
REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Biomarkeri ai inflamației și riscul neoplazic la nivelul tractului digestiv superior

Doctorand **Alexandra Loor (Coroian)**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Dan Lucian Dumitrașcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Inflamația	19
1.1. Definiția inflamației	19
1.2. Epidemiologia inflamației cronice	20
1.3. Patogeneza inflamației	20
1.3.1. Activarea receptorilor inflamatori	20
1.3.2. Activarea căilor de semnalizare intracelulară	20
1.3.3. Eliberarea markerilor inflamatori	21
1.3.4. Recrutarea celulelor inflamatorii	22
1.3.5. Rezoluția inflamației	23
1.4. Tipuri histo-patologice ale inflamației cronice	23
1.5. Factori de risc asociați cu inflamația cronică	23
1.6. Inflamația și carcinogeneza	24
1.7. Inflamația în recurența cancerului	27
2. Neoplaziile tractului digestiv superior	29
2.1. Cancerul esofagian	29
2.1.1. Prevalența cancerului esofagian	29
2.1.2. Carcinomul esofagian cu celule scuamoase	29
2.1.3. Adenocarcinomul esofagian	29
2.2. Cancerul gastric	30
2.2.1. Prevalența cancerului gastric	30
2.2.2. Factori de risc generali ai cancerului gastric	31
2.2.3. Carcinomul gastric	31
2.2.4. Limfomul gastric	32
2.3. Tumorile gastro-intestinale stromale (GIST)	32
2.4. Tumorile maligne ale cavității bucale	32
3. Helicobacter pylori	35
3.1. Istoric	35
3.2. Epidemiologia infecției cu Helicobacter pylori	35
3.2.1. Prevalența și distribuția geografică	35
3.2.2. Sursa infecției	36
3.2.3. Căi de transmitere a infecției	36

3.3. Microbiologie	36
3.3.1. Morfologia Helicobacter pylori	36
3.3.2. Profilul enzimatic	37
3.3.3. Condiții de creștere	37
3.4. Diagnosticul infecției cu Helicobacter pylori	37
3.4.1. Mijloace non-invazive de diagnostic	37
3.4.1.1. Testul respirator	37
3.4.1.2. Testul vaporilor de amoniac	38
3.4.1.3. Teste serologice	38
3.4.1.4. Teste salivare și urinare	38
3.4.1.5. Antigenul fecal pentru Helicobacter pylori	38
3.4.2. Mijloace invazive de diagnostic	39
3.4.2.1. Histologia	39
3.4.2.2. Testul ureazei	39
3.4.2.3. Cultura și testarea rezistenței la antibiotice	39
3.4.2.4. Amplificarea genetică a ADN-ului bacterian în fragmente de mucoasă gastrică (PCR și RT-PCR)	40
3.4.2.5. Hibridizarea fluorescentă in situ (FISH)	40
3.5. Infecția cu Helicobacter pylori și carcinogeneza	40
3.6. Boli asociate infecției cu Helicobacter pylori	41
3.6.1. Afecțiuni gastrice	41
3.6.2. Afecțiuni extra-gastrice	42
4. Gastropanel	43
4.1. Semnificația testului	43
4.2. Componentele Gastropanel	43
4.3. Acuratețea Gastropanel	44
5. Peptestul salivar	47
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	51
2. Studiul 1. Prevalența infecției cu Helicobacter pylori în rândul pacienților dispeptici din regiunea Nord-Vestică a României	53
2.1. Introducere	53
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	54
2.3. Material și metodă	54
2.4. Rezultate	55
2.5. Discuții	58
2.6. Concluzii	63

3. Studiul 2. Infecția cu Helicobacter pylori diagnosticată cu ajutorul testului respirator C13 în rândul studenților mediciști români	65
3.1. Introducere	65
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
3.3. Material și metodă	66
3.4. Rezultate	68
3.5. Discuții	71
3.6. Concluzii	75
4. Studiul 3. Studiu comparativ a 2 teste fecale imunocromatografice de antigen fecal Helicobacter pylori	77
4.1. Introducere	77
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	78
4.3. Material și metodă	78
4.4. Rezultate	79
4.5. Discuții	86
4.6. Concluzii	88
5. Studiul 4. Prevalența refluxului gastro-esofagian în rândul studenților de la canto	89
5.1. Introducere	89
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	90
5.3. Material și metodă	91
5.4. Rezultate	92
5.5. Discuții	94
5.6. Concluzii	96
7. Concluzii generale (sinteză)	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: inflamație, Helicobacter pylori, boala de reflux gastro-esofagian, cancer esofagian, cancer gastric, test respirator cu uree-C13.

Introducere

Neoplaziile tractului digestiv superior au o etiologie heterogenă cu o agresivitate crescută și constituie în continuare o problemă de sănătate la nivel mondial. În ultimele decade, cancerul gastric afișează o tendință universală de scădere, tendință observată în special pentru tipurile de cancer gastric non-cardial, în timp ce cancerurile gastrice de tip cardinal au înregistrat o tendință de creștere sau staționară. În ceea ce privește cancerurile esofagiene, par și acestea să aibă o tendință globală de scădere, dar analizând însă tipurile histo-patologice, se constată o creștere semnificativă și susținută a adenocarcinoamelor esofagice. Inflamația cronică este direct implicată în procesul de carcinogeneză prin numeroase mecanisme. În esență, aceasta determină

modificări epigenetice cu anularea secundară a genelor supresoare tumorale, determină apariția speciilor reactive de azot și oxigen și stimulează producerea a numeroși factori proinflamatori care sunt implicați în proliferarea tumorală, în angiogeneză precum și în invazia metastatică. Factorul principal de risc în apariția adenocarcinomului esofagian îl reprezintă refluxul gastro-esofagian, atât cel acid cât și cel biliar, prin inducerea metaplaziei intestinale columnare, modificare precursore adenocarcinomului esofagian. Includerea infecției cu H Pylori în categoria factorilor de risc ai apariției cancerului esofagian este controversată, existând studii care susțin ipoteza că infecția ar constitui un factor protector și altele care rețin contribuția bacteriei în carcinogeneza esofagiană. Infecția cu *Helicobacter pylori* (H pylori), agent bacterian considerat carcinogen de clasa 1 de către Organizația Mondială a Sănătății (OMS) încă din anul 1994, este principalul agent etiologic al cancerului gastric.

Infecția cu H pylori reprezintă una dintre cele mai răspândite infecții la nivel mondial, studiile publicate indicând faptul că mai mult de jumătate din populația mondială o are. Ultimele date în ceea ce privește infecția cu H pylori în Europa au fost publicate în anul 2018 și indică cea mai mică prevalență a infecției în Nordul Europei și cea mai mare în Estul și Sudul Europei. În ultimii ani, s-a observat o scădere a prevalenței infecției cu H pylori în majoritatea zonelor geografice la nivel mondial. În România, primele publicații despre bacteria H pylori au apărut în anul 1990, însă până în prezent datele epidemiologice sunt puține, lipsind cu desăvârșire pentru multe regiuni ale țării. Studiul prevalenței infecției cu H pylori precum și îmbunătățirea metodelor de diagnostic sunt esențiale în managementul corect al bolii.

Contribuția personală:

Ipoteza generală

Infecția cu H pylori, carcinogen de clasa I conform OMS este principalul factor de risc în dezvoltarea cancerului gastric și conform ultimelor studii se pare că această bacterie este implicată și în apariția cancerului esofagian. Refluxul gastro-esofagian reprezintă principalul factor etiologic în dezvoltarea cancerului esofagian de tip adenocarcinom. Întregul proces al carcinogenezei în neoplaziile tractului digestiv superior are la baza modificările de inflamație cronică. Identificarea corectă a infecției cu H pylori și a refluxului gastro-esofagian conduce la stabilirea populației care prezintă risc crescut de a dezvolta neoplazii ale tractului digestiv superior. Acești pacienți necesită o supraveghere corectă în vederea eradicării infecției și a diagnosticării modificărilor preneoplazice (esofag Barrett, metaplazie intestinală gastrică, gastrită cronică atrofică) sau a cancerelor în stadii incipiente.

Obiectivele generale ale cercetării

- a. Determinarea prevalenței infecției cu H pylori în rândul pacienților dispeptici și non-dispeptici din zona de Nord-Vest a României și compararea rezultatelor cu cele de literatură.
- b. Compararea prevalenței infecției cu H pylori cu trendul epidemiologic al cancerelor esogastrice din România.
- c. Determinarea prevalenței infecției cu H pylori și a dispepsiei în rândul studenților la Medicină.
- d. Compararea a 2 teste fecale ale antigenului H pylori în vederea optimizării diagnosticului și compararea acestora cu examinarea histo-patologică într-un centru terțiar din Nord-Vestul României.
- e. Evaluarea non-invazivă a refluxului gastro-esofagian la un grup profesional de risc: studenții de la canto.

Primul studiu a avut ca obiectiv principal estimarea prevalenței infecției cu H pylori în rândul pacienților dispeptici din regiunea de Nord-Vest a României. Obiectivul secundar a fost de a efectua o analiză a trendului epidemiologic al infecției cu H pylori în rândul populației simptomatice din această regiune a țării comparând datele cu cele existente în literatură.

Material și metodă: S-a efectuat un studiu retrospectiv în care au fost incluși 414 pacienți

dispeptici care s-au adresat unui centru secundar "Policlinica Salvosan Ciobanca" din Zalău, Sălaj, România în perioada 2014-2018 la care au fost dozați anticorpii Ig G anti-H pylori. Principala variabilă urmărită a fost rezultatul serologic al anticorpilor H pylori. Ca predictorii, s-a colectat data despre vârsta, sexul, mediul de proveniență și anul testului serologic.

Rezultate: Din cei 414 pacienți care au fost incluși în studiu, 42.2% (175 pacienți) au fost din zone rurale și 57.7% (239 pacienți) au fost din zona urbană. În ceea ce privește distribuția pe sexe 63.8% au fost femei și 36.2% au fost bărbați. Vârsta medie a fost de 21 de ani. Din cei 414 pacienți, 40.8% (n=169) au avut Ig G anti-H pylori pozitivi și 59.2% (n=245) au avut Ig G anti-H pylori negativi. În ceea ce privește testele pozitive, procentele au fost aproximativ la fel, cu valori ușor mai crescute în rândul bărbaților 41.33% față de femei 40.53%, dar cu o diferență care nu a fost statistic semnificativă. S-a găsit o prevalență a infecției mai mare în zonele rurale 42.29% față de 39.75% în zonele urbane, dar fără semnificație statistică (p=0.6). Cea mai mare prevalență a fost observată în anul 2018 cu o valoare de 48.86% (43/88) și o valoare a p=0.01.

Concluzii: Studiul nostru a relevat faptul că, în rândul pacienților dispeptici din regiunea de Nord-Vest a României, în care au fost incluși atât copii cât și adulți, prevalența infecției cu H pylori a fost mai mare de 40%. Comparând rezultatele noastre cu cele din studiile anterioare privind prevalența infecției cu H pylori din România, am reușit să detectăm o scădere a ratei infecției cu H pylori pe un interval de 30 de ani.

Al doilea studiu – a investigat prevalența infecției cu H pylori în rândul studenților mediciști utilizând testul respirator cu uree marcată C13. S-a evaluat și prezența dispepsiei la această categorie de subiecți precum și relația dintre dispepsie și infecția cu H pylori.

Material și metodă: S-a efectuat un studiu prospectiv în care au fost incluși 150 de studenți din primul și al treilea an de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România, în perioada septembrie-octombrie 2019. Au fost înrolați în studiu studenții de la Medicină Generală și Stomatologie (primul și al treilea an), indiferent de prezența sau absența simptomatologiei digestive care s-au prezentat voluntar și au semnat consimțământul informat. Aceștia au fost testați pentru infecția cu H pylori folosind testul respirator cu uree marcată cu C13. Au fost excluși din studiu studenții care au mâncat, au fumat cu mai puțin de 4 ore anterior testării precum și pe cei care au urmat tratamente anterioare cu antiacide, IPP sau antibiotice (cu 4 săptămâni înainte de testare) sau cei care au avut antecedente de infecție cu H pylori pentru care au urmat protocolul de eradicare cu mai puțin de 8 săptămâni în urmă. Toți studenții au completat chestionarul Roma IV al dispepsiei funcționale precum și un chestionar legat de simptomatologie, antecedente patologice, familiale și condiții de viață.

Rezultate: Din cei 150 de studenți 68% (102) au fost femei și 32% (48) au fost bărbați. În ceea ce privește mediul de proveniență 16.67% au fost din mediul rural. Majoritatea participanților la studiu au fost din zona Transilvaniei (regiunea de Nord-Vest a României), numai 16% (24) au provenit din alte regiuni ale țării. Media vârstei a fost de 21 de ani. 45 de studenți au fost din anul 1 iar restul de 105 din anul 3 de facultate. Prevalența infecției cu H pylori a fost de 25.33%, respectiv 38 din cei 159 de studenți înrolați în studiu au avut testul pozitiv. Conform chestionarului Roma IV 18% din studenți au întrunit criteriile pentru dispepsia funcțională. Dintre cei care au întrunit criteriile de dispepsie funcțională 37% (10) au avut testul respirator pozitiv. Conform chestionarelor, 8% (12 din 150) au avut istoric de infecție cu H pylori. Din cei 12 studenți cu istoric de infecție cu H pylori 5 au avut un nou test pozitiv.

Nu am găsit o asociere semnificativă statistic între consumul de medicație AINS, alcool, fumat și dispepsia funcțională. În studiul de față studenții din primul an au avut un risc de 1.21 (95% CI 0.68 - 2.15) mai mare de a prezenta infecție cu H pylori (23.8%, n=25) decât cei din anul 3 (23.8%, n=13), dar cu o asociere care nu a fost semnificativă statistic (p=0.512). Cei cu antecedente de infecție cu H pylori au prezentat un risc de 4.45 ori (95% CI 1.6 - 12.37) mai mare de a avea dispepsie funcțională față de cei fără astfel de istoric.

Concluzii: Conform cunoștințelor noastre, acest studiu este primul raport privind prevalența infecției cu *H. pylori* în rândul studenților la Medicină investigați cu testul respirator cu uree-C13 din Nord-Vestul României. Prevalența infecției a fost de 25,33%. 18% dintre studenți au îndeplinit criteriile Roma IV pentru dispepsia funcțională. Nu am găsit nicio asociere semnificativă statistic între infecția *H. pylori* și criteriile Rome IV pentru dispepsie funcțională. Cei cu antecedente de infecție cu *H. pylori* au prezentat un risc de 4,45 ori mai mare de a dezvolta dispepsie funcțională.

Al treilea studiu -a avut ca obiectiv compararea a 2 teste fecale de antigen *H. pylori* imunocromatografice. Totodată s-a analizat acuratețea lor prin compararea cu rezultatele obținute prin examinarea histo-patologica.

Material și metodă: S-a efectuat un studiu prospectiv în care au fost incluși 150 de pacienți cu simptomatologie gastro-intestinală care s-au prezentat în cadrul Departamentului de Medicină Internă a Spitalului Județean de Urgență Cluj-Napoca în perioada iunie 2019-februarie 2020. Au fost excluși pacienții care au avut tratamente anterioare cu antiacide, IPP sau antibiotice (cu 4 săptămâni înainte de testare), cei care au avut antecedente de infecție HP pentru care au urmat protocolul de eradicare cu mai puțin de 8 săptămâni în urmă. Toți pacienții au efectuat analize biologice și ecografie abdominală. S-a efectuat testarea infecției cu *H. pylori* cu ajutorul testului antigen fecal utilizat în cadrul spitalului kitul imunocromatografic Healgen. Pentru toți cei care au avut un test pozitiv s-a efectuat endoscopie digestivă superioară. Comparativ din aceeași proba biologică s-a efectuat și testarea antigenului fecal *H. pylori* cu ajutorul kitului imunocromatografic de la CTK. Am analizat în cadrul studiului datele demografice, stilul de viață, simptomatologie, istoricul infecției cu *H. pylori*, protocolul de eradicare, simptomele de alarmă, antecedente familiale de neoplazii și am efectuat comparație între cele 2 teste fecale imunocromatografice. Deasemenea am analizat pe un subgrup de pacienți (n=58) la care s-a efectuat endoscopie digestivă superioară datele endoscopice și am comparat acuratețea testului fecal studiat cu cea obținută din rezultatul histopatologic.

Rezultate: Din toți cei 150 de pacienți, 70% (105) au fost femei și 30% (45) au fost bărbați. În ceea ce privește mediul de proveniență 46,67% au provenit din mediul rural. Media vârstei a fost de 64 de ani. Majoritatea subiecților 86,67% au provenit din partea de Nord-Vest a țării. Din cei 150 de pacienți investigați 40% s-au prezentat pentru simptome dispeptice, iar din aceștia 21,6% au avut infecție cu *H. pylori*. În rândul celor fără dispepsie 18,8% au avut infecția cu *H. pylori*. Analizând rezultatele testului fecal *H. pylori* studiat de la CTK s-a găsit o sensibilitate de 100 %, și o specificitate de 95,2 %. Acuratețea diagnostică a fost de 96%. Când s-a analizat întregul eșantion de subiecți s-a constatat o concordanță ridicată între cele două teste fecale pentru diagnosticul infecției *H. pylori*, măsurată prin indicele Kappa al lui Cohen 0,87 (95% CI: 0,77 - 0,97), $p < 0,001$, și cu indicele Kappa ajustat pentru prevalență și bias 0,92. Concordanța totală observată a fost de 96,0%. S-a comparat acuratețea diagnostică a testului folosit în spital (Healgen) și a celui nou (CTK) în comparație cu examinarea standard histopatologică efectuată la un subgrup de pacienți (n = 58). Ambele teste au avut aceeași specificitate de 93,4%, dar testul utilizat în spital (Healgen) a avut o sensibilitate mai slabă (72%) comparativ cu sensibilitatea ridicată a testului nou CTK (96%). Cei care au avut infecție cu *H. pylori* confirmată la examinarea histo-patologică, au avut ca modificări endoscopice principale pangastrita erozivă și bulbita erozivă.

Concluzii: Când s-a analizat întregul eșantion de subiecți s-a constatat o concordanță ridicată între cele două teste fecale pentru diagnosticul infecției *H. pylori*, respectiv 96,0% cu un dezacord de 4% observat între testul fecal CTK pozitiv și cel Healgen negativ. Prevalența infecției cu *H. pylori* a avut procente de 16,67% respectiv 20,67% (în funcție de test). Pe subgrupul de pacienți la care s-au comparat cele 2 teste imunocromatografice cu examinarea histopatologică a fost relevantă aceeași specificitate a testelor de 93,4% dar o sensibilitate superioară pentru testul

comparat CTK de 96% versus 72% a testului Healgen utilizat în cadrul spitalului. Din cei 150 de pacienți investigați 40% s-au prezentat pentru simptome dispeptice, iar din aceștia 21,6% au avut infecție cu H pylori. În rândul celor fără dispepsie 18.8% au avut prezentă infecția cu H pylori.

Al patrulea studiu - a avut ca obiectiv evaluarea bolii de reflux gastro-esofagian la studenții de la canto și compararea cu prevalența acestei patologii în rândul studenților mediciști și a rezidenților.

Metodă și materiale : S-a efectuat un studiu de tip caz-control în care au fost incluși 30 de studenți din cadrul Academiei de Muzică "Gheorghe Dima" din Cluj-Napoca, de la secția canto. Au fost excluși din studiu cei care nu au dorit să participe, cei care au avut istoric de patologii care ar putea produce reflux gastro-esofagian și de asemenea cei care au utilizat medicație antiacidă cu cel puțin 48 de ore înaintea examinării. Ca și control au fost recrutați 20 de studenți mediciști și rezidenți cu o distribuție similară în ceea ce privește vârsta și sexul. S-a făcut o evaluare a simptomatologiei utilizând chestionare legate de simptomatologie de reflux și stil de viață. Pentru toți subiecții incluși în studiu s-a efectuat testul salivar Peptest.

Rezultate: În studiu au fost incluși 30 de studenți cântăreți cu vârsta medie a grupului de 23 de ani. În grupul celor 20 de studenți mediciști și rezidenți care au constituit grupul martor vârsta medie a fost de 27 de ani. În rândul cântăreților 40% (12 persoane) au fost de sex masculin și 60% (18 persoane) de sex feminin. În grupul control 35% (5 persoane) au fost bărbați și 65% (15 persoane) au fost femei. În ceea ce privește stilul de viață, în rândul studenților cântăreți aproape jumătate (46.7%) nu consumă deloc alcool, 50% ocazional, 3.3% zilnic. Fumatul s-a regăsit într-un procent de 10% în grupul studiat. Din cei 30 de studenți cântăreți 50% (15 subiecți) au raportat simptome de reflux gastro-esofagian, ($p < 0.001$) dintre care simptomele principale au fost reprezentate de pirozis și răgușeală. Peptestul salivar a fost pozitiv într-un procent foarte mare 96.67%, respectiv 29 din cei 30 de studenți cântăreți față de 30%, 6 subiecți din cei 20 din grupul control cu un p semnificativ statistic. Conform rezultatelor studiului, studenții de la secția canto au o probabilitate de 3,22 de ori mai mare de a avea reflux gastro-esofagian față de populația generală.

Concluzii: Studenții de la canto prezintă un risc mai mare de a dezvolta reflux gastro-esofagian. Peptestul salivar, ar putea fi o metodă total neinvazivă, foarte utilă în diagnosticarea BRGE la acești pacienți.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Un punct de originalitate al tezei constă în faptul că ea cuprinde un studiu al tendinței epidemiologice a infecției cu H pylori în România, al doilea în ultimii 30 de ani, primul fiind efectuat în anul 2009. Analizând datele obținute și comparându-le cu cele preexistente, s-a detectat o scădere a prevalenței la toate grupele de vârstă. În teză se regăsește primul studiu din România în ceea ce privește prevalența infecției cu H pylori în rândul studenților mediciști, o grupă cu risc profesional, diagnosticul infecției fiind verificat cu ajutorul testului respirator cu uree-C13. Testele fecale ale antigenului fecal sunt extrem de folosite în practica clinică pentru diagnosticarea infecției cu H pylori. În urma studiului comparativ a două teste fecale imunocromatografice cu examinarea histopatologică a fost relevată o sensibilitate mai mică a testului folosit în cadrul spitalului față de cea a testului studiat. Concordanța între cele două teste a fost de 96%. Îmbunătățirea metodelor de diagnostic ale infecției cu H pylori este extrem de importantă în managementul corect al acestei patologii. Teza conține primele date legate de refluxul gastro-esofagian, factorul principal în apariția adenocarcinomului esofagian, în rândul studenților de la canto. Cu ajutorul Peptestului salivar s-a constatat o prevalență de 96% a refluxului gastro-esofagian la această categorie de subiecți.

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

Biomarkers of inflammation and neoplastic risk in the upper digestive tract

Doctoral candidate **Alexandra Loor (Coroian)**

Doctoral supervisor **Prof. Dr. Dan Lucian Dumitraşcu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Inflammation	19
1.1. Definition of inflammation	19
1.2. Epidemiology of chronic inflammation	20
1.3. Pathogenesis of inflammation	20
1.3.1. Activation of inflammatory receptors	20
1.3.2. Activation of intracellular signaling pathways	20
1.3.3. Release of inflammatory markers	21
1.3.4. Recruitment of inflammatory cells	22
1.3.5. Inflammation resolution	23
1.4. Histopathological types of chronic inflammation	23
1.5. Risk factors associated with chronic inflammation	23
1.6. Inflammation and carcinogenesis	24
1.7. Inflammation in cancer recurrence	27
2. Neoplasms of the upper digestive tract	29
2.1. Esophageal cancer	29
2.1.1. Prevalence of esophageal cancer	29
2.1.2. Esophageal squamous cell carcinoma	29
2.1.3. Esophageal adenocarcinoma	29
2.2. Gastric cancer	30
2.2.1. Prevalence of gastric cancer	30
2.2.2. General risk factors for gastric cancer	31
2.2.3. Gastric carcinoma	31
2.2.4. Gastric lymphoma	32
2.3. Gastrointestinal stromal tumors (GIST)	32
2.4. Malignant tumors of the oral cavity	32
3. Helicobacter pylori	35
3.1. History	35
3.2. Epidemiology of Helicobacter pylori infection	35
3.2.1. Prevalence and geographical distribution	35
3.2.2. Source of infection	36
3.2.3. Routes of transmission	36
3.3. Microbiology	36

3.3.1. Helicobacter pylori morphology	36
3.3.2. Enzymatic profile	37
3.3.3. Growth conditions	37
3.4. Diagnosis of Helicobacter pylori infection	37
3.4.1. Non-invasive means of diagnosis	37
3.4.1.1. Respiratory test	37
3.4.1.2. Ammonia vapor test	38
3.4.1.3. Serological tests	38
3.4.1.4. Salivary and urinary tests	38
3.4.1.5. Fecal antigen test	38
3.4.2. Invasive means of diagnosis	39
3.4.2.1. Histology	39
3.4.2.2. Urease test	39
3.4.2.3. Culture and antibiotic resistance testing	39
3.4.2.4. Genetic amplification of bacterial DNA in fragments of gastric mucosa (PCR and RT-PCR)	40
3.4.2.5. In situ fluorescent hybridization (FISH)	40
3.5. Helicobacter pylori infection and carcinogenesis	40
3.6. Diseases associated with Helicobacter pylori infection	41
3.6.1. Gastric diseases	41
3.6.2. Extragastric diseases	42
4. Gastropanel	43
4.1. Significance of the test	43
4.2. Gastropanel's components	43
4.3. The accuracy of Gastropanel	44
5. Salivary Peptest	47
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis. Objectives.	51
2. Study 1. Prevalence of Helicobacter pylori infection among dyspeptic patients in the North-West region of Romania	53
2.1. Introduction	53
2.2. Hypothesis. Objectives.	54
2.3. Material and method	54
2.4. Results	55
2.5. Discussions	58
2.6. Conclusions	63
3. Study 2. Helicobacter pylori infection diagnosed with the C13 respiratory test among Romanian medical students	65
3.1. Introduction	65
3.2. Hypothesis. Objectives.	66
3.3. Material and method	66

3.4. Results	68
3.5. Discussions	71
3.6. Conclusions	75
4. Study 3. Comparative study of 2 fecal immunochromatographic tests of fecal Helicobacter pylori antigen	77
4.1. Introduction	77
4.2. Hipotesis. Objectives	78
4.3. Material and method	78
4.4. Results	79
4.5. Discussions	86
4.6. Conclusions	88
5. Study 4. Prevalence of gastroesophageal reflux disease among singing students	89
5.1. Introduction	89
5.2. Hipotesis. Objectives	90
5.3. Material and method	91
5.4. Results	92
5.5. Discussions	94
5.6. Conclusions	96
7. General conclusions	97
8. Originality and innovative contributions of the thesis	99
REFERENCES	101

Key-words: inflammation, Helicobacter pylori, gastroesophageal reflux disease, esophageal cancer, gastric cancer, urea-C13 respiratory test.

Introduction

Upper gastrointestinal neoplasms have a heterogeneous etiology with increased aggression and continue to be a global health problem. In recent decades, gastric cancer has shown a universal declining trend, a trend observed especially for non-cardiac gastric cancers, while cardiac-type gastric cancers have shown an increasing or stationary trend. Regarding esophageal cancers, they also seem to have a global downward trend, but analyzing the histopathological types, we find a significant and sustained increase in esophageal adenocarcinomas. Chronic inflammation is directly involved in the process of carcinogenesis through numerous mechanisms. In essence, it causes epigenetic changes with the secondary cancellation of tumor suppressor genes, causes the appearance of reactive nitrogen and oxygen species and stimulates the production of many proinflammatory factors that are involved in tumor proliferation, angiogenesis and metastatic invasion. All these mechanisms have been studied in the pathophysiology of many types of neoplasms, especially those in the gastric sphere. The main risk factor in the occurrence of esophageal adenocarcinoma is gastroesophageal reflux, both acidic and biliary, by inducing columnar intestinal metaplasia, precursor change of esophageal adenocarcinoma. The inclusion of H Pylori infection in the risk category factor for esophageal cancer is controversial. There are studies supporting the hypothesis that infection may be a protective factor and others that hold the

bacterium's contribution to esophageal carcinogenesis. Infection with *Helicobacter pylori* (*H pylori*), a bacterial agent considered class 1 carcinogen by the World Health Organization (WHO) Since 1994, is the main etiological agent of gastric cancer. *H pylori* infection is one of the most widespread infections in the world, with published studies indicating that more than half of the world's population has it. The latest data on *H pylori* infection in Europe were published in 2018 and indicate the lowest prevalence of infection in Northern Europe and the highest in Eastern and Southern Europe. In recent years, there has been a decrease in the prevalence of *H pylori* in most geographical areas worldwide. In Romania, the first publications on the bacterium *H pylori* appeared in 1990, but so far epidemiological data are few, completely missing for many regions of the country. The study of the prevalence of *H pylori* infection as well as the improvement of diagnostic methods are essential in the correct management of the disease.

Personal contribution:

Hipotesis

H pylori infection, a class I carcinogen according to the WHO is the main risk factor in the development of gastric cancer and according to the latest studies it seems that this bacterium is also involved in the appearance of esophageal cancer. Gastroesophageal reflux is the main etiological factor in the development of adenocarcinoma-type esophageal cancer. The whole process of carcinogenesis in neoplasms of the upper digestive tract is based on changes in chronic inflammation.

A correct identification of *H pylori* infection and gastroesophageal reflux disease can determine the population at high risk of developing neoplasms of the upper digestive tract. These patients require proper surveillance to eradicate the infection and to diagnose preneoplastic changes (Barrett's esophagus, gastric intestinal metaplasia, chronic atrophic gastritis) or early-stage cancers.

General objectives of the research

- a. Determining the prevalence of *H pylori* infection among dyspeptic and non-dyspeptic patients in the North-West of Romania and comparing the results with those in the literature.
- b. Comparison of the prevalence of *H pylori* infection with the epidemiological trend of eso-gastric cancers in Romania.
- c. Determining the prevalence of *H pylori* infection and dyspepsia among medical students.
- d. Comparison of 2 fecal tests of *H pylori* antigen in order to optimize the diagnosis and compare them with the histopathological examination in a tertiary center in North-West Romania.
- e. Non-invasive assessment of gastroesophageal reflux disease in a high-risk occupational group: singing students.

The first study aimed to estimate the prevalence of *H pylori* infection among dyspeptic patients in the North-West region of Romania. The secondary objective was to perform an analysis of the epidemiological trend of *H pylori* infection among the symptomatic population in this region of the country by comparing the data with those in the literature.

Material and method: A retrospective study was performed including 414 patients who attended a secondary center from Zalău, Salaj, Romania between 2014 and 2018. Patients with dyspeptic symptoms, which either presented by their own initiative or were referred by their general practitioners for evaluation of the presence of IgG anti-HP antibodies, were included in the study. There was no exclusion criteria. The main outcome measure was the serology test result for HP

antibodies As predictors, the date of age, sex, place of origin and year of serological test were collected.

Results: Of the 414 patients who were included in the study, 42.2% (175 patients) were from rural areas and 57.7% (239 patients) were from urban areas. Regarding the distribution by sex, 63.8% were women and 36.2% were men. The average age was 21 years. Of the 414 patients, 40.8% (n = 169) had positive anti-H pylori Ig G and 59.2% (n = 245) had negative anti-H pylori Ig G. Regarding the positive tests, the percentages were approximately the same, with slightly higher values among men 41.33% compared to women 40.53%, the difference having no statistical significance. A higher prevalence of infection was found in rural areas 42.29% compared to 39.75% in urban areas, but without statistical significance (p = 0.6). The highest prevalence was observed in 2018 with a value of 48.86% (43/88) and a p-value=0.01. **Conclusions:** Our study revealed that, among dyspeptic patients in the North-West region of Romania, which included both children and adults, the prevalence of H pylori infection was greater than 40%. Comparing our results with those of previous studies on the prevalence of H pylori infection in Romania, we were able to detect a decrease in the rate of H pylori infection over a period of 30 years.

The second study investigated the prevalence of H pylori infection among medical students using the C13-labeled urea respiratory test. The presence of dyspepsia in this category of subjects was also assessed, as well as the relationship between dyspepsia and H pylori infection.

Material and method: A prospective study was carried out which included 150 first and third year students of "Iuliu Hatieganu " University of Medicine and Pharmacy " Cluj-Napoca, Romania, between September and October 2019. Students of General Medicine and Dentistry (first and third year) who volunteered and signed the informed consent were enrolled in the study regardless of the presence or absence of digestive symptoms. They were tested for H pylori infection using the C13-labeled urea respiratory test. Students who ate, smoked less than 4 hours before the test, as well as those who had previously been treated with antacids, PPIs or antibiotics (4 weeks before the test) or who had a history of H pylori infection for which they followed the eradication protocol less than 8 weeks ago were excluded from the study. All students completed the Rome IV functional dyspepsia questionnaire as well as a questionnaire related to symptoms, pathological history, family and living conditions.

Results: Of the 150 students, 68% (102) were women and 32% (48) were men. Regarding the area of origin, 16.67% were from rural areas. Most of the participants in the study were from Transylvania area (Northwest region of Romania), only 16% (24) came from other regions of the country. The average age was 21 years. 45 students were from first year and 105 from third year of college. The prevalence of H pylori infection was 25.33%, respectively 38 of the 159 students enrolled in the study had a positive test. According to the Roma IV questionnaire, 18% of students met the criteria for functional dyspepsia. Of those who met the criteria for functional dyspepsia, 37% (10) had a positive respiratory test. According to the questionnaires, 8% (12 out of 150) had a history of H pylori infection. Of the 12 students with a history of H pylori infection, 5 had a new positive test. We did not find a statistically significant association between NSAID use, alcohol, smoking, and functional dyspepsia. In the present study, first-year students had a 1.21 (95% CI 0.68 - 2.15) higher risk of having H pylori infection (23.8%, n = 25) than those in the third year (23.8%, n = 25). 13), but with an association that was not statistically significant (p = 0.512). Those with a history of H pylori infection had a 4.45-fold (95% CI 1.6 - 12.37) higher risk of having functional dyspepsia than those without such a history.

Conclusions: To our knowledge, this study is the first report on the prevalence of H. pylori infection

among medical students investigated with the urea-C13 respiratory test in northwestern Romania. The prevalence of the infection was 25.33%. 18% of students met the Rome IV criteria for functional dyspepsia. We found no statistically significant association between H. pylori infection and Rome IV criteria for functional dyspepsia. Those with a history of H. pylori infection had a 4.45 (95% CI 1.6 - 12.37) higher risk of developing functional dyspepsia.

The third study aimed to compare 2 fecal immunochromatographic H pylori antigen tests. At the same time, their accuracy was analyzed by comparing with the results obtained by histopathological examination.

Material and method: A prospective study was performed which included 150 patients with gastrointestinal symptoms who presented to the Department of Internal Medicine of the Cluj-Napoca County Emergency Hospital between June 2019 and February 2020. Patients who had previous treatment with antacids, PPIs or antibiotics (4 weeks before testing), those with a history of HP infection for whom they followed the eradication protocol less than 8 weeks ago were excluded. All patients underwent biological tests and abdominal ultrasound. H pylori infection was tested using the fecal antigen test, Healgen immunochromatographic kit used in the hospital. For all those who had a positive test, upper digestive endoscopy was performed. Comparatively, from the same biological sample, the fecal H pylori antigen was tested using the CTK immunochromatographic kit. In the study, we analyzed demographic data, lifestyle, symptoms, history of H pylori infection, eradication protocol, alarm symptoms, family history of neoplasms and performed a comparison between the 2 fecal immunochromatographic tests. We also analyzed the endoscopic data on a subgroup of patients (n = 58) who underwent upper digestive endoscopy and compared the accuracy of the fecal test studied with that obtained from the histopathological result.

Results: Out of all 150 patients, 70% (105) were women and 30% (45) were men. Regarding the environment of origin, 46.67% came from rural areas. The average age was 64 years. The majority of subjects 86.67% came from the North-West of the country. Of the 150 patients investigated, 40% presented for dyspeptic symptoms, and of these 21.6% had H pylori infection. Among those without dyspepsia, 18.8% had H pylori infection. Analyzing the results of the fecal H pylori test studied from CTK, a sensitivity of 100% was found, and a specificity of: 95.2%. The diagnostic accuracy was: 96%. When the whole sample of subjects was analyzed, a high concordance was found between the two fecal tests for the diagnosis of H pylori infection, measured by Cohen's Kappa index 0.87 (95% CI: 0.77 - 0.97), $p < 0.001$, and with the Kappa index adjusted for prevalence and bias 0.92. The total concordance observed was 96.0%, while there was a discrepancy of 4% between tests. The diagnostic accuracy of the hospital used (Healgen) and new (CTK) tests was compared with the standard histopathological examination performed in a subgroup of patients (n = 58). Both tests had the same specificity of 93.4%, but the test used in the hospital (Healgen) had a lower sensitivity (72%) compared to the high sensitivity of the new CTK test (96%). For those with H pylori confirmed on histopathological examination, the main endoscopic changes were erosive gastritis and erosive bulbitis.

Conclusions: When analyzing the whole sample of subjects, a high concordance was found between the two fecal tests for the diagnosis of H pylori infection, respectively 96.0% with a 4% disagreement observed between the positive CTK and negative Healgen fecal test. The prevalence of H pylori infection was between 16.67% -20.67% (depending on the test). On the subgroup of patients in whom the 2 immunochromatographic tests were compared with the histopathological examination, the same specificity of the tests of 93.4% was revealed but a higher sensitivity for the comparative CTK test of 96% versus 72% to the Healgen test used in the hospital. Of the 150 patients

investigated, 40% were diagnosed with dyspeptic symptoms, and 21.6% of them had H pylori infection. Among those without dyspepsia, 18.8% had H pylori infection present.

The fourth study - aimed at evaluating gastroesophageal reflux disease in singing students and comparing it with the prevalence of this pathology among medical students and residents.

Method and materials: A case-control study was carried out in which 30 students from the "Gheorghe Dima" Academy of Music in Cluj-Napoca, from the singing department, were included. Those who did not want to participate were excluded from the study, those who had a history of pathologies that could cause gastroesophageal reflux and also those who have used antacid medication for at least 48 hours before the examination. As a control, 20 medical students and residents with a similar distribution in terms of age and sex were recruited. An assessment of symptoms was made using questionnaires related to reflux symptoms and lifestyle. The salivary Peptest test was performed for all subjects included in the study.

Results: The study included 30 singing students with an average age of 23 years. In the group of 20 medical students and residents who formed the control group, the average age was 27 years. Among the singers, 40% (12 people) were male and 60% (18 people) were female. In the control group 35% (5 people) were men and 65% (15 people) were women. In terms of lifestyle, among the singing students almost half (46.7%) do not consume alcohol at all, 50% occasionally, 3.3% daily. Smoking was found in 10% of the study group. Of the 30 singing students, 50% (15 subjects) reported symptoms of gastroesophageal reflux disease ($p < 0.001$), of which the main symptoms were heartburn and hoarseness. The salivary Peptest was positive in a very high percentage of 96.67%, respectively 29 of the 30 singing students compared to 30%, 6 subjects out of the 20 in the control group with a statistically significant p-value. According to the data from this study, a student in the singing department is 3.22 times more likely to have gastroesophageal reflux disease than the general population.

Conclusions: Singing students have a higher risk of developing gastroesophageal reflux. Salivary Peptest could be a completely non-invasive method, very useful in diagnosing GERD in these patients.

Originality and innovative contributions of the thesis

A point of originality of the thesis is that it includes a study of the epidemiological trend of H pylori infection in Romania, the second in the last 30 years, the first being performed in 2009. Analyzing the data obtained and comparing it with pre-existing one, a decrease in prevalence was detected in all age groups. The thesis includes the first study in Romania regarding the prevalence of H pylori infection among medical students, a group at professional risk, the diagnosis of the infection being verified using the urea-C13 respiratory test. Fecal antigen tests are widely used in clinical practice to diagnose H pylori infection. Following the comparative study of two fecal immunochromatographic tests with histopathological examination, a lower sensitivity of the test used in the hospital than that of the studied test was revealed. The concordance between the two tests was 96%. Improving the diagnostic methods of H pylori infection is extremely important in the correct management of this pathology. The thesis contains the first data related to gastroesophageal reflux, the main factor in the occurrence of esophageal adenocarcinoma among singing students. With the help of the salivary Peptest, a prevalence of 96% of gastroesophageal reflux was found in this category of subjects.
