

Dušanka Mičetič - Turk¹, Darja Urlep², Mitja Krajnc³, Maša Knehtl⁴

Diagnostična vrednost neinvazivnih testov pri okužbi s *Helicobacter pylori* v otroški dobi

The Diagnostic Value of Non-invasive Tests of the Helicobacter pylori Infection in the Childhood

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: helicobacter okužbe – diagnostika, otrok

Okužba s *Helicobacter pylori* poteka v otroštvu večinoma brez simptomov, vendar predstavlja pomemben dejavnik v nastanku intestinalne metaplazije in karcinoma želodca v odrasli dobi. Želeli smo ugotoviti, ali predstavljajo neinvazivni testi za odkrivanje okužbe s *Helicobacter pylori* posamezno in v kombinaciji koristne neinvazivne metode v rutinski diagnostiki okužbe v pediatrični populaciji. Na skupnem vzorcu 62 otrok z anamnestično-kliničnim sumom na okužbo s *Helicobacter pylori* smo prospektivno opravili štiri neinvazivne teste za določanje okužbe: serološko preiskavo določanja specifičnih IgA in IgG proti *Helicobacter pylori*, pregled vzorca blata na antigen *Helicobacter pylori* in 13-C urea dihalni test. Pri 32 preiskovancih je bila okužba potrjena z invazivno metodo zlatega standarda. Izračunali smo specifičnost, občutljivost, pozitivno in negativno napovedno vrednost ter površino pod krivuljo ROC za posamezne neinvazivne teste. Diagnostično vrednost različnih kombinacij testov pa smo ugotavljali s testom ROC in klasično diskriminantno analizo. Urea dihalni test ima v primerjavi z dokazom HpSA, IgG in IgA kot samostojen test najvišjo diagnostično vrednost. Kombinacija vseh štirih testov ima višjo diagnostično vrednost kot katerikoli samostojen test. Enako velja za kombinacijo urea dihalnega testa s testom za dokaz HpSA ali s serološkimi testi. Slabše rezultate sta pokazali kombinacija obeh seroloških testov in kombinacija seroloških testov z dokazom HpSA. Kot presejalni test je klinično uporaben urea dihalni test kot samostojen test ali kombinacija urea dihalnega testa z dokazom HpSA v blatu oziroma s serologijo (IgA, IgG) ali kombinacija vseh štirih neinvazivnih testov.

ABSTRACT

KEY WORDS: helicobacter infections – diagnosis, child

The infection with *Helicobacter pylori*, mostly asymptomatic in children, is also an important factor in the development of intestinal metaplasia and gastric carcinoma in adulthood. In the present article we want to establish whether the noninvasive diagnostic tests of the *Helicobacter pylori* infection could individually and in different combinations be used in every-day paediatric clinical practice. A total of 62 coincidentally chosen children with symptoms and signs suspicious of the HP infection were prospectively studied. They underwent four noninvasive diagnostic tests: serology – specific antibodies IgA and IgG against HP, stool antigen test and 13-C urea breath test. 32 of the patients had their infection confirmed with

¹ Prof. dr. Dušanka Mičetič - Turk, dr. med., višja svetnica, KO za pediatrijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

² Asist. mag. Darja Urlep, dr. med., KO za pediatrijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

³ Mitja Krajnc, dr. med., KO za pediatrijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

⁴ Maša Knehtl, dr. med., KO za pediatrijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor.

the invasive gold standard method. We calculated specificity, sensitivity, positive and negative predictive value and ROC area under the curve for an individual test. We estimated the diagnostic values of test combinations with ROC testing and classic discriminative analysis. Urea breath test compared to HpSA, IgG and IgA has been shown to have the highest diagnostic value as an individual test. The combination of all four tests has the diagnostic value that is higher than of any of the individual tests. The same applies to combination urea breath test + HpSA or with serology. The results of combination of both serologic tests and combination serology + HpSA turned out to be worse. Urea breath test individually and its combinations with HpSA or serology (IgG, IgA) are clinically applicable as the screening methods for HP infection. The same goes to the combination of all four tests.

UVOD

Bakterija *Helicobacter pylori* (HP) je gramnegativna mikroaerofilna bakterija, ki je prilagojena izključno na življenje v kislem okolju želodca (in želodčnih metaplastičnih spremembah v požiralniku, dvanajstniku in Meckelovem divertiklu) (1). V najvišjih koncentracijah so jo dokazali v antralni regiji želodca (2). Gibljivost ji omogoča, da se umesti v sloj med mukusom in epitelijem. Tvori encim ureazo, ki razgrajuje sečnino v bikarbonat in amoniak, ki je za sluznico toksičen. Iz amoniaka in vode nastaja amonijev hidroksid, ki povzroči alkalizacijo okolice bakterije in ji zagotavlja pogoje za preživetje.

Okužba s HP se pojavlja pri 40–50 % populacije v razvitih državah in pri 80–90 % populacije v državah v razvoju (1, 3, 4). Pojavnost okužbe s HP je za razviti svet ocenjena na 0,5 % letno, za države v razvoju pa na 3–10 % letno (5).

Okužba s HP poteka pri otroku večinoma brez simptomov in je najpogosteje povezana s kroničnim limfocitnim vnetjem želodčne sluznice z limfoidnimi folikli v sluznici, ki se kaže kot nodularni gastritis. Za razliko od odraslih je v pediatrični populaciji peptična razjeda redka, redkejša je tudi črevesna metaplazija. Čeprav je želodčni karcinom v otroštvu zelo redek, pa pojavnost (incidenca) želodčnega karcinoma v odrasli dobi kaže visoko stopnjo soodvisnosti s pogostnostjo (prevalenco) okužbe s HP v otroštvu (1, 3, 5–7), zato je odkrivanje okužbe s HP v med otroki izjemnega pomena.

DIAGNOSTIKA OKUŽBE S HP

Za diagnostiko okužbe s HP so na razpolago diagnostične metode, ki jih delimo na invazivne in neinvazivne (tabela 1).

Invazivne preiskave

Endoskopska diagnostika zgornjih prebavil z odvzemom številnih bioptov sluznice želodca ter histološki pregled vzorcev predstavlja zlati standard v diagnostiki okužbe s HP (4).

Histološka preiskava biopta je metoda z visoko občutljivostjo, pri kateri se vzorci, odvzeti pri EGDS, obarvajo z ustreznimi barvili (srebrenje Whartin-Starry, Giemsa, klasično hematoksilin-eozinsko barvanje) ter se oceni prisotnost HP ter stopnja aktivnosti vnetja želodčne in dvanajstnikove sluznice, razširjenost omenjenega vnetja in tudi morebitna prisotnost atrofičnega gastritisa, črevesne metaplazije in MALT-limfoma. Na občutljivost metode vpliva izkušnost patologa, predvsem pa število vzorcev želodčne sluznice (4, 8, 9).

Smernice evropskega in severnoameriškega združenja za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN-a in NASPHGAN-a) navajajo, da je endoskopija zgornjih prebavil osnovna diagnostična metoda pri otrocih s simptomi zgornjih prebavil, ki so sumljivi za okužbo s HP. Le na podlagi

Tabela 1. Metode v diagnostiki okužbe s HP. Metode, označene z *, predstavljajo diagnostične metode zlatega standarda.

Invazivne diagnostične metode

Histološka preiskava biopta*

Hitri ureazni test*

Faznokontrastni mikroskopski pregled svežega biopta

Bakterijska kultura*

PCR – verižna reakcija s polimerazo

Neinvazivne diagnostične metode

Serološke preiskave – protitelesa IgA in IgG proti HP

Dihalni test s sečnino (C-13 ali C-14)

Dokazovanje antigena HP v blatu

z EGDS dokazane okužbe s HP se lahko odločimo za zdravljenje okužbe s HP (4–6, 10). Priporoča se odvzem bioptov predvsem sluznice antruma, male krivine želodca, telesa ter po potrebi tudi fundusa in kardije želodca (2). Slabost te invazivne diagnostične metode pa je predvsem v njeni izraziti obremenitlosti, pri mlajših otrocih od 10 let pa tudi v potrebi po sedaciji oziroma anesteziji otroka ob preiskavi.

Hitri ureazni test temelji na razgradnji sečnine z ureazo v amonijev ion in bikarbonat – reakcija se kaže s spremembo pH, kar zaznamo s pomočjo pH-indikatorja. Rezultat je lahko lažno negativen, če je število bakterij majhno oz. je razporeditev bakterij žariščna, kar je problem predvsem pri otrocih (2). Test se opravi ob EGDS na bioptu želodčne sluznice. Bistvena prednost testa je v tem, da je hiter, preprost in poceni, glavna pomanjkljivost pa je prav v nizki občutljivosti, še posebej pri otrocih. Večinoma se uporabljajo komercialni testi, npr. CLO in CM (3, 8, 9, 11). Občutljivost metode je odvisna od števila bioptičnih vzorcev, mesta odvzema bioptov, bakterijske gostote in predhodne uporabe antibiotikov in inhibitorjev protonske črpalke (5).

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

Bakterijska kultura je visoko specifična diagnostična metoda in metoda zlatega standarda, njena občutljivost pa je odvisna od mikrobiološke obdelave vzorca, števila in mesta odvzema bioptov. Njen pomen je predvsem v možnosti testiranja občutljivosti bakterije na antibiotike. Metoda dokazovanja bakterije temelji na biokemični zaznavi različnih bakterijskih encimov (ureaze, oksidaze, katalaze, gamaglutamil transpeptidaze) in morfoloških lastnostih (3, 5, 8, 9).

PCR – verižna reakcija s polimerazo je visoko občutljiva genetska metoda dokazovanja bakterijske DNA, ki jo lahko dokazujemo v bioptičnem vzorcu želodčne sluznice, želodčnem soku, žolču, slini in blatu. Uporabna je tudi za ugotavljanje občutljivosti na antibiotike. Najpogosteje temelji na genu *UreC* kot specifični sondi (3, 5, 8, 9).

Neinvazivne preiskave

Mesto neinvazivnih testov za dokazovanje okužbe s HP pri otrocih je predmet številnih

preučevanj in raziskav ter zaenkrat še ni povsem jasno opredeljeno. Prevladuje stališče, da neinvazivni testi za dokazovanje okužbe s HP v pediatrični populaciji ne morejo nadomestiti endoskopije zgornjih prebavil ter se na podlagi le-teh ne moremo odločati glede zdravljenja okužbe s HP (4, 6, 10). Uporabljajo se zlasti za spremljanje učinkovitosti zdravljenja. Pomen neinvazivnih testov je tudi v epidemioloških študijah pojavnosti, pogostnosti okužbe s HP v pediatrični populaciji, poleg tega tudi načina prenosa okužbe ter možnosti spontane ozdravitve in preprečevanja okužbe. Neinvazivni testi naj bi bili enostavni, poceni in diagnostično zanesljivi (4, 6, 7, 12).

Serološke preiskave (določanje protiteles IgA in IgG proti HP) temeljijo na dokazovanju protiteles proti HP v krvi, želodčnem soku, slini ali blatu z različnimi metodami (aglutinacijo, reakcijo vezave komplementa, najpogosteje pa z ELISO) (5, 9). Preiskave so poceni in enostavne. Okužba s HP povzroči lokalno in sistemsko tvorbo protiteles. Prehodnemu dvigu IgM sledi dvig protiteles IgG in IgA. Humoralni odziv je polimorfen. Prepoznali so številne antigene, proti katerim se tvorijo protitelesa (CagA, UreA, UreB, lipopolisaharide in podenote flagelina) (13). Metoda dokazovanja IgA-protiteles je manj občutljiva kot določanje IgG-protiteles. Zaradi počasnega povišanja oz. počasnega upadanja vrednosti protiteles metoda ni povsem primerna za spremljanje uspešnosti zdravljenja (5, 9). Antigenske lastnosti HP-sevov se razlikujejo med posameznimi etničnimi in geografskimi populacijami, zato je potrebno serološke teste standardizirati za vsako populacijo posebej in hkrati prilagoditi cut-off vrednosti (6, 14). Najboljši so testi, ki so usmerjeni proti multiplim antigenom. Cut-off vrednosti naj bi bile za otroke tudi posebej prirejene zaradi drugačnosti imunskega odziva v otroškem obdobju (3, 8, 9, 12, 15, 16). Nekateri avtorji navajajo manjšo zanesljivost seroloških testov pri otrocih glede na odrasle (14). Večina komercialnih testov ni prilagojena za otroško populacijo (6, 14).

Dihalni test s sečnino (označeno s C-13 ali C-14) temelji na isti biokemični reakciji kot hitri ureazni test. Test je enostaven, varen in neboleč, velja za visoko specifičnega in občutljivega. S testom se določa celokupna encimska

aktivnost ureaze. Bolnik v poskusnem obroku popije predpisano količino sečnine, ki ima namesto C-12 v molekuli C-13 ali C-14. Označen ogljik iz uree, ki jo razgradi ureaza HP, se pojavi v bikarbonatnem anionu, ki se absorbira v kri in se kot ^{13}C ali $^{14}\text{CO}_2$ izloči v izdihanem zraku (8). Pred testom in določen čas po testu se (s pomočjo spektrometrične, infrardeče spektroskopske metode ali z lasersko asistirano analizo razmerij) izmeri razmerje med C-12 in C-13, ki se ob prisotnosti bakterije značilno spremeni (16, 17). Če je razmerje povečano za več kot 0,4%, je rezultat pozitiven (nekateri avtorji priporočajo cut-off vrednost 0,25%, 0,3% oziroma 0,35%). Izotop C-13 je povsem neškodljiv, zato je primeren za uporabo pri otrocih. Slabost testa je njegova visoka cena in težja izvedba pri manjšem otroku (3, 9, 15–18). Urea C-13 dihalni test velja v pediatriji ne glede na uporabljeni protokol za zanesljivega (z morebitno izjemo otrok pod starostjo 6 let oz. še posebej pod 2. letom, kjer še ni bil zadostno potrjen). Raziskave kažejo, da je občutljivost nižja pri nižji starostni skupini otrok (6, 12). Optimalna vrednost cut-off in testni protokol, vključno z odmerkom in načinom vnosa uree, za pediatrično vrednost še nista zanesljivo določena. Pri otrocih uporabljamo 50 mg uree, pri odraslih 75–100 mg (16, 17). Na rezultate lahko vpliva zdravljenje z antibiotiki in zaviralci protonске črpalke (5).

Dokazovanje HP v blatu temelji na dokazu specifičnih antigenov HP v blatu, ki se pojavijo po okužbi, običajno s pomočjo EIA-metode (12). Poliklonska protitelesa, adsorbirana na površini testne ploščice, se specifično vežejo na HP-antigene iz vzorca blata. Z encimom konjugirano poliklonalno protitelo omogoča po dodatku substrata za encim barvno reakcijo, ki se kvantitativno oceni spektrofotometrično. Prednost testa je v neinvazivnosti in enostavnosti odvzema vzorca (8, 9, 19). Optimalna vredost cut-off za pediatrično populacijo, ki bi omogočila najustreznejšo občutljivost in specifičnost, še ni zanesljivo določena. Zelo pomembno je diagnostično ovrednotenje testa za posamezne etnične skupine in geografska območja (20). Japonski raziskovalci menijo, da ima test ustrezno diagnostično vrednost v vseh starostnih skupinah otroštva (21).

Z raziskavo smo želeli oceniti diagnostično vrednost in pomen neinvazivnih diagnostičnih metod za ugotavljanje okužbe s HP pri otrocih (serološke preiskave določanja protiteles IgG in IgA proti HP, dihalnega testa s sečnino in dokazovanja antigena HP v blatu).

Hkrati smo želeli ovrednotiti diagnostično vrednost kombinacij neinvazivnih testov, česar v pregledani literaturi nismo našli.

METODE DELA

Naša raziskava je potekala od začetka septembra 2003 do konca junija 2004 v okviru Odseka za gastroenterologijo in prehrano Kliničnega oddelka za pediatrijo Splošne bolnišnice Maribor.

Bolnike in/ali njihove starše oziroma skrbnike smo pred vključitvijo v raziskavo seznanili z načinom izvedbe in cilji naloge, po čemer so potrdili svoje prostovoljno sodelovanje. Pri izvedbi raziskave smo se držali načel Helsinško-tokijske deklaracije in Kodeksa medicinske deontologije Slovenije. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko-etična vprašanja.

Preiskovanci

V raziskavo, ki smo jo zastavili prospektivno, smo vključili 62 otrok, starih od 7 do 18 let, ki so bili poslani na diagnostiko zaradi dispeptičnih simptomov pod sumom na okužbo s HP. Najpogostejši simptomi so bili bolečina v trebuhu, slabost, bruhanje, inapetenca, hujšanje, driska in zgaga. Izključitvenih kriterijev glede na enkratnost opravljanja diagnostičnih postopkov nismo predvideli. Otroke smo naključno izbrali med bolniki odseka za gastroenterologijo. Vsem je opravila endoskopski poseg – EGDS v sklopu diagnostičnega postopka ista pediatriinja – gastroenterologinja. Z metodo zlatega standarda je bila ugotovljena okužba s HP pri 32 otrocih. Med raziskavo predvsem zaradi nesodelovanja preiskovancev nismo mogli opraviti vseh predvidenih testov pri vseh bolnikih. Tem okoliščinam smo priredili statistično analizo.

Protokol raziskave

Za preiskovane bolnike smo v okviru raziskave zbrali naslednje podatke:

- Datum sprejema, ime in priimek, spol, starost.
- Anamneza ob sprejemu: družinska anamneza s poudarkom na prebavilih, prejšnje bolezni, sedanja bolezen, dosedanja zdravila.
- Status ob sprejemu: telesna teža, telesna višina, indeks telesne mase, lokalni status trebuha.
- Laboratorijski izvidi ob sprejemu/pred uvedbo zdravljenja: eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV (srednja celična prostornina), MCH (srednja vrednost celičnega hemoglobina), MCHC (srednja vrednost hemoglobina na celico), C-reaktivni protein, hitrost usedanja eritrocitov, nepravilnosti v diferencialni krvni sliki, nepravilnosti v biokemijskih testih.
- Izvid EGDS, pri čemer smo bili pozorni zlasti na refluks, hiatalno hernijo, hiperemijo, edem, erozije, ulkuse, nodularnost (mikronodularnost/makronodularnost), atrofijo, vnetne polipe in rezultat hitrega ureaznega testa v sklopu EGDS.
- Patohistološki izvid: določitev stopnje vnetja želodčne sluznice po revidirani Sydneyjski klasifikaciji (22), prisotnost bakterije HP, črevesna metaplazija, atrofija/izguba žlez, fibroza, drugo.
- Seroški test – titri protiteles IgG in IgA proti *Helicobacter pylori*: pozitivno/negativno, številčna vrednost.
- Dokazovanje HP-antigena v blatu: pozitivno/negativno.
- Urea dihalni test: pozitiven/negativen, številčna vrednost.
- Zdravljenje okužbe s HP.

Način testiranja

Za odkrivanje **antigenov HP v človeškem blatu** smo uporabljali test Premier Platinum HpSA proizvajalca Meridian Bioscience, Inc., ZDA. V skladu z navodili proizvajalca je vse faze testiranja izvajalo usposobljeno laboratorijsko osebje Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor ob upoštevanju vseh možnih omejitev, odvzem vzorca blata pa so opravile medicinske sestre Kliničnega oddelka za pediatrijo Maribor. Test temelji na metodi EIA. Rezultat se ovrednoti na osnovi spektrofotometrije pri valovni dolžini 450 nm oz. 450 nm/630 nm, pri čemer so kot pozitivni

rezultat v prvem primeru šteje vrednost absorbance nad 0,160, v drugem pa nad 0,120 (23).

Za dokazovanje **protiteles proti HP v serumu** smo uporabljali test SERION ELISA classic *Helicobacter pylori* IgG/IgM/IgA proizvajalca Institut Virion Serion GmbH, Nemčija, ki ga je v skladu z njegovimi navodili ob upoštevanju vseh možnih omejitev izvajalo usposobljeno laboratorijsko osebje Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, vzorce krvi pa so odvzele medicinske sestre Kliničnega oddelka za pediatrijo Maribor. Test temelji na metodi ELISA, uporabljen encim je alkalna fosfataza, substrat pa p-nitrofenilfosfat, ki po reakciji z encimom daje obarvane derivate. Intenziteta barve, sorazmerna s količino vezanih specifičnih protiteles, se kvantitativno spektrofotometrično oceni. Pozitivni rezultat, preračunan iz absorbance, za IgG in IgA znaša več kot 30 U/ml (24).

13-C urea dihalni test

Uporabljali smo test *Helicobacter Test INFAI* proizvajalca INFAI (Institut fuer biomedizinische Analytik & NMR-Imaging GmbH), Bochum, Nemčija.

Test smo izvajali po naslednjem protokolu:

1. zbiranje osnovnega vzorca zraka na tešče v belo epruveto – bolnik rahlo pihuje preko plastične cevke;
2. preiskovanec popije 200 ml 100 % pomarančnega soka, da upočasnijo praznjenje želodca, nato pa 30 ml vode, v kateri je raztopljenih 45 mg uree 13-C, za otroke nad 14 let 75 mg;
3. pol ure kasneje zbira zrak na isti način v modro epruveto.

Preiskovanci so bili tešči vsaj 6 ur pred preiskavo in so najmanj 3 tedne pred testom prenehali z jemanjem antibiotikov, anticidov, zaviralcev protonске črpalke in antagonistov H2. Ostale dele testa je izvedlo osebje Encimskega laboratorija Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo Kliničnega centra v Ljubljani po infrardeči spektroskopski metodi. Za pozitivni rezultat smo šteli 0,4 % povečanje razmerja med C-12 in C-13.

Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabljali program SPSS for Windows 12,0.

Tabela 2. Velikost vzorca pri posameznih testih glede na resnično/lažno pozitivnost/negativnost.

Neinvazivni diagnostični test	Število resnično negativnih	Število lažno pozitivnih	Število resnično pozitivnih	Število lažno negativnih
IgA-protitelesa na HP	25	1	9	16
IgG-protitelesa na HP	21	5	21	4
HP-antigen v blatu	22	3	17	10
urea dihalni test	24	3	18	3

Za vsak neinvazivni test smo izračunali njegovo specifičnost in občutljivost ter pozitivno in negativno napovedno vrednost.

Prav tako smo za vsak posamezni test naredili test ROC. Ob interpretaciji testa ROC smo upoštevali naslednje intervale površin pod krivuljo:

- 0,50–0,75 – znatna diagnostična vrednost,
- 0,75–0,92 – dobra diagnostična vrednost,
- 0,92–0,97 – zelo dobra diagnostična vrednost,
- 0,97–1,00 – odlična diagnostična vrednost.

Diagnostično vrednost različnih kombinacij testov smo ugotavljali z linearno regresijo v kombinaciji s testom ROC in s klasično diskriminantno analizo (25).

REZULTATI

Za resnično pozitivne ob primerjavi z neinvazivno metodo smo šteli otroke, pri katerih je bila okužba s HP dokazana s pomočjo ene od invazivnih metod, ki veljajo za zlati standard, za resnično negativne pa tiste, kjer le-ta na enak način ni bila dokazana. Tabela 2 prikazuje velikost vzorca pri posameznih testih.

Izračunani Sn in Sp za dokazovanje prisotnosti specifičnih protiteles IgA proti HP znašata 36,0% in 96,2%; PPV in NPV pa 90% in 61%. Izračunani Sn in Sp za dokazovanje

prisotnosti specifičnih protiteles IgG proti HP sta 84,0% in 80,8%, PPV in NPV pa 80,8% in 84%. Izračunani Sn in Sp za določanje HpSA znašata 63,0% in 88,0%, PNV in NNV pa 85,0% in 68,8%. Izračunani Sn in Sp za urea dihalni test znašata 91,0% in 83%, PNV in NNV pa 85,7% in 88,9%. Izračunane vrednosti so prikazane v tabeli 3.

Površina pod krivuljo ROC (Receiver operating characteristic curve) za IgA znaša 0,670, za IgG 0,733, za HpSA 0,701 in za urea dihalni test 0,839. Tabela 4 prikazuje rezultate statistične analize s testom ROC za posamezne teste.

Izračunali smo tudi površine pod krivuljo ROC za kombinacije posameznih testov, rezultate statistične analize prikazuje tabela 5.

V tabeli 6 so prikazani rezultati klasične diskriminantne analize za različne kombinacije testov.

RAZPRAVA

Da se test lahko uporablja kot presejalni test, morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji: visoka občutljivost, ustrezna specifičnost, enostavnost, neškodljivost, nizka cena, možnost nadaljnjega zdravljenja (25).

V študiji, narejeni na odrasli populaciji ter objavljeni leta 2001 v reviji *The American Journal of Gastroenterology* (26), je znašala Sn testa za dokaz HP v blatu 88,9%, Sp pa

Tabela 3. Občutljivost, specifičnost, pozitivna in negativna napovedna vrednost posameznih testov. *V oklepajih je naveden 95% interval zaupanja.

	Sn* (%)	Sp* (%)	PPV (%)	NPV
serologija IgA	36,0 (20,3–55,8)	96,2 (81,1–99,2)	90,0	61,0
serologija IgG	84,0 (65,4–93,0)	80,8 (62,1–91,9)	80,8	84,0
HpSA	63,0 (44,2–78,7)	88,0 (70,0–95,3)	85,0	68,8
UDT	85,7 (65,4–95,2)	88,9 (71,9–96,5)	85,7	88,9

Tabela 4. Rezultati statistične analize s testom ROC za posamezne teste.

Testne spremenljivke	Površina pod krivuljo	Standardna napaka	(Asimptotski) 95 % interval zaupanja	
			spodnja meja	zgornja meja
IgA	0,670	0,101	0,471	0,868
IgG	0,733	0,092	0,553	0,912
HpSA	0,701	0,097	0,510	0,892
UDT	0,839	0,078	0,685	0,993

94,4%; Sn in Sp dihalnega testa s sečnino 93,3% in 98,1%; serološki test pa je pokazal 95,6% Sn in 92,6% Sp. Rezultati omenjene študije so podani glede na zlati standard, ki je oblikovan glede na rezultate testiranja z invazivnimi metodami (kultivacija, histološki pregled in ureazni CLO-test).

V literaturi je najti rezultate podobnih študij iz različnih koncev sveta tako na odrasli kot na pediatrični populaciji. Večkrat je poudarjen pomen lokalnega ovrednotenja neinvazivnih testov za dokazovanje okužbe s HP (21).

Za Slovenijo podatkov o diagnostični vrednosti kateregakoli od neinvazivnih testov za dokaz okužbe s HP nimamo. Tako je pričujoča študija prva v slovenskem prostoru, ki ugotavlja diagnostično vrednost neinvazivnih testov pri okužbi s *Helicobacter pylori* v otroški dobi.

Študije, omenjene v uvodu, so pokazale, da je HpSA v blatu zanesljiva metoda pri ugotavljanju okužbe s HP v vseh starostnih skupinah otroštva, čeprav Braden s sodelavci poroča o razmeroma nizki občutljivosti (83%) pri otrocih, mlajših od 6 let (13).

Naši rezultati kažejo nekoliko slabšo diagnostično vrednost v primerjavi z multicentrično japonsko študijo, ki je vključevala 64 otrok, starih 2–17 let, v kateri sta bili Sn in Sp ocenjeni na 96% in 96,8%; PPV in NPV

pa na 93,2% in 98,4%. Omenjena študija ni pokazala statistično pomembnih razlik med skupinami otrok različnih starosti (manj kot 5 let, 6–10 let, več kot 11 let) (3, 21). Roggero s sodelavci je ugotavljal diagnostično vrednost testa dokazovanja HpSA na vzorcu 85 otrok, starih od 20 mesecev do 17 let, v primerjavi z invazivnimi diagnostičnimi metodami kot zlatim standardom. Ugotovljeni Sn in Sp sta bili 100% in 70%, PPV in NPV pa 54% in 100% (3). Nemška študija na vzorcu 274 otrok, ki je za zlati standard prav tako vzela histologijo, kulturo in HUT, je dala naslednje rezultate: Sn 88,9%, Sp 94%. Starost ni pomembno vplivala na zanesljivost testa. V primerjavi z UDT se je test pokazal za manj zanesljivega (Sn 100%, Sp 98,9%) (12). Podobne rezultate je pokazala študija za ovrednotenje testa za dokaz antigena v blatu s pomočjo monoklonalnih

Tabela 6. Rezultati klasične diskriminantne analize za različne kombinacije testov.

Kombinacija testov	% pravilno uvrščenih enot
IgA, IgG	82,4
IgA, IgG, HpSA	80,0
IgA, IgG, UDT	87,2
HpSA, UDT	87,8
IgA, IgG, HpSA, UDT	85,7

Tabela 5. Rezultati statistične analize s testom ROC za različne kombinacije testov.

Testne spremenljivke	Površina pod krivuljo	Standardna napaka	(Asimptotski) 95 % interval zaupanja	
			spodnja meja	zgornja meja
IgA in IgG	0,781	0,085	0,615	0,948
IgA in IgG in HpSA	0,795	0,084	0,630	0,961
IgA in IgG in UDT	0,851	0,074	0,706	0,997
HpSA in UDT	0,855	0,073	0,711	0,999
IgA in IgG in HpSA in UDT	0,858	0,072	0,717	1,000

protiteles v blatu na pediatrični kliniki v Muenchnu, v katero so vključili kar 302 otroka z dispeptičnimi težavami (starost 0,5–18,7 let): Sn 99 %, Sp 98 %, PPV 98 %, NPV 99 % (30). Slovaška študija (91 otrok) je potrdila visoko Sn (90,3 %) in Sp (100 %), PPV (100 %) in NPV (95,2 %). Po mnenju avtorjev dokaz antigena v blatu lahko nadomesti endoskopijo pri ugotavljanju okužbe s HP (27).

Po drugi strani pa so rezultati lanske ameriške študije, v kateri je sodelovalo 120 otrok, pokazali razmeroma nizko občutljivost testa dokazovanja antigena HP v blatu: 67 %. Ocenjeni Sp, PPV in NPV pa so bile 99 %, 86 % in 97 %. Zaradi nizke občutljivosti test HpSA po mnenju avtorjev ne more nadomestiti zlatega standarda (28).

Njihovemu spoznanju se pridružujemo tudi mi, saj tudi naši rezultati ne potrjujejo visoke diagnostične vrednosti testa za dokaz HpSA. V naši študiji znaša Sn testa za dokaz antigena HP v blatu 63 %, Sp 88 %, PPV 85 % ter NPV 68,8 %. Površina pod ROC-krivuljo je 0,701, kar ne kaže na visoko diagnostično vrednost omenjenega testa, ampak kvečjemu na znatno (angl. *fair*).

Zaključujemo torej, da testa za dokazovanje HpSA ne moremo uporabiti za presejanje okužbe s *Helicobacter pylori* pri otrocih. Test pa lahko služi kot dopolnilni neinvazivni test za potrjevanje okužbe s HP pri otrocih in mladostnikih, morebiti kot eden od testov v kombinaciji, ter nam je v pomoč pri odločitvi ali bomo pri otroku, ki ima sumljive simptome in znake za okužbo s HP, opravili invazivne diagnostične teste ali ne.

Z našo študijo ocenjene vrednosti za urea dihalni test Sn 91 %, Sp 83 %, PNV 85,7 % in NNP 88,9 % so primerljive z rezultati tujih študij in tako potrjujejo visoko diagnostično vrednost urea dihalnega testa. Površina pod ROC-krivuljo je 0,839, kar prav tako kaže na dobro diagnostično vrednost.

Naši rezultati so nekoliko slabši v primerjavi z rezultati multicentrične japonske študije, ki je vključevala 220 otrok, starih od 2 do 16 let. Za primerjavo so vzeli invazivne diagnostične teste (kultura/histologija/HUT). Pri cut-off vrednosti sta bili ocenjeni Sp 97,8 % in Sn 98,5 %. Visoka Sp in Sn sta bili potrjeni v vseh starostnih skupinah (pod 5 let, 6–10, nad 11 let) (3, 17). Pomembno je vedeti, da je bila naša cut-off vrednost postavljena višje, na 0,4 %.

Brazilska študija, ki je vključevala 75 otrok, starih od 6 mesecev do 18 let, je primerjala UDT z zlatim standardom. Ocenjeni Sn in Sp sta bili 96,8 % in 93,2 %, PPV in NPV pa 90,9 % in 97,6 %. Pri otrocih, starih več kot 6 let, se je test pokazal kot zanesljiv, manj pa pri otrocih, mlajših od 6 let (3, 18). Španska študija, ki je vključila 100 otrok (9,2 ± 2 leti), je ocenila Sn, Sp, PNV in NPV 91 %, 97 %, 98 % in 90 %. Referenčni kriteriji za diagnozo okužbe s HP so temeljili na histologiji, kulturi in serologiji. Površina pod krivuljo ROC je bila 0,94. Vsi otroci v tej študiji so bili starejši od 4,5 let, zato študija ne podaja zaključkov za mlajše otroke (16). Visoka občutljivost in specifičnost sta bili potrjeni tudi pri turških otrocih, starih 3–18 let. Za primerjavo sta bili vzeta invazivna diagnostična testa (kultura in histologija) (3). Belgijska retrospektivna študija na 139 otrocih je ugotavljala zanesljivost urea dihalnega testa v primerjavi s serološko diagnostično metodo. UDT je pokazal višjo občutljivost (98 %) v primerjavi s serologijo (79 %) in primerljivo specifičnost (96 %) v primerjavi z 92 % pri serološkem testu. Avtorji zaključujejo, da je za dokaz aktivne Hp okužbe pri otrocih UDT bolj zanesljiv test kot serološka metoda (29).

Podobno potrjujejo tudi naši rezultati. Še več, na podlagi rezultatov naše študije zaključujemo, da bi lahko bil urea dihalni test kot samostojen test edini izmed proučevanih neinvazivnih testov primeren za presejanje okužbe s HP pri otrocih, ki imajo bolezenske težave, sumljive za okužbo s HP. Z uporabo UDT za presejanje okužbe s HP pri otrocih, ki imajo sumljive simptome in znake za okužbo s HP, bi lahko zmanjšali število invazivnih diagnostičnih preiskav, ki so za otroke zelo obremenilne ter bistveno dražje glede na urea dihalni test. Izračunano občutljivost smatramo za dovolj visoko, ker okužba s HP v otroštvu ni življenjsko nevarna. Kot najzanesljivejši neinvazivni diagnostični test je UDT med neinvazivnimi testi najširše uporaben, npr. v spremljanju uspešnosti zdravljenja, epidemioloških in drugih raziskavah.

Izračunani Sn in Sp za dokazovanje prisotnosti IgA-protiteles proti HP znašata 36,0 % in 96,2 %; PPV in NPV pa 90 % in 61 %.

Izračunani Sn in Sp za dokazovanje prisotnosti IgG-protiteles proti HP sta 84,0 % in 80,8 %, PPV in NPV pa 80,8 % in 84 %.

Površina pod krivuljo ROC za protitelesa IgA je 0,670, za IgG pa 0,733. Rezultata ne govorita v prid visoki diagnostični vrednosti obeh testov, ampak kvečjemu znatni.

Tuje študije ne navajajo ločenih rezultatov testov za dokaz protiteles IgA in IgG proti HP.

Turška študija, ki je ugotavljala vrednost serološke preiskave IgG s pomočjo metode Western blot, je ugotovila visoko Sn, Sp, PPV in NPV: 80 %, 100 %, 100 %, 85 %. Pri otrocih, mlajših od 7 let, je test pokazal nižjo občutljivost (30). Študija, ki je vključila 134 otrok, starih med 1 in 14 let, je ocenila diagnostično vrednost testa Western Blot kit (Helico Blot 2,1) v primerjavi z zlatim standardom. Ocenjeni Sn in Sp sta bili 98,6 % in 87,1 %. PPV in NPV pa 89,9 % in 98,3 % (31). 190 otrok je bilo vključenih v italijansko študijo, ki je ugotavljala diagnostično vrednost HpSA in seroloških testov. Test določanja Ag v blatu je pokazal višjo Sn in NPV (91,5 % in 96,5 %), medtem ko je metoda določanja protiteles proti HP pokazala višjo Sp in PNV (89,6 % in 76,0 %) (32).

V primerjavi z zgoraj navedenimi študijami naši rezultati kažejo slabšo zanesljivost in diagnostično vrednost. Po drugi strani pa so primerljivi oziroma kažejo večjo diagnostično vrednost od rezultatov študij, navedenih v nadaljevanju.

Japonska študija, ki je vključila 157 otrok, je primerjala vrednost serološkega testa (ELISA Ig A in Ig G) z določanjem HPs Ag v blatu. Za otroke, mlajše od 10 let, sta bili ugotovljeni Sn in Sp serološke metode 54,5 % in 62,1 %, pri otrocih, starejših od 10 let, pa so bili rezultati še slabši. Poleg tega ni prišlo do serokonverzije med sledenjem v enem letu študije, čeprav je bila dokazana uspešnost zdravljenja okužbe HP s testom ugotavljanja HpSA. Avtorji navajajo, da je vzrok temu prav v nezrelem imunskem odzivu ali toleranci na HP v otroštvu, zato je serološka diagnostika HP okužbe manj zanesljiva pri otrocih, mlajših od 10 let (3, 14).

Po mnenju nekaterih avtorjev imajo serološke metode, z izjemo epidemioloških raziskav, omejeno diagnostično uporabnost, saj pozitivni titri še ne pomenijo prisotnosti aktivne okužbe (16).

Študija, ki je ugotavljala diagnostično vrednost dveh seroloških preiskav (FlexSure; SmithKline Diagnostics Inc., Philadelphia,

PA, USA in Medmira, MedMira Laboratories, Dartmouth, Canada), je vključila 349 preiskovancev, tako brezsimptomnih kot simptomatskih otrok in njihovih staršev. Zlati standard za primerjavo je bila kultura/histologija/C13-UDT. Ocenjena Sn je znašala 59 % in 71 %, Sp pa 92 % in 98 %, PPV 55 % in 88 %, NPV pa 93 % in 94 %. Test se je pokazal za manj zanesljivega pri otrocih kot pri odraslih. Razlog naj bi bila nižja pogostnost (prevalenca) okužbe s HP pri otrocih in dejstvo, da imajo otroci nasploh nižje vrednosti protiteles v primerjavi z odraslimi. Avtorji študije ne svetujejo uporabe omenjenih testov za presejanje okužbe s HP pri otrocih (3).

Tudi na podlagi naših rezultatov ne moremo potrditi uporabe seroloških testov za presejanje okužbe s *Helicobacter pylori* pri otrocih. Dokazovanje protiteles proti HP pa je ob upoštevanju omejitvev potencialno uporabna metoda za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja okužbe s HP (pride do padca titra protiteles) ter morebitne ponovitve okužbe s HP. Predvsem pa ima veljavo v epidemioloških študijah, ker gre za enostaven in razmeroma poceni test.

S pomočjo iskanja ustreznih kombinacij posameznih neinvazivnih testov smo želeli preveriti, ali je možno izboljšati njihovo diagnostično moč in ugotoviti, katera od možnih kombinacij ima najvišjo diagnostično vrednost. V literaturi tovrstnih študij nismo zasledili.

Rezultati testa ROC so pokazali, da je pri vseh možnih kombinacijah posameznih testov površina pod krivuljo v intervalu, ki kaže dobro diagnostično vrednost. Najvišjo diagnostično vrednost ima kombinacija vseh štirih testov: serološke metode določanja IgA-protiteles, IgG-protiteles, dokazovanja HpSA in urea dihalnega testa (površina pod krivuljo ROC je v tem primeru največja in znaša 0,858). Le nekoliko manjšo diagnostično vrednost ima kombinacija HpSA in urea dihalnega testa (površina pod ROC krivuljo znaša 0,855) in kombinacija IgA, IgG in urea dihalnega testa (površina pod ROC krivuljo je 0,851). Kombinacija testov: IgA, IgG in HpSA v blatu kaže slabšo diagnostično vrednost (površina pod ROC-krivuljo 0,795). Najslabšo diagnostično vrednost kaže kombinacija IgA in IgG (površina pod ROC-krivuljo 0,781).

Če primerjamo vrednosti površin pod krivuljo ROC različnih kombinacij testov z vrednostmi površin pod krivuljo ROC za posamezne teste, ugotovimo, da so posamezni testi manj zanesljivi kot kombinacije le-teh. Izjema je le urea dihalni test (površina pod krivuljo 0,839), ki kaže kot samostojen test višjo diagnostično vrednost v primerjavi s kombinacijo z določanjem IgA in IgG (površina pod krivuljo 0,781) ali s kombinacijo IgA in IgG, ter dokazovanjem HpSA (površina pod krivuljo 0,795). Kljub temu kombinacija urea dihalnega testa s serologijo in/ali testom za dokaz Ag v blatu kaže na višjo diagnostično vrednost kot samostojna uporaba urea dihalnega testa.

Diskriminantna klasična analiza zanesljivosti različnih kombinacij testov je pokazala nekoliko drugačne rezultate kot analiza z ROC-testom. Najvišjo diagnostično vrednost imata kombinacija testa za dokaz HP Ag v blatu in UDT: 87,8 % ter kombinacija določanja IgA, IgG in UDT: 87,2 %. Nekoliko slabšo diagnostično vrednost kaže kombinacija vseh štirih neinvazivnih testov (IgA, IgG, HpsAg v blatu in UDT): 85,7 %. Najslabšo diagnostično vrednost pa kažeta kombinacija IgA in IgG: 82,4 % ter kombinacija IgA, IgG in dokaz Ag v blatu: 80,0 %.

Če pri vrednotenju upoštevamo rezultate obeh testov (ROC-testa in diskriminantne klasične analize), lahko sklepamo, da je najbolj zanesljiva kombinacija testa za dokaz okužbe s HP dokazovanje Ag v blatu in urea dihalnega testa. Manjšo zanesljivost kaže kombinacija vseh štirih testov, sledi kombinacija določanja IgA, IgG in urea dihalnega testa. Najmanj zanesljivi pa sta kombinaciji IgA, IgG z/brez testa za dokaz HP Ag v blatu.

Zaključujemo, da ima kombinacija vseh štirih neinvazivnih testov višjo diagnostično vrednost kot katerikoli samostojen test. Enako velja za kombinacijo urea dihalnega testa

z dokazom HpSA ali s serologijo. Zaradi dobre zanesljivosti (diagnostične vrednosti) bi se omenjene kombinacije testov lahko uporabljale kot presejalni testi pri otrocih in mladostnikih z anamnestično-kliničnim sumom na okužbo s HP. Na ta način bi lahko predvideli, pri katerih bolnikih bodo potrebne invazivne diagnostične preiskave.

ZAKLJUČEK

Kot presejalni test je klinično kot samostojen test uporaben samo urea dihalni test, ki je zadostno občutljiv in specifičen. Kombinacija vseh štirih neinvazivnih testov ima višjo diagnostično vrednost kot katerikoli samostojen test. Enako velja za kombinacijo urea dihalnega testa z dokazom HpSA v blatu ali serologijo (IgA, IgG). Zaradi visoke diagnostične vrednosti bi se omenjene kombinacije testov lahko uporabljale kot presejalni testi pri otrocih in mladostnikih z anamnestično-kliničnim sumom na okužbo s HP. Serološki testi so uporabni za epidemiološke študije in potencialno za ugotavljanje uspešnosti zdravljenja okužbe s HP ter morebitne ponovitve okužbe s HP. Test za določanje HpSA je uporaben le kot dopolnilni test za potrjevanje okužbe s HP, kot samostojen test pa ima premajhno diagnostično vrednost za presejanje.

ZAHVALA

Mentorici prim. prof. dr. Dušanki Mičetić-Turk, dr. med., višji svetnici, in somentorici asist. mag. Darji Urlep, dr. med., se iskreno zahvaljujemo za vodenje in spodbudo pri pravi naloge ter za pridobljeno znanje.

Najlepša hvala prof. dr. Petru Kokolu, univ. dipl. ing. el., za nasvete pri statistični obdelavi podatkov.

Vsem preiskovancem hvala za sodelovanje.

LITERATURA

1. Bujanover Y, Reif S, Yahav J. *Helicobacter pylori* and peptic disease in the pediatric patient. *Pediatr Gastroenterol* 1996; 43: 213-33.
2. Elitsur Y, Lawrence Z, Triest WE. Distribution of *Helicobacter pylori* organisms in the stomachs of children with *H. pylori* infection. *Hum Pathol* 2002; 33: 1133-5.
3. Wewer V, Kalach N. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2003; 8 Suppl 1: 61-6.
4. Mičetić-Turk D. Okužba s *Helicobacter pylori* pri otrocih in mladostnikih. Zbornik III. kongresa šolske in visokošolske medicine Slovenije; 2001; Novo mesto. Ljubljana: Sekcija za šolsko in visokošolsko medicino SZD, 2001.

5. Gold BD, Colleti RB, Abbott M, et al. *Helicobacter pylori* infection in children: recommendations for diagnosis and treatment. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 31: 490-7.
6. Drumm B, Koletzko S, Oderda G. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. European Paediatric Task Force on *Helicobacter pylori*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 30: 207-13.
7. Editorial: Guidelines for the treatment of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? Annals of Pharmacotherapy 1997; 31: 1247-9.
8. Osredkar J. Dihalni test s sečnino – njegovo mesto v diagnostiki. Zdrav Vest 2004; 1: 14-7.
9. Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? Ann Med 2001; 33: 91-7.
10. Mičetić-Turk D. *Helicobacter pylori* in children. Advances in paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. Zagreb: ESPGHAN Summer School: Croatia&Slovenia, 2001; 45-50.
11. Nijevitch AA, Shcherbakov PL. Quantitative assessment of gastric juice urease activity in children infected with *Helicobacter pylori*. Am J Gastroenterol 2002; 1845-6.
12. Konstantopoulos N, Russmann H, Tasch C, et al. Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen test (HpSA) for detection of *Helicobacter pylori* in children. Am J Gastroenterol 2001; 96: 677-83.
13. Moran AP, Svennerholm AM, Penn CV. Pathogenesis and host response of *Helicobacter pylori*. Trends Microbiol 2002; 10: 545-7.
14. Okuda M, Miyashiro E, Koike M, et al. Serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infection is not accurate for children below 10. Pediatrics International 2002; 44: 387-90.
15. Kato S, Tachikawa T, Ozawa K, et al. Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter pylori* infection in children. Pediatrics 2001; 107 (6): 87-92.
16. Canete A, Abunaji Y, Alvarez-Calatayud G, et al. Breath test using a single 50-mg dose of ¹³C urea to detect *Helicobacter pylori* infection in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36: 105-11.
17. Kato S, Ozawa K, Konno M, et al. Diagnostic accuracy of the ¹³C-urea breath test for childhood *Helicobacter pylori* infection: a multicenter Japanese study. Am J Gastroenterol 2002; 97: 1668-73.
18. Kawakami E, Strehl Machado R, Reber M, et al. ¹³C urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002; 35: 39-43.
19. Goščiniak G, Przondo-Mordarska A, Iwanczak B, et al. *Helicobacter pylori* antigens in stool specimens of gastritis children before and after treatment. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36: 376-80.
20. Roggero P, Bonfiglio A, Luzzani S, et al. *Helicobacter pylori* stool antigen test: a method to confirm eradication in children. J Pediatr 2002; 250: 775-7.
21. Kato S, Ozawa K, Okuda M, et al. Accuracy of the stool antigen test for the diagnosis of childhood *Helicobacter pylori* infection: a multicenter Japanese study. Am J Gastroenterol 2003; 98: 296-300.
22. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol. 1996; 20 (10): 1161-81.
23. Anon. Enzyme Immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* antigens in stool specimens for diagnosis and monitoring. Cincinnati, ZDA: Meridian Bioscience, Inc.; 2001.
24. Anon. SERION ELISA classic *Helicobacter pylori* IgG/IgM/IgA: Gebrauchsanweisung. Wuerzburg, Nemčija: Institut Virion Serion GmbH; 2002.
25. Premik M. Uvod v epidemiologijo. Ljubljana: Inštitut za socialno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani; 1998.
26. Monteiro L, DeMascarel A, Sarrasqueta AM, et al. Noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. Am J Gastroenterol 2001; 96: 353-8.
27. Sykora J, Valecka K, Hejda V, et al. Accurate noninvasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using antigen determination in the feces in the pediatric population (abstract). Cas Lek Cesk 2002, 141 (13): 425-7.
28. Elitsur Y, Lawrence Z, Hill I. Stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children with symptomatic disease: a prospective study. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2004; 39 (1): 64-67.
29. Corvaliga L, Bontems P, Devaster JM, et al. Accuracy of serology and ¹³C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* in children. Pediatr infect Dis J. 1999; 18 (11): 976-9.
30. Ogunc D, Artan R, Ongut G, et al. Evaluation of a Western blot technique (Helicoblot 2.1) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. Pathology 2003, 35 (2): 157-60.
31. Oleastro M, Matos R, Cabral J, et al. Evaluation of a Western blot test, Helico blot 2.1, in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a pediatric population. Helicobacter 2002; 7 (3): 210-5.
32. Bonamico M, Strappini PM, Bonci E, et al. Evaluation of stool antigen test, PCR on oral samples and serology for the noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in children. Helicobacter 2004, 9 (1): 69-76.