravljenja po eradikaciji. Za določanje bistvenih sprememb koncentracije mora med eradikacijo in serološko kontrolo preteči vsaj 6 mesecev.⁽⁸⁶⁾ Zlasti pri protitelesih IgG je treba upoštevati, da so lahko prisotna več mesecev ali celo let. Zato ima serološki nadzor omejeno uporabnost. Za dodaten nadzor se priporoča neinvazivni dihalni preizkus ¹³C.

6. SKLEP

Cilj naše raziskave je bil, ugotoviti diagnostično uporabnost testov določanja antigenov v blatu in slini ter testa določanja protiteles IgG in IgA proti *H. pylori* v serumu. S tem namenom smo zbrali podatke o 103 pacientih v starosti od 11 do 86 let in jim naredili omenjene neinvazivne teste, ter dihalni test s sečnino, katerega smo uporabili kot zlati standard. Izračunali smo njihovo specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter natančnost. Preverili smo uspešnost zdravljenja okužbe pri 19 bolnikih, ki so prišli na ponovno kontrolo po predpisani eradikacijski terapiji, ter primerjali vrednosti seroloških markerjev in dihalnega testa s sečnino.

Ugotovili smo:

- Občutljivost H&R testa za določanje antigenov *H. pylori* v blatu je 91,3 %, njegova specifičnost pa 80,5 %. Pozitivna napovedna vrednost je 72,41 %, negativna napovedna vrednost 94,29 % in natančnost 84,38 %, kar predstavlja dobro skladnost z dihalnim testom s sečnino. DIMA test za določanja antigenov *H. pylori* v blatu je pokazal še boljšo diagnostično uporabnost. Njegova občutljivost je 92,86 %, njegova specifičnost pa 96,29 %. Pozitivna napovedna vrednost je 92,86 %, negativna napovedna vrednost 96,29 % in natančnost 95,12 %. Testa določanja antigenov *H. pylori* v blatu se lahko uporabljata kot alternativa dihalnemu testu s sečnino, še posebno v državah v razvoju, vendar se rezultati vedno interpretirajo ob upoštevanju celostne klinične slike in ob rezultatih ostalih laboratorijskih preiskav.
- Občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgG proti *H. pylori* je 97,29 %, njegova specifičnost pa 49,06 %. Pozitivna napovedna vrednost je 57,14 %, negativna napovedna vrednost 96,30 % in natančnost 68,89 %. Občutljivost testa v serumu za določanje protiteles IgA proti *H. pylori* pa znaša 67,57 % in specifičnost 58,49 %. Pozitivna napovedna vrednost je 53,19 %, negativna napovedna vrednost 72,09 % in natančnost 62,22 %. Razlog nizke specifičnosti pri obeh testih protiteles proti *H. pylori* je v počasnem povišanju oz. upadanju protiteles.
- Občutljivost testa za selektivno identifikacijo *H. pylori* ureaze v slini je 18,92 %, njegova specifičnost 85,45 %. Pozitivna napovedna vrednost je 46,67 %, negativna napovedna vrednost 61,04 % in natančnost 58,70 %. Test dokazovanja *H. pylori* v slini ni zadosten pokazatelj okužbe s *H. pylori*.
- Uspešnost zdravljenja okužbe s *H. pylori* v proučevani populaciji, ne glede na predpisano shemo zdravljenja, znaša 63,16 %.

- Delež pozitivnih rezultatov in absolutna višina ravni protiteles IgG je bila višja od protiteles IgA, kar je bilo pričakovano, saj so IgA protitelesa sekrecijska in prisotna predvsem lokalno na sluznici. Kot smo predvidevali, so vrednosti seroloških markerjev padle, vendar so bile še vedno pozitivne, saj se količina protiteles skoraj zagotovo značilno zmanjša šele po šestih mesecih.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Marshall B, Warren J. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1(8336): 1273–1275.
2. Marshall B, Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1(8390): 1311–1315.
3. Maddocks AC. *Helicobacter pylori* (formerly *Campylobacter pyloridis/pylori*) 1986–1989: a review. *J Clin Pathol* 1990; 43: 353–356.
4. Surveyor I, Goodwin CS, Mullan BP, Geelhoed E, Warren JR, Murray RN, et al. The 14C-urea breath-test for the detection of gastric *Campylobacter pylori* infection. *Med J Aust* 1989; 151: 435–439.
5. Halme L, Karkkainen P, Rautelin H, Kosunen TU, Sipponen P. High frequency of helicobacter negative gastritis in patients with Crohn's disease. *Gut* 1996; 38: 379–383.
6. Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1808–1825.
7. Hirschl AM, Rotter ML. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Journal of Gastroenterology* 1996; 31: 33–36.
8. Trevisani L, Sartori S, Galvani F, Rossi MR, Ruina M, Caselli M. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces with a new enzyme immunoassay method: preliminary results. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 893–894.
9. Makristathis A, Pasching E, Schutze K, Wimmer M, Rotter ML, Hirschl AM. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2772–2774.
10. Tepeš B. Priporočila za zdravljenje okužbe s *Helicobacter pylori* v Sloveniji v letu 2005. *Gastroenterolog* 2005; 9: 77–85.

11. Gubina M TB, Vidmar G, Ihan A, Logar J, Wraber B, Poljanec J, et al. Prevalenca protiteles proti bakteriji *Helicobacter pylori* v Sloveniji v letu 2005. Zdrav Vestn 2006; 75: 169–173.
12. Reberšek-Gorišek J, Pinter Ž, Pocajt M, Kavalarič R, Novak D. Prikaz raziskav bakterije *Helicobacter pylori* v Splošni bolnišnici Maribor od leta 1988 do 2005. Zdrav Vestn 2006; 75: Supl. II: 41-48.
13. Dajčman D. Osnove fiziologije želodca. Medicinski mesečnik 2005; maj: 21-28.
14. Kocijančič A, Mrevlje F. Interna medicina, druga dopolnjena izdaja. Ljubljana, EWO, d.o.o. 1998; 365-366.
15. Kocijančič A., Mrevlje F., Štajer F.: Interna medicina; 3.izdaja; Littera picta, Ljubljana, 2005; 461-492.
16. Lee A, Hazzell SL, O'Rourke J, Kouprach S. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. Infect Immun 1988; 56: 2843-2850.
17. Otto G, Hazzell SH, Fox JG, et al. Gastric colonization of cats by *Helicobacter* like organisms: animal and public health implication. J Clin Microbiol 1994; 32: 1043-1049.
18. Bujanover Y, Reif S, Yahav J. *Helicobacter pylori* and peptic disease in the pediatric patient. Pediatr Gastroenterol 1996; 43: 213–233.
19. Elitsur Y, Lawrence Z, Triest WE. Distribution of *Helicobacter pylori* organisms in the stomachs of children with H. pylori infection. Hum Pathol 2002; 33: 1133–1135.
20. Nilsson I, Utt M, Nilsson H-O, et al. Two-dimensional electrophoretic and immunoblot analysis of cell surface proteins of spiral-shaped and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Electrophoresis 2000; 21: 2670-2677.
21. Andersen LP, Dorland A, Karacan H, et al. Possible clinical importance of the transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms. Scand J Gastroenterol 2000; 35: 897-903.

22. Segal ED, Falkow S, Tompkins LS. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 1259-1264.
23. Cole SP, Cirillo D, Kagnoff MF, Guiney DG, Eckmann L. Coccoid and spiral *Helicobacter pylori* differ in their abilities to adhere to gastric epithelial cells and induce interleukin-8 secretion. Infect Immun 1997; 65: 843-846.
24. Cave DR. How is *Helicobacter pylori* transmitted? Gastroenterology 1997; 113 (Suppl 6): 9-14.
25. Gill HH, Shankaran K, Desai HG. *Helicobacter pylori* in dental plaque of children and their family members. J Assoc Physicians India 1994; 42: 719-721.
26. Li C, Ha T, Ferguson DA, et al. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva and faeces. Dig Dis Sci 1996; 41: 2142-2149.
27. Von Recklinghausen G, Weischer T, Ansorg R, Mohr C. No cultural detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1994; 281: 102-106.
28. Von Recklinghausen G, Weischer T, Ansorg R, Mohr C. No cultural detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1994; 281: 102-106.
29. Kelly SM, Pitcher MCL, Farmery SM, Gibson GR. Isolation of *Helicobacter pylori* from faeces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterology 1994; 107: 1671-1674.
30. Fox JG, Blanco MC, Yan L, et al. Role of gastric pH in isolation of *Helicobacter pylori* from the faeces of ferrets. Gastroenterology 1993; 104: 86-92.
31. Fantry GT, Zheng Q-X, James SP. Conventional cleaning and disinfection techniques eliminate the risk of endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. Am J Gastroenterol 1995; 90: 227-232.

32. Kohli Y, Kato T, Iwaki M, Ito S, Yamazaki Y, Hata M. Clinical significance of sterilization of endoscopic instruments. *Dig Endosc* 1993; 5: 33-37.
33. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2007; 22;445 (7130): 982.
34. Gubina M, Tepeš B, Vidmar G, Logar J, Wraber B, Poljanec J, Bricelj I. Prevalenca okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* v Sloveniji v letu 2005. *Zdrav vestnik* 2006; 75: 169-172.
35. Wadstrom T, Hirno S, Boren T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;10 Suppl 1:1330.
36. Nilius, M, Malfertheiner, P. *Helicobacter pylori* enzymes. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 Suppl 1:65.
37. Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S, Fukuda MN, et al. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science* 2004 ;13;305(5686):1004.
38. Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localises to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol* 2004; 6: 149.
39. Brennen, DJ, Krieg NR, Staley JT (eds), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Vol 2, 2nd edn. New York; Springer 2004:252-256).
40. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* cagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl acad Sci USA* 2000; 97: 1265.
41. Appelmek BJ, Monteiro MA, Martin SL. Why *Helicobacter pylori* has Lewis antigens. *Trends Microbiol* 2000; 8:566.
42. Caspary, W.F. et al Diagnostik und Therapie der *Helicobacter pylori* Infektion *Z Gastroenterol* 34 (1996): 392–401.

43. Malfertheiner, P. et al *Helicobacter pylori* Infektionen und Ulkuserkrankungen Chirug 69 (1998): 239–248.
44. Stolte, M. Klassifikation und Graduierung der Gastritis – was bringt das aktualisierte SydneySystem Leber Magen Darm 29 suppl II (1997): 1–19.
45. Fischbach, W. *Helicobacter* und Lymphom Chirug 69 (1998): 249–251.
46. Blaser, M.J. *Helicobacter pylori* and associated diseases BMJ 316 (1998): 1507–1510.
47. Naylor GR, Gotoda T, Dixon M. Why does Japan have a high incidence of a gastric cancer? Comparison of gastritis between UK and Japanese patients. *Gut* 2006;55: 1550.
48. Nimish Vakil, Dino Vaira. Sequential Therapy for *Helicobacter pylori*. Time to Consider Making the Switch? *JAMA*. 2008;300(11):1346-1347.
49. Tepeš B., Gubina M.: Razlogi za neuspeh antimikrobnega zdravljenja okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* in naše terapevtske možnosti; *Zdravn vestn* 2004; 73: 503-506.
50. Wang WM, Gu Q, Lam SK et al. Randomised controlled study of robeprazole, levofloxacin and rifabutin triple therapy vs. quadruple therapy as secondline treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 553–560.
51. Coelho LG, Martins GM, Passos MC et al. Once-daily, low cost, highly effective *Helicobacter pylori* treatment to family members of gastric cancer patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 131–136.
52. Tepeš B, Gubina M. Razlogi za neuspeh antimikrobnega zdravljenja okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* in naše terapevtske zmožnosti. *Zdravniški vestnik* 2004; 73: 503-506.
53. Tepeš B. *Helicobacter pylori* v novem milenijumu. *Gastroenterolog* 2004; 8: (supl 2): 56-57.
54. Drumm B, Koletzko S, Oderda G. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 207–213.

55. Editorial: Guidelines for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? *Annals of Pharmacotherapy* 1997; 31: 1247–1249.
56. Konstantopoulus N, Russmann H, Tasch C, et al. Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen test (HpSA) for detection of *Helicobacter pylori* in children. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 677–683.
57. Mičetić-Turk D, Urlep D, Krajnc M, Knehtl M. Diagnostična vrednost neinvazivnih testov pri okužbi s *Helicobacter pylori* v otroški dobi. *MED RAZGL* 2006; 45: 79–89.
58. Howden CW, Hunt RH. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection. Ad Hoc Committee on Practice Parameters of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2336.
59. Gisbert JP, de la Morena F, Abaira V. Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101: 1926.
60. Tepeš B. Comparison of two invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* after antimicrobial therapy. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 331.
61. Tepeš B, Ferlan-Marolt V, Juteršek A, Kavčič B, Zaletel-Kralj L. Interobserver agreement in the assessment of gastritis reversibility after *H. pylori* eradication. *Histopathology* 1999; 34: 126.
62. Osredkar J. Dihalni test s sečnino- njegovo mesto v diagnostiki. *Zdravniški vestnik* 2004; 73: 13–17.
63. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, Penland RL, Malaty HM, Graham DY. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. *Arch Intern Med* 2001; 161: 1218.
64. INFAI, SMPC;
<http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Helicobacter/emea-combined-h140sl.pdf>

65. P. Malferheiner: Expert report on the clinical documentation for the product Pylori 13, Medical Instruments Corporation; Part IC3.
66. Vegal Farmaceutica S.L., Inc: H&R H. pylori. One step H. pylori Antigen Test Device, Madrid, 2007.
67. DIMA Gessellschaft für Diagnostika mbH, Inc: Helicobacter pylori Ag. Rapid test for the detection of H. pylori antigen in human stool samples, Goettingen; 2010.
68. dBest One Step H. pylori Saliva Test Disk For Saliva or Endoscopy Biopsy, (Revised, Jan 4, 2008).
69. Navodila proizvajalca Orion Diagnostica, Pyloriset EIA-A III (zadnja revizija 05/2007).
70. Koželj M, Hafner M. Helicobacter pylori in bolezni želodca ter dvanajstnika. Zdravst. vestnik 1996; 65: 5-11.
71. Premik M. Vrednotenje presejalnih programov; animus.mf.uni-lj.si/~socmed/C14.doc
72. Da Silva JMK, Villares CA, Monteiro M, Colauto C, Santos AF, Mattar R. Validation of a rapid stool antigen test for diagnosis of Helicobacter pylori infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2010; 52(3): 125-128.
73. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, *et al.* Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut. 2007;56:772-781.
74. Silva FM, Navarro-Rodriguez T, Barbuti RC, Mattar R, Hashimoto CL, Eisig JN. Helicobacter pylori reinfection in Brazilian patients with peptic ulcer disease: a 5-year follow-Up. Helicobacter. 2010;15:46-52.

75. Gisbert JP, Pajares JM. Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20:1001-1017.
76. Hooton C, Keohane J, Clair J, Azam M, O'Mahony S, Crosbie O, *et al.* Comparison of three stool antigen assays with the 13C-urea breath test for primary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring treatment outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:595-9
77. Kato S, Ozawa K, Okuda M, Nakayama Y, Yoshimura N, Konno M, *et al.* Multicenter comparison of rapid lateral flow stool antigen immunoassay and stool antigen enzyme immunoassay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter.* 2004;9:669-73
78. Krausse R, Müller G, Doniec M. Evaluation of a rapid new stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in adult patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2062-2065.
79. Kuloğlu Z, Kansu A, Kirsacıoğlu CT, Ustündağ G, Aysev D, Ensari A, *et al.* A rapid lateral flow stool antigen immunoassay and 14C-urea breath test for the diagnosis and eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62:351-356.
80. Blanco S, Forné M, Lacoma A, Prat C, Cuesta MA, Latorre I, *et al.* Comparison of stool antigen immunoassay methods for detecting *Helicobacter pylori* infection before and after eradication treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;61:150-155.
81. Hirschl AM, Rotter ML. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Journal of Gastroenterology* 1996; 31: 33–36.
82. Kotnik V. Imunološki testi in odkrivanje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori*. *Zdrav Vestn* 2011; 80: 469–475.

83. Argenziano G, Donnarumma G, Iovene MR, Arnese P, Baldassarre MA, Baroni A. Incidence of anti-*Helicobacter pylori* and anti-CagA antibodies in rosacea patients. *International Journal of Dermatology* 2003; 42: 601–604.
84. Urita Y, Hike K, Torii N, Kikuchi Y, Kurakata H, Kanda E, Sasajima M, Miki K. Comparison of Serum IgA and IgG Antibodies for Detecting *Helicobacter pylori* Infection. *Internal Medicine* Vol. 43 (2004), No. 7; 548-552.
85. Yamaoka, Y. et al Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J Clin Pathol* 52(3) (1999): 215–218.
86. Kosunen, T.U. et al Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM-antibody titers after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 339 (1992): 893–895.
87. Wilcox MH, Dent TH, Hunter JO, Gray JJ, Brown DF, Wight DG, Wraight EP. Accuracy of serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection-a comparison of eight kits. *J Clin Pathol* 1996; 49: 375.
88. Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, Ueno I, Akamatsu T 2000. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 5: 30-37.
89. Loster BW, Majewski SW, Cze[*n*ikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Pierzchalski P, Konturek SJ 2006. The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach. *J Physiol Pharmacol* 57: 91-100.
90. Kraiden S, Fuksa M, Anderson J, et al. Examination of human stomach biopsies, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27(6): 1397-1298.
91. Souto R, Colombo AP 2008. Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients. *J Periodontol* 79: 97-103.

92. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, Schmalz G, Ruhl S 2008. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *Eur J Oral Sci* 116: 297-304.
93. Oshowo A, Tunio M, Gillam D, et al. Oral colonization is unlikely to play an important role in *Helicobacter pylori* infection. *Br J Surg* 1998; 85(6): 850-852.
94. Kato S, Furuyama N, Ozawa K, Ohnuma K, Inuma K. Long-term follow-up study of serum immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies after *Helicobacter pylori* eradication. *Pediatrics* 1999; 104.
95. Kotnik V. Vloga protiteles pri sifilisu. In: Miljković J, ed. 6. Dermatološki dnevi. 6.-7. november 2009; Maribor. Maribor: Univerzitetni klinični center, Oddelek za kožne in spolne bolezni; 2009: 111–127.