

**PANEVROPSKI UNIVERZITET APEIRON
FAKULTET ZDRAVSTVENIH NAUKA
MEDICINSKO-LABORATORIJSKI INŽENJERING**

**IMUNOLOŠKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA
BAKTERIJSKIH INFEKCIJA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor
Prof.dr. Drago N. Nedić

Student
Armin Begić

Banja Luka, Oktobar 2022. godine

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. IMUNOLOŠKI LABORATORIJSKI TESTOVI	4
2.1. Kliničke laboratorijske metode za detekciju humoralnog imuniteta	5
2.2. Metode testiranja u kojima je antigen ili antitijelo vezano za solidnu površinu	5
2.2.1. Imunoaglutinacija	5
2.2.2. Enzimoimunotest (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA)	7
2.2.3. Western blot	7
2.3. Test metode koje ovise o formiranju imunih kompleksa	8
2.3.1. Nefelometrija	8
2.3.2. Imunodifuzija	9
2.3.3. Imunoelektroforeza	10
2.4. Reakcija vezivanja komplementa (RVK)	10
2.4.1. Krioglobulini	11
2.5. Imunohistohemijske metode	11
2.5.1. Imunofluorescencija	11
2.5.2. Određivanje komplementa	11
2.6. Kliničke laboratorijske metode za detekciju celularnog imuniteta	12
2.6.1. Fenotipizacija leukocita	13
2.7. Metode aktivacije limfocita	13
2.7.1. Test funkcije neutrofila	15
3.1. Klasifikacija	16
3.2. Morfologija	21
3.3. Patogenost	21
3.4. Kulturne osobine	22
3.5. Identifikacija	22
3.6. Epidemiologija	23
3.7. Znakovi i simptomi	23
3.8. Tretman	24
3.8.1. Gastritis	24
3.8.2. Peptični čirevi	24
3.8.3. Ekstranodalni limfom B-ćelije rubne zone	24
3.8.4. Difuzni veliki B-ćelijski limfom	25
3.8.5. Adenokarcinom želuca	25
3.9. Otpornost na antibiotike	25

3.10. Prognoza.....	26
3.11. Historija.....	26
3.12. Adaptacija na želudac	28
3.13. Prevencija.....	29
3.14. Materijal za bakteriološki pregled.....	30
4. VLASTITI RAD	31
4.1. Prikaz obuhvaćenih ispitanika u našoj analizi	31
4.2. Analiza količine antitijela IgG na <i>Helicobacter pylori</i> u serumu	31
4.3. Analiza prisustva antigena na <i>Helicobacter pylori</i> u stolici.....	36
5. ZAKLJUČAK.....	39
6. LITERATURA	40
7. POPIS SLIKA I TABELA.....	41

Armin Begić

(Ime i prezime studenta)

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Izjavljujem i svojim potpisom potvrđujem da je diplomski rad

Imunološko laboratorijska dijagnostika

bakterijskih infekcija

(naslov rada)

isključivo rezultat mog vlastitog rada uz preporuke i konsultacije sa mentorom. Rad se temelji na mojim istraživanjima i oslanja se na objavljenu literaturu, a što pokazuju korišćene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da nijedan dio rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da nije prepisan iz necitiranog rada, te da nijedan dio rada ne ugrožava bilo čija autorska prava. U izradi rada pridržavao(la) sam se Pravilnika o diplomskom/specijalističkom radu.

U B.Luci, 04.10.2022.

Student

Armin B.

(potpis)



Amin Begić

(Ime i prezime studenta)

IZJAVA O KORIŠTENJU AUTORSKOG DJELA

Izjavljujem i svojim potpisom dajem saglasnost Panevropskom univerzitetu „APEIRON“, kao nosiocu prava iskorištavanja, da moj diplomski/specijalistički rad pod nazivom

Imunološko laboratorijska dijagnostika

bakterijskih infekcija

(naslov rada)

koristi na način da ga, u svrhu stavljanja na raspolaganje javnosti, kao cjeloviti tekst ili u skraćenom obliku trajno objavi u javno dostupni repozitorijum Panevropskog univerziteta „APEIRON“, a sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom. Korištenje diplomskog/specijalističkog rada na navedeni način ustupam bez naknade.

U B.Luci, 04.10.2022.

Student

Amin B.

(potpis)

1. UVOD

Bakterije predstavljaju mikroorganizme, koje možemo naći kako u organizmu tako i u našoj okolini. Bakterije imaju svoje dejstvo, neke negativno a neke čak i pozitivno za naš organizam. One veoma često izazivaju infekcije.

Kako bi se infekcija razvila potrebno je da se ispune određeni preduvjeti. Kao osnovni preduslov je izvor infekcije, tj. određena bakterija. Sljedeći uslov je put prenošenja zaraze. Od izvora infekcije, do domaćina mora postojati neki od načina prenosa. To mogu biti direktni dodiri, dodir preko nekih zaraženih predmeta, zrakom kao i vektorima. Treći uslov su ulazna vrata. To je mjesto gdje patogeni mikroorganizam ulazi u tijelo domaćina. Razvoj infekcije još zavisi od virulencije uzročnika kao i osjetljivosti domaćina.

Da bi se bakterijske infekcije suzbile, koriste se antibiotici. Zbog velikog porasta rezistencije na ove lijekove, dijagnostika ovih infekcija je veoma bitna zbog uspješnog liječenja.

Procese dijagnostike vršimo u različitim laboratorijama, kao što su mikrobiološke, imunološke, medicinsko biohemijske i slično. U radu se opisuju različite vrste imunoloških testiranja. Posebno je opisana bakterija *Helicobacter pylori*, njena morfologija, kulturelne osobine, epidemiologija, tretman i slično.

Pored ovoga, u poglavlju vlastiti rad analiziraćemo podataka o infekciji ovom bakterijom, vrste testova koji se koriste u dijagnostici *Helicobacter pylori*, način testiranja i sve vezano za ove testove. Rezultate testova ćemo analizirati, na osnovu spola, dobi i godina pacijenata, kako bi vidjeli koje grupe stanovnika ovog područja su najviše oboljevale od ove infekcije, nešto više o infekciji kao i tretmanu ove infekcije.

2. IMUNOLOŠKI LABORATORIJSKI TESTOVI

Laboratorijsku dijagnostiku imunološkog sistema baziramo na testovima koji ispituju građu funkciju humoralnog i celularnog imuniteta, u cilju utvrđivanja razine i opsega njegovog oštećenja. Iako su tehnologije za detekciju antigena i antitijela u zadnje vrijeme uglavnom automatizovane, osnovni principi metode testa su ostali najčešće isti.

Detekcija antigena i antitijela ovisi o formiranju kompleksa antigen-antitijelo. Jedna od vežućih komponenti (antigen ili antitijelo) je definisana, često obilježena i koristi se radi određivanja drugog partnera u kompleksu.

Optimalan odnos antigen - antitijelo je jedan udio antigena na 80 dijelova antitijela. Postoje specifični termini za varijacije ovih odnosa.

O prozoni govorimo kada su antitijela saturirala sva reaktivna mjesta na antigenu. Antitijela ne formiraju unakrsne veze između ćelija, te nema aglutinacije. Zona ekvivalencije je kada su antigeni i antitijela u optimalnom odnosu, a kada dolazi do aglutinacije. Fenomen post zone se javlja kada je antigen u suvišku, te je time aglutinacija skrivena masom neaglutinisanih antigena (1).

U cilju razumijevanja metodologije imunoloških testova važno je upoznati i pojmove monoklonalnih odnosno poliklonalnih antitijela. Monoklonalna antitijela su monospecifična antitijela koja su identična, zato što su produkovana od strane jednog jedinog tipa B-limfocita. Sve ćelije koje produkuje određen tip monoklalnog antitijela klonovi su jedne jedine ćelije majke.

Poliklonalna antitijela su antitijela produkovana od strane različitih klonova B-ćelija. Praktično predstavljaju smjesu molekula imunoglobulina, od kojih svaki prepoznaje isti antigen, ali reaguje sa različitim antigenskim determinantama datog antigena. Tehnologija produkcije monoklonalnih antitijela omogućava produkciju velike količine prečišćenih antitijela u postupku koji podrazumijeva nekoliko osnovnih koraka, među kojima su: (2)

- imunizacija životinja
- izolacija ćelija (iz organizma imunizovane životinje) koje »in vivo« imaju svojstvo produkcije određenog antitijela (koje želimo da proizvedemo)
- postojanje kulture ćelija koja ima svojstvo kontinuiranog rasta u kulturi
- formiranje hibridne ćelije, koja kombinuje svojstvo »besmrtnosti« i svojstvo produkcije K određenog antitijela
- postojanje hraniteljske kulture ćelija, koja izlučuje supstance neophodne za rast prethodne dvije kulture, kao i njihovih hibrida.

2.1. Kliničke laboratorijske metode za detekciju humoralnog imuniteta

Prisustvo antitijela na određene proteine ili druge strane komponente određuje između ostalog imunološki odgovor pacijenta, te se stoga detekcija antitijela, kvalitativna i kvantitativna, koristi u evaluaciji normalnog i poremećenog imunološkog odgovora. Povećana upotreba molekularno kloniranih antigena je značajno povećala preciznost detekcije antitijela. Detekcija antigena se obično koristi za određivanje stranih proteina ili nekih drugih komponenti (npr. infektivni agensi ili lijekovi). Detekcija antigena u svrhu određivanja fenotipa ćelija je osnovni metod analize, posebno hematopoetskih ćelija. Detekcija antitijela ili antigena ovisi o formiranju antigen-antitijelo kompleksa. Jedan od dva učesnika reakcije vezivanja (antigen ili antitijelo) je definisan, označen i koristi se u svrhu određivanja druge komponente kompleksa (3).

U procesu vezivanja antigena za antitijelo najčešće se radi o najjednostavnijem obliku reakcije vezivanja specifičnog monoklalnog antitijela, za traženi pojedinačni antigeni epitop, pri čemu se formiranje kompleksa prati metodom precipitacije istog ili prisustvom oznake (fluorescentne, radioaktivne ili enzimatske) na antitijelu. Upotreba molekularnih kloniranih proteina kao modela antigena koristi se u potrazi za specifičnim antitijelima koja prepoznaju dati protein. Isti može odrediti izotip reagujućeg antitijela (IgG, IgM ili IgE).

Prilikom testiranja se često koriste i složenije mješavine antigena i antitijela. Na primjer, antitijela za specifično testiranje mogu biti poliklonalni serum od životinje imunizirane sa antigenom (ili serumom pacijenta sa poznatim oboljenjem ili stanjem), a antigeni mogu biti kompleksna mješavina proteina, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina od infektivnog agensa. Često su antigeni ili antitijela vezani za solidnu podlogu, što omogućava imunim kompleksima da se odvoje od drugih komponenti u mješavini reagenasa. Ovaj proces se naziva imunoprecipitacija i obično se dešava kada se antitijelo ili antigen nalaze u suvišku u mješavini reaktanata. Količina nastalih kompleksa se određuje sekundarnim vezivanjem sa označenim reagensom (3).

2.2. Metode testiranja u kojima je antigen ili antitijelo vezano za solidnu površinu

2.2.1. Imunoaglutinacija

Imunoaglutinacija je reakcija između korpuskularnog antigena i odgovarajućeg specifičnog antitijela. Unošenjem suspenzije čestica (eritrociti, ćelije, bakterije, gljivice, inertne čestice obložene antigenom) koje na svojoj površini imaju veći broj antigenskih determinanti u rastvor odgovarajućeg specifičnog antitijela dolazi do nagomilavanja, aglutinacije čestica. Do aglutinacije dolazi usljed međusobno ukrštenog povezivanja čestica mostovima, sačinjenim od molekula antitijela, koji sa svoja najmanje dva ili više veznih mjesta reaguje sa antigenkim determinantama na dvije susjedne čestice (1).

Optimalno stvaranje aglutinata se javlja u zoni ostvarivanja ekvivalentnog odnosa antigena i antitijela. Ako je antitijelo u velikom višku, neće doći do stvaranja aglutinata i reakcija je lažno negativna. Ovo odsustvo aglutinacije u prisustvu suviše velike količine antitijela, naziva se fenomen prozone s obzirom na to da se zapaža prije zone aglutinacije prilikom titriranja antitijela. U uslovima kada se konstantna količina partikularnog antigena dodaje u serije

rastućih razblaženja antiseruma. Također u prisustvu nedovoljne, subaglutinišuće količine antitijela neće doći do aglutinacije, iako se odigrala reakcija antitijela sa korpuskularnim antigenom.

Imunoaglutinacija se odvija u dvije faze. U prvoj fazi dolazi do specifične interakcije između antitijela i antigenskih determinanti na površini čestica, a u drugoj do aglutinacije čestica. Na reakciju imunoaglutinacije u njenoj drugoj fazi utiču nespecifični faktori, kao što su koncentracija elektrolita, vrijednost pH, temperatura i vrijeme, kao i veličina čestica, elektrostatski naboj i polivalentna antitijela.

Metodi imunoaglutinacije se mogu izvoditi na staklenoj pločici, u epruveti ili u posebnim plastičnim pločama za mikrotitraciju, sa većim brojem bazenčića. Neaglutinisane čestice prilikom spontane sedimentacije ravnomjerno klize niz zidove bazenčića ka dnu, gdje formiraju talog u vidu dugmeta pravilnog kružnog oblika. Nasuprot tome, aglutinisane čestice se ne skupljaju u centru dna, ne stvaraju talog, već difuzno pokrivaju dno bazenčića slojem nepravilnog oblika i nejednake gustine (1).

Metode imunoaglutinacije se koriste za detekciju antigena, ali i za mjerenje titra specifičnih antitijela u serumu. Titar predstavlja recipročnu vrijednost najvećeg razblaženja seruma koje daje jasno vidljivu aglutinaciju. Metodi imunoaglutinacije mogu biti direktni i indirektni (pasivni). U metode direktne imunoaglutinacije, partikulisani antigen je aglutinisan direktno od strane antitijela. Na primjer, to je aglutinacija bakterija u prisustvu specifičnih antibakterijskih antitijela. Tu spadaju npr. Gruberov test za krajnju identifikaciju enterobakterija, Widalov test za identifikaciju i kvantificiranje antitijela na somatske O i flagelinske H antigene *Salmonellae typhi*, Weil-Felixov test za antitijela na uzročnike pjegavog tifusa itd.

Metod indirektne imunoaglutinacije zasniva se na mogućnosti da se neki inače solubilni antigeni mogu pasivnom adsorpcijom ili hemijskim putem vezati za površinu eritrocita ili raznih inertnih čestica (polistirena, bentonina) koje postanu pasivni nosači datog antigena. Kada ove antigenom obložene čestice dođu u dodir sa odgovarajućim antitijelom specifičnim za vezane antigene, doći će do njihove aglutinacije koja se naziva indirektnom ili pasivnom aglutinacijom.

Posebnu metodu predstavlja, takozvana obrnuta indirektna imunoaglutinacija u kojoj su antitijela poznate specifičnosti vezana za neke inertne čestice. Na primjer, moguće je ovaj test koristiti za detekciju HbsAg u serumu gdje su eritrociti obloženi anti - HbsAg antitijelom, te aglutinišu u serumu koji sadrži HbsAg. Za razliku od antieritrocitnih antitijela klase IgM, antieritrocitna antitijela klase IgG često ne dovode do aglutinacije eritrocita, iako sa njima reaguju i oblažu ih (nekompletna antitijela). Tipičan primjer su antitijela na Rh determinante humanih eritrocita. Međutim, dodavanjem antiimunoglobulinskog antiseruma postiže se aglutinacija eritrocita koji su obloženi nekompletnim antitijelima (1).

U laboratorijskoj praksi koristi se direktni i indirektni Coombsov test. Direktni Coombsov test se najčešće koristi za dokazivanje prisustva majčinih anti - Rh antitijela klase IgG, koja su se vezala za antigenske determinante eritrocita novorođenčeta. Indirektnim Coombsovim testom najčešće se ispituje prisustvo anti Rh antitijela klase IgG u serumu Rh negativnih žena. Ispitivani serum se najprije inkubira sa Rh eritrocitima, a potom se dodaju antiimunoglobulinska antitijela. Ako dođe do hemaglutinacije test je pozitivan.

2.2.2. Enzimoimunotest (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA)

U enzimoimunotestu, ELISA testu, antitijelo (ili antigen) je fiksirano na površinu kao što je jažica mikrotitarske ploče (od 96 polja) ili plastično polje. Uzorak koji se testira se dodaje i vezani materijal se detektuje sekundarno, enzimski obilježenim antitijelima. Enzimi se najčešće vezuju za antitijela, i to za antitijela koja su ili specifična za neki antigen ili za antitijela na imunoglobuline. Količina enzima u antigen antitijelo kompleksu se određuje posredno mjerenjem količine produkta razgradnje odgovarajućeg supstrata koji se unosi u završnoj fazi testa. Koriste se enzimi čiji supstrati daju obojene produkte razgradnje i čija se količina lako može kolorimetrijski mjeriti. Na primjer, enzim alkalna fosfataza i njen supstrat p-nitrofenil fosfat koji razgradnjom daje p-nitrofenil intenzivne žute boje. Varijante tehnika ELISA dijele se na tehnike u kojima je antigen u čvrstoj fazi i tehnike u kojima je antitijelo u čvrstoj fazi.

U prvu grupu, na primjer, spada enzimoimunotest za IgG antitijela protiv virusa rubeole. Varijante enzimoimuno testova u kojima je antitijelo u čvrstoj fazi, zasnivaju se na principima »sendviča antitijela«. U ovu grupu testova spada enzimoimunotest za površinski antigen virusa hepatitisa B (HbsAg). ELISA esej je brz, jednostavan i jako se adaptira na automatske analajzere. Oni zahtijevaju visoko pročišćene reagense, tako da su upotreba monoklonalnih antitijela i rekombinantnih antigena uveliko doprinijeli rasprostranjenju upotrebi ELISA (1).

Pored ELISA, važno je spomenuti i radioimunotestove (RIA). Vezivanje određene količine radioaktivnim izotopom obilježenog antigena za ograničenu i fiksiranu količinu specifičnog antitijela u rastvoru može se u različitom stepenu inhibirati dodavanjem raznih količina neobilježenog antigena. Step en inhibicije pod datim uslovima direktno je proporcionalan količini dodatog neobilježenog antigena, pa se može koristiti za procjenu te količine. Usavršavanjem metoda radioaktivnog obilježavanja antigena kojima se postiže visoka specifična aktivnost, radioimunotestom se mogu detektovati izvanredno male količine antigena (čak do 10^{-12} g/ml) (3).

U odnosu na RIA, ELISA ima mnoge prednosti: brže se izvodi, jeftinija je, zahtijeva manje komplikovanu opremu i, što je najvažnije, izbjegava se rizik rada sa radioaktivnim materijalom kao i problemi oko njegovog skladištenja i uklanjanja.

2.2.3. Western blot

Western blot je tehnika kojom se detektuju makromolekuli peptidne prirode (najčešće proteini). Princip izvođenja ovog metoda podrazumijeva sljedeće korake:

- Izdvajanje proteina
- Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu
- Prenos (blotting) proteina sa gela na čvrstu podlogu odnosno membranu
- Specifično vezivanje antitijela za odgovarajuću antigensku determinantu
- Detekcija antigen-antitijelo kompleksa.

Prednost ove metode je u istovremenom detektovanju formiranog kompleksa antigen-antitijelo, kao i molekulske mase antigena. Međutim, ova metoda je komplikovanija za izvođenje od većine drugih antigen antitijelo reakcija i teže je kvantifikovati rezultate.

U dijagnostičke svrhe u rutinskim laboratorijama uglavnom se koristi rekombinantni imunoblot esej (RIBA), metod koji umanjuje nedostatak Western blota i omogućuje njegovo korištenje za rutinsku analizu. RIBA metod se koristi za određivanje antitijela u serumu bolesnika koja su specifična za različite infektivne agense kao što su HIV1 i HIV2.

2.3. Test metode koje ovise o formiranju imunih kompleksa

Imunoprecipitacija je reakcija između solubilnog antigena i odgovarajućih specifičnih antitijela. Reakcija imunoprecipitacije se odvija u dvije faze. U prvoj fazi dolazi do specifičnog vezanja antigena sa antitijelom. Ukoliko se reakcija odvija u tečnom mediju ova reakcija traje veoma kratko. Druga faza se karakteriše stvaranjem vidljivih agregata i može da traje satima ili danima. Na nju utiču nespecifični fizički faktori, kao što su koncentracije jona, pH, temperatura i vrijeme. Joni pomažu reakciji, smanjujuću površinski potencijal, čime omogućavaju agregaciju hidrofobnih kompleksa.(2)

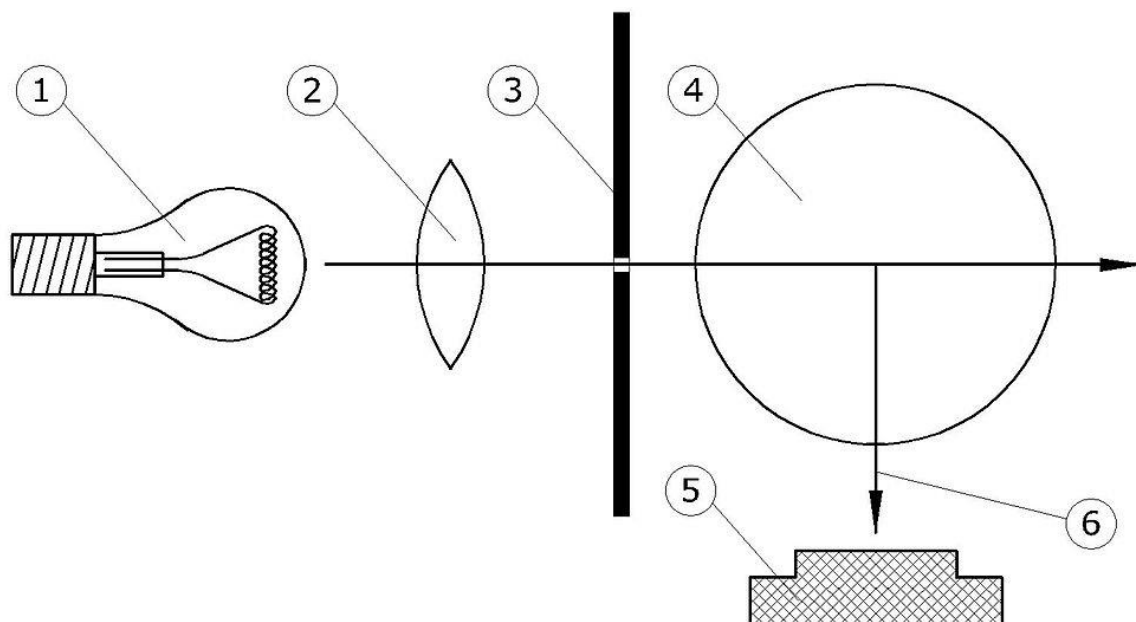
Obzirom na sredinu u kojoj se precipitacija odvija, metodi imunoprecipitacije se dijele u dvije grupe:

- » Metode u kojima se za precipitaciju koristi tečni medij
- » Metodi sa polučvrstim medijom — gelom.

U oba slučaja metodi mogu biti kvalitativni, semikvantitativni, kvantitativni.

2.3.1. Nefelometrija

Nefelometrija je metoda imunoprecipitacije utečnom mediju. Koristi se u mjerenju koncentracije mnogih antigena (imunoglobulina, komponenti komplementa, C reaktivnog proteina, itd.) u serumu, plazmi i drugim biološkim tečnostima. Kada se pomiješaju razblaženi rastvori konstantne količine veoma prečišćenog i optički čistog monospecifičnog antiseruma i rastvori raznih količina odgovarajućeg antigena, nastaje zamućenost usljed stvaranja mikroprecipitata koji se ne talože već ostaju da lebde. Step zamućenosti pod datim uslovima direktno je proporcionalan koncentraciji antigena i može se precizno mjeriti na osnovu rasipanja upadnog zraka svjetlosti (nefelometrija). Osjetljivost mjerenja znatno se povećava upotrebom monohromatske svjetlosti iz lasera (Slika 1) (1).



Slika 1. Dijelovi nefelometra: 1. izvor svjetlosti, 2. optička leća, 3. otvor u objektivu, 4. okrugla kiveta, 5. fotometar s filtrima (fotomultiplikator), 6. raspršene zrake svjetlosti (90°).¹

2.3.2. Imunodifuzija

U metodi imunoprecipitacije u polučvrstom mediju (gelu), precipitat se javlja u vidu precipitacijske linije, koja se formira na mjestu ekvivalentnog odnosa koncentracije antigen i antitijela u gelu.

Postoje dva načina na koje se solubilni antigen i antitijelo dovode u međusobni dodir: prosta difuzija ili uz pomoć dejstva električne struje. U prvu grupu metoda spadaju dvostruka imunodifuzija, jednostruka radijalna imunodifuzija i imuno elektroforeza, a u drugu grupu spadaju: jednodimenzijaska jednostruka elektroimunodifuzija i jednodimenzijaska dvostruka elektroimunodifuzija.

2.3.2.1. Dvostruka imunodifuzija u gelu

U tankom sloju gela agara na staklenoj ploči načine se bazenčići u koje se stavljaju rastvori antigena i antitijela. Iz dva susjedna bazenčića solubilni antigen i antitijelo naspramno migriraju

¹ <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/hr/thumb/a/ab/Nefelometar.jpg/1024px-Nefelometar.jpg>

difuzijom obrazujući gradijente koncentracije. Migracijski frontovi antigena i antitijela se susreću i ukrštaju, a na mjestu između dva susjedna bazenčića gdje se ostvari ekvivalentni odnos koncentracija obje komponente nastaju nerastvoreni kompleksi antigen antitijelo koji dalje ne migriraju. Nerastvoreni kompleksi obrazuju precipitat u vidu precipitacijske linije. Ako je koncentracija antigena relativno veća od koncentracije antitijela, precipitacijska linija će se javiti bliže bazenčiću u koji je unijeto antitijelo. Ako su koncentracije približno jednake, linija će biti na sredini rastojanja između dva bazenčića. Ako je, međutim, koncentracija antitijela veća od koncentracije antigena, linija će biti bliže bazenčiću u koji je unijet antigen. Zbog toga se korištenje sistema serijskih razblaženja, bilo antigena ili antitijela, mogu dobiti semikvantitativni podaci o njihovim relativnim koncentracijama (1).

2.3.2.2. Jednostruka radijalna imunodifuzija

Za razliku od dvostruke imunodifuzije u ovoj metodi difunduje samo antigen iz bazenčića u gel, sa uniformno inkorporisanim monospecifičnim antitijelom pogodne koncentracije.

2.3.3. Imunoelektroforeza

Imunoelektroforeza predstavlja kombinaciju elektroforeze i dvostruke imunodifuzije. Izvodi se u tankom sloju gela (agara, agaroze, skroba, poliakrilamida) na staklenoj ploči. U prvoj fazi postupka se izvrši elektroforetsko razdvajanje antigena iz njihove smjese. U drugoj fazi, a poslije završene elektroforeze, u gelu se načini kanal paralelan sa pravcem prethodno djelujućeg električnog polja. U kanal se stavlja antiserum koji sadrži antitijela na antigen koji se ispituje. Antigen i antitijelo naspramno difunduju i na mjestu gdje se ostvare ekvivalentni odnosi koncentracija obje komponente formira se precipitat. Obzirom da antigen difunduje iz tačkastog izvora radijalno, a da antitijelo iz kanala difunduje u ravnom frontu, formiraće se precipitacijski lukovi sa konkavitom prema mjestu lokalizacije antigena.

Na osnovu intenziteta, oblika i veličine lukova, kao i na osnovu njihove udaljenosti od kanala, Može se steći uvid o relativnoj količini i homogenosti odgovarajućeg antigena. U kliničkoj imunologiji se metod imunoelektroforeze koristi za kvalitativnu i semikvantitativnu analizu proteina seruma i drugih tkivnih tečnosti, prije svega normalnih i abnormalnih imunoglobulina.

2.4. Reakcija vezivanja komplementa (RVK)

Reakcija vezivanja komplementa je veoma pouzdana tehnika koja se koristi kako za detekciju specifičnih antitijela u serumu, tako i za detekciju antigena. Formiranje imunoloških kompleksa u rastvoru može se pratiti prema mogućnosti komplementa da fiksira i troši proteine komplementa. Unošenje standardizovane količine komplementa u mješavinu poznatoga antigena i nepoznatog seruma za koji se pretpostavlja da sadrži antitijela na taj antigen i mjerenjem utroška komplementa, može se utvrditi da li se specifična reakcija antigen antitijelo stvarno odigrala. Mjerenje utroška komplementa vrši se dodavanjem u drugoj fazi testa, tzv. indikatorskog sistema, koji se sastoji od standardizovanog broja eritrocita »senzibilisanih« standardizovanom količinom antieritrocitnih antitijela. Ukoliko u serumu ima specifičnih antitijela, stvoriće se antigen antitijelo kompleks, koji vezuje, troši komplement. Zbog toga što je komplement utrošen neće doći do hemolize eritrocita naknadno dodatog indikatorskog sistema. Reakcija vezivanja komplementa je pozitivna i dokazuje da u serumu postoje

specifična antitijela. Esej fiksacije komplementa se koristi za detekciju imunološkog odgovora na infektivne agense (bakterije, rikecije, mikoplazme, parazite, gljivice...), antitireoglobulinska i anti trombocitna antitijela, itd.

2.4.1. Krioglobulini

Krioglobulini su serumski imunoglobulini koji precipitiraju na temperaturama manjim od 37°C. Prisustvo krioglobulina u krvi određuje se inkubacijom seruma na +4°C nekoliko sati, zatim posmatranjem formiranja precipitata. Precipitirani proteini se izoluju centrifugiranjem, rastvore u rastvaraču na 37% i esejom se određuje prisustvo imunoglobulina pomoću nefelometrije ili imunofiksacione elektroforeze.

Postoje tri tipa krioglobulina:

- » Tip I: monoklonalni imunoglobulini ili laki lanci;
- » Tip II: monoklonalni imunoglobulini uglavnom IgM koji se vežu za normalne IgG. Antitijela koja prepoznaju normalan IgG se nazivaju reumatoidni faktor (RF);
- » Tip III: poliklonalni RF (obično IgM ili IgA izotipa) vezan na poliklonalni IgG.

2.5. Imunohistohemijske metode

2.5.1. Imunofluorescencija

U ovoj metodi, specifična antitijela (obično monoklonalna) konjugirana sa fluorescentnim obilježivačem koriste se kao probe za detekciju antigena u uzorku pacijentovog tkiva ili ćelija. Vezanje antitijela za tkivo ili ćelije je vidljivo direktno, korištenjem fluorescentnog mikroskopa. Ovaj bazični proces može se koristiti za detekciju antitijela u serumu pacijenta koja su reaktivna na specifični patogen ili pokazuju unakrsnu reakciju za specifični tkivni antigen. Detekcija reaktivnih antitijela u serumu pacijenta korištenjem sekundarno obilježenih antiantitijela se naziva indirektna imunofluorescencija. Fluorescencija podrazumijeva emisiju svjetlosti jedne talasne dužine dok je supstanca obasjana svjetlošću druge boje. Klasični fluorohromi su fluorescein i rodamin (1).

2.5.2. Određivanje komplementa

Hemoliza eritrocita pomoću antitijela in vitro ovisi od komplementa. Hemolitički esej za klasični put aktivacije komplementa uključuje ovčije eritrocite, zečija antitijela na ovčije eritrocite i pacijentov serum kao izvor komplementa. Obim liziranja u standardizovanom sistemu opisuje krivulju S oblika kada se prikaže u odnosu na rastuću količinu komplementa (ili pacijentovog seruma). U srednjem dijelu ove krive, što odgovara 50% hemolize, linearni odnos postoji između nivoa hemolize i količine aktivnosti prisutnog komplementa. Razina komplementa u Serumu određuje se testom ukupne hemolitičke aktivnosti seruma (CH50) (engl. total hemolytic complement - CH50). Testom se ispituje klasični put aktivacije komplementa, pa je stoga koristan za Pretraživanje većine nedostatnosti sistema komplementa. Vrijednost CH50 = 0 nalazi se pri manjku komponenti C1-C8, dok se u manjku C9 vrijednosti CH50 kreću od 25% do 50% normalne Vrijednosti, Test CH50 neće otkriti manjak properdina ili faktora D (tada je potrebno učiniti "Pecijalni test - APH50). Manjak faktora | ili H udružen

je s povećanom potrošnjom C3 i stoga sniženom vrijednosti CH50. Manjak C1-inhibitora udružen je sa sniženom razinom C4. (1)

2.6. Kliničke laboratorijske metode za detekciju celularnog imuniteta

Protočna citometrija je tehnologija koja simultano mjeri, a potom i analizira mnogobrojne karakteristike pojedinačnih čestica, uglavnom ćelija, prilikom njihovog protoka kroz aparat (engl. »flow« - protok).

Čestice se mjere i analiziraju u odnosu na:

- relativnu veličinu
- relativnu gustinu i složenost
- relativni intenzitet fluorescencije.

Protočni citometar se sastoji od 3 međusobno povezana sistema: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sistem čine pokretačka tekućina, koja je nosač stanične suspenzije, stanična suspenzija i zračni potisak. Protočni sistem omogućava da ćelije iz stanične suspenzije pojedinačno, laminarnim tokom, kroz sistem uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla koje s lećama, filtrima i detektorima čine optički sistem. Ćelije se obasjavaju laserskim svjetlom, a stepen raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazatelj je fizičkih osobina ćelija - veličine (svjetlost koja se raspršila pod malim kutom od 0,5-10, FSC - prema engl. forward scatter) i zrnatosti (svjetlost raspršena pod pravim kutom - SSC, prema engl. side scatter). Dodatno obilježavanje ćelija slobodnim ili (ponajčešće) za monoklonaalna antitijela vezanim fluorescentnim bojama (fluorokromima), koristi se za dodatno obilježavanje specifičnih staničnih struktura. Fluorokromi obasjani laserskom svjetlošću emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti, a hvataju je specifični detektori protočnog citometra. Sve svjetlosne signale elektronski sistem pretvara u digitalne signale, koji se prenose u elektroničko računalo i služe za analizu.

Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi citogram veličine i zrnatosti ćelija (FSCxSSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih ćelija iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Upravo je to jedna od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući da ćelije prije analize nije potrebno prethodno fizički razdvojiti. Od ostalih prednosti valja izdvojiti veliku brzinu mjerenja signala ($>10^3$ ćelija u sekundi), te istodobno mjerenje više parametara (fizičkih parametara i fluorescentnih signala), pa se na modernim citometrima istodobno može analizirati i do desetak parametara.

Premda je do danas razvijen velik broj protočno citometrijskih testova za analizu različitih staničnih obilježja i/ili funkcija, ona se još uvijek ponajviše koristi u cilju imunofenotipizacije, tj. obilježavanja specifičnih ćelijskih biljega. Od imunofenotipskih analiza posebno se izdvaja analiza limfocita periferne krvi u cilju ocjene imunološkog statusa, imunofenotipizacija leukemija i limfoma i praćenje ostalih malignih ćelija (minimalne rezidualne bolesti), mjerenje broja CD34⁺ matičnih ćelija hematopoeze u perifernoj krvi i leukocitnom koncentratu za potrebe transplantacije matičnih ćelija hematopoeze, dijagnostika paroksizmalne noćne hemoglobinurije (PNH) i mjerenje sadržaja stanične DNA u cilju otkrivanja aneuploidija (najčešće u leukemijama) i proliferacijske aktivnosti ćelija (za funkcijske testove limfocita ili procjenu proliferacije tumorskih ćelija). Funkcijski testovi leukocita najčešće se koriste za mjerenje aktivacije i proliferacije limfocita, kao i za analizu funkcije granulocita (fagocitoze i respiracijskog praska). (2)

2.6.1. Fenotipizacija leukocita

Osnovna metoda za određivanje relativnog i apsolutnog broja pojedinih razreda i podrazreda limfocita u perifernoj krvi je imunološka fenotipizacija limfocita, pomoću monoklonalnih antitijela i protočne citometrije. Imunološka fenotipizacija leukocita temelji se na otkrivanju membranskih leukocitnih diferencijacijskih antigena (LDA) iz sistema CD-klasifikacije (engl. clusters of differentiation), pomoću specifičnih monoklonalnih antitijela. CD molekule se koriste u svrhu sortiranja ćelija pomoću raznih metoda, uključujući i protočnu citometriju.

Danas se obično koristi dvostruko ili trostruko bojenje ćelija, tj. istodobna analiza dva ili tri biljega na ćelijama. Na taj se način može analizirati ne samo udio (broj) pojedine skupine limfocita, već i njihov stupanj diferencijacije ili aktivacije. Paleta monoklonalnih antitijela koja se koristi u dijagnostici ovisi o indikaciji. Njime se otkriva relativni i apsolutni broj limfocita T i T-limfocitnih subpopulacija (pomagačkih i citotoksičnih), limfocita B i NK-ćelija u perifernoj krvi, a katkada i u koštanoj srži.

Pri tumačenju i prikazivanju rezultata limfocitnih subpopulacija treba se služiti referentnim vrijednostima. Udio i apsolutni broj limfocitnih subpopulacija u krvi ovisi o dobi i spolu, pa za djecu i starije osobe uvijek treba tražiti primjerene referentne raspone, uključujući one iz velikih serija ispitanika iz literature. Pri tome treba imati na umu da je apsolutni broj ćelija važniji podatak nego njihov udio u zajedničkoj lozi. Praćenje limfocitnih subpopulacija pokazalo se vrijednim za dijagnostiku specifičnih imunodeficijenција (npr. parcijalnog Di Georgeovog sindroma) i praćenje bolesnika s imunodeficijenциjama, posebno u kontekstu specifične terapije. Zrelost i stupanj diferencijacije limfocita B ispituje se na temelju izražavanja razreda antigenskog receptora (IgM, IgD, IgG ili IgA) i biljega CD27. (2)

Imunofenotipizacija limfocita T može ukazati na specifični poremećaj: nezreli CD4+CD8+ limfociti T mogu se naći u perifernoj krvi bolesnika s teškom združenom imunodeficijenциjom, dok neizražavanje biljega CD43 na limfocitima T karakterizira Wiskott-Aldrichov sindrom.

2.7. Metode aktivacije limfocita

Postoje brojni testovi limfocitne funkcije, no oni su, u načelu, složeni i nestandardizirani, funkcijski testovi limfocita T uključuju mjerenje proliferacije limfocita, analizu citokina i imunoglobulina podraženih limfocita i testove citotoksičnosti. Od funkcijskih ispitivanja limfocita najčešće se izvodi test proliferacije limfocita in vitro, dok se složenije analize izvode u specijaliziranim laboratorijima. Limfociti se mogu aktivirati i potaknuti na poliklonsku proliferaciju in vitro, primjenom nespecifičnih aktivatora (mitogenika, superantigena, forbol-estera i antilimfocitnih antitijela), dok se aktivacija antigen-specifičnih receptora inducira »memorijskim« antigenima i alogeničnim molekulama HLA (tj. alogeničnim ćelijama).

Mitogenici su poliklonski aktivatori limfocita, a najčešće se koriste lektin fitohemaglutinin (PHA), konkavalin A (ConA) i korovski mitogen (PWM). PHA i ConA služe za procjenu aktivacije limfocita T, a zahtijevaju prisutnost monocita za stimulaciju limfocita T. Uobičajeni aktivatori limfocita B jesu PWM (učinak ostvaruje preko limfocita T) i stafilokokni protein A (SPA). Drugi nespecifični aktivatori limfocita jesu forbol-esteri (npr. PMA) i superantigeni, kao što je toksični šok sindrom toksin (engl. toxic shock syndrome toxin, TSST). Forbol-esteri

izravno aktiviraju proteinkinazu C (PKC), čime se zaobilazi početna faza aktivacije limfocita preko receptora. Superantigeni aktiviraju limfocite T tako da se izravno vežu za B-lanac T-staničnog receptora (TSR) i za molekulu II. klase HLA na antigen-prezentujućim ćelijama.

Antitijela koja se koriste za nespecifičnu aktivaciju limfocita T uključuju antitijela na signalnu (CD3) i kostimulacijsku molekulu (CD28), kao i na različite adhezijske molekule (naprimjer, CD2). Nasuprot poliklonskim aktivatorima, antigeni podražavaju samo one limfocite koji izražavaju specifične receptore za te antigene. Za mjerljivi odgovor limfocita T na antigene in vitro koriste se antigeni iz cjepiva, odnosno antigeni ubikvitarnih uzročnika, čime se ispituje memorijski odgovor limfocita. Stoga je testiranje antigenima manje učinkovito u dojenačkoj dobi i u djece. Najčešće se koriste tetanusni toksoid (TT), ekstrakt *Candida albicans*, tuberkulin (PPD) i streptolizin/ streptodornaza. Proliferacija limfocita na alogenične ćelije u reakciji pomiješanih limfocita (engl. mixed lymphocyte reaction, MLR) je dodatna metoda za procjenu funkcije limfocita T. Zbog svoje relativne složenosti postupak nije u rutinskoj upotrebi, već se obično izvodi u specijaliziranim centrima za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze. Reakcija pomiješanih limfocita je in vitro metoda za praćenje proliferacije CD4 (Th) i nastanka CD8 (Tc) limfocita. Kada se alogeni (različiti MHC haplotipovi) limfociti stave u kulturu zajedno, CD4 populacija se razvija. U periodu Od oko 48 sati stvara se i razvija populacija CD8 ćelija. CD4 ćelije, dendritičke ćelije i određeni tipovi aksesornih ćelija su važne za MLR. (1)

Ukupna proliferacija limfocita iz alogenih loza mjeri se dodavanjem [³H]-timidin u medij kulture i monitoringom njegovog preuzimanja (preuzimanje se dešava tokom svakog dijeljenja ćelija), Ipak, nije sasvim jasno na osnovu preuzimanja [³H]-timidina koliko svaka pojedinačna Populacija proliferiše. Ovu dilemu riješava jednosmjerna MLR. Jedna populacija - stimulatorse Prvo inaktivira (pomoću mitomicina c ili letalnih doza X zračenja) prije dodavanja u polja za MLR. Ove inaktivirane ćelije omogućavaju strane aloantigene za populaciju reaktivnih ćelija. U periodu Od 24-48 sati, dolazi do odgovora T ćelija, proliferacije i u periodu od sljedećih 48 sati širenja Populacije funkcionalnih citotoksičnih T limfocita.

Umjesto ugradnje radioaktivnog timidina, danas su razvijene sljedeće tehnike:

- i. mjerenje ugradnje neradioaktivnog spoja brom-deoksiuridina (BrdU) pomoću fluorescentnih anti-BrdU antitijela i protočne citometrije;
- ii. analiza sadržaja DNA protočnom citometrijom (mjeri se udio ćelija u proliferaciji);
- iii. mjeri se izražaj aktivacijskih biljega CD69 ili CD25 na limfocitima s pomoću protočne citometrije. Treba napomenuti da se analizom izražavanja aktivacijskih biljega (naprimjer CD69) na limfocitima podraženim kroz kraći period (4-6 sati) ne mjeri proliferacija limfocita, već samo početna faza, tj. aktivacija limfocita. (1)

Test proliferacije limfocita (LPA) mjeri proliferaciju limfocita postavljenih u kratkoročne kulture tkiva, gdje podležu klonalnoj proliferaciji kada se stimulišu in vitro stranim molekulama, antigenima ili mitogenima. CD4 limfociti proliferiraju u odgovoru na antigene peptide povezane sa klasom II MHC na antigen prezentujućim ćelijama. Ovaj proliferativni odgovor limfocita na antigene in vitro javlja se samo ako je pacijent imuniziran na taj isti antigen ili nakon oporavka od infekcije mikroorganizmima koji sadrže taj antigen ili nakon vakcinacije sa istim. Neke normalne osobe ne reaguju na dati antigen ali većina ljudi reaguje na najmanje jedan ili nekoliko najčešćih mikrobnih antigena.

2.7.1. Test funkcije neutrofila

Polimorfonuklearni neutrofili (PMN) su primarne efektorske ćelije urođenog imuniteta. Imaju relativno kratak životni vijek, oko 24 sata, te se stoga konstantno stvaraju u koštanoj srži. PMN su prve ćelije koje dopijevaju na mjesto inflamacije nakon čega stimulirane raznim faktorima podliježu respiratornom prasku i oslobađaju superoksid, antimikrobne peptide i proteine i stvaraju ograničen broj proinflamatornih citokina. PMN deficijencija rezultira u podložnosti infekcijama. Ove deficijencije mogu biti posljedica smanjenog broja (supresija koštane srži nakon, npr. hemoterapije) ili zbog intrinzičkih defekata PMN. Testovi za određivanje ovakvih defekata podrazumijevaju evaluaciju adhezije, hemotaksije, fagocitoze, stvaranja superoksida i ubijanja bakterija (3).

PMN koriste selektine i integrine na površini ćelija da bi izveli svoju funkciju migriranja na mjesto inflamacije. Selektin koji se nalazi na leukocitima, L selektin, uz pomoć endotelnih selektina omogućava kotrljanje PMN duž endotelne površine. Uz prisustvo inflamatornih medijatora (hemokini, TNF, bakterijski produkti kao što je LPS) PMN postaju aktivirani i čvrsto prijanjaju na endotelnu površinu koristeći integrinske receptore. Deficijencija selektina ili integrina vodi specifičnoj deficijenciji leukocitne adhezije (LAD).

Kod ovakvih pacijenata ne postoji mogućnost stvaranja gnoja na mjestu infekcije. Nedostatak ovih površinskih molekula određuje se bojenjem sa monokonalnim antitijelima i imunofenotipizacijom: LAD I pacijentima nedostaje B2 subjedinica (CD18) velikih leukocitnih integrina, a LAD II nedostaje fukozil transferaza uključena u ekspresiju selektina na površini leukocita. Nemogućnost PMN da adheriraju na odgovarajuće površine se evaluira sa in vitro adhezionim esejima.

PMN se aktiviraju sa raznim agensima i vežu na površine sa ligandima, a snaga vezivanja određuje se rezistencijom na ispiranje. Neutrofili koriste razne površne receptore za vezanje na opsonizirane bakterije. Određivanje ovih receptora se vrši mjerenjem vezanih čestica obilježenih fluorescentnim bojama. Najinteresantniji i najprimjenjiviji je test određivanja sposobnosti ovih ćelija da stvaraju superoksid. To je skrining test za hroničnu granulomatozu, poremećaj uzrokovan deficijencijom jedne ili nekoliko podjedinica oksidaze, koja djeluje na nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, najčešće na p91phox i p47phox protein. Najčešće se koristi nitroblu tetrazolium test (NBT) i 2,7 dihlorofluorescein test (DCF). NBT je jasna, žuta, u vodi rastvorljiva komponenta, koja formira formazan, plave boje, po redukciji. Inkubacijom aktiviranih polimorfonukleara - PMN (postiže se tretmanom sa forbol miristat acetatom (PMA), izlaganjem LPS, inkubacijom sa opsoniziranim česticama koje stimuliraju fagocitozu) sa NBT rezultira u stvaranju O₂⁻ i redukciji boje. Aktivirani PMN su plave boje kada se gledaju pod svjetlosnim mikroskopom. DCF test koji se radi pomoću protočne citometrije je jednostavnija metoda skrininga. Ovaj test zapravo mjeri nastali H₂O₂ od O₂ pomoću superoksid dizmutaze. H₂O₂ mjeri se oksidacijom nefluorescentne komponente 2,7 dihlorodihidrofluorescein (DCFH) do fluorescentne komponente DCF, koja se lako detektuje protočnom citometrijom. Testovi degranulacije se obično koriste za dijagnostiku nedostatka proteina u granulama. Detekcija deficijencije proteina primarnih ili sekundarnih granula može se također dijagnostikovati protočnom citometrijom.

3. HELICOBACTER PYLORI

3.1. Klasifikacija

Porodica: Helicobacteraceae

Rod: Helicobacter

Vrsta: *Helicobacter pylori* preko 35 vrsta

Synonym(s): *Campylobacter pylori* (homotypic syn.), *Helicobacter nemestrinae* (heterotypic syn.), *Campylobacter pylori* subsp. *pylori* (nomotypic syn.)

Helicobacter pylori (poznata kao *Campylobacter pylori* od ranije) je spiralna (helikoidna) gram-negativna bakterija. Često se nalazi u želucu, te je mikroaerofilna. Posjeduje helikoidni oblik (po čemu je i dobila naziv „*helicobacter*“). Rezultatom evolucije u cilju penetracije sluznice želuca smatra se da je dobila ovaj oblik, kako bi proizvela infekciju. 1982. godine prvi put su je otkrili australski doktori Barry Marshall i Robin Warren. (4) *H. pylori* je bila povezana s limfomima limfoidnog tkiva povezanog sa sluznicom koju imaju želudac, jednjak, debelo crijevo, rektum, kao i tkiva oko očiju (nazvano ektranodalni limfom B-ćelije rubne zone navedenog organa), te limfoidnog tkiva u stomaku (nazvano difuzni veliki limfom B-ćelija) (5).



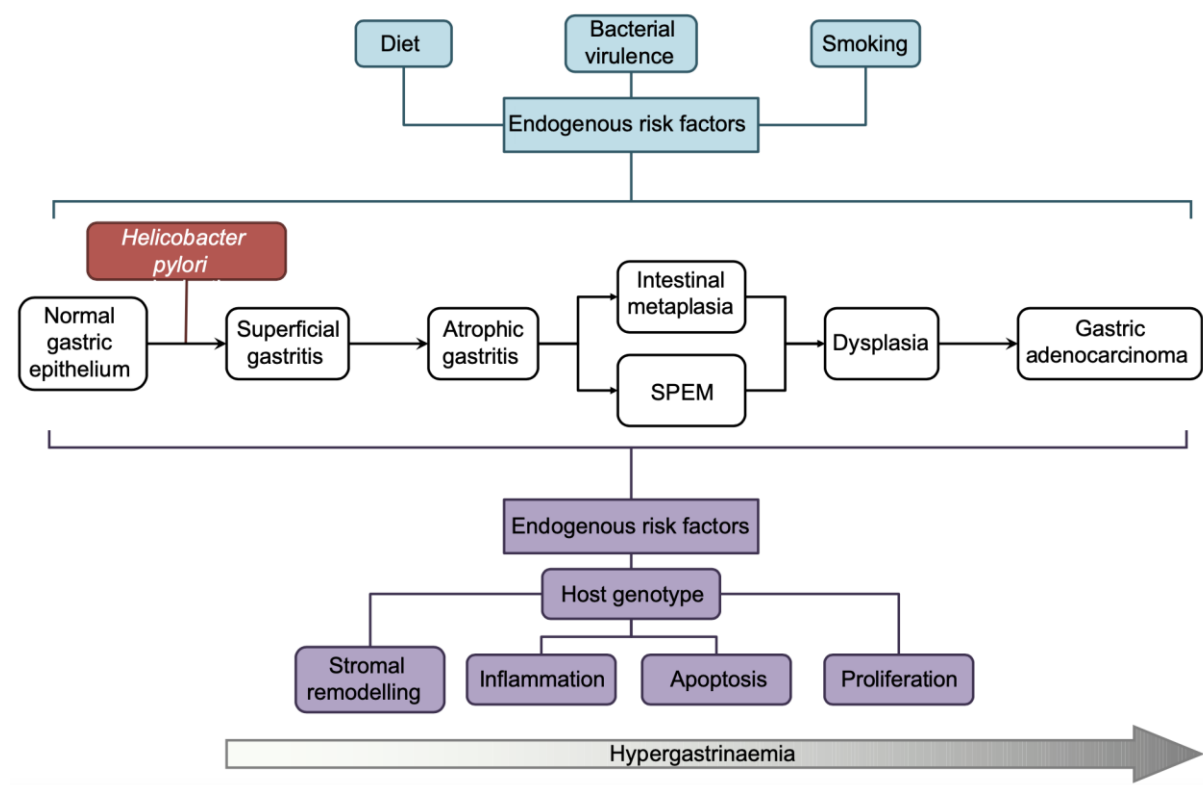
Ilustracija 1 *Helicobacter pylori*²

Faktori rizika povezani sa rakom želuca (ilustracija 2) spadaju u dvije glavne grupe. Prvi se sastoji od potencijalno promjenjivih egzogenih faktora rizika, kao što su unos soli u ishrani i nitrozamina, faktori virulencije *H. pylori*, ne-*Helicobacter* želučana mikrobiota i pušački status. Drugu grupu čine nepromjenjivi genetski ili intrinzični faktori rizika domaćina. Među ovim genetskim faktorima su polimorfizmi na lokusima koji kodiraju citokine i njihove receptore,

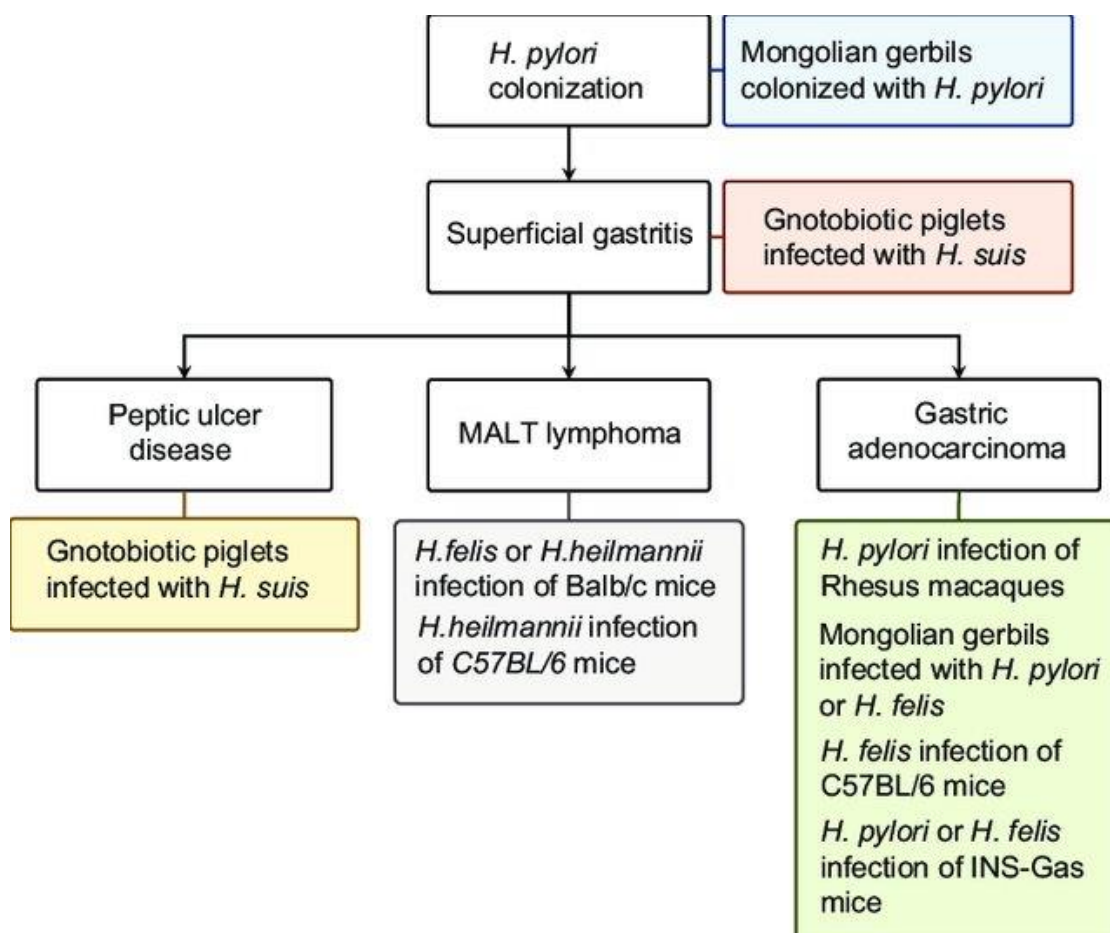
² <https://neuromid.com/association-of-helicobacter-pylori-with-multiple-sclerosis-protective-or-risk-factor/>

stromalni remodelirajući proteini, kao što su matriks metaloproteinaze i antigen matičnih stanica prostate (PSCA), koji u kontekstu želučane patologije, djeluje kao tumor supresorski gen (12).

Razvoj karcinoma želuca odvija se stereotipnim patološkim putem (Ilustracija 2 i 3), koji je prvi put predložen mnogo prije identifikacije *H. pylori*. Tokom nekoliko decenija, neke osobe s hroničnim površinskim gastritisom razvijaju želučanu atrofiju, koju karakterizira mršavi gubitak parijetalnih stanica u sluznici želučanog korpusa. Ovo smanjuje lučenje želučane kiseline, što dovodi do većeg intraluminalnog pH, smanjenog lučenja somatostatina i posljedičnog lučenja gastrina. Osim što stimulira lučenje kiseline iz parijetalnih stanica, gastrin također pojačava proliferaciju u zoni matičnih stanica epitela želuca što dovodi do povećanja prometa epitelnih stanica (12).



Ilustracija 2 *H. pylori* infekcija i progresija u karcinom želuca. Shema koja pokazuje patološku progresiju preneoplazije želuca izazvane *H. pylori* i naglašava endogene faktore rizika za progresiju ka karcinomu želuca. SPEM, metaplazija koja eksprimira spazmolitički polipeptid (12)

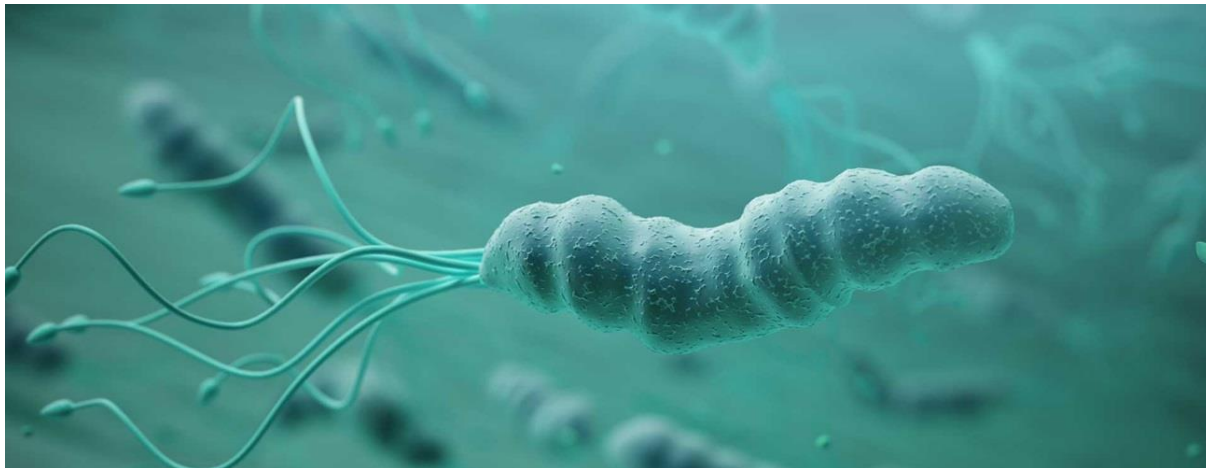


Ilustracija 3 Modeliranje patoloških ishoda infekcije *Helicobacter*. Šematski prikaz glavnih patoloških ishoda infekcije *Helicobacter* kod ljudi, označen detaljima o najbolje okarakteriziranim modelima in vivo za ova stanja (12)

H. pylori obično izaziva asimptomatsku infekciju, ponekad može uzrokovati gastritis (upalu želuca) odnosno čireve na početku duodenuma. Ovu infekciju možemo također povezati i s razvojem određenih karcinoma. Oni se javljaju kod manje od 20 % slučajeva. Neka ispitivanja su pokazala da bakterija *H. pylori* uzrokuje i širi spektar drugih oboljenja (npr. anemija nedostatka željeza, multipla skleroza, idiopatska trombocitopenična purpura, ateroskleroza, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, psorijaza, nekoliko autoimunih bolesti kože, bolest koronarnih arterija, parodontoza, Guillain-Barréov sindrom, rozacea, hronična urtikarija, opadanje kose na pojedinim mjestima, dijabetes melitus, Henoch–Schönleinova purpura, nizak nivo vitamina B12 u krvi, blefaritis, autoimuna neutropenija, glaukom otvorenog ugla, antifosfolipidni sindrom, diskrazija plazminih ćelija, reaktivni artritis, centralna serozna retinopatija, metabolički sindrom, ne-alkoholni steatohepatitis, različiti tipovi alergija, hepatička fibroza, ne-alkoholna bolest masne jetre te karcinom jetre (6).

Smatra se da bakterijska infekcija ima zaštitne efekte nosioca zaraze protiv infekcija od ostalih patogena, astme, gojaznosti, celijakije, upalne bolesti crijeva, rinitisa, atopijskog dermatitisa, gastroezofagealne refluksne bolesti, i raka jednjaka. Ipak, ova istraživanja štetnih i zaštitnih efekata su se često zasnivala na korelaciji umjesto na direktnoj vezi i često su bila u suprotnosti s drugim istraživanjima koja pokazuju suprotan ili nikakav učinak na navedenu bolest, tako da je dosta ovih tvrdnji ostalo kontroverzno (5).

H. pylori po nekim istraživanjima igra važnu ulogu u prirodnoj abdominalnoj ekologiji. Jedan od primjera, uticajem tipa bakterija koje koloniziraju probavni sistem. Ostala istraživanja ukazuju da ne-patogeni sojevi *H. pylori* mogu korisno normalizirati lučenje želučane kiseline i regulisati apetit.



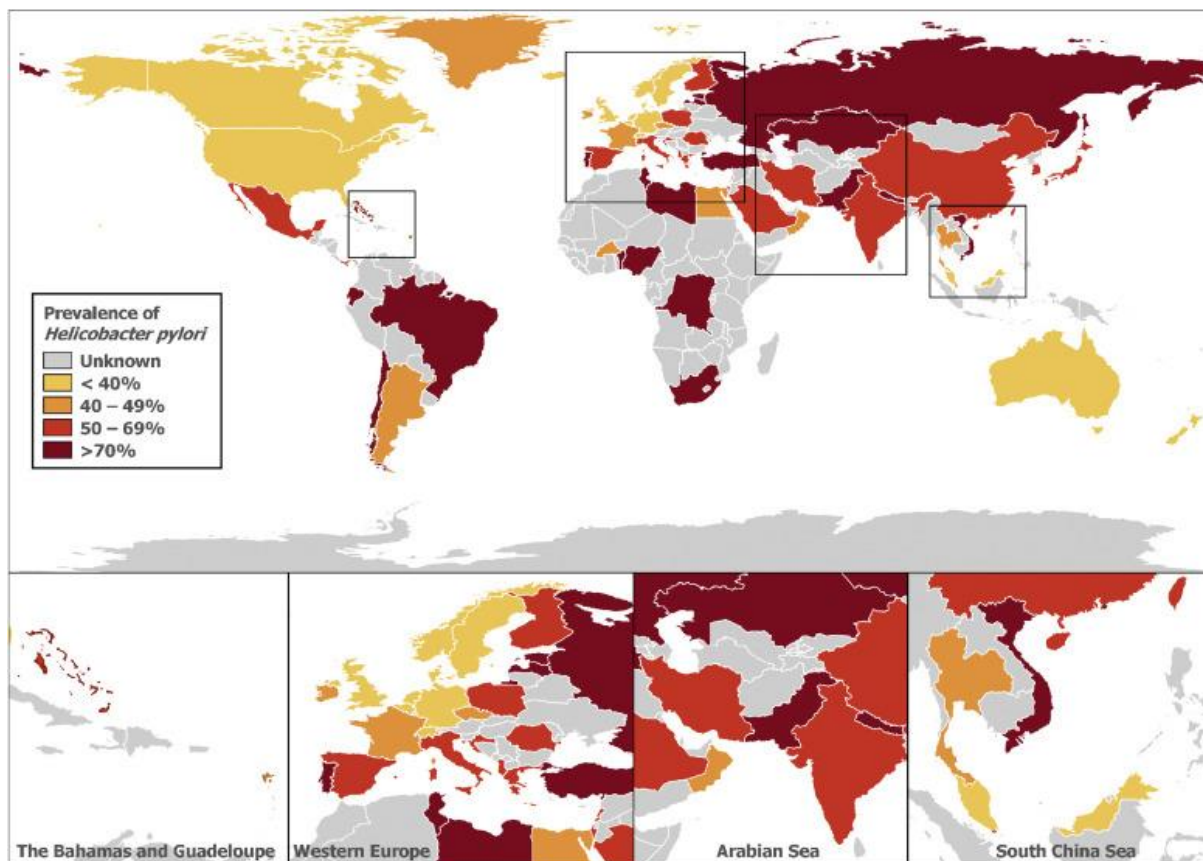
Ilustracija 4 *Helicobacter pylori*³

Procjene iz 2015. godine pokazuju da je infekciju (ili kolonizaciju) bakterijom *H. pylori* imalo više od pola svjetske populacije, posebno u zemljama u razvoju. Posljednjih decenija, u dosta zemalja svijeta smanjuje se rasprostranjenost *H. pylori* u digestivnom sistemu (7).

James K.Y. Hooi i sar. opisuju podatke u 2017. godini koji se odnose na 2015. godinu (11) i navode da se epidemiologija infekcije *Helicobacter pylori* promijenila sa poboljšanjima sanitarnih uslova i metodama eradikacije. Izvršili su sistematski pregled i meta-analizu kako bi procijenili promjene u globalnoj prevalenciji infekcije *H. pylori*. Izvršili su sistematsku pretragu baza podataka MEDLINE i EMBASE za studije prevalencije infekcije *H. pylori* objavljene od 1. januara 1970. do 1. januara 2016. Analizirali su podatke na osnovu geoshemskih regiona Ujedinjenih nacija i pojedinačnih zemalja. Koristili su model slučajnih efekata da izračunaju objedinjene procjene prevalencije sa 95% intervala povjerenja (CI), ponderisane veličinom studije. Ekstrapolirali su procjene prevalencije iz 2015. kako bi dobili procijenjeni broj osoba s infekcijom *H. pylori*. Među 14.006 pregledanih izvještaja, identifikovali su 263 članka u punom tekstu o prevalenciji infekcije *H. pylori*; U konačnu analizu uključeno je 184, uključujući podatke iz 62 zemlje. Afrika je imala najveću skupnu prevalenciju infekcije *H. pylori* (70,1%; 95% CI, 62,6-77,7), dok je Okeanija imala najnižu prevalenciju (24,4%; 95% CI, 18,5-30,4). Među pojedinačnim zemljama, prevalenca infekcije *H. pylori* varirala je od samo 18,9% u Švajcarskoj (95% CI, 13,1-24,7) do 87,7% u Nigeriji (95% CI, 83,1-92,2). Na osnovu regionalnih procjena prevalencije, bilo je oko 4,4 milijarde osoba s infekcijom *H. pylori* širom svijeta u 2015.

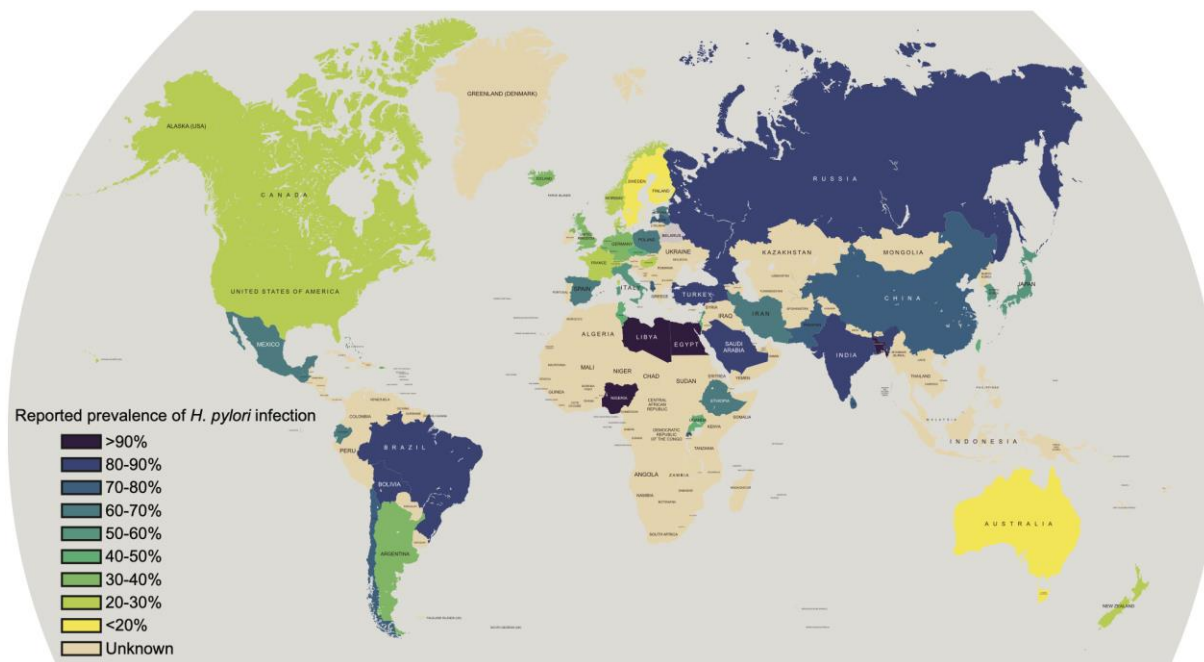
Na kraju zaključuju da u sistematskom pregledu i meta-analizi za procjenu prevalencije infekcije *H. pylori* u svijetu, uočena je velika količina varijacija među regijama – više od polovine svjetske populacije je zaraženo. Ovi podaci se mogu koristiti u razvoju prilagođenih strategija za globalno iskorjenjivanje (11) što se može vidjeti na mapi 1.

³ <https://gastroenterologija.com/h-pylori-prehrana/>



Ilustracija 5 Globalna prevalencija (HP choropleth map). Određene regije su uvećane kako bi se bolje prikazale manje zemlje. Interaktivna globalna mapa na mreži koja prikazuje HP-ovu rasprostranjenost može se naći na sljedećem URL: <https://people.ucalgary.ca/~ggkaplan/HP2016.html>.

Slično istraživanje su proveli i podatke dobili i Michael D. Burkitt i sar. (12) što se može vidjeti na ilustraciji 6.



Ilustracija 6 Prevalencija infekcije Helicobacter pylori širom svijeta. Mapa pokazuje prevalenciju infekcije H. pylori u različitim dijelovima svijeta. Posebno je visoka prevalencija u subsaharskoj Africi, Latinskoj Americi i na Bliskom istoku. Australazija, Švicarska i općenito Sjeverna Amerika i Zapadna Evropa imaju najmanju incidencu infekcije H. pylori. Podaci izvedeni iz Asfeldt et al., 2008; Ben Mansour et al., 2016; Laszewicz et al., 2014; Lizza et al., 2014; McDonald et al., 2015; Peleteiro et al., 2014; Saltanova, 2001; Sanchez Ceballos et al., 2007; van Blankenstein et al., 2013..

3.2. Morfologija

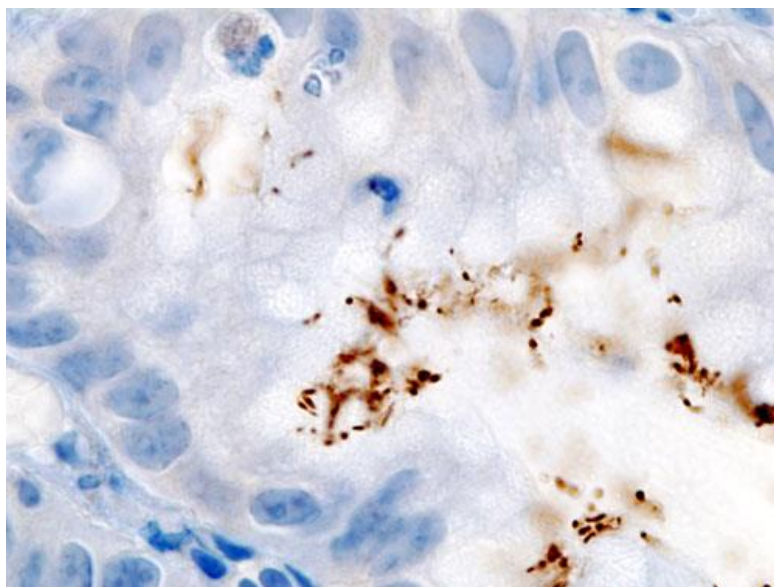
Helicobacter pylori je mali spiralno zavijeni Gram-negativni bacil. Pokretan je pomoću 4-6 flagela koje se nalaze na jednom polu. Može biti u obliku zareza, ili kraćih ili dužih spirala. U mikroskopskom razmazu izgleda kao »krila galeba» ili u obliku slova S.

3.3. Patogenost

Infekcija nastaje peroralnim putem. *Helicobacter pylori* prolazi kroz sloj sluzi, potom se veže na epitelne želučane ćelije za koje posjeduje specifične adhezine. Sloj želučane sluzi štiti je od kiseline prisutne u želucu (pH vrijednost u lumenu želuca iznosi 1-2, a uz epitel je oko 7,4). Ova bakterija luči enzim ureazu koja lokalno snižava pH od 2 do 6-7. Pretpostavlja se da kad jednom kolonizira sluznicu, tu ostaje dugo, možda i doživotno. Infekcija može proći asimptomatski ili se može razviti klinička slika akutnog gastritisa (bol u epigastriju, mučnina, povraćanje). Akutni gastritis može preći u hronični gastritis. Tako upalno promijenjena sluznica je povoljno mjesto za razvoj peptičkog ulkusa u želucu ili u duodenumu. *Helicobacter pylori* se dovodi u vezu i sa adenokarcinomom i sa MALT limfomom (4).

3.4. Kulturelne osobine

Helicobacter pylori je mikroaerofilna bakterija. Za rast joj treba 5-6% kisika, povišena koncentracija CO₂ (7-12%), te povećana vlažnost. Za izolaciju iz kliničkih uzoraka koristi se *Campylobacter* selektivna podloga. Male kolonije porastu za 3-7 dana pri temperaturi od 35-37°C. Na krutoj podlozi raste sporo; tek nakon 3-7 dana inkubacije porastu sitne, bezbojne, glatke, jajne kolonije 1-2 mm u promjeru. (Slika 2)



Slika 2. Imunohistohemijsko bojenje *H. pylori* (smeđe) iz biopsije želuca ⁴

3.5. Identifikacija

Identificira se pomoću biohemijskih reakcija. *Helicobacter pylori* je: katalaza-pozitivan, oksidaza-pozitivan, snažno ureaza-pozitivan. Razvijene su molekularne metode detekcije *H. pylori* iz različitih materijala (biopsijskog uzorka, stolice). Dokazivanje infekcije sa *H. pylori* vrši se iz biopsijskog uzorka želučane sluznice ili se dokazuje DNA bakterije u stolici.(4)

Indirektno se infekcija može dokazati manje invazivnim metodama:

- U serumu pacijenta mogu se dokazati antitijela koja nastaju tokom infekcije, ostaju dugotrajno pozitivna, a titar im se znatno smanjuje nakon terapije. Za dokazivanje antitijela koristi se enzimski imuno test ELISA (pri tome kao antigen služi ili cijela bakterija ili ekstrakt pojedinih dijelova bakterije ili enzim ureaza).
- Zbog snažne aktivnosti ureaze, urea data peroralno pacijentu koji ima *H. pylori* brzo se razgrađuje, te tako nastali CO₂ može se dokazati u izdahnutom zraku. Ova metoda koristi se vrlo rijetko.

⁴ https://bs.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori

3.6. Epidemiologija

Ovom bakterijom zaraženo je najmanje pola svjetske populacije, pa je to čini najrasprostranjenijom infekcijom u svijetu. Stopa zaraze trenutno varira zavisnosti od lokacije; puno veću stopu zaraze imaju zemlje u razvoju u odnosu na Zapad (Zapadna Evropa, Sjeverna Amerika, Australija), gdje su procijenjene stope oko 25%.(4)

Na patološki ishod infekcije utiče dob pri kojoj neko dobije ovu bakteriju utiče. Osobe zaražene u ranoj dobi imaju veće šanse razviti jače upale koje mogu biti praćene atrofičnim gastritisom sa većim naknadnim rizikom od želučanog čira, želučanog raka, ili oboje. Infekcije kod osoba starije dobi dovodi do različitih želučanih promjena koje veoma često dovode do dvanaestopalačnog (duodenalnog) čira. Tokom ranog djetinjstva infekcije se stiču u svim državama. U zemljama u razvoju stopa zaraze ipak je veća nego u industrijaliziranim nacijama. Uzrok je vjerovatno lošiji sanitarni uslovi, uz slabiju primjenu antibiotika za nevezane patologije. U razvijenim zemljama, trenutno je rijetko moguće pronaći zaraženo dijete, dok procenat zaraženih osoba povećava se sa godinama, sa oko 50% zaraženih osoba dobi preko 60 godina u odnosu na 10% kod osoba između 18 i 30 godina. Veća prevalencija kod starijih odražava veće stope infekcije u prošlosti kada su te osobe bile djeca prije nego se desila infekcija u kasnijoj dobi tih osoba. Primjerice u SADu, kod afroameričkog i hispanoameričkog stanovništva rasprostranjenost zaraze je veća, najviše zbog socioekonomskih faktora. Viši nivo higijenskih standarda kao i raširena upotreba antibiotika uglavnom dovela je do niže stope infekcije na Zapadu. Iako se opća učestalost infekcije *H. pylori* smanjuje u svim dijelovima svijeta, javlja se pojava otpornosti na antibiotike za *H. pylori*; pronađeno je više sojeva otpornih na metronidazol i klaritromicin u više dijelova svijeta (6).

3.7. Znakovi i simptomi

Simptome i komplikacija gotovo do 90% osoba sa infekcijom *H. pylori* nikad ne osjeti. Ali osobe koje su zaražene sa *H. pylori* posjeduju 10% do 20% rizika da razviju stomachne čireve za vrijeme života. Infekcija se javlja kao akutni gastritis sa bolom u stomaku ili sa mučninom. Ukoliko se razvije u hronični gastritis, kada su prisutni simptomi, često su jednaki onima od neulcerozne dispepsije: stomahni bolovi, mučnina, nadimanje, podrigivanje i ponekad povraćanje. Između obroka, ukoliko je želudac, u rano jutarnjim satima, bol se najčešće javlja. Bol se može javiti i u drugim dijelovima dana. Manje česti simptomi čira uključuju mučninu, povraćanje te gubitak apetita (4).

Izlučivanjem tamne stolice možemo zapaziti krvarenje u želucu. Ukoliko je prisutno produženo krvarenje, može doći do anemije. Ona uzrokuje slabost i umor. Hematemeza, hematohezijska ili melena se mogu dogoditi kod teškog krvarenja. Do duodenalnih čireva često dovodi upala pilorusa (koji spaja želudac i duodenum). Do čira želuca može dovesti upala sluznica želuca. Kolorektalni odnosno želučani polipi mogu izrasti kod osoba sa infekcijom *H. Pylori*. Oni predstavljaju nekancerozne izrasline ovih sluznica. Polipi su obično bez simptoma, a mogu biti uzrok žgaravice, krvarenja gornjih probavnih organa i rijetko opstrukcije želučanog izlaza. Kod kolorektalnih polipa može doći do rektalnog krvarenja, proljeva, anemije, gubitka težine, bolova u stomaku i sl.

Povećan rizik od razvoja karcinoma imaju osobe sa hroničnom infekcijom *H. Pylori*. Najčešći su želučani adenokarcinomi, zatim difuzni veliki B-ćelijski limfom želuca, još rjeđe, debelog crijeva, rektuma, jednjaka, ili očnih adneksa (npr. orbita, konjunktiva, i/ili očnih kapaka).

3.8. Tretman

3.8.1. Gastritis

Najčešća manifestacija infekcije bakterije *H. Pylori* je akutni ili hronični površinski gastritis. Simptomi i znakovi ovog gastritisa, kod dosta osoba nestaju spontano bez pribjegavanja protokolima za iskorjenjivanje *H. pylori*. Kod ovakvih slučajeva, infekcija *H. pylori* prisutna je i nakon remisije. Kako bi se iskorijenila bakterija različiti antibiotici se koriste, zajedno sa inhibitorom protonske pumpe. To obično dovodi do izlječenja. "Trojna terapija" sastoji se od klaritromicina, amoksicilina, te inhibitora protonske pumpe u trajanju 14–21 dan (2–3 sedmice). Obično se smatra tretmanom prve linije (6).

3.8.2. Peptični čirevi

Kod osobe sa peptičnim ulkusom, prilikom ustanovljenja postojanja *H. pylori*, iskorjenjivanje bakterije je standardna procedura, kako bi se omogućilo zaliječenje čira. Jednosedmična "trojna terapija" koja se sastoji od inhibitora protonske pumpe (IPP) poput omeprazola i antibiotika klaritromicina i amoksicilina je standardna terapija prve linije. (Dejstvo IPP-a protiv *H. pylori* može se označiti kao direktan bakteriostatski efekt zbog inhibicije bakterijske P-tip ATPaze i/ili ureaze.) Vremenom su se razvile varijante trojne terapije, poput različite vrste IPP-a, kao što je pantoprazol ili rabeprazol, kao i zamjena amoksicilina sa metronidazolom za osobe alergične na penicilin. Kod osoba sa povećanom otpornošću na klaritromicin druge opcije se preporučuju. Ovom terapijom je revolucioniziran tretman peptičnih čireva, te je omogućeno liječenje bolesti. Prethodno, jedina opcija bila je kontrola simptoma korištenjem antacida H₂-antagonista ili samog inhibitora protonske pumpe.

3.8.3. Ekstranodalni limfom B-ćelije rubne zone

Ekstranodalni limfomi B-ćelije rubne zone (poznati kao MALT limfomi) su generalno indolentni maligniteti. Preporučan tretman za *H. pylori*-pozitivne ekstranodalnog limfoma marginalne zone B-ćelija želuca, kada je lokaliziran (npr. Ann Arbor stage I i II), sastoji se od primjene režima kombinacije antibiotik-IPP koji obuhvataju režime iskorjenjivanja bakterije. Ako početni režim ne uspije iskorijeniti patogena, pacijenti se tretiraju alternativnim protokolima. Iskorjenjivanje patogena je uspješno u 70–95% slučajeva. Otprilike 50-80% pacijenata koji uspiju iskorijeniti patogena nakon 3–28 mjeseci razviju remisiju i dugotrajnu kliničku kontrolu njihovog limfoma. Radijacijska terapija za želudac i okolne (npr. perigastrične) limfne čvorove također se uspješno koristi za ovakve lokalizirane slučajeve. Pacijenti sa nelokaliziranim (npr. sistematski Ann Arbor faza III i IV) bolestima koje su bez simptoma pažljivo se promatraju, a ako su simptomatski, tretiraju se imunoterapijskim tabletama, rituximabom, (koji se uzima 4 sedmice) zajedno sa hemoterapijom, kloroambucilom, u trajanju od 6–12 mjeseci; 58% ovih pacijenata dostignu 58% stopu preživljavanja bez progresije bolesti za 5 godina. Pacijenti faze III/IV se uspješno liječe sa rituximabom ili samom hemoterapijom, kao što je ciklofosamid. Samo su se rijetki *H. pylori* pozitivni slučajevi ekstranodalnog limfoma marginalne zone B-ćelije debelog crijeva uspješno liječili režimom antibiotik-inhibitor protonske pumpe; trenutno preporučeni tretmani za ovu

bolest jesu operativna resekcija, endoskopska resekcija, radijacija, hemoterapija, ili, odnedavno, rituximab. U nekoliko prijavljenih H. pylori pozitivnih slučajeva ektranodalni limfom rubne zone B-ćelije jednjaka, lokalizirana bolest se uspješno tretira režimom antibiotik-IPP; ipak, uznapredovala bolest je manje responzivna na ove režime, ali djelimično je responzivna na rituximab (5).

Terapija sa antibioticima i inhibitorom protonske pumpe i lokaliziranom radijacijom se uspješno koriste za tretiranje H. pylori pozitivnog ektranodalnog limfoma rubne zone B-ćelije rektuma; mada je radijacijska terapija dala malo bolje rezultate te se tako preporučuje kao preferirani tretman za bolest. Tretman lokaliziranog H. pylori pozitivnog ektranodalnog limfoma rubne zone B-ćelije očnih adneksa sa režimom antibiotika i inhibitora protonske pumpe postigao je dvogodišnju i petogodišnju stopu preživljavanja bez greške od 67%, odnosno 55%, a petogodišnju stopu bez napredovanja bolesti od 61%. Ipak, generalno prepoznat izabrani tretman za pacijente sa sistemskim uključivanjem koristi razne hemoterapijske medikamente često u kombinaciji sa rituximabom (5).

3.8.4. Difuzni veliki B-ćelijski limfom

Daleko agresivniji karcinom je difuzni veliki B-ćelijski limfom u odnosu na ektranodularni limfom marginalne zone B-ćelija. Uzroci ovog maligniteta koji su H. pylori pozitivni mogu se izvesti iz drugog navedenog limfoma i manje su agresivni kao i podložniji liječenju u odnosu na H. pylori negativne slučajeve (6).

Neka od novih istraživanja sugeriraju da u ranoj fazi, lokalizirani, H. pylori pozitivni difuzni veliki limfom B-ćelija, ukoliko je na želudac ograničen, može uspješno tretirati antibiotik-IPP režimom. Također, studijama se nalaže dodatno praćenje pacijenata koji se tretiraju jednim od tretmana za iskorjenjivanje HPY, s obzirom na agresivnost difuznog velikog B-ćelijskog limfoma. Ukoliko dođe do kliničkog pogoršanja na ovom režimu ili se pronade neresponzivnost, ovim pacijenti se prebacuju na konvencionalnije terapije kao što je hemoterapija (npr. CHOP ili tretman sličan CHOP-u), imunoterapija (npr. rituximab), operativni zahvat, i/ili lokalna radioterapija. Kombinacijom jednog ili više navedenih metoda se uspješno tretiraju HPY pozitivni difuzni veliki B-ćelijski limfomi.

3.8.5. Adenokarcinom želuca

Sa većinom slučajeva adenokarcinoma želuca povezana je H. pylori, posebno sa onima koji se nalaze van želučane kardije (spoj želuca i duodenuma). Liječenje ove vrste karcinoma je jako agresivno čak i kod lokalizirane bolesti koja se naknadno tretira sa hemoterapijom i radijacijom prije operativne resekcije. Pošto je ovaj karcinom, jednom kada se razvije, nezavisan od zaraze s H. pylori, režim s antibioticima i inhibitorom protonske pumpe ne koristi se u ovom tretmanu.

3.9. Otpornost na antibiotike

Sve veći broj osoba zaraženih bakterijom H. Pylori je otporan na antibiotike. Otpornost dovodi nekoliko serija antibiotske terapije, zbog neuspjelog prvobitnog tretmana. U upotrebi je onda i četverostruka terapija. Kod četverostruke terapije dodaje se bizmutov koloid, kao što je bizmut-

subsalicilat. Kod sojeva otpornih na klaritromicin, preporuka je korištenje levofloksacina kao jednog dijela terapije (8).

Supresivni efekat na HPY vrši unos mliječne kiseline kod životinja i ljudi, te suplementi jogurtoma sa laktobacilima i bifidobakterijama povećali su stopu iskorjenjivanja H. pylori kod ljudi. Butirat proizvode simbiotske bakterije koje su obično prisutne u crijevima. Ponekad se koriste, kao dodatak antibiotskoj terapiji, probiotici koji također pomažu zaustavljanje infekcije HPY. Antimikrobe koji vrše destrukciju ćelijskog zida H. Pylori sadrži buterna kiselina. Ona uništava zid induciranjem izražaja regulatorne T-ćelije (posebno, FOXP3) i sintezom antimikrobnih peptida koji se zovu LL-37, koji nastaju njenim djelovanjem inhibitora histonske deacetilaze (7).

Sulforafan, tvar koja se pojavljuje u brokulama i karfiolu, predložena je kao tretman. Kao dodatni tretman predlaže se i parodontalna terapija skaliranja i planiranja korijena.

3.10. Prognoza

Infekcijom bakterija H. pylori nastanjuje želudac, pa dovodi do hroničnog gastritisa, tj. dugotrajnog zapaljenja želuca. Bakterija može opstati kod većine osoba u trbuhu decenijama. Kliničke simptome ne osjeti velika većina zaraženih osoba, iako imaju hronični gastritis. Vremenom do želučani i duodenalni čirevi se razviju kod oko 10–20% osoba koje imaju H. pylori. Ova infekcija povezana je i sa rakom želuca, sa 1–2% rizika tokom života, te manje od 1% rizika od želučanog MALT limfoma.

Smatra se da kod neliječene infekcije sa H. Pylori, bakterija ostaje čitav život jednom kad se uspostavi u želucu. Kod starijih, ipak, infekcija može nestati jer želučana sluznica postaje uveliko atrofična i negostoljubiva za kolonizaciju. Nije poznat odnos akutnih infekcija koje opstaju, ali neka istraživanja koja su pratila prirodnu historiju kod stanovništva, prijavilo je očiglednu spontanu eliminaciju (8).

Sve je veći broj dokaza koji utvrđuju kako HPY može imati ulogu u zaštiti od nekih bolesti. Smanjenjem prisustva HPY u populaciji, dramatično je porasla učestalost refluksne kiseline, Barrettovog ezofagusa i raka jednjaka. 1996 godine, Martin J. Blaser je iznio tvrdnju kako H. pylori ima koristan efekat regulisanjem kiselosti sadržaja želuca. Ova hipoteza nije univerzalno prihvaćena jer nasumična kontrolirana ispitivanja nisu uspjela pokazati pogoršanje simptoma bolesti refluksne kiseline prateći iskorjenjivanje H. pylori. Ali Blaser je potvrdio svoj stav kako je HPY član normalne flore želuca. Pretpostavio je da su promjene u fiziologiji želuca uzrokovane gubitkom H. pylori doprinijele porastu javljanja nekoliko bolesti, poput dijabetesa tipa 2, pretilosti i astme. Također, ova grupa nedavno je ukazala kako kolonizacija HPY bakterije povezana s nižom učestalošću dječje astme (6).

3.11. Historija

Oko 60.000 godina prije, H. pylori je migrirala iz Afrike zajedno sa njenim domaćinom (ljudski nosioc). Istraživanja pokazuju da genetička raznolikost kod H. pylori, u odnosu na one kod domaćina, smanjuju sa fizičkom udaljenošću od istočne Afrike. Korištenjem podataka genetičke raznolikosti, istraživači su napravili simulacije koje pokazuju da se bakterija raširila iz istočne Afrike prije oko 58.000 godina. Ovi rezultati pokazali su kako savremeni čovjek bio

zaražen sa HPY prije migracije iz Afrike, te da je bakterija ostala povezana sa ljudskim nosiocima iz tog vremena (9).

Barry Marshall i Robin Warren, doktori iz Perth (Zapadna Australija) su 1982. godine otkrili *Helicobacter pylori* prvi put u stomaku pacijenata sa gastritisom i čirevima. Konvencionalno razmišljanje tog vremena bilo je kako bakterija može živjeti u kiseljoj okolini ljudskog želuca. 2005. godine ova dva naučnika su dobili Nobelovu nagradu za fiziologiju ili medicinu (8).

Prije istraživanja Marshalla i Warrena, njemački naučnici našli su bakteriju spiralnog oblika u sluznici ljudskog želuca 1875. godine, ali nisu bili u mogućnosti uzgojiti je, te su rezultati na kraju zaboravljeni. Italijanski istraživač Giulio Bizzozero opisao je bakterije sličnog oblika koje žive u kiseljoj okolini želuca kod pasa 1893. godine. Profesor Walery Jaworski sa Jagelonskog univerziteta u Krakóvu ispitivao je sedimente želuca koji su uzeti ispiranjem želuca kod ljudi 1899. godine. Među nekim štapičastim bakterijama, on je također našao bakteriju sa karakterističnim spiralnim oblikom, koje je zvao *Vibrio rugula*. On je bio prvi koji je sugerisao na moguću ulogu ovog organizma u patogenezi želučanih bolesti. Njegov rad je uvršten u knjizi *Handbook of Gastric Diseases*, ali je imao mali uticaj, jer je bio napisan na poljskom jeziku. Nekoliko manjih studija izvršenih u ranom 20. vijeku pokazalo je prisustvo zakrivljenih štapića u želucu kod više osoba sa čireom ili rakom na želucu. Interes za bakterijom je opadao, jer američka studija objavljena 1954. godine nije uspjela vidjeti bakteriju kod 1180 slučajeva želučane biopsije (5).

1970ih je nastavljen interes za razumijevanjem uloge bakterije kod trbušnih bolesti, sa vizualizacijom bakterija u želucu kod osoba sa stomaknim čirevima. 1979. godine Robin Warren je posmatrao bakteriju, dok je 1981. godine dalje istražio sa Barryjem Marshallom. 1982. godine su uspjeli vizuelizirati kolonije, kada su nenamjerno ostavili Petrijeve zdjelice na inkubaciji pet dana tokom uskršnjeg vikenda. U njihovim originalnim dokumentima, Warren i Marshall su tvrdili da stomačne čireve i gastritis uzrokuje bakterijska infekcija, a ne stres ili začinjena hrana, kako se ranije pretpostavljalo.

Skepticizam je bio prvobitno izražen, dok je kroz nekoliko godina kasnije više istraživačkih grupa je verificiralo povezanost HPY sa gastritisom i čirom (u manjem omjeru). Marshall je popio čašu sa kulturom *Helicobacter pylori*, kako bi dokazao da ova bakterija uzrokuje gastritis, a da nije slučajni prolaznik. Kroz nekoliko dana je obolio sa mučninom i povraćanjem. Nakon 10 dana inokulacije, endoskopijom su dokazani znakovi gastritisa i prisustvo *H. pylori*. Ovi rezultati su potvrdili kako je *H. pylori* uzročnik. Ovi naučnici pokazivali su kako antibiotska terapija ima učinka u liječenju više slučajeva gastritisa. Prvu trojnu terapiju je izumio Thomas Borody (gastroenterolog iz Sidneja) 1987. godine za liječenje duodenalnih čireva. 1994. godine, Nacionalni instituti za zdravlje navode da su najčešći čirevi duodenuma i želuca bili uzrokovani infekcijom *H. pylori*, te su savetovali uključivanje antibiotske terapije za tretman (9).

Prvobitno bakterija je nazivana *Campylobacter pyloridis*, a kasnije preimenovana u *C. pylori* 1987. godine (*pylori* je genitiv od *pylorus*, kružni otvor koji vodi želudac u duodenum, od starogrčke riječi *πυλώρας* (*pilorus*), što znači vratar.). Kada su 16S ribosomska RNK, sekvenciranje gena i ostala istraživanja pokazala 1989. godine da bakterija ne pripada rodu *Campylobacter*, bakterija je prebačena u svoj rod, *Helicobacter*, od starogrčke riječi *ἑλίκης* (*heliks*) što znači "spirala" ili "kalem" (4).

Grupa stručnjaka u Kopenhagenu se oktobra 1987 sastala kako bi osnovala Evropsku *Helicobacter* studijsku grupu (EHSG), međunarodne multidisciplinarne istraživačke grupe i

jedine institucije fokusirane na HPY. Ova organizacija je uključena u Godišnju međunarodnu radionicu za *Helicobacter* te slične bakterije, Izvještaje iz Maastrichtskog konsenzusa (Evropski konsenzus za upravljanje *H. pylori*), i ostale obrazovne i istraživačke grupe, uključujući dva međunarodna dugoročna projekta:

- Hp-EuReg - Evropski registar za upravljanje sa HPY – baza podataka koja sistematski registrira rutinske kliničke prakse evropskih gastroenterologa.

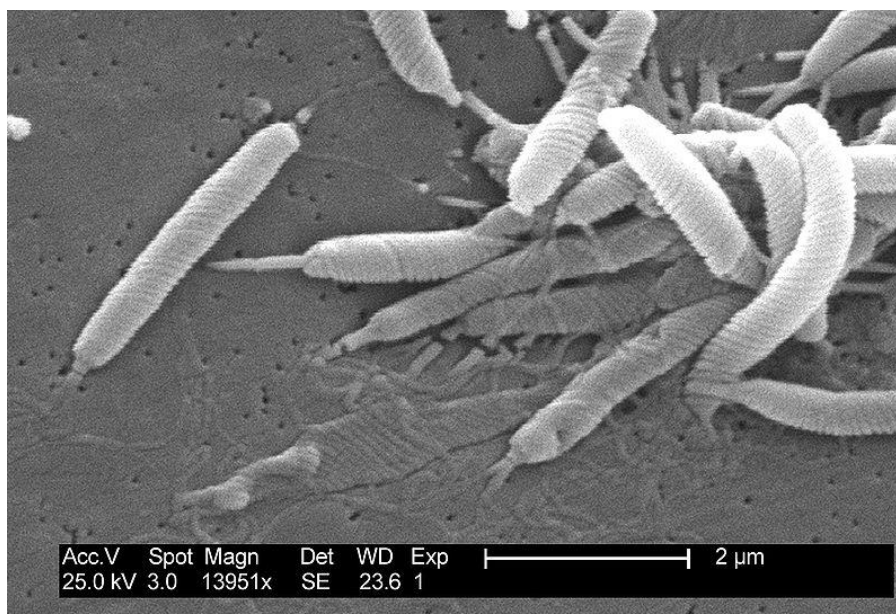
OptiCare - Optimalno upravljanje s HPY u primarnoj njezi – dugoročni obrazovni projekt koji cilja na širenje preporuka iz Maastrichta zasnovanim na dokazima IV konsenzusa za ljekare primarne njege u Evropi, koji finansira grant za obrazovanje iz United European Gastroenterology.

3.12. Adaptacija na želudac

H. pylori uz pomoć svojih bičeva zakopava u sluznicu želuca kako bi dosegla epitelne ćelije ispod (u područje manje kiselosti), kako bi izbjegla kiselu sredinu lumena želuca. Ova bakterija osjeti pH vrijednost sluznice, te se pomjera prema manje kiselom dijelu (hemotaksija). Ovim održava bakteriju da ne bude gurnuta unutar lumena sa bakterijskom sluznom sredinom, koja se neprekidno pomjera od mjesta nastanka na epitelu do razlaganja na sučelju lumena.

Na unutrašnjoj površini epitela sluznice se nalazi *H. pylori*, a ponekad unutar samih ćelija epitela. Na epitelne ćelije prijanja proizvodeći adhezive. Adhezivi se vežu na lipide i ugljikohidrate u epitelnoj ćelijskoj membrani. BabA, je jedan od ovakvih adheziva koji se veže na Lewis b antigen. Ovaj antigen se nalazi na površini ćelija želučanog epitela. Prijanjanje *H. pylori* preko BabA zavisi od kiselosti i može se potpuno reverzirati smanjenjem pH. Predloženo je da BabA reakcija na kiselinu omogućava prijanjanje dok istovremeno dopušta efektivan bijeg iz nepovoljne okoline na pH vrijednost koja je štetna za organizam. Drugi takav adheziv, SabA, veže se na povećane nivoe sialyl-Lewis x antigena koji je izražen na sluznici želuca.(10)

Korištenjem hemotaksije kako bi izbjegla područje niskog pH, bakterija također neutralizira kiselinu u svojoj okolini proizvodeći velike količine ureaze. Ureaza razlaže prisutnu ureu u želucu na CO₂ i amonijak. Reagujući sa jakim kiselinama u okolini proizvode neutralnu okolinu oko *H. pylori*. Nokautni mutanti ureaze nisu sposobni za kolonizaciju. Izraz ureaze nije samo neophodan za uspostavljanje prvobitne kolonizacije nego i za održavanje hronične infekcije.



Slika 3. *Helicobacter pylori* pod elektronskim mikroskopom⁵

3.13. Prevencija

Postoji jasna potreba za novim terapijskim strategijama radi prevencije ili uklanjanja bakterije, zbog uloge *H. pylori* kao velikog uzročnika određenih bolesti (posebno karcinoma) i njene povećane otpornosti na antibiotike. Na razvoj održive vakcine je uloženo puno rada s ciljem omogućivanja alternativne strategije za kontrolu infekcije *H. pylori* kao i ostalih popratnih bolesti. Naučnici istražuju različite pomoćnike (katalizatore), antigene i rute imunizacije kako bi se utvrdio najprikladniji sistem imunološke zaštite. Tek nedavno većina istraživanja je prešla sa testiranja životinja na testiranje ljudi. Potencijalna vakcina za HPY kod beba, ekonomskom evaluacijom utvrdila je da bi bila isplativo rješenje za prevenciju peptičnih čireva i trbušnih adenokarcinoma (barem u Holandiji). Također i u SADu je proučavan sličan pristup. Ali do kraja 2019 nije bilo kandidata vakcina toliko naprednih, pa je vakcina tek u prvoj fazi ispitivanja. Također kao trenutni prioritet velikih farmaceutskih kompanija nije bio razvoj ove vakcine (4).

Dosta istraživanja pokušalo je spriječiti razvoj bolesti povezanih sa bakterijom HPY, iskorjenjivanjem bakterije u ranim fazama zaraze, korištenjem antibiotskih sredstava. Istraživanja također pokazuju da ovi tretmani ukoliko efikasno uklone HPY iz želuca, smanje i upalu i druge histopatološke abnormalnosti povezane sa ovom zarazom. Ipak istraživanja pokazuju nemogućnost tretmana kod ozbiljnih histopatoloških abnormalnosti infekcija s HPY, npr. atrofija želuca i metaplazija, od kojih su oboje prethodnici želučanom adenokarcinomu. Ovim istraživanjima potvrđena je nemogućnost prevencije želučanog adenokarcinoma korištenjem antibiotskih sredstava. Meta-analiza (npr. statistička analiza koja kombinira rezultate višestrukih nasumičnih kontroliranih ispitivanja) objavljena 2014. godine našla je da ovi tretmani nisu spriječili razvoj ovog adenokarcinoma. Novijim studijama potvrđeno je da iskorjenjivanje HPY infekcije umanjuje pojavu adenokarcinoma želuca povezanih s HPY kod osoba sa bilo kojim nivoima baznog rizika. Neophodne su dalje studije za razjašnjenje ovog problema. Svakako studije se slažu da antibioticima efektivno smanjujemo pojavu metahronog

⁵ https://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter#/media/File:Helicobacter_sp_01.jpg

želučanog karcinoma povezanog s HPY. (Metahroni karcinomi su karcinomi koji se ponovo pojavljuju 6 mjeseci ili kasnije nakon resekcije (operacije) početnog karcinoma.) Sugerise se da antibiotski režim može biti korišten nakon resekcije želučanog karcinoma uzrokovanog s HPY u cilju smanjenja metahrone ponovne pojave (10).

3.14. Materijal za bakteriološki pregled

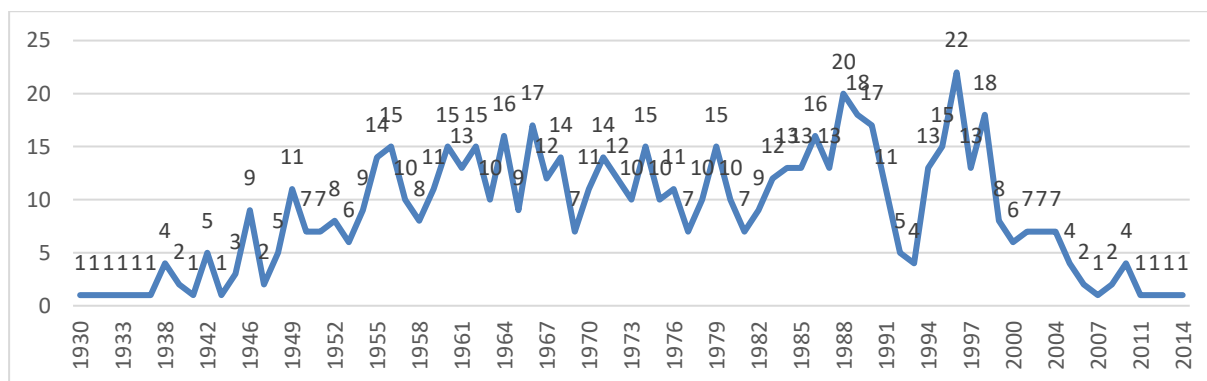
Za bakteriološki pregled uzima se bioptički uzorak želučane sluznice, a za dokazivanje antitijela serum pacijenta.

4. VLASTITI RAD

U privatnoj zdravstvenoj ustanovi „Poliklinika Medical Irac Tuzla“ provedena je analiza na urađenih 688 uzoraka na određivanje IgG u serumu, te 65 uzorka stolice na potvrđivanje prisustva antigena u stolici. Potrudili smo se ustanoviti učestalost prisustva infekcije *Helicobacter pylori* kod određenih grupa ljudi. Izvršili smo podjelu po spolu na muške i ženske, po godini rođenja, nivou IgG antitijela na *Helicobacter pylori* u serumu ispitanika, prisustvu/odsustvu antigena bakterija u stolici.

4.1. Prikaz obuhvaćenih ispitanika u našoj analizi

Na slici broj 4 predstavljenoj ispod prikazan je grafik koji prikazuje da smo u našoj analizi obuhvatili sve dobne skupine, kako mlađe osobe, tako i osobe srednje i starije dobi.

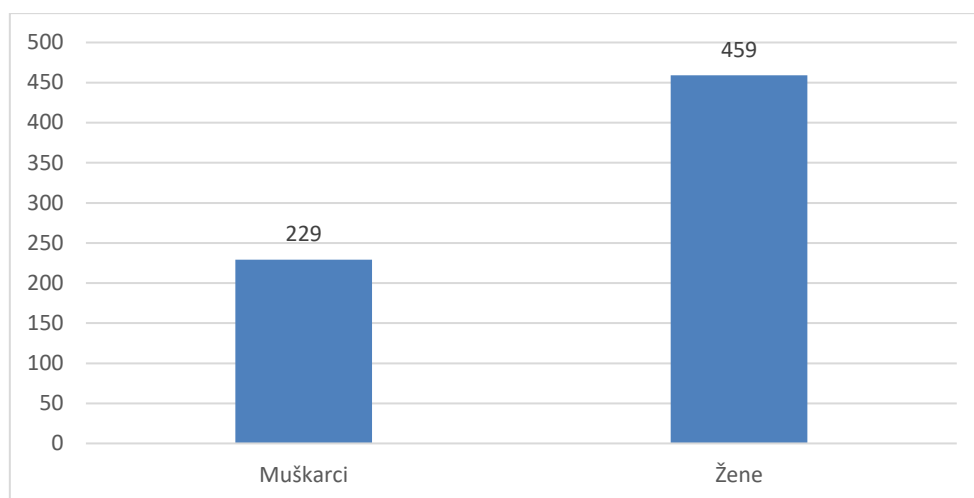


Slika 4. Prikaz pacijenata po godini rođenja

Na slici 4 prikazana je dobna skupina naših ispitanika. U analizi su učestvovala lica od 1930. godišta, pa sve do 2014. godišta. Broj pacijenata po godinama nije bio identičan, ali je bio dovoljno veliki za prikaz prisustva bakterije *Helicobacter pylori* u serumu ispitanih pacijenata. Najveći broj pacijenata je bio srednjih godina od 1960. – 1990. godišta. Malo manji broj je starijih osoba i lica mlađe životne dobi, ali je bio prisutan.

4.2. Analiza količine antitijela IgG na *Helicobacter pylori* u serumu

U periodu od 3.1.2019. do 25.8.2022. godine, u privatnoj zdravstvenoj ustanovi Poliklinika „Medical Irac“, testirano je 688 uzoraka na prisustvo bakterije *Helicobacter pylori*. Od toga je bio znatno veći broj osoba ženskog spola. Na grafiku ispod je prikazan odnos analiziranih pacijenata po spolu.



Slika 5. Grafički prikaz ispitanih uzoraka po spolu pacijenta

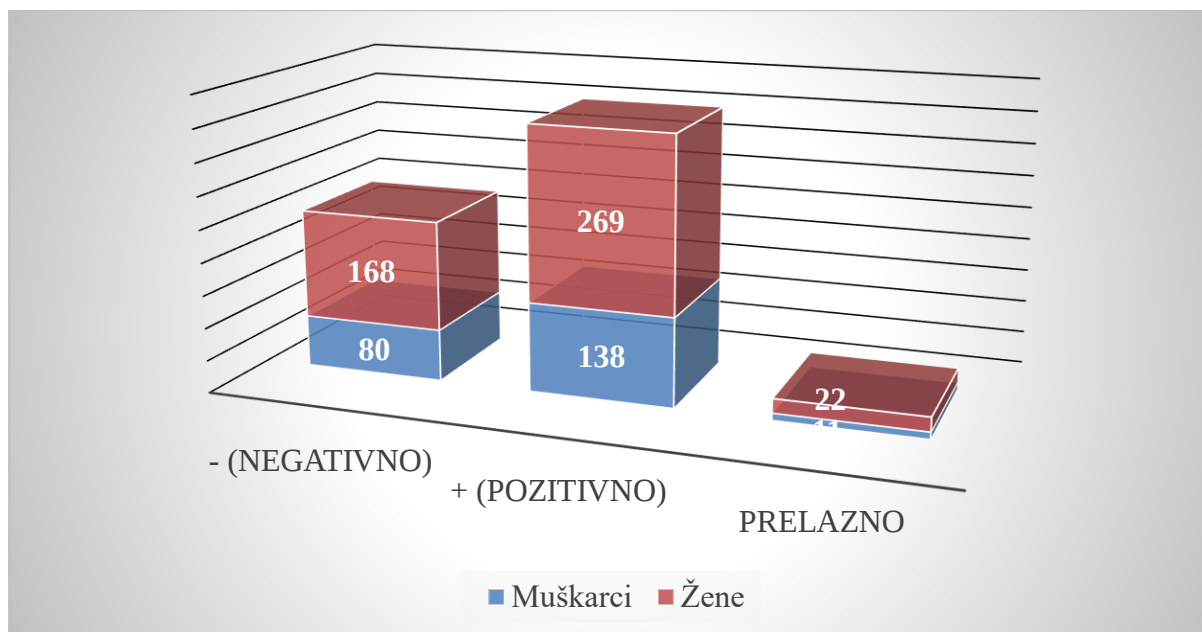
Na slici 5 je prikazan odnos analiziranih osoba. Ovdje možemo primijetiti znatno veći broj lica ženskog spola. U analizi je učestvovalo 459 žena i 229 muškaraca. U tabeli 1 je prikazan odnos analiziranih uzoraka po spolu i prisustvu ili odsustvu IgG antitijela.

Tabela 1 Tabelarni prikaz ispitanih uzoraka po spolu pacijenta

	Muškarci	Žene	Ukupno
- (negativno)	80	168	248
+ (pozitivno)	138	269	407
Prelazno	11	22	33
Ukupni zbir	229	459	688

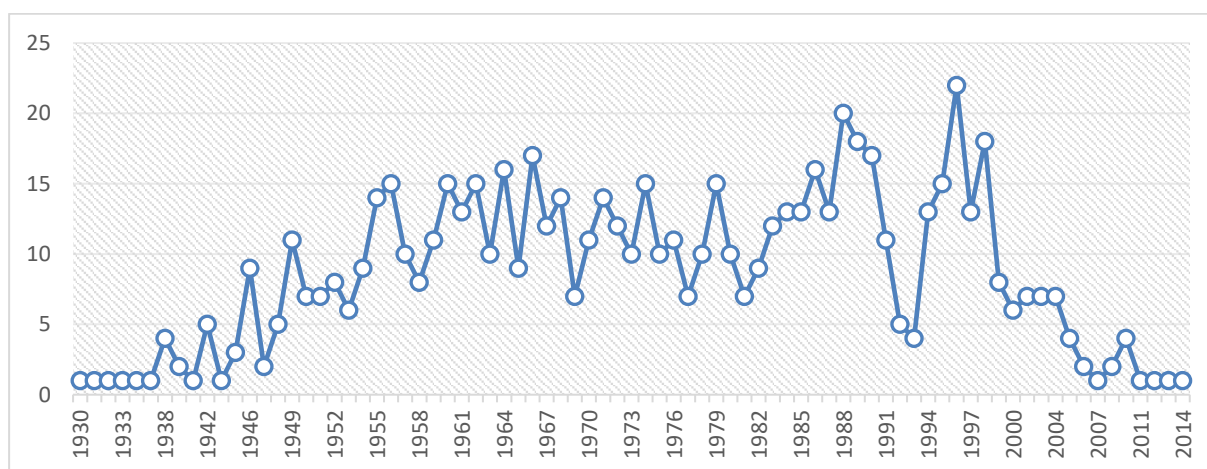
U tabeli 1 možemo vidjeti da se radilo sa 688 uzoraka. Od tih 688 uzoraka, 229 muškaraca, a 459 žena. Od 229 testiranih muškaraca, 138 je imalo pozitivan rezultat (IgG veći od 1,00 COI), 11 je bilo prelaznih rezultata (IgG je u rasponu od 0,75 COI – 1,00 COI), te 80 negativnih (IgG je manji od 0,75). Sličan rezultat imamo i kod žena, gdje na otprilike duplo većem uzorku ispitivanih seruma imamo gotovo pa identičan rezultat. Od 459 testiranih žena, 269 je imalo pozitivan rezultat (IgG veći od 1,00 COI), 22 je bilo prelaznih rezultata (IgG je u rasponu od 0,75 COI – 1,00 COI), te 168 negativnih (IgG je manji od 0,75). Od ukupno 688 ispitivanih uzoraka 59% (407) je pozitivnih nalaza, 5% (33) prelaznih, a 36% (248) negativnih nalaza.

Na slici 6, predstavljen je grafički prikaz odnosa iz tabele 1.



Slika 6. Grafički prikaz odnosa pozitivnih i negativnih nalaza u odnosu na spol pacijenta

Analizom prethodnog grafika možemo zaključiti da na infekciju sa *Helicobacter pylori*, spol nije imao uticaja. Zaraženi su bili i muškarci i žene u skoro pa istom omjeru. Iako je broj žena testiranih bio duplo veći, omjer zaraženih žena je također bio duplo veći u odnosu na muškarce.



Slika 7. Grafički prikaz osoba sa pozitivnim IgG na H. pylori po godini rođenja

Po grafiku iznad (Slika 7) možemo zaključiti da je najveći broj zaraženih osoba bio u dobi od 18 do 35 godina. Nešto manje je bilo osoba srednje životne dobi. Starije osobe i djeca su najmanje imali pozitivnih nalaza. Iako su osobe starije životne dobi i djeca brojčano u uzorku bili manje zastupljeni, pozitivnih testova je bilo još manje.

Analiza koju smo provodili u privatnoj poliklinici „Medical Irac“ iz Tuzle, rađena je na Biomeriuxovom uređaju Mini Vidas (Slika 8). Ovo je kompaktni automatizovani imuno analizator, koji radi na principu ELFA tehnike (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Ovo je unaprijeđena verzija već spomenutog ELISA testa. Enzimski fluorescentni test (ELFA) zasnovan na ovom principu je približno 100 puta osjetljiviji od odgovarajućeg ELISA testa.

Aparati iz Vidas porodice su poznati kao precizni i pouzdani uređaji, što našim testovima i rezultatima daje sigurnost i pouzdanost.



Slika 8. Mini Vidas ⁶

Na slici 9 imamo prikazan primjer nalaza pozitivnih na antitijela IgG na *Helicobacter pylori* rađenih u već spomenutoj ustanovi („Medical Irac“).

⁶ <https://www.biomerieux-usa.com/vet-vidas>



MEDICINSKO-BIOHEMIJSKI LABORATORIJ

Ime i prezime pacijenta:	Adis Adić
Datum rođenja:	18.06.1983.
Datum izdavanja:	26.05.2022

Imunohemijske analize:				
TU	Test	Vrijednost	Jedinice	Ref. interval
S	HPY	2,55		negativno < 0,75 prelazni rezultat 0,75 - 1.00 pozitivno >= 1.00

S – Serum, P – Plazma, K – Puna krv (EDTA antikoagulans), eP – EDTA Plazma, kK – Kapilarna krv, U – Urin

Nalaz odobrio/la

Slika 9. Pozitivan nalaz na prisustvo IgG antitijela na *Helicobacter pylori*

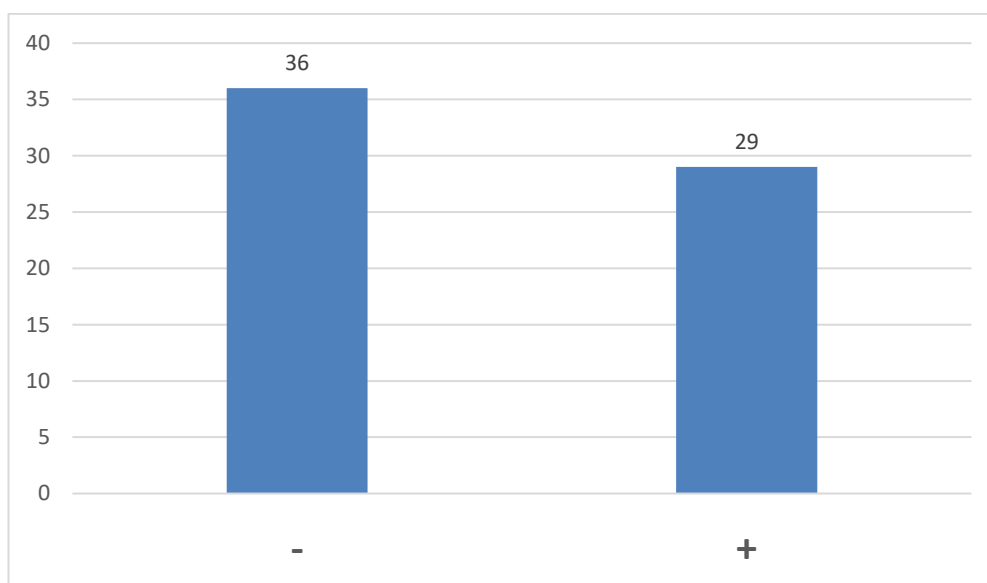
4.3. Analiza prisustva antigena na *Helicobacter pylori* u stolici

Kao drugu analizu provedenu, također u istoj ustanovi, rađeni su testovi na prisustvo antigena *Helicobacter pylori* u stolici pacijenata. Ova metoda je veoma brza i jednostavna, za razliku od serološkog dokazivanja antitijela u serumu. Ovom metodom se otkriva trenutna (aktuelna) infekcija, za razliku od serološkog testa gdje IgG antitijela HPY mogu biti prisutna i do godinu dana od infekcije bakterijom. Tako je ovaj test pravi pokazatelj uspješnosti liječenja odnosno terapije. Ovim testom se dokazuje antigen bakterije u stolici pacijenta, pa nalaze označavamo sa „Pozitivno“ ili „Negativno“.

U našoj analizi antigena *Helicobacter pylori* imali smo puno manji broj uzoraka nego broj uzoraka seruma za serološko testiranje. Iako mali broj, bio je dovoljan za analizu i prikaz stanja infekcija sa *Helicobacter pylori*.

Za analizu uzima se uzorak stolice, koji mora biti dostavljen u laboratoriju unutar jednog sata. Ukoliko to nije moguće, preporučuje se upotreba frižidera. Uzorak bi se trebao čuvati na temperaturi od 2 °C do 4 °C, te dostavljen u laboratoriju unutar 24 sata.

Za ovu analizu smo imali 65 uzoraka stolice, što je predstavljeno na slici 10.

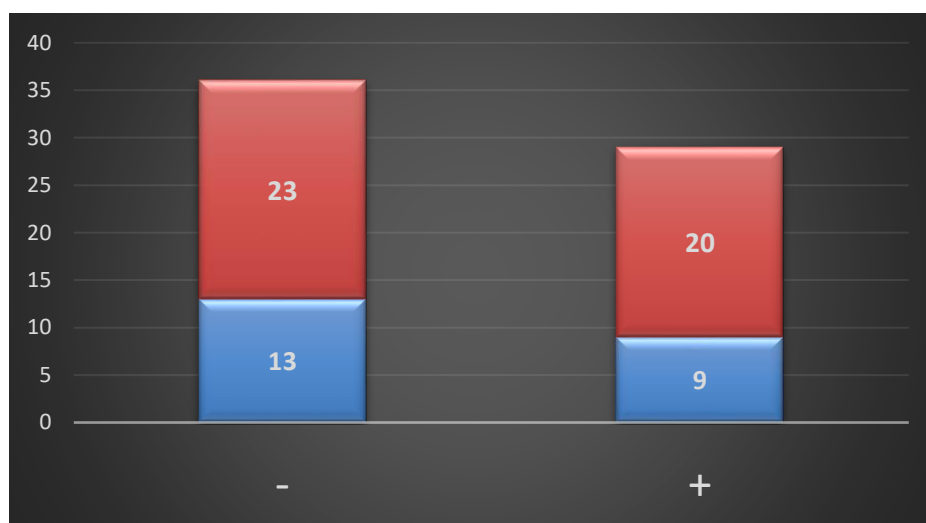


Slika 10. Odnos testiranih na prisustvo antigena HPY u stolici

Na slici broj 10, možemo vidjeti da je od 65 uzoraka stolice dostavljenih u laboratoriju, od čega je 29 bilo pozitivno a 36 negativnih nalaza.

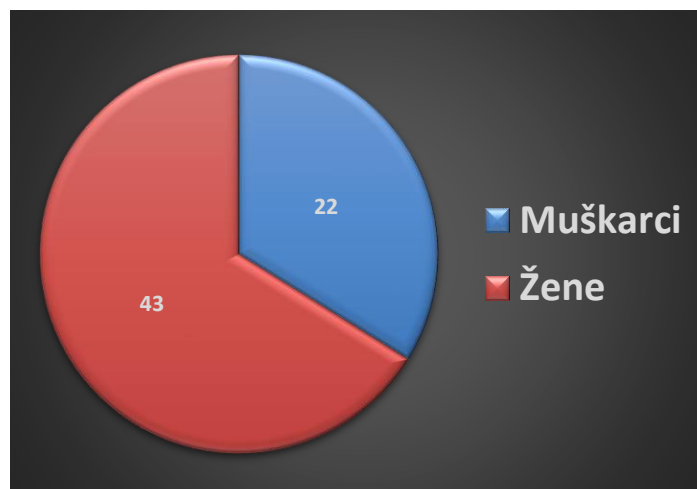
Tabela 2 Odnos testiranih na prisustvo antigena HPY u stolici

Prebrojati od Spol			
	Muškarci	Žene	Ukupno
- (negativno)	13	23	36
+ (pozitivno)	9	20	29
Ukupno	22	43	65



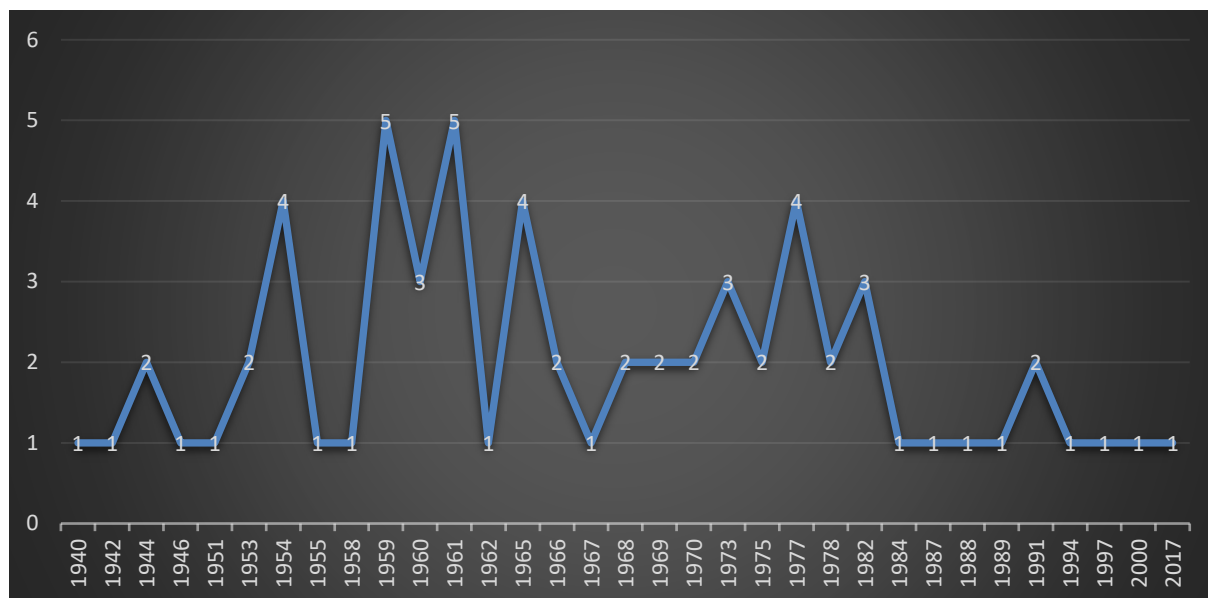
Slika 11. Odnos testiranih na prisustvo antigena HPY u stolici

Na slici broj 11 vidimo da od 29 pozitivnih osoba, 20 je bilo žena a 9 muškaraca. Dok od 36 negativnih nalaza, 23 su bile žene a 13 muškarci. Odnos svih muškaraca/žena u analizi je bio 22/43, što možemo vidjeti na slici 12.



Slika 12. Prikaz pacijenata testiranih na prisustvo HPY u stolici po spolu

Najveći procenat ispitanika je bio preko 60 godina životne starosti. Grafički je prikazano na slici 13.



Slika 13. Prikaz pacijenata testiranih na prisustvo HPY u stolici po godini rođenja

5. ZAKLJUČAK

Helicobacter pylori bakterijom zaraženo je najmanje pola svjetske populacije, što je čini najrasprostranjenijom infekcijom u svijetu.

Osobe zaražene u ranoj dobi imaju veće šanse razviti jače upale koje mogu biti praćene atrofičnim gastritisom sa većim naknadnim rizikom od želučanog čira, želučanog raka, ili oboje.

Kod infekcije *Helicobacter pylori*, u analizi nam je bio najznačajniji ELISA metod testiranja za dijagnostiku IgG antitijela u serumu (ELFA) i antigena u stolici (ELISA).

Prema našem istraživanju, odnos zaraženih muškaraca i žena je ravnomjeran. Bakterija se nalazi u oba spola podjednako, a nešto više kod osoba testiranih dobi od 18 – 35 godina.

Helicobacter pylori in vitro je značajno osjetljiv na većinu antibiotika: amoksicilin, metronidazol, nitrofurantoin, eritromicin, azitromicin, tetraciklin. Osjetljiv je i na bizmutove soli koje se koriste u liječenju peptičkog ulkusa kao i na omeprazol. Najbolji rezultat postignut je primjenom kombinirane terapije: claritromicin + amoksicilin + metronidazol u trajanju 7-10 dana.

Brojne studije pokazale su da ovako provedena terapija dovodi do eradikacije *Helicobacter pylori* u 96% pacijenata.

6. LITERATURA

1. Nurkić J. Imunologija u: Medicinska mikrobiologija sa imunologijom i parazitologijom. Tuzla:Off-set 2013; 145-206
2. Kalenić S, Milinarić-Missoni E-Medicinska bakteriologija i mikologija, Zagreb, 1995.
3. Senji P, Škrlin J, Volner Z-Osnove mikrobiološke i parazitološke dijagnostike, Zagreb, 2005.
4. Hukić M. Bakteriologija u: Medicinska mikrobiologija sa imunologijom i parazitologijom. Tuzla:Off-set 2013; 207-328
5. https://bs.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori
6. A. Kobaš-Medicinska bakteriologija, Zagreb, 2016.
7. Z. Volner-Medicinska bakteriologija, virologija i parazitologija, Zagreb, 2014.
8. WHO, Transport of infectious materials, 2004.
9. Correa P, Piazuolo MB (januar 2012). "Evolutionary History of the Helicobacter pylori Genome: Implications for Gastric Carcinogenesis". Gut and Liver. 6 (1): 21–8. doi:10.5009/gnl.2012.6.1.21. PMC 3286735. PMID 22375167.
10. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease (Report). NIH Consensus Statement Online. 12. 7. 1. 1994. str. 1–23. Pristupljeno 21. 08. 2022.
11. James K.Y. Hooi, Wan Ying Lai, Wee Khoo Ng, Michael M.Y. Suen, Fox E. Underwood, Divine Tanyingoh, Peter Malfertheiner, David Y. Graham, Vincent W.S. Wong, Justin C.Y. Wu, Francis K.L. Chan, Joseph J.Y. Sung, Gilaad G. Kaplan, Siew C. Ng, Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis, Gastroenterology, Volume 153, Issue 2, 2017, Pages 420-429, ISSN 0016-5085, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508517355312>)
12. Michael D. Burkitt, Carrie A. Duckworth, Jonathan M. Williams and D. Mark Pritchard: Helicobacter pylori-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. [Disease Models and Mechanisms](#) 10(2):89-104; 2017; DOI: [10.1242/dmm.027649](https://doi.org/10.1242/dmm.027649)

7. POPIS SLIKA I TABELA

Slika 1. Dijelovi nefelometra: 1. izvor svjetlosti, 2. optička leća, 3. otvor u objektivu, 4. okrugla kiveta, 5. fotometar s filtrim (fotomultiplikator), 6. raspršene zrake svjetlosti (90°).	9
Slika 2. Imunohistohemijsko bojenje H. pylori (smeđe) iz biopsije želuca	22
Slika 3. Helicobacter pylori pod elektronskim mikroskopom.....	29
Slika 4. Prikaz pacijenata po godini rođenja	31
Slika 5. Grafički prikaz ispitanih uzoraka po spolu pacijenta	32
Slika 6. Grafički prikaz odnosa pozitivnih i negativnih nalaza u odnosu na spol pacijenta.....	33
Slika 7. Grafički prikaz osoba sa pozitivnim IgG na H. pylori po godini rođenja	33
Slika 8. Mini Vidas	34
Slika 9. Pozitivan nalaz na prisustvo IgG antitijela na Helicobacter pylori	35
Slika 10. Odnos testiranih na prisustvo antigena HPY u stolici	36
Slika 11. Odnos testiranih na prisustvo antigena HPY u stolici	37
Slika 12. Prikaz pacijenata testiranih na prisustvo HPY u stolici po spolu.....	37
Slika 13. Prikaz pacijenata testiranih na prisustvo HPY u stolici po godini rođenja	38
Ilustracija 1 Helicobacter pylori	16
Ilustracija 2 H. pylori infekcija i progresija u karcinom želuca.	17
Ilustracija 3 Modeliranje patoloških ishoda infekcije Helicobacter.	18
Ilustracija 4 Helicobacter pylori	19
Ilustracija 5 Globalna prevalencija (HP choropleth map).	20
Ilustracija 6 Prevalencija infekcije Helicobacter pylori širom svijeta.	21
Tabela 1 Tabelarni prikaz ispitanih uzoraka po spolu pacijenta	32
Tabela 2 Odnos testiranih na prisustvo antigena HPY u stolici	37