

# Laboratorijska dijagnostika *Helicobacter pylori* infekcija

---

**Grinžek, Tajana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:328040>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tajana Grinžek**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

***HELICOBACTER PYLORI* INFEKCIJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Tajana Grinžek**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

***HELICOBACTER PYLORI* INFEKCIJA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren na Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Maja Bogdan

Ovaj rad sadrži 35 stranica, 9 slika i 6 tablica.

## *Zahvala*

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Bogdan na pomoći, sugestijama, potpori i strpljenju tijekom izrade završnog rada!

Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek za pomoć i savjete tijekom praktičnog dijela rada.

Veliko hvala dr.sc. Kristini Kralik i izv.prof.dr.sc. Vesni Ilakovac na velikoj pomoći, trudu i savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Najveću zahvalu upućujem svojoj majci koja je gotovo sama nesebičnim pomaganjem i potporom omogućila mi studiranje i sam dovršetak istog. Hvala joj što je bila uz mene kroz svaki uspon i pad. Bez nje ne bih bila tu gdje jesam i ono tko jesam te ovaj rad posvećujem njoj.

Per aspera ad astra!

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	1
1.1.1. Prevalencija <i>Helicobacter pylori</i> .....	2
1.2. Dijagnostičke metode .....	2
1.2.1. Imunokromatografski test .....	3
1.2.2. Test ureaze .....	3
1.2.3. Brzi ureazni test .....	4
1.2.4. Biopsija želučane sluznice .....	5
1.3. Liječenje .....	6
1.3.1. Antimikrobna osjetljivost .....	8
<b>3. ISPITANICI I METODE</b> .....	10
3.1. Ustroj studije .....	10
3.2. Ispitanici .....	10
3.3. Metode .....	10
3.3.1.1. ICT .....	10
3.3.1.2. Uzgoj <i>H. pylori</i> od uzorka bioptata želučane sluznice .....	14
3.3.2. E-testovi .....	15
3.4. Statističke metode .....	17
<b>4. REZULTATI</b> .....	18
<b>5. RASPRAVA</b> .....	24
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	28
<b>7. SAŽETAK</b> .....	29
<b>8. SUMMARY</b> .....	30
<b>9. LITERATURA</b> .....	31
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	34

## POPIS KRATICA

AT – antigenski test

CO<sub>2</sub> – ugljični dioksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

ELISA – enzimski povezani imunosorbentni test (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*)

EUCAST – Europski odbor za testiranje antimikrobne osjetljivosti (engl. *The European Committee on antimicrobial susceptibility testing*)

ICT – imunokromatografski test (engl. *immunochromatographic test*)

IPP – inhibitori protonske pumpe

IRMS – masena spektrometrija odnosa izotopa (engl. *isotope ratio mass spectrofotometry*)

LARA – laserski potpomognuti analizator omjera (engl. *laser assisted ratio analyzer*)

MALDI TOF – matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*)

MALT – sluznično limfno tkivo (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*)

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

NDRIS – ne disperzivni infracrveni spektroskop (engl., *non-dispersive infrared spectroscopy*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

UIT – urea izdisajni test

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

SAD – Sjedinjene Američke Države

## 1. UVOD

### 1.1. *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* je gram-negativna bakterija koja se najčešće nalazi na sluznici želuca. To je aerofilna, spiralna bakterija koja se evolucijski razvila kako bi lakše inficirala sluznicu želuca. *Helicobacter pylori* kolonizira ljudski želudac i izaziva upalu, a u nekim slučajevima dugotrajna infekcija može rezultirati teškim patološkim stanjima. Infekcija najčešće prolazi bez simptoma, ali može biti uzrok kroničnog gastritisa, razvoja vrieda na želudcu i duodeomu, rijetkog tipa tumora se naziva MALT limfomom (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue*) te želučanog karcinoma. Poznato je da infekcija počinje ulaskom bakterije u probavni sustav no sam način inficiranja nije točno istražen. Pretpostavlja se da se događa na nekoliko načina: bakterije iz usne šupljine zaražene osobe dospjevaju u usta zdrave (najčešći način prijenosa), zdrava osoba se inficira prijenosom bakterija iz povraćanog sadržaja zaražene osobe, prijenosom prljavim rukama iz stolice zaraženih u usta zdravih. Razvoj infekcije ovisi o nekoliko faktora kao što su uspješnost kolonizacije, patogenosti i o imunološkom odgovoru domaćina. Počinje pričvršćivanjem na želučanu sluznicu što je prvi korak u uspostavljanju bakterijske kolonizacije, a proteini vanjske membrane igraju ključnu ulogu u vezivanju za ljudske stanice (1). Točno postavljena dijagnoza i pravilno kliničko liječenje važni su koraci u poboljšanju kliničkog ishoda pacijenta. Različite dijagnostičke metode koriste se za otkrivanje.

Godine 2005. Barry Marshall i Robin Warren dobili su Nobelovu nagradu za fiziologiju za svoj pionirski rad na *Helicobacter pylori*. Prema riječima Nobelovog odbora, nagrađeni su zbog otkrića bakterije i njezine uloge u gastritisu i peptičkom ulkusu. Povjerenstvo je dodalo: „Zahvaljujući pionirskom otkriću Marshalla i Warrena, peptički ulkus više nije kronično stanje koje često onesposobljava, već bolest koja se može izliječiti kratkim režimom antibiotika i inhibitora lučenja kiseline (2). Uistinu zanimljiva je činjenica kako je profesor Marshall 1983. godine sam „popio“ kulturu bakterija kako bi dokazao da ona zaista uzrokuje ulkus na želudcu jer u ono vrijeme znanstvenici su bili skeptični prema činjenici da bakterija može preživjeti u izrazitom kiselom pH želuca. Za tri dana je razvio gastritis – prekursor ulkusa.



## 1.1.1. Prevalencija *Helicobacter pylori*

Prevalencija *H. pylori* je visoka u većini zemalja. U sjevernoeuropskim i sjevernoameričkim populacijama je zaraženo dvije trećine odraslih dok je u južnoj i istočnoj Europi, Južnoj Americi i Aziji prevalencija često viša od 50 % (3). Procjenjuje se da je oko 4.4 milijardi ljudi inficirano bakterijom (4). Sama prevalencija infekcije *H. pylori* veća je u zemljama u razvoju u usporedbi s razvijenim zemljama i može varirati ovisno dobi, spolu, etničkoj pripadnosti, mjestu rođenja i socioekonomskim čimbenicima (5). Prema istraživanjima, prevalencija *H. pylori* u Hrvatskoj kod odraslih osoba može varirati između 40 % i 50 % što je nešto manje u usporedbi s prošlim desetljećima kad je prevalencija bila više (6). Prevalencija infekcije opada u mnogim zemljama zbog poboljšanja sanitarnih uvjeta, životnog standarda, boljom zdravstvenom skrbi i širim pristupom antibioticima.

## 1.2. Dijagnostičke metode

Dijagnostičke metode dijele se na invazivne (endoskopske) i neinvazivne metode. Neinvazivne metode uključuju: urea izdisajni test (UIT), antigenski testovi (AT) u uzroku stolice, serologiju i molekularne metode. Invazivne metode uključuju endoskopsko snimanje, brzi test ureaze, histologiju, kulturu i molekularne metode (7). Histološke metode uključuju bojanje po Gramu, Giemsi i imunološko bojenje te mikroskopsko promatranje tipičnih bakterija. Pregledom krvi i sline dokazuje se postojanje specifičnih antitijela u zaražene osobe. Najčešće korištena i najjeftinija metoda je pregled stolice kojom se dokazuje postojanje antigena u stolici bolesnika. Testovi antigena se izrađuju pomoću enzimskih imunotestova i imunokromatografije. Koristi se i polimerazna lančana reakcija (PCR prema engl. *polymerase chain reaction*) koja omogućuje veću točnost od ostalih metoda zbog bolje detekcije u uzrocima s manje bakterija (8). Invazivne metode provode se u sklopu specijalističke gastroenterološke obrade i uključuju provođenje endoskopskog pregleda jednjaka, želuca i dvanaesnika (9). Uzorci tkiva se uzimaju prilikom endoskopskog pregleda.

## 1.2.1. Imunokromatografski test

Imunokromatografski test (ICT prema engl. *Immunochromatographic test*) je test kojim se detektira antigen *H. pylori* u uzorku stolice. Postoje dvije vrste tih neinvazivnih testova, a to su imunokromatografski "screening" testovi za kvalitativnu detekciju te ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent essay*) laboratorijski testovi (10). Ovaj test je visoko specifičan, osjetljiv, jednostavan i osim utvrđivanja aktualne infekcije koristi se kao kontrola za napredak terapije. Stolica se ponovno testira nakon 4 do 8 tjedana od početka terapije kako bi se dobio dobar uvid u proces liječenja bolesnika.

## 1.2.2. Test ureaze

Test ureaze je biokemijski test koji se koristi za detekciju enzima ureaze. Helikobakter otpušta enzim ureazu koji razgrađuje ureu u amonijak i ugljični dioksid ( $\text{CO}_2$ ).

Test je jednostavan i brz što ga čini jako korisnim testom za identifikaciju organizama koji proizvode ureazu u kliničkim i laboratorijskim uvjetima.



Slika 1. Prikaz PyloPlus RUT brzog testa ureaze tvrtke Laborie sa sjedištem u SAD-u (Sjedinjene Američke Države). Ružičasta boja ukazuje na prisustvo u organizmu. (izvor: fotografirala autorica)



Slika 2. Prikaz negativnog rezultata testa ureaze. (izvor: fotografirala autorica)

## 1.2.3. Brzi ureazni test

Brzi ureazni test ili urejni izdisajni test je najpopularniji neinvazivni test. Bazira se na otkrivanju označenog ugljičnog dioksida (označenog izotopom ugljika –  $^{13}\text{C}$  ili  $^{14}\text{C}$ ) u uzorku izdahnutog zraka. Temelji se na rezultatu enzimske ureazne aktivnosti helikobaktera. Osjetljivost i specifičnost mu je najčešće viša od 95 %. Sam postupak je brz pa su rezultati obično dostupni unutar nekoliko dana.

Rezultat teksta iskazuje se kao razlika omjera  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ . Uzroci se mogu analizirati različitim tehnologijama: masenom spektrometrijom odnosa izotopa (IRMS prema engl. *Isotope Ratio Mass Spectrofotometry*), nedisperzivnim infracrvenim spektroskopom (NDIS prema engl. *Non-Dispersive Infrared Spectroscopy*) ili laserskim potpomognutim analizatorom omjera (LARA prema engl. *Laser Assisted Ratio Analyzer*) (11). Sve navedene metode postižu jednake rezultate.

#### 1.2.4. Biopsija želučane sluznice

Biopsija želučane sluznice je medicinski postupak kojim se uzima mali uzorak tkiva iz sluznice želuca radi mikroskopskog pregleda. Ovaj postupak se najčešće izvodi tijekom gastroskopije. Gastroskopija je endoskopska procedura kojom se kroz usta i jednjak uvodi tanka cijev sa kamerom (endoskopom) u želudac. Tijekom gastroskopije liječnik uzima jedan ili više malih uzoraka tkiva pomoću endoskopa. Postupak je obično brz iako može izazvati nelagodu.

Razlozi za izvođenje biopsije su sumnja na gastritis, ispitivanje abnormalnosti, sumnja na rak želuca i sumnja na *Helicobacter pylori* infekciju. Histološkim pregledom boji se uzorak već spomenutim bojama što omogućava mikroskopsko prepoznavanje bakterije. Od molekularnih metoda se koristi PCR kojom se detektira deoksiribonukleinska kiselina (DNA prema engl. *deoxyribonucleic acid*) u uzorku tkiva. Metoda koja se koristila za ovaj rad je kultura bakterija.

Kako se *H. pylori* rutinski izolira kulturom iz uzoraka biopsije ljudskog želuca organizmu su potrebni mikroaerofilni okoliš i složeni mediji. Međutim Columbia Agar Base ili Brain Heart Infusion s dodatkom krvi ili seruma obično se smatra prikladnom za kulturu. Primarna izolacija organizma iz uzorka želučane biopsije zahtijeva uzgoj 5 – 7 dana u mikroaerofilnoj atmosferi stvorenoj u spremniku pomoću komercijalno dostupnog generatora atmosfere (vrećice) (12). Selektivni i neselektivni mediji obogaćeni krvlju/serumom preporučuju se za uzgoj iz uzoraka želučane biopsije, čime se povećava osjetljivost kulture. Dodavanje antibiotika u podlogu preporučuju za selektivne medije kako bi se olakšala primarna izolacija.



Slika 3. Prikaz izgleda kolonije *Helicobacter pylori* na HP agaru. (izvor: fotografirala autorica)

Smatra se kako je bakteriološka kultura zahtjevan, dugotrajan postupak i nepotreban za rutinsku dijagnozu infekcije *H. pylori* jer će drugi neinvazivni testovi otkriti dokaze o mikroorganizmu kod većine pacijenata (13). Usprkos tome uzgoj kulture smatra se zlatnim standardom jer može dati pouzdanije rezultate nego ICT (npr. zbog križne reaktivnosti) i važan je za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti.

### 1.3. Liječenje

Liječenje infekcije bakterijom *Helicobacter pylori* obično se sastoji od kombinacije antibiotika i lijekova koji smanjuju kiselost želuca kako bi se učinkovito iskorijenila bakterija i omogućilo zacjeljivanje sluznice želuca. Ova terapija je poznata kao trostruka terapija ili četverostruka terapija.

Trostruka terapija je najčešći pristup liječenju i uključuje:

- 1) IPP (inhibitori protonske pumpe) - lijekovi poput omeprazola ili pantoprazola smanjuju proizvodnju želučane kiseline pomažući zacjeljivanje sluznice i pojačavajući učinak antibiotika.

- 2) Dva antibiotika: Obično se koriste kombinacije antibiotika kao su klaritromicin, amoksisilin ili metronidazol.

Četverostruka terapija se primjenjuje ako je trostruka neuspješna ili ako postoji rezistencija na antibiotike, a sastoji se od:

- 1) IPP.
- 2) Bizmut -subsalicilat: Djeluje kao zaštitnik sluznice i posjeduje antibakterijska svojstva.
- 3) Dva antibiotika: Najčešće kombinacije uključuju metronidazol i tetraciklin ili amoksisilin.

Zbog povećane otpornosti *H. pylori* na određene antibiotike terapija može zahtijevati prilagodbu prema rezultatima testa osjetljivosti (antibiograma). Klaritromicin je antibiotik iz grupe makrolida. Djeluje tako da inhibira sintezu proteina u bakterijama što dovodi do zaustavljanja rasta i razmnožavanja bakterija. Posebno je učinkovit protiv gram-pozitivnih bakterija kao i protiv određenih gram-negativnih bakterija. Amoksisilin je antibiotik iz grupe penicilina koji se široko koristi za liječenje različitih bakterijskih infekcija. Djeluje tako da inhibira sintezu stanične stijenke bakterije što dovodi do njihove smrti. Kao i klaritromicin je posebno učinkovit protiv gram-pozitivnih bakterija. Metronidazol je antimikrobni lijek koji ubrajamo u skupinu nitroimidazola i djeluje tako da ometa sintezu DNA mikroorganizma. Tetraciklin je antibiotik koji se obično koristi kao dio kombinirane terapije za liječenje infekcija uzrokovanih *Helicobacter pylori*. Tetraciklin djeluje tako da inhibira sintezu bakterijskih proteina, sprječava rast i razmnožavanje bakterije. Levofloksacin je još jedan antibiotik koji se može koristiti kao dio režima liječenja, osobito u slučajevima kada standardni tretmani ne uspiju ili kada postoji poznata otpornost na antibiotike prve linije. Levofloksacin se često koristi u onome što je poznato kao trostruka terapija ili četverostruka terapija temeljena na levofloksacinu. Levofloksacin je fluorokinolonski antibiotik koji djeluje tako da inhibira sintezu bakterijske DNA što u konačnici ubija bakterije. Rifampicin je antibiotik koji se povremeno koristi kao dio režima liječenja infekcija *H. pylori* osobito u slučajevima otpornosti na najčešće korištene antibiotike. Rifampicin se obično ne koristi kao prva linija liječenja *H. pylori* zbog nuspojava i rizika od razvoja otpornosti. Međutim, može se koristiti kao dio druge linije ili terapije kada standardni tretmani ne uspiju. Rifampicin djeluje tako da inhibira sintezu bakterije RNA što sprječava bakterije u proizvodnji bitnih proteina potrebnih za preživljavanje. Ako se rifampicin razmatra kao dio liječenja *H. pylori* vrlo važno je da terapiju vodi zdravstveni djelatnik koji može pratiti nuspojave i po potrebi prilagoditi

liječenje. Kao što je već napomenuto infekcije helikobakterom obično se liječe kombinacijom antibiotika kako bi se učinkovito uklonile bakterije i smanjio rizik razvoja otpornosti na antibiotike.

### 1.3.1. Antimikrobna osjetljivost

Antimikrobna osjetljivost se odnosi na sposobnost mikroorganizma da budu inhibirani ili uništeni djelovanjem antimikrobnih sredstava. Testiranje antimikrobne osjetljivosti je laboratorijska metoda koja se koristi za određivanje učinkovitosti određenih antimikrobnih lijekova protiv određenih patogena. Ovaj test se provodi u kliničkim laboratorijima kako bi se pomoglo liječnicima u odabiru najprikladnijeg liječenja za infekcije.

Rezultati testiranja antimikrobne osjetljivosti se izražavaju kao:

- 1) Osjetljiv (S): Mikroorganizam je osjetljiv na određeni lijek što znači da lijek može učinkovito suzbiti ili uništiti mikroorganizam pri normalnim terapijskim dozama.
- 2) Osjetljiv uz povišenu izloženost antibiotiku (I): Mikroorganizam pokazuje osjetljivost ako se lijek primjeni u većim dozama ili na mjestima u tijelu gdje se lijek nakuplja.
- 3) Otporan (R): Mikroorganizam je otporan na lijek što znači da taj lijek neće biti učinkovit za liječenje infekcije uzrokovane tim mikroorganizmom.

Testiranje antimikrobne osjetljivosti je ključno za pravilno liječenje infekcija i sprječavanje razvoja otpornosti na antibiotike. *Helicobacter pylori* je patogen za koji stvara sve veću otpornost na antibiotike te predstavlja ozbiljnu prijetnju ljudskom zdravlju (14). Stope eradikacije *Helicobacter pylori* pale su posljednjih godina, uglavnom zbog pojave infekcija otpornih na antibiotike. Doista, Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je nedavno označila *H. pylori* infekciju otpornu na klaritromicin visokim prioritetom za istraživanje (15). Postoji nekoliko problema povezanih s liječenjem eradikacije *H. pylori*. Različiti režimi liječenja trenutno se koriste diljem svijeta, a standardno liječenje razlikuje se ovisno o regiji i zemlji. Drugo, antimikrobna otpornost *H. pylori* raste zbog neselektivne uporabe antibiotika (16). Otpornost na metronidazol je relativno česta i može se kretati od 10 % do više od 50 % ovisno o geografskom području. Što se amoksicilina tiče u usporedbi s drugim antibioticima *H. pylori* pokazuje relativno nisku stopu otpornosti na amoksicilin. Otpornost helikobaktera na amoksicilin je općenito rijetka, obično ispod 1 do 2 % u većini svjetskih regija (17). To znači da je amoksicilin i dalje vrlo učinkovit u liječenju *H. pylori* infekcija u većini slučajeva.

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi rada su:

1. Ispitati učestalost *H. pylori* u ispitivanom period u uzorcima stolice ICT metodom.
2. Ispitati učestalost *H. pylori* u ispitivanom periodu u uzorcima dobivenim biopsijom želučane sluznice.
3. Ispitati antimikrobnu osjetljivost izolata.
4. Prikazati demografska obilježja ispitanika.



### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Studija je izvedena kao presječna studija.

#### 3.2. Ispitanici

U istraživanje su bili uključeni rezultati pacijenata čiji su uzorci (stolica i/ili biopat želučane sluznice) u okviru laboratorijske dijagnostike radi sumnje na infekciju *H. pylori* u periodu od 18. 5. 2020. do 31. 12. 2023. godine analizirani na Zavodu za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su podatci o broju uzoraka i rezultatima testiranja i demografske osobitosti pacijenata dobiveni iz arhivske elektronike baze podataka Zavoda. Osobni podatci bolesnika nigdje nisu korišteni.

#### 3.3. Metode

Laboratorijska dijagnostika kod sumnje na infekciju *H. pylori*, obuhvaća više, ranije opisanih, dijagnostičkih testova. U laboratoriju Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije KBC Osijek dijagnostika se temeljila na dvije dijagnostičke metode. Jedna je imunokromatografski test koji je detektirao prisutnost fekalnog antigena bakterije *Helicobacter pylori* u uzorku stolice koji nije bio stariji od 24 h. Druga korištena metoda je kultivacija uzoraka dobivenih biopsijom želučane sluznice i uzgoj *H. pylori*.

##### 3.3.1.1. ICT

U uvodu je ta metoda općenito opisana, ali budući da je to metoda koja je korištena za dobivanje statističkih podatke za ovaj rad valja je detaljnije opisati. Temelji se na principu imunološke reakcije između specifičnih antitijela i antigena prisutnih u uzorku. Test traka sadrži specifična antitijela koja su reagirala s antigenima *H. pylori* te se pojavila vidljiva linija

ako su antitijela bila prisutna. Općenite prednosti ove metode su to što brzo daje rezultate (15 do 30 minuta), jednostavna je, jeftina i može se koristiti na terenu bez posebne potrebe za laboratorijskom opremom.

Postupak:

1) Uzimanje uzorka:

- Za antigenski test: Prikupljao se uzorak stolice.

2) Priprema seta za testiranje: Sam kit nije bilo potrebno pripremati u laboratoriju već je to komercijalan test koji sadrži test traku ili kasetu zajedno s puferskom otopinom.

3) Aplikacija uzoraka:

- Uzorak stolice: Mala količina uzorka stolice se pomiješala s puferskom otopinom i nekoliko kapi uzorka stolice se nanijelo na kasetu za testiranje.

4) Inkubacija: Uzorak se pustio da migrira duž test trake što je trajalo 10 do 15 minuta.

5) Tumačenje rezultata:

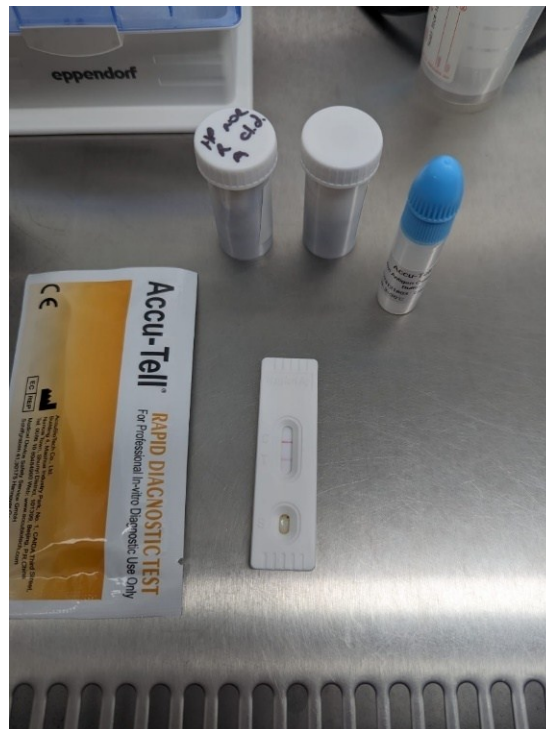
- Pozitivan rezultat: Pojava obojene linije u testnoj i kontrolnoj regiji ukazale su na prisutnost helikobaktera u stolici
- Negativan rezultat: Jedna linija u kontrolnoj regiji, a bez linije u testnoj ukazala je na negativan rezultat.

Valja napomenuti ako se u kontrolnoj regiji ne pojavi linija test je nevažeći i treba ga ponoviti. Isto tako postoji mogućnost križne reaktivnosti što dovodi do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata.

Točan test koji je korišten je Accu- Tell® *H. pylori* antigen Rapid Test Cassette tvrtke Accubiotech Co sa sjedištem u Kini. To je brzi imunološki kromatografski test za kvalitativno otkrivanje *H. pylori* antigena u uzorcima ljudskog fecesa. Najprije se prikupila dovoljna količina fecesa (1 do 2 mL ili 1 do 2 g) u čistu, suhu posudu. Analiza se provela unutar 6 sati nakon prikupljanja. Nakon toga odvio se čep posude za uzorke te se nasumično aplikatorom za prikupljanje uzorka ubolo na najmanje 3 različita mjesta kako bi prikupili približno 50 mg uzorka. Što se tiče tekućih uzoraka kapaljkom se aspirirao uzorak, a zatim se su prenijele dvije kapi u epruvetu za prikupljanje uzorka u kojoj je bio pufer za ekstrakciju. Snažno se zategnuo čep, epruveta se snažno protresla kako bi se pomiješali uzorak i pufer. Vrećica se

### 3. ISPITANICI I METODE

stavila na sobnu temperaturu prije otvaranja. Iz vrećice se izvadila test kasetna koja je morala biti upotrijebljena unutar jednog sata. Epruveta se držala uspravno, otvorio se čep i prenijele su se dvije pune kapi ekstrahiranog uzorka u udubinu za uzorak na kaseti. Zatim se pokrenula štoperica. Rezultati su se očitavali nakon 10 minuta. Inače se rezultati ne smiju se čitati ako je proteklo 20 ili više minuta.



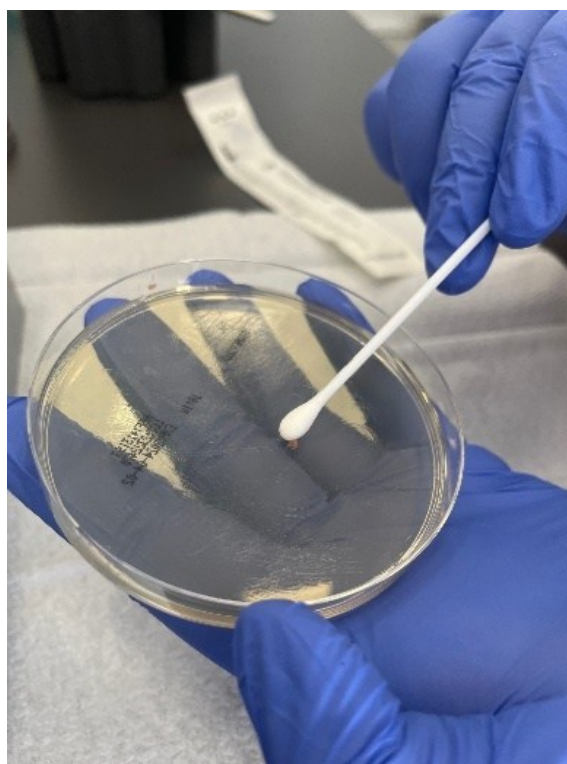
Slika 4. Na kaseti se vide dvije obojene linije što ukazuje na postojanje bakterije u organizmu, tj. ovo je prikaz pozitivnog rezultata. (izvor: fotografirala autorica).



Slika 5. Prikaz negativnog testa iz istog komercijalnog kita. Obojena je samo kontrolna linija što ukazuje na odsustvo helikobaktera. (izvor: fotografirala autorica)

#### 3.3.1.2. Uzgoj *H. pylori* od uzorka bioptata želučane sluznice

Uzorci želučane sluznice dobiveni biopsijom su promptno po uzorkovanju dostavljeni u laboratorij. Bioptati su potom inokulirani na kruta selektivna hranilišta (npr, Pyl agar) i bujon koji sadrži ureu. Hranilišta su inkubirana u mikroaerofilnim uvjetima i vlažnoj atmosferi 7 dana na 37°C, a bujon s ureom inkubiran je aerobno na 37°C. Ukoliko je bio prisutan helicobakter, bujon je promijenio boju iz roze u ljubičastu. Agare se pregledavalo na karakterističan makroskopski izgled kolonija helicobaktera na površini agara, od suspektih kolonija je napravljen mikroskopski preparat koji je bio bojen po gramu, a konačna identifikacija provodila se matricom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom (MALDI-TOF prema engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*) i spektrofotometrijom masa (Bruker Maldi Biotyper).



Slika 6. Prikaz nanošenja uzorka na agar kako bi u inkubaciji porasle bakterije. (izvor: fotografirala autorica)



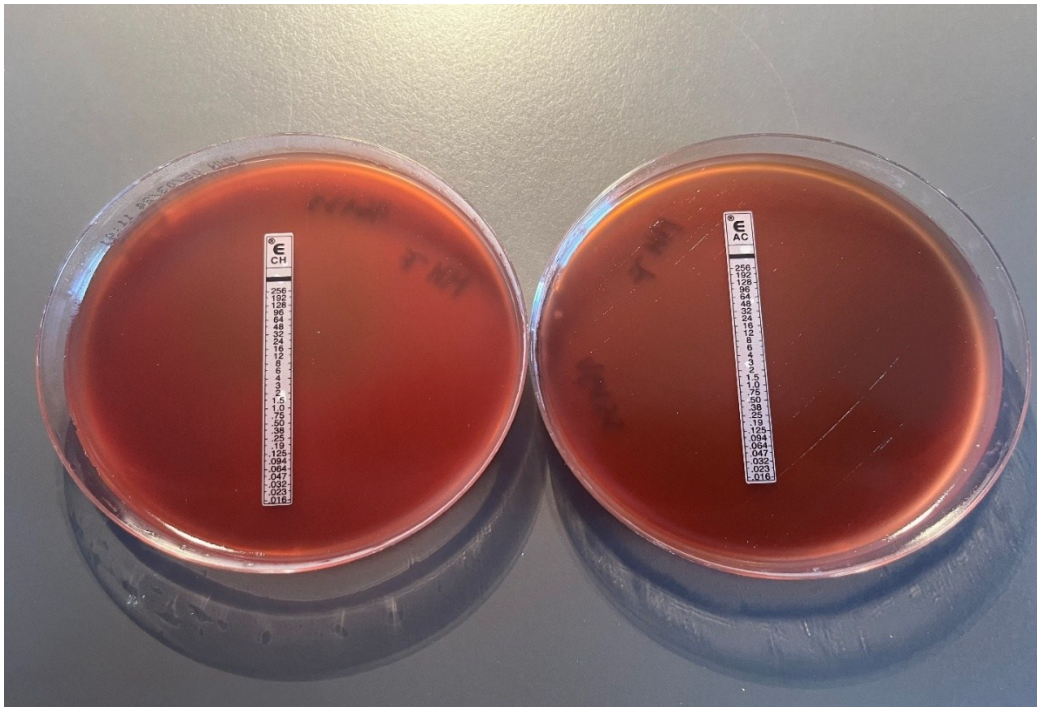
Slika 7. Prikaz spremnika za uzgoj s generatorom mikroaerofilne atmosfere. (izvor: fotografirala autorica)

### 3.3.2. E-testovi

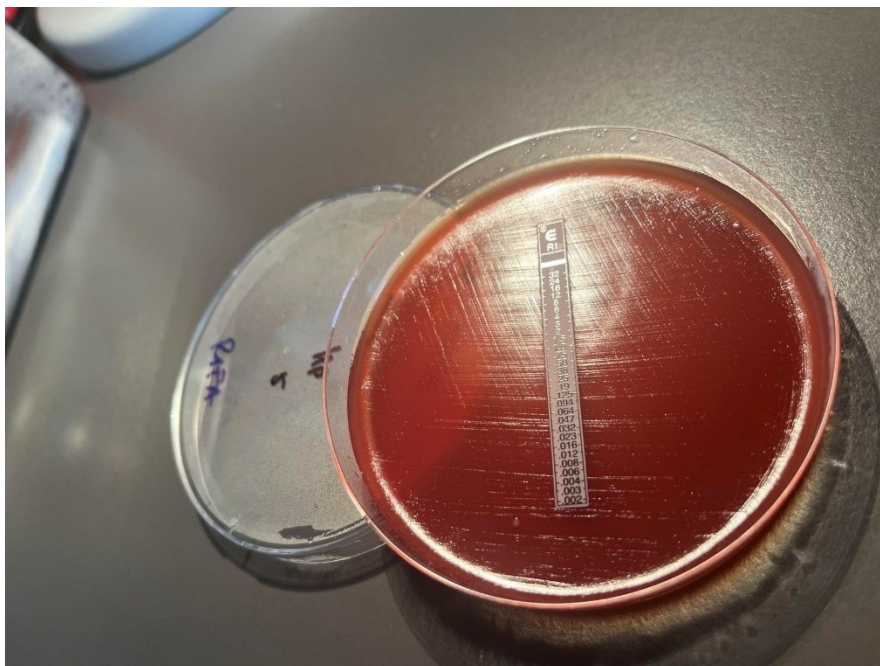
Osjetljivost izolata *H. pylori* na klaritromicin, metronidazol, amoksicilin, levofloksacin, rifampicin i tetraciklin ispitana je na MH-F agaru.

Suspenzija gustoće 0,5 McFarland standard ( $5 \times 10^5$  CFU/mL) nanescna je na površinu Mueller Hinton Fastidious agara (MH-F), a na površinu su se aplicirali E-testovi navedenih antibiotika i potom su inkubirani u mikroaerofilnoj atmosferi. Vrijednosti MIK-a (minimalne inhibitorne koncentracije) pojedinog antibiotika interpretirane su prema standardima Europskog odbora za testiranje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST prema engl. *The European Committee on antimicrobial susceptibility testing* (18).





Slika 8. Prikaz helikobaktera rezistentnog na amoksicilin i klaritromicin. Oko test trake nema zone inhibicije što upućuje na rezistentnost bakterije na ispitivane antibiotike. (izvor: fotografirala autorica)



Slika 9. Prikaz helikobaktera osjetljivog na rifampicin. Oko test trake postoji zona inhibicije što upućuje da ovaj soj je osjetljiv na spomenuti antibiotik (izvor: fotografirala autorica)

#### 3.4. Statističke metode

Kategorijski podaci opisivani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike kategorijskih varijabli testirane su  $\chi^2$  testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Zbog kontinuiranih varijabli koje ne slijede normalnu raspodjelu, numerički podaci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike u kontinuiranim podacima po godinama testirane su Kruskal Wallisovim testom (*post hoc* test Conover ). Izvješće o provedenom istraživanju načinjeno je prema smjernicama za izvještavanje rezultata istraživanja u biomedicini i zdravstvu (19).

Sve *P* vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\text{Alpha} = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 22.018 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2024).



## 4. REZULTATI

Istraživanje je provedeno na 798 uzoraka, od kojih je 125 (15,7 %) iz 2020. godine, 194 (24,3 %) iz 2021. godine, 225 (28,3 %) iz 2022. godine i iz 2023. godine 253 (31,7 %) uzoraka. S obzirom na uzorak, 538 (67,4 %) uzoraka je iz stolice, a bioptata sluznice želuca 260 (32,6 %). Od ukupno 65 (25,3 %) pozitivnih nalaza bioptata sluznice želuca, značajno ih je više tijekom 2021. i 2022. godine ( $\chi^2$  test,  $P = 0,04$ ). Nema značajnih razlika u raspodjeli uzoraka između pozitivnih i negativnih nalaza iz stolice, te ukupnog broja pozitivnih i negativnih nalaza po godinama (Tablica 1).

Tablica 1. Raspodjela uzoraka po godinama i rezultata analiza

Uzorak		Broj (%) uzoraka					$P^*$
		2020	2021	2022	2023	Ukupno	
Bioptat sluznice želuca	Negativno	32 (94,1)	41 (70,7)	61 (70,1)	58 (74,4)	192 (74,7)	<b>0,04</b>
	Pozitivno	2 (5,9)	17 (29,3)	26 (29,9)	20 (25,6)	65 (25,3)	
	Ukupno	34 (100)	58 (100)	87 (100)	78 (100)	257 (100)	
Stolica	Negativno	73 (83)	114 (83,8)	115 (83,3)	146 (83,4)	448 (83,4)	0,99
	Pozitivno	15 (17)	22 (16,2)	23 (16,7)	29 (16,6)	89 (16,6)	
	Ukupno	88 (100)	136 (100)	138 (100)	175 (100)	537 (100)	
Ukupno negativno		108 (86,4)	155 (79,9)	176 (78,2)	204 (80,6)	643 (80,7)	0,31
Ukupno pozitivno		17 (13,6)	39 (20,1)	49 (21,8)	49 (19,4)	154 (19,3)	
Ukupan broj uzoraka godišnje		125 (100)	194 (100)	225 (100)	253 (100)	797 (100)	

\* $\chi^2$  test

Spol je poznat u 764 uzoraka, od kojih je 251 (32,9 %) uzorak od bolesnika muškog spola, a 513 (67,1 %) od bolesnika ženskog spola.

Nema značajne razlike u raspodjeli uzoraka prema spolu i rezultatu, u kulturi ili antigenskom testu po godinama praćenja (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela uzoraka po rezultatu nalaza u odnosu na spol po uzorku i godini praćenja

		Broj (%) uzoraka u odnosu na spol			<i>P</i> *
		Muški	Ženski	Ukupno	
<b>2020.</b>					
Kultura	Negativno	7 (87)	23 (96)	30 (94)	0,40
	Pozitivno	1 (13)	1 (4)	2 (6)	
Antigenski test	Negativno	18 (72)	49 (89)	67 (84)	0,06
	Pozitivno	7 (28)	6 (11)	13 (16)	
<b>2021.</b>					
Kultura	Negativno	7 (78)	31 (67)	38 (69)	0,54
	Pozitivno	2 (22)	15 (33)	17 (31)	
Antigenski test	Negativno	48 (81)	66 (86)	114 (84)	0,49
	Pozitivno	11 (19)	11 (14)	22 (16)	
<b>2022.</b>					
Kultura	Negativno	20 (77)	36 (64)	56 (68)	0,25
	Pozitivno	6 (23)	20 (36)	26 (32)	
Antigenski test	Negativno	38 (81)	74 (85)	112 (84)	0,53
	Pozitivno	9 (19)	13 (15)	22 (16)	
<b>2023.</b>					
Kultura	Negativno	25 (86)	31 (66)	56 (74)	0,06
	Pozitivno	4 (14)	16 (34)	20 (26)	
Antigenski test	Negativno	38 (81)	100 (85)	138 (84)	0,54
	Pozitivno	9 (19)	18 (15)	27 (16)	

\* $\chi^2$  test

U uzorcima stolice, značajno su mlađi ispitanici tijekom 2020. godine u odnosu na sve ostale godine, a dob ispitanika 2021. godine značajno je niža u odnosu na 2022. i 2023. godinu (Kruskal Wallisov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 3).

Tablica 3. Razlike u dobi ispitanika s obzirom na uzorak i godine praćenja

	Medijan (interkvartilni raspon) dobi				$P^*$
	2020.	2021.	2022.	2023.	
Stolica	35 (14 - 57)	41 (20 - 61,8)	53 (34 - 65)	51 (29,8 - 64)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
Bioptat sluznice želuca	55 (37,3 - 65,8)	57 (44 - 64)	54 (42,8 - 66,3)	57,5 (43,5 - 66)	0,77

\*Kruskal Wallis test (*post hoc* test Conover)

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajne razlike (2020.) vs. (2021., 2022., 2023.); (2021.) vs. (2022., 2023.)

Negativna nalaz imaju značajno mlađi ispitanici tijekom 2020. godine u odnosu na sve ostale godine, a ispitanici 2021. godine su značajno mlađi uspoređujući ih s ispitanicima 2022. godine (Kruskal Wallisov test,  $P < 0,001$ ). U pozitivnim nalazima nema značajne razlike u dobi po godinama (Tablica 4).

Tablica 4. Razlike u dobi ispitanika s obzirom na rezultat i godine praćenja

Rezultat	Medijan (interkvartilni raspon) dobi				$P^*$
	2020.	2021.	2022.	2023.	
Negativno	42 (17 - 57)	47,5 (25,3 - 62)	53,5 (36,3 - 65,8)	52 (34 - 64)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
Pozitivno	58 (36,25 - 63,5)	54 (31 - 65)	53 (40,25 - 66)	57 (45 - 66)	0,61

\*Kruskal Wallis test (*post hoc* test Conover)

†na razini  $P < 0,05$  značajne razlike (2020.) vs. (2021., 2022., 2023.); (2021.) vs. (2022.)

U uzorcima stolice, značajno su mlađi ispitanici s negativnim nalazom tijekom 2020. godine u odnosu na sve ostale godine, te tijekom 2021. godine u odnosu na 2022. i 2023. godinu (Kruskal Wallisov test,  $P < 0,001$ ).

Nema značajnih razlika u dobi ispitanika kod pozitivnog nalaza iz stolice, te kod bilo kojeg nalaza u bioptatu sluznice želuca (Tablica 5).

Tablica 5. Razlike u dobi ispitanika s obzirom na rezultate pojedinog uzorka i godine praćenja

	Medijan (interkvartilni raspon) dobi po godinama				$P^*$
	2020.	2021.	2022.	2023.	
Stolica					
Negativno	29 (13 - 53,5)	39 (19 - 61)	52 (32,5 - 65)	51 (27 - 64)	<b>&lt;0,001<sup>†</sup></b>
Pozitivno	58,5 (38 - 64,5)	48,5 (20 - 63,5)	56,5 (39,8 - 66,5)	55 (39 - 65)	0,56
Bioptat sluznice želuca					
Negativno	55 (39,8 - 66,3)	57 (43 - 64)	56 (44,3 - 66,8)	56,5 (43 - 65)	0,98
Pozitivno	47 (26,3 - 51,8)	58 (50 - 65,5)	49,5 (39,5 - 64)	58,5 (51,8 - 67,5)	0,26

\*Kruskal Wallis test (*post hoc* test Conover)

†na razini  $P < 0,05$  značajne razlike (2020.) vs. (2021., 2022., 2023.); (2021.) vs. (2022., 2023.)

Osjetljivost na uzročnika *Helicobacter pylori* testirala se na amoksicilinu, tetraciklinu, klaritromicinu, metronidazolu, levofloksacinu i rifampicinu.

Tijekom 2020. godine nema značajnih razlika u senzitivnosti ili rezistentnosti pojedinih lijekova s obzirom na uzročnika.

U 2021. godini značajno su više senzitivni nego li rezistentni amoksicilin, tetraciklin, rifampicin (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ) i levofloksacin (Fisherov egzakti test,  $P = 0,005$ ), dok je metronidazol značajnije više otporniji nego li osjetljiv (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ).

Tijekom 2022. godini značajno su više osjetljivi nego li otporniji amoksicilin, tetraciklin, rifampicin i levofloksacin (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ), dok nema značajne razlike u senzitivnosti i rezistentnosti u slučaju klaritromicina i metronidazola.

Značajno su više otporniji nego li osjetljivi tijekom 2023. godine klaritromicin i metronidazol. dok su amoksicilin, tetraciklin i levofloksacin značajnije više osjetljiviji nego li otporni (Fisherov egzakti test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 6).

Tablica 6. Osjetljivost lijekova na uzročnika *Helicobacter pylori* po godinama.

Uzročnik <i>Helicobacter pylori</i>	Broj (%) uzoraka u odnosu na osjetljivost			P*
	Senzitivan	Rezistentan	Ukupno	
<b>2020.</b>				
Amoksisilin	2	0	2	0,33
Tetraciklin	2	0	2	0,33
Klaritromicin	1	1	2	>0,99
Metronidazol	0	0	0	-
Levofloksacin	0	0	0	-
Rifampicin	0	0	0	-
Ukupno	2	1		
<b>2021.</b>				
Amoksisilin	14	3	17	<0,001
Tetraciklin	17	0	17	<0,001
Klaritromicin	6	11	17	0,08
Metronidazol	2	15	17	<0,001
Levofloksacin	13	4	17	0,005
Rifampicin	12	0	12	<0,001
Ukupno	17	16		
<b>2022.</b>				
Amoksisilin	20	5	25	<0,001
Tetraciklin	24	1	25	<0,001
Klaritromicin	11	14	25	0,14
Metronidazol	12	13	25	0,38
Levofloksacin	23	2	25	<0,001
Rifampicin	21	4	25	<0,001
Ukupno	26	21		
<b>2023.</b>				
Amoksisilin	18	2	20	<0,001
Tetraciklin	20	0	20	<0,001
Klaritromicin	4	16	20	<0,001
Metronidazol	5	15	20	<0,001
Levofloksacin	17	3	20	<0,001
Rifampicin	13	7	20	0,19
Ukupno	20	18		

\*Fisherov egzaktni test

## 5. RASPRAVA

U ispitivanom periodu od 18. 5. 2020. do 31. 12. 2023. ukupno je analizirano 798 uzoraka stolice i bioptata želučane sluznice pri čemu je analizirano gotovo dvostruko više uzoraka stolica nego bioptata sluznice želuca. Tome u prilog ide činjenica da je endoskopija želučane sluznice invazivna metoda i može biti neugodna za pacijenta dok je ICT daleko jednostavniji za pacijenta, a sam test ima visoku osjetljivost i specifičnost—Analizom rezultata ovog istraživanja uočeno je da je 25 % antigenih testova i 17 % bioptata pozitivno na prisustvo *H.pylori*, za razliku od studije u kojoj je sudjelovao 61 pacijent, a *H. pylori* je dijagnosticiran u oko 60 % želučanih biopsija, dok je 40 % bilo pozitivnih nalaza u uzorcima stolice (20). Viši postotak pozitivnih nalaza želučanih biopsija zabilježen je u rezultatima ovog istraživanja jer je tijekom 2021. i 2022. godine bilo značajno više i analiziranih ali i pozitivnih nalaza. Mogući razlog tome je i pandemija COVID-19 kada su slijedom nastalih okolnosti dijagnostički (i terapijski resursi) bili prije svega fokusirani na dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa.

Iako je analizirano dvostruko više uzoraka bolesnika ženskog spola, nije uočena statistički značajna razlika obzirom na spol, vrstu i rezultat provedene analize. Za razliku od rezultata ovog istraživanja, prema studiji Ibrahima i suradnika, kojom su obuhvaćeni rezultati 244 presječnih istraživanja, muški spol je općenito povezan s većom prevalencijom infekcije *H. pylori*, u djece kao i u odraslih (21). Iako su potrebna daljnja istraživanja kako bi se razumjeli mehanizmi kojima spol može utjecati na stjecanje i/ili postojanost infekcije rezultati podupiru mali doprinos spolnih razlika u prevalenciji infekcije na ishode povezane s *H. pylori* kod muškaraca, uključujući nastanak raka želuca (22).

Analizom dobi ispitanika u ovom istraživanju, uočeno da su tijekom 2020. dominirali uzorci mlađih bolesnika u odnosu na ostale godine provedene studije. S mlađom dobi nisu povezani samo uzorci stolice nego su 2021. godine bili obrađeni značajno mlađi ispitanici. Smanjena prevalencija infekcije *Helicobacter pylori* tijekom pandemije COVID-19 primijećeno je u mnogim studijama i može se pripisati različitim faktorima, prvenstveno onim vezanim u promjenama zdravstvenog sustava i ponašanju ljudi tijekom pandemije (23). Mogući razlog za nižu prevalenciju *H pylori* tijekom pandemije je ograničen pristupim zdravstvenim sustavima. Tijekom pandemije zdravstveni sustavi su preusmjerili resurse k borbi protiv COVID-19 što je dovelo do odlaganja ili smanjenja broju rutinskih pregleda, uključujući endoskopske procedure za dijagnozu helikobaktera. Time je broj dijagnosticiranih slučajeva

postao manji. Što se tiče starijih ljudi to je moguća posljedica savjeta da ne izlaze bezrazložno u bolnice, domove zdravlja i druge zdravstvene institucije zato što su to jedni od glavnih izvora zaraze mikroorganizmima. Pa je pretpostavka da se zbog opasnosti od oboljenja i straha pacijenata nisu testirali na *H. pylori*. Drugi mogući razlozi za nižu prevalenciju su promjena higijenskih navika (redovno pranje ruku i nošenje maski), smanjena upotreba antibiotika za druge infekcije i manjeg kontakta među ljudima. To ne mora nužno značiti smanjene prevalencije nego su moguće implikacije da je došlo do odloženih dijagnoza kod pacijenata sa simptomima gastrointestinalnih promjena.

U 2021. godini mlađi ispitanici su imali značajnije više negativnih nalaza u odnosu na sve ostale godine. Što se podudara s rezultatima koji govore da su zabilježene stope infekcije *Helicobacter pylori* visoke kod osoba starijih od 40 godina, ali se smanjuju u mlađim dobnim skupinama (24). Iako što se tiče pozitivnih nalaza nije bilo razlike u dobi valjalo bi objasniti kako postoji nekoliko razloga zbog kojih mlađa populacija može biti inficirana te tako opisati veću pojavu negativnih nalaza kod mlađih ispitanika. Napomenuto je da se bakterija prenosi kroz kontaminiranu hranu, vodu ili blizak kontakt s inficiranim osobama pa tako mladi ljudi, posebno oni koji žive u zajednicama s lošijim sanitarnim uvjetima mogu biti podložni infekciji. Razvijanjem Hrvatske, osobito nakon Domovinskog Rata, poboljšani su socioekonomski uvjeti (s naglaskom na zdravstvenu skrb) te se može zaključiti da generacije rođene poslije rata (tj. mladi ljudi koji su bili ispitivani) imaju značajno negativne nalaze stolice. Mnogi ljudi se inficiraju u djetinjstvu, ali nisu svjesni infekcije jer perzistira u tijelu godinama bez izazivanja simptoma, ali može postati problematična kasnije u životu. Ulogu igra i genetska predispozicija te razlike u imunološkom odgovoru igraju ulogu zašto neki mladi ljudi razviju simptome ili komplikacije zbog infekcija. Ono što je u današnjem modernom svijetu gotovo najveća predispozicija za svaku bolest su stres i prehrana. Dokazano je kako psihološki stres pojačava kolonizaciju želuca helikobakterom (24). Stres uslijed užurbanog načina života, nedovoljno vremena za pravilnu prehranu i pušenje mogu pogoršati simptome i povećati rizik od komplikacija kod već zaraženih. U Hrvatskoj je provedeno istraživanje kako bi se utvrdila raširenost infekcije. ELISA testom su testirani ljudi od 20 do 70 godina. Teritorij je podijeljen na 3 dijela: centar, sjever i jug zemlje. Zaključeno je da kod starije populacije prevladava veća stopa zaraze. Nadalje je utvrđeno kako infekcija nije jednako raširena na sva istraživana područja. Prevalencija zaraze gotovo je jednaka na sjeveru i centru zemlje, dok je na jugu zemlje značajno različita (25). Specifični podaci o prevalenciji infekcije helikobakterom u Slavoniji nisu široko dostupni u javnim izvorima (26).



Iako se Slavonija smatra ruralnim i manje razvijenim područjem postoji mogućnost da stopa prevalencije može biti viša od gore navedenih podataka. Pretpostavka je da će se doseljnjem migranta iz siromašnijih zemlja prevalencija povećati zbog činjenice da je rizični čimbenik loše socioekonomsko stanje u djetinjstvu. Čak sanitarni uvjeti nisu najvažniji koliko je prenapučenost prostora u kojem dijete živi.

U Hrvatskoj, prevalencija helikobakterom među odraslom populacijom je relativno visoka, slično kao i u mnogim drugim zemljama Srednje i Istočne Europe (27). Što se tiče mlađih ljudi prevalencija je manja u razvijenim zemljama (28). Kako infekcija zahvaća ljude svih dobnih skupina iznenađujuća je činjenica kako u pozitivnim nalazima nema značajne razlike u dobi.

Osjetljivost *Helicobacter pylori* ispitana je za amoksicilin, tetraciklin, klaritromicin, metronidazol, levofloksacin i rifampicin. Tijekom 2020. godine nema značajnih razlika u osjetljivosti i otpornosti uzročnika na pojedine lijekove. Kroz sljedeće tri uočena je različita rezistencija na antibiotike. Kako je eradikacija bakterije postao sve veći izazov treba uzeti u obzir svaku pojavu povećanja rezistentnosti ili smanjenja osjetljivosti. Najnoviji podaci o rifampicinu ukazuju na razvoj rezistencije kod *Helicobacter pylori* (29).

No, oni ipak može biti racionalan izbor za neke sojeve *H. pylori* rezistentne na više lijekova i kao treća linija eradikacijske terapije.

Najviše zabrinjava rezistencija na lijekove prve linije koji u 2023.godini iznose amoksicilin, klaritromicin i metronidazol. Ti rezultati su sukladni literaturnim podacima prema kojima Hrvatska ima visoku stopu rezistencije na klaritromicin (30). Naime, što se Republike Hrvatske tiče, prema istraživanju Hojsak i sur. i prikazu desetogodišnjeg iskustva (2001. – 2010.) rezistencija na klaritromicin u neliječeni bolesnika iznosila je 11,9 %, a na metronidazol 10,1 %. Tijekom sljedećeg desetljeća statistički je značajno porasla rezistencija na klaritromicin. Zabilježen je i porast rezistencije na metronidazol na 16 %. Osim toga, stopa eradikacije kod neliječeni pacijenata bila je u oba istraživanja ispod 90 %, odnosno ispod razine koja se smatra poželjnom (31). Gotovo je „normalno“ da bakterija sa vremenom se na svaki antibiotik stvara rezistenciju. Brzina nastanka rezistencije ne ovisi uvijek o samoj potrošnji antibiotika nego mogu i drugi čimbenici biti u pitanju. *H. pylori* je bakterija koja postaje primjer rezistencije u Europi. Već u ranijoj dječjoj dobi javlja se rezistencija na klaritromicin (32). Pretpostavlja se da je razlog tome što se dječje akutne respiratorne infekcije liječe makrolidima. Rezistencija na metronidazol u Europi iznosi od 7 % do 49 %

(31). Žene redovito dobivaju metronidazol zbog ginekoloških infekcija pa bi to mogao biti jedan od razloga pojave rezistencije.

Osim što je od velikog kliničkog značaja postaviti brzu i točnu dijagnozu prisustva *H.pylori*, iznimno je važno nastaviti kontinuirano pratiti antimikrobnu osjetljivost *H.pylori* u različitim dijelovima zemalja i svijeta, jer se na tako dobivenim rezultatima temelje lokalne preporuke odnosno terapijske smjernice za liječenje nastalih infekcija.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Nije uočena razlika u raspodjeli uzoraka prema spolu i rezultatu, u kulturi ili antigenom testu.
- U 2021. i 2022. godine zabilježeno je statistički značajno više izolata *H.pylori*.
- Uočena je razlika u detekciji infekcija. Češće je detektirana kod starijih osoba.
- *H. pylori* postaje primjer rezistentne bakterije.
- Uočeno je da je otpornost na amoksisilin, tetraciklin i levofloksacin niska.
- Zabilježen je porast otpornosti na rifampicin u 2023. godini.

## 7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj istraživanja je prikazati osobitosti laboratorijske dijagnostike uzoraka kod sumnja na infekciju helikobakterom u periodu od 18. 05. 2020. – 31. 12. 2023. godine Zavoda za kliničku mikrobiologiju i bolničke infekcije Klinike za infektologiju KBC Osijek.

Nacrt studije: Studija je ustrojena kao presječna studija.

Ispitanici i metode: U istraživanje su bili uključeni pacijenti čiji su uzorci (stolica i/ili bioptat želučane sluznice) analizirani radi sumnje na infekciju *H. pylori*. Dijagnostika se temeljila na dvije metode. Jedna metoda je bio AT koji detektira prisutnost fekalnog antigena bakterija, a druga korištena metoda je kultivacija uzoraka dobivenih biopsijom želučane sluznice.

Rezultati: Primitveno je 798 uzorka kroz tri godine. Od toga gotovo dvostruko više uzorka stolice. Značajno su više bili pozitivni uzorci biopata u 2021. i 2022. godini. Nije postojala značajna razlika u raspodjeli uzorka prema spolu i rezultatu, u kulturi ili AT. Uzorak stolice su dostavljali značajno mlađi ispitanici koji su imali i više negativnih nalaza stolice. Kod pozitivnih nalaza nije bilo razlike u dobi. Osjetljivost helikobaktera se testirala na amoksisilin, tetraciklin, klaritromicin, metronidazol, levofloksacinu i rifampicin. Na amoksisilin, tetraciklin, rifampicin i levofloksacin su se bakterije kroz godine pokazale senzitivne dok su na metronidazol i klaritromicin bile rezistentne.

Zaključak: Prevalencija helikobaktera je visoka u cijelom svijetu dok je u Hrvatskoj taj postotak još veći. Zahvaljujući ICT metodi lako je detektirati bakteriju u organizmu. ICT metoda je jeftina, brza, jednostavna za obavljanje i visoko specifična. Također; testiranje antimikrobne osjetljivosti je od iznimne važnosti zbog praćenja porasta rezistencije.

Ključne riječi: antimikrobna osjetljivost; bioptat sluznice želuca; *Helicobacter pylori*; ICT

## 8. SUMMARY

### LABORATORY DIAGNOSTICS OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

**Objectives:** The aim of the study is to present the peculiarities of laboratory diagnostics of samples in suspected *Helicobacter* infection in the period from 18.05.2020 – 31.12.2023 of the Department of Clinical Microbiology and Hospital Infections of the University Hospital Center Osijek.

**Study design:** The study was conducted as a cross-sectional study.

**Subjects and methods:** The study included patients whose samples (stool and/or biopsy of the gastric mucosa) were analyzed for suspected *H. pylori* infection. Diagnostics was based on two methods. One method was an antigen test that detects the presence of fecal antigen of bacteria, and the second method used was the cultivation of samples obtained by biopsy of the gastric mucosa.

**Results:** 798 samples were received over three years. Of that, almost twice as many stool samples. There were significantly more positive biopsy samples in 2021 and 2022. There was no significant difference in the distribution of the sample according to gender and score, culture or AT. Stool samples were submitted by significantly younger subjects who had more negative stool findings. There was no age difference in positive findings. The sensitivity of *Helicobacter* was tested to amoxicycline, tetracycline, clarithromycin, metronidazole, levofloxacin and rifampicin. Over the years, bacteria have proven to be sensitive to amoxicycline, tetracycline, rifampicin and levofloxacin, while they were resistant to metronidazole and clarithromycin.

**Conclusion:** The prevalence of *Helicobacter* is high all over the world, while in Croatia the percentage is even higher. Thanks to ICT methods, it is easy to detect bacteria in the body. The ICT method is cheap, fast, easy to perform and highly specific. Also; antimicrobial susceptibility testing is extremely important to monitor the rise of resistance.

**Keywords:** antimicrobial susceptibility; biopsy of gastric mucosa; *Helicobacter pylori*; ICT

## 9. LITERATURA

- 1) Brito BB, Silva FAF, Soares AS, Pereira VA, Santos MLC, Sampaio MM i sur. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J Gastroenterol*. 2019 Oct 7;25(37):5578-5589. doi: 10.3748/wjg.v25.i37.5578. PMID: 31602159; PMCID: PMC6785516.
- 2) Marshall B. *Helicobacter pylori*--a Nobel pursuit?. *Can J Gastroenterol*. 2008;22(11):895-896. doi:10.1155/2008/459810.
- 3) Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins (Basel)*. 2017 Mar 11;9(3):101. doi: 10.3390/toxins9030101. PMID: 28287480; PMCID: PMC5371856.
- 4) Huh CW, Kim BW. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Korean J Gastroenterol*. 2018 Nov 25;72(5):229-236. doi: 10.4166/kjg.2018.72.5.229. PMID: 30642138.
- 5) Bruce MG, Maaroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2008 Oct;13 Suppl 1:1-6. doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00631.x. PMID: 18783514.
- 6) Katičić M, Duvnjak M, Filipec Kanižaj T, Krznarić Ž, Marušić M, Mihaljević S i sur. Croatian guidelines for diagnostics and treatments of *helicobacter pylori* infection. *Liječnički vjesnik [Internet]*. 2014. 136(1-2).Dostupno na adresi: <https://hrcak.srce.hr/172574>. [Datum pristupa: 21.07.2023.].
- 7) Connor B. CDC Yellow Book 2024. Travel-Associated Infections & Diseases. May 01, 2023. Dostupno na adresi: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/helicobacter-pylori>. [Datum pristupa: 22.12.2023.].
- 8) Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014 Sep;19 Suppl 1:1-5. doi: 10.1111/hel.12165. PMID: 25167938.
- 9) Sabbagh P, Javanian M, Koppolu V, Vasigala VR, Ebrahimpour S. *Helicobacter pylori* infection in children: an overview of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Jun;38(6):1035-1045. doi: 10.1007/s10096-019-03502-5. Epub 2019 Feb 7. PMID: 30734129.
- 10) Garza-González E, Perez-Perez G. I, Maldonado-Garza H.J, Bosques-Padilla F. J. A. Review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol*. 2014 Feb 14; 20(6): 1438 – 1449.
- 11) Katičić M, Filipec T, Maričić V. Urejni izdisajni test. *Medicus [Internet]*. 2002;11(2\_Psihofarmakologija):277-289 [Datum pristupa: 13.08.2024.] Dostupno na adresi: <https://hrcak.srce.hr/20029>.

- 12) Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 28;20(36):12847-59. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12847. PMID: 25278682; PMCID: PMC4177467.
- 13) Glupczynski Y. Microbiological and serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: an overview. *Br Med Bull*. 1998;54:175–186.
- 14) Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Sep;18(9):613-629. doi: 10.1038/s41575-021-00449-x. Epub 2021 May 17. PMID: 3400208.
- 15) Smith SM, O'Morain C, McNamara D. *Helicobacter pylori* resistance to current therapies. *Curr Opin Gastroenterol*. 2019 Jan;35(1):6-13. doi: 10.1097/MOG.0000000000000497. PMID: 30489412.
- 16) Medakina I, Tsapkova L, Polyakova V. *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance: Molecular Basis and Diagnostic Methods. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11):9433. 2023 May 29. doi:10.3390/ijms24119433.
- 17) Ng H-Y, Leung WK, Cheung K-S. Antibiotic Resistance, Susceptibility Testing and Stewardship in *Helicobacter pylori* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(14):11708. doi:10.3390/ijms241411708.
- 18) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [Datum pristupa: 22.12.2023.]. Dostupno na adresi: dostupno na <http://www.eucast.org>).
- 19) EQUATOR Network | Enhancing the QUALity and Transparency Of Health Research [Internet]. [Datum pristupa 4.6.2024]. Dostupno na: <https://www.equator-network.org/>.
- 20) Sharbatdaran M, Kashifard M, Shefaee S, Siadati S, Jahed B, Asgari S. Comparison of stool antigen test with gastric biopsy for the detection of *Helicobacter pylori* infection. *Pak J Med Sci*. 2013;29(1):68-71. doi:10.12669/pjms.291.286.
- 21) Ibrahim A, Morais S, Ferro A, Lunet N, Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: Systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Dig Liver Dis*. 2017 Jul;49(7):742-749. doi: 10.1016/j.dld.2017.03.019. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28495503.
- 22) Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol*. 2009;472:467-477. doi:10.1007/978-1-60327-492-0\_23.

- 23) Babuš, V; Presečki V, Katičić M, Balijsa M, Zorić I, Kronja, Lj, i sur. Rasprostranjenost infekcije s *Helicobacter pylori* u odrasloj populaciji Hrvatske // Liječnički vjesnik : glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora, 119 (1997), 5-6; 139-142.
- 24) Ekmektzoglou K, Rokkas T. H. Pylori Treatment in the COVID-19 Era. What Have We Learned So Far?. *Curr Gastroenterol Rep.* 2024;26(3):86-91. doi:10.1007/s11894-024-00922-y.
- 25) Guo G, Jia KR, Shi Y, Liu X, Liu KY, Qi W i sur. Psychological stress enhances the colonization of the stomach by *Helicobacter pylori* in the BALB/c mouse. *Stress.* 2009;12(6):478-485. doi:10.3109/10253890802642188.
- 26) *Helicobacter pylori* infekcija - treba li se liječiti? [Internet]. PLIVAZdravlje. 2016 [Datum pristupa:28.08.2024.]Dostupno na :<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/6157/Helicobacter-pylori-infekcija-treba-li-se-lijeciti.html>.
- 27) Li Y, Choi H, Leung K, Jiang F, Graham DY, Leung WK. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection between 1980 and 2022: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2023 Jun;8(6):553-564. doi: 10.1016/S2468-1253(23)00070-5. Epub 2023 Apr 20. PMID: 37086739.
- 28) Boyanova L, Markovska R, Hadzhiyski P, Kandilarov N, Mitov I. Rifamycin use for treatment of *Helicobacter pylori* infection: a review of recent data. *Future Microbiology.* 2020 Aug;15(12):1185–96.
- 29) M. Percl, S. Kolaček, O. Jadrešin, A. Boričević, H. Kapitanović, J. Grgurić. Hrvatski pedijatrijski časopis. Zagreb. Vol. 42, No 3,4. srpanj 1998.
- 30) Vrebalo Cindro P, Bukić J, Leskur D, et al. *Helicobacter pylori* Infection in Croatian Population: Knowledge, Attitudes and Factors Influencing Incidence and Recovery. *Healthcare (Basel).* 2022;10(5):833. Published 2022 Apr 30. doi:10.3390/healthcare10050833.
- 31) Mišak Z, Hojsak I, Despot R, Jadrešin O, Kolaček S, Konjik V i sur. Smjernice za dijagnozu i liječenje infekcije *Helicobacterom pylori* u djece i adolescenata. *Liječnički vjesnik.*2022;144(7-8):197-206.
- 32) Jung YS, Tran MTX, Song H, Park B, Moon CM. Association between Age at *Helicobacter pylori* Eradication and the Risk of Gastric Cancer Stratified by Family History of Gastric Cancer: A Nationwide Population-Based Study. *Cancers (Basel).* 2023;15(5):1604. Published 2023 Mar 4. doi:10.3390/cancers15051604.



## 10. ŽIVOTOPIS

Tajana Grinžek

Datum rođenja: 28. srpnja 1996.

Adresa: Donje Jesenje 19 b, 49233, Gornje Jesenje,

E-mail adresa: tgrinzek@gmail.com

Obrazovanje:

rujan 2011. – lipanj 2015.: jezična gimnazija, Srednja škola Krapina

rujan 2019. – rujan 2022.: sveučilišni prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

rujan 2022. – danas: sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Članstvo i aktivnost u udrugama:

2020. – 2022.: član Udruge studenata Medicinsko laboratorijske dijagnostike

2021. – 2023.: član Studentske sekcije za fiziologiju i imunologiju

2021. – 2023.: član Hrvatskog društva za hipertenziju

Nagrade:

Dekanova nagrada za akademsku godinu 2020./2021.

Zahvala Akademika Bojana Jelakovića, predsjednika Hrvatskog društva za hipertenziju, na projektu „Lov na tihog ubojicu“ 2021.

Dekanova nagrada za akademsku godinu 2021./2022.

Ostale aktivnosti:

svibanj 2021.: sažetak „COVID-19 i hipertenzija“ za Dan hipertenzije

2021. – 2023.: aktivno sudjelovanje na javnozdravstvenom projektu Lov na tihog ubojicu

prosinac 2021.: volontiranje na uzimanju uzoraka za testiranje COVID-19

travanj 2022.: aktivno sudjelovanje na RECOOP kongresu s radom „mRNA expression of enzymes COX1, COX2, eNOS and iNOS in athletes consuming enriched hen eggs“

svibanj 2022.: voditelj radionice „Stanice našeg tijela“ na Festivalu znanosti

travanj 2023.: voditelj radionice „Priroda se budi, a s njom i alergije“ na Festivalu znanosti