

Αντιγόνα μοριακές τεχνικές

Εμμανουήλ Αρχαύλης*, Μαρίνα Κοντού**

*Επιμελητής Α', Α' Γαστρεντερολογική Κλινική Νοσοκομείο «Ευαγγελισμός»

**Ιδ. Γαστρεντερολόγος

Η λοίμωξη από το ελικοβακτηρίδιο του πυλωρού (ΕΠ) παρά την παγκόσμια μείωση του επιπολασμού του παραμένει ένα παγκόσμιο πρόβλημα. Σύνοδοι ομοφωνίας και ανασκοπήσεις έχουν καθορίσει σε ποιον ασθενή πρέπει να αναζητηθεί και αν υπάρχει να εκριζωθεί. Παρότι υπάρχει πλειάδα δοκιμασιών για τον πιστοποιήση της λοίμωξης και τον έλεγχο της εκρίζωσης του ωστόσο η ιδανική δοκιμασία δεν υπάρχει. Ένα επιπλέον πρόβλημα που απασχολεί τον κλινικό ιατρό είναι και η ευαισθησία του μικροβίου στα συνήθως χρησιμοποιούμενα φάρμακα, με δεδομένο την συνεχώς αυξανόμενη αντοχή του μικροβίου σ' αυτά.

Α. Ορολογικές δοκιμασίες (αντισώματα)

Ορολογικές δοκιμασίες με χρήση ELISA για μέτρηση των IgG αντισωμάτων είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος, καθώς είναι φθηνή¹ και μη επεμβατική μέθοδος ανίχνευσης του μικροβίου. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει υψηλή ευαισθησία (>90%) αλλά ευρέως κυμαινόμενη ειδικότητα (από 75-96%), όπως και η ακρίβεια της μεθόδου κυμαίνεται, ιδίως σε ειδικές πληθυσμιακές ομάδες, όπως οι ηλικιωμένοι² και οι ασθενείς με κίρρωση ήπατος.³ Ωστόσο, απαραίτητη είναι η επικύρωση της δοκιμασίας σε κάθε πληθυσμό. Η θετική προγνωστική τιμή της δοκιμασίας εξαρτάται από τον επιπολασμό του μικροβίου στο πληθυσμό. Έτσι σε χώρες με μικρό επιπολασμό (>20%), θετικό αποτέλεσμα παριστά αληθή λοίμωξη μόνο στους μισούς ασθενείς. Για τον λόγο αυτό σε παρόμοιους πληθυσμούς οι σύνοδοι ομοφωνίας δηλώνουν ότι δεν πρέπει να χρησιμοποιείται. Ωστόσο, είναι μια τεχνική τα αποτελέσματα της οποίας δεν εξαρτώνται από παράγοντες που είναι γνωστό ότι μειώνουν την ευαισθησία άλλων μεθόδων. Όπως για παράδειγμα ο ασθενής που δεν μπορεί να διακόψει για επαρκές χρονικό διάστημα τους αναστολείς αντλίας πρωτονίων (ΑΑΠ) ή σε ασθενή με αιμορραγία πεπτικού, καταστάσεις δηλαδή που σχετίζονται με χαμηλή ευαισθησία όταν χρησιμοποιούνται δοκιμασία αναπνοής ή ταχεία δοκιμασία ουρεάσης. Σε παρόμοιους ασθενείς έχει προταθεί ο έλεγχος των αντισωμάτων σαν μια εναλλακτική προσέγγιση.⁴ Δυστυχώς παρότι η τιμή των αντισωμάτων μειώνεται σταδιακά⁵ μετά την εκρίζωση. Ωστόσο ποιοτικές δοκιμασίες παραμένουν θετικές για αρκετό διάστημα μετά από αυτήν.⁶ Επίσης με ορολογικές δοκιμασίες μπορεί να δείχθει αν ο ασθενής έχει «επιθετικό» στέλεχος αφού η παρουσία πρωτεϊνών όπως η CagA έχει συσχετισθεί με ελκογέννεση αλλά και αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο.^{7,8}

Τέλος ορολογικές μέθοδοι έχουν προταθεί σαν μη επεμβατική προσέγγιση για πρόβλεψη προνεοπλασματικών καταστάσεων (γαστρική ατροφία) σε ασθενείς με ελικοβακτηριδιακή λοίμωξη,⁹ όπως η μέτρηση του πεψινογόνου I και II. Ο ορολογικός προσδιορισμός του πεψινογόνου I και II της γαστρίνης 17 και αντισώματα έναντι ΕΠ GastroPanel (BioHit, Helsinki, Finland) δίνουν πολύτιμες πληροφορίες για ασθενείς που βρίσκονται σε κίνδυνο για εντερικού τύπου γαστρικό καρκίνο. Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη οι Inoue *et al* κατέταξαν άτομα με βάση τα ορολογικά αποτελέσματα για ΕΠ πεψινογόνο I (<70 Ig/L) και λόγο πεψινογόνου I/II (<3). 40% των ατόμων είχαν και τους 3 αυτούς δείκτες αρνητικούς και συνεπώς οι συγγραφείς τους χαρακτήρισαν άτομα με μικρό κίνδυνο για γαστρικό καρκίνο και συνεπώς αποκλείστηκαν από αντίστοιχο πρόγραμμα ενδοσκοπικής επιτήρησης.¹⁰

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης των αντισωμάτων στο σίελο δεν έδειξαν καλή ευαισθησία και ειδικότητα (87 έναντι 96%, και 73 έναντι 90%, αντίστοιχα σε σχέση με τον ορό).¹¹

Δοκιμασίες κοπράνων Το ΕΠ (αντιγόνα του) έχει αναγνωρισθεί στα κόπρανα ασθενών,¹² γεγονός που οδήγησε στη δημιουργία δοκιμασιών αναζήτησης του εκεί. Αποτελεί μια εύκολη και τελείως αναίμακτη δοκιμασία με χαμηλό γενικά κόστος εξέτασης αλλά και κόστος μηχανημάτων.^{13,14}

Υπάρχουν αρκετές δοκιμασίες γραφείου (έτοιμα Kit για αναζήτηση του μικροβίου σε επίπεδο πρωτοβάθμιας φροντίδας). Η ακρίβεια της δοκιμασίας βρέθηκε να είναι εξαιρετική συγκρινόμενη με άλλες παραδοσιακές μεθόδους όπως η δοκιμασία αναπνοής ή ενδοσκοπικές μέθοδοι.¹³ Αυτή η

δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε και για το έλεγχο της έκβασης αγωγής εκρίζωσης, παρότι δεν έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα όλες οι σχετικές μελέτες σε αυτό το πληθυσμό. Επίσης δεν έχει υπάρξει ομοφωνία για το ελάχιστο απαιτούμενο χρόνο μεταξύ του πέρατος της αγωγής και της δοκιμασίας κοπράνων. Σε μια σχετική μελέτη 4 εβδομάδες μετά το πέρας του σχήματος, η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 90 και 95% αντίστοιχα.¹⁴ Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δώσει και άλλες μελέτες.¹⁵ Έχει χρησιμοποιηθεί και σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (έως και 7 μέρες μετά την εκρίζωση) με καλά αποτελέσματα.¹⁶

Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει χαμηλότερη διαγνωστική ακρίβεια ιδίως σε ειδικούς ασθενείς όπως για παράδειγμα ο ασθενής με αιμορραγία ανωτέρου πεπτικού ή μετά από εκρίζωση,¹⁷⁻¹⁹ παρατηρούνται εξαιρετικά συχνά ψευδώς θετικά αποτελέσματα μετά την αγωγή εκρίζωσης.¹⁷ Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που ανευρίσκονται συχνά σε ασθενείς με αιμορραγία ανωτέρου πεπτικού, θεωρείται ότι οφείλονται σε διασταυρούμενη αντίδραση των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων με στοιχεία του αίματος.¹⁸ Σε άλλη μελέτη υπολογίσθηκε ότι οι δοκιμασίες κοπράνων έχουν συχνότητα 20% ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων όταν εκτελούνται έως και 6 εβδομάδες μετά την εκρίζωση.¹⁹ Μελέτες που χρησιμοποίησαν μονοκλωνικά αντισώματα έδειξαν καλύτερη ευαισθησία μετά την αγωγή εκρίζωσης σε σχέση με παλαιότερες δοκιμασίες (που είχαν πολυκλωνικά αντισώματα).^{20,21}

Η χορήγηση αναστολέων αντλίας πρωτονίων έχει βρεθεί να μειώνει την διαγνωστική ακρίβεια των δοκιμασιών κοπράνων.²² Παρόμοια επηρεάζει και η χορήγηση άλλων παραγόντων όπως το βισμούθιο, όχι όμως η ρανιτιδίνη. Παρότι τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με την χορήγηση ΑΑΠ δεν είναι τόσο συχνά όσο με την δοκιμασία αναπνοής, ωστόσο και με την τεχνική αυτή πρέπει να τηρείται ένα παρόμοιο χρονικό διάστημα χωρίς ΑΑΠ όπως και με την δοκιμασία αναπνοής. Αν υπάρχει θετικό αποτέλεσμα σε ασθενή υπό ΑΑΠ αυτό πρέπει να θεωρείται σαν πραγματικά θετικό αλλά αν το αποτέλεσμα είναι αρνητικό σε ασθενή που δεν έχει διακόψει τα φάρμακα αυτά για τουλάχιστον 2 εβδομάδες η δοκιμασία πρέπει να επαναλαμβάνεται με σωστές συνθήκες ή το αποτέλεσμα να επαληθεύεται με άλλη δοκιμασία που δεν επηρεάζεται από τα φάρμακα.

Εκτός από τη δοκιμασία ανίχνευσης του αντιγόνου στα κόπρανα που εκτελείται στο εργαστήριο υπάρχουν παρόμοιες που εκτελούνται στο γραφείο στην πρωτοβάθμια περίθαλψη. Σε δύο μελέτες που χρησιμοποίησαν την δοκιμασία αυτή για την ανίχνευση του μικροβίου πριν και μετά από αγωγή εκρίζωσης, βρήκαν εξαιρετική ευαισθησία και ειδικότητα και στις δύο περιπτώσεις.^{23,24}

Σε ανάλυση αποφάσεων για εύρεση της δοκιμασίας (δοκιμασία κοπράνων, ορολογικές και δοκιμασία αναπνοής) με το καλύτερο λόγο αποτελέσματος κόστους.²⁵ Σε μελέτη σχετικά με την πρωτοβάθμια περίθαλψη βρέθηκε ότι παρότι η δοκιμασία κοπράνων ήταν ακριβότερη από τις ορολογικές δοκιμασίες, ωστόσο προσέφερε μεγαλύτερη ακρίβεια όταν εφαρμόζονταν σε πληθυσμό με χαμηλό ή μέτριο επιπολασμό του μικροβίου που δεν έχει λάβει αγωγή εκρίζωσης. Μετά από την αγωγή εκρίζωσης, η δοκιμασία κοπράνων είχε την καλύτερη αναλογία κόστους αποτελέσματος για επιβεβαίωση της εκρίζωσης.²⁶

Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την διάγνωση της λοίμωξης. Ωστόσο, εκτελείτο σε βιοπτικό υλικό (άρα ήταν επεμβατική τεχνική) και η ευαισθησία και ειδικότητα υπολείπετο αρκετά από άλλες παραδοσιακές τεχνικές (πχ ιστολογία, UBT). Επίσης απαιτείται ακριβός εξοπλισμός. Νεώτερες τεχνικές όπως η real time PCR δίνει καλύτερα αποτελέσματα από την απλή PCR όμως αυτή απαιτεί ακόμα ακριβότερα και εξειδικευμένα μηχανήματα. Η τεχνική αυτή ωστόσο, έχει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπόλοιπες γιατί δεν επηρεάζεται από τα όποια προβλήματα διαχείρισης του υλικού αλλά ούτε και από καταστάσεις όπως η λήψη του υλικού κατά την ενδοσκόπηση σε ασθενή με ενεργό αιμορραγία ανωτέρου πεπτικού. Σε μια μελέτη από την Ισπανία με τέτοιους ασθενείς οι 42/52 ασθενείς που η παθολογοανατομική εξέταση δεν κατέδειξε την λοίμωξη με εκτέλεση PCR στα δείγματα παραφίνης βρέθηκαν τελικά να έχουν την λοίμωξη.²⁷

Ωστόσο σε άλλες μελέτες τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά πιθανά λόγω παρουσίας ουσιών στο γαστρικό περιεχόμενο που παρεμβαίνουν στην μέθοδο.²⁸ Η χρήση των ΑΑΠ βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει την PCR σε κόπρανα ασθενών σε αντίθεση με την δοκιμασία αναπνοής.²⁹

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αναζήτηση των υπεύθυνων μεταλλάξεων υπεύθυνων για αντοχή στις μακρολίδες ή στις κινολόνες με μελέτες να αναφέρουν καλό προγνωστικό δείκτη σε μελέτες. Η χρήση PCR πχ GenoType HelicoDR έδειξε ευαισθησία και ειδικότητα για ύπαρξη αντοχής 94% και 99% για κλαριθρομυκίνη και 87% και 98,6% για λεφοβλοξασίνη αντίστοιχα.^{30,31} Άλλοι συγγραφείς ενώ βρήκαν καλή συσχέτιση της ύπαρξης μετάλλαξης στο υπεύθυνο γονίδιο για αντοχή στην κλαριθρομυκίνη (εκρίζωση σε ασθενείς με ή χωρίς μετάλλαξη 93.5% και 7.7% αντίστοιχα), ωστόσο για την λεφοβλοξασίνη ήταν αντίστοιχα 41.7 και 93.5% αντίστοιχα.³²

Έχει δοκιμασθεί η διενέργεια real-time PCR από δείγματα κοπράνων (*H. pylori* ClariRes assay; Ingenetix, Vienna, Austria) και θεωρείται πρακτικά το μόνο τεστ διάγνωσης τόσο της λοίμωξης όσο και της αντοχής στις μακρολίδες. Υπάρχουν τεχνικά προβλήματα λόγω παρουσίας αναστολέων της Taq πολυμεράσης που οδηγεί σε χαμηλή ευαισθησία.³³ Ωστόσο διάφορες μελέτες έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα.³⁴⁻³⁶

Ενδιαφέρουσα είναι η δημιουργία ποσοτικής realtime PCR (Q-PCR) που μπορεί να καθορίσει το μικροβιακό φορτίο σε κάθε περιοχή του στομάχου³⁷ αλλά και η αναζήτηση πολλαπλών στελεχών στον ίδιο ασθενή, που θεωρείται κακός προγνωστικός παράγοντας για την έκβαση της αγωγής εκρίζωσης. Σε μελέτη βρέθηκε ότι όλοι σχεδόν οι ασθενείς (99%) είχαν μόλυνση από πολλά στελέχη (έως 5 ανά άτομο) και ο αριθμός αυτός σχετιζόταν με την εξέλιξη ή την βαρύτητα της νόσου.³⁸

Με μοριακές τεχνικές μελετήθηκε η παρουσία του μικροβίου σε εξωγαστρικές θέσεις όπως η οδοντική πλάκα,³⁹ η χοληδόχος κύστη⁴⁰ αθηρωματικές πλάκες,⁴¹ σε βιοψία ήπατος ασθενών με ηπατίτιδα C⁴² κύτταρα από MALT επιτεφυκότα,⁴³ κλπ, προσπαθώντας να βρεθεί παθογενετικός ρόλος του μικροβίου στις εν λόγω παθήσεις.

Επίσης με μοριακές τεχνικές μπορεί να ταυτοποιηθεί η παρουσία η μη προγνωστικών δεικτών επιθετικού μικροβίου όπως *cagA*, *vacA*, *s*, και *m* polymorphism,^{44,45} αλλά και της παρουσίας φωσφορολιποποιημένων μοτίβων τυροσίνης στο EPIYA της *CagA* πρωτεΐνης. Η παρουσία των μοτίβων (και ο αριθμός των επαναλήψεων αυτών) έχει προταθεί να συνδέεται με επιθετικότερα στελέχη. Στην Κολομβία τα 67 στελέχη που μελετήθηκαν ήταν όλα δυτικού τύπου(C) με 1, 2, ή 3 μοτίβα EPIYA-C. Στελέχη με 1 μόνο μοτίβο σχετιζόταν με ηπιότερη νόσο⁴⁶ που έχει ενοχοποιηθεί (εν μέρει) για την διαφορά στην επίπτωση του γαστρικού καρκίνου. Στην Ελλάδα μελετήθηκαν 98 στελέχη σε παιδιά και βρέθηκαν να είναι κυρίως 2C⁴⁷ επίσης με μοριακές τεχνικές ερευνώνται παράγοντες του ξενιστή που προδικάζουν ταχύτερη εξέλιξη προς καρκίνο (πχ IL-1B-511T⁴⁸ του IL-8-251 A/T⁴⁹).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Xie F, Luo N, Lee HP. Cost effectiveness analysis of populationbased serology screening and (13)C-Urea breath test for Helicobacter pylori to prevent gastric cancer: a Markov model. *World J Gastroenterol* 2008;14:3021-3027.
2. Liston R Pitt MA Banerjee AK IgG ELISA antibodies and detection of Helicobacter pylori in elderly patients *Lancet* 1996;347:269.
3. Nardone G, Coscione P, D'ARmiento FP, et al. Cirrhosis negatively affects the efficiency of serologic diagnosis of Helicobacter pylori infection. *Ital J Gastroenterol* 1996;26:332-336.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of Helicobacter pylori infection –the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut* 2012;61:646-664.
5. Feldman M Cryer B, Lee E, et al. Role of seroconversion in confirming cure of helicobacter pylori infection. *JAMA* 1998;280:363-365.
6. Tiryaki Z, Yilmaz-Ciftdogan D, Kasirga E. Diagnostic value of stool antigen and antibody tests for Helicobacter pylori infection in Turkish children with upper gastrointestinal complaints before and after eradication. *Turk J Pediatr* 2010;52:505-511.
7. Peleteiro B, Lunet N, Barros R, La Vecchia C, et al. Factors contributing to the underestimation of Helicobacter pylori-associated gastric cancer risk in a high-prevalence population. *Cancer Causes Control* 2010;21:1257-1264.
8. Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, et al. Serum antibody positivity for distinct Helicobacter pylori antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. *Int J Med Microbiol* 2006;296:223-228.
9. Toyoda K, Furusyo N, Ihara T, et al Serum pepsinogen and Helicobacter pylori infection-a Japanese population study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2117-2124.
10. Inoue K, Fujisawa T, Haruma K. Assessment of degree of health of the stomach by concomitant measurement of serum pepsinogen and serum Helicobacter pylori antibodies. *Int J Biol Markers* 2010;25:207-212.
11. Sonmezoglu M, Baysal B, Ergen A, et al. Detection and evaluation of salivary antibodies to Helicobacter pylori in dyspeptic patients. *Int J Clin Pract* 2005;59:433-436.
12. Kelly SM, Pitcher MC, Farmery SM, Gibson GR. Isolation of Helicobacter pylori from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* 1994;107:1671-1674.
13. Trevisani L, Sartori S, Galvani F, et al. Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting Helicobacter pylori in feces: a prospective pilot study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1830-1833.

14. Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 1999; 354:30-33.
15. Manes G, Balzano A, Iaquinto G, et al. Accuracy of stool antigen test in posteradication assessment of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2001;46:2440-2444.
16. Vaira D, Vakil N, Menegatti M, et al. The stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* after eradication therapy. *Ann Intern Med* 2002;136:280-287.
17. Makristathis A, Pasching E, Schütze K, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1998;36:2772-2774.
18. van Leerdam ME, van der Ende A, ten Kate FJ, et al. Lack of accuracy of the noninvasive *Helicobacter pylori* stool antigen test in patients with gastroduodenal ulcer bleeding. *Am J Gastroenterol* 2003;98:798-801.
19. Perri F, Manes G, Neri M, et al. *Helicobacter pylori* antigen stool test and 13C-urea breath test in patients after eradication treatments. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2756-2762.
20. Calvet X, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, et al. Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a reappraisal. *Clin Infect Dis* 2009;48:1385-1391.
21. Shimoyama T, Kobayashi I, Kato C, et al. Comparison of monoclonal antibody-based stool antigen tests to determine the results of *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1431-1434.
22. Bravo LE, Realpe JL, Campo C, et al. Effects of acid suppression and bismuth medications on the performance of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2380-2383.
23. Wu DC, Wu IC, Wang SW, et al. Comparison of stool enzyme immunoassay and immunochromatographic method for detecting *Helicobacter pylori* antigens before and after eradication. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;56:373-378 .
24. Veijola L, Myllyluoma E, Korpela R, Rautelin H. Stool antigen tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection before and after eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2005;11:7340-7344.
25. Vakil N, Rhew D, Soll A, Ofman JJ. The cost-effectiveness of diagnostic testing strategies for *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1691-1698.
26. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004;9:347-368.
27. Ramirez-Lazaro MJ, Lario S, Casalots A, Sanfeliu E, Boix L, Garcia-Iglesias P, et al. Real-time PCR improves *Helicobacter pylori* detection in patients with peptic ulcer bleeding. *PLoS ONE* 2011;6:e20009
28. Lin HJ, Lo WC, Perng CL, Tseng GY, Li AF, Ou YH. Mucosal polymerase chain reaction for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in patients with bleeding peptic ulcers. *World J Gastroenterol* 2005;11:382-385.
29. Yakoob J, Jafri W, Abbas Z, Abid S, Islam M, Ahmed Z. The diagnostic yield of various tests for *Helicobacter pylori* infection in patients on acid-reducing drugs. *Dig Dis Sci* 2008;53:95-100.
30. Cambau E,, Allerheiligen v.,Coulon C,et al. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Cl Microbiol* 2009;47:3600-3607.
31. Agudo S, Alarcon T, Urruzuno P, et al. Detection of *Helicobacter pylori* and clarithromycin resistance in gastric biopsies of pediatric patients by using a commercially available real-time polymerase chain reaction after NucliSens semiautomated DNA extraction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:213-219.
32. Liou JM, Chang CH, Yung YC. Antimicrobial agents and chemotherapy. Mar 2011, p. 1123–1129
33. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 1997;35:995-998.
34. Scaletsky IC, Aranda KR, Garcia GT, et al. Application of real-time PCR stool assay for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in Brazilian children. *Helicobacter* 2011;16:311-315.
35. Scincchi LA, Correa P, Bravo LE, et al. Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children. *Helicobacter* 2012;17:96-106.

36. Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, et al. I. *Helicobacter pylori* oipA genetic diversity and its associations with both disease and cagA, vacA s, m, and i alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;71:335-340.
37. Shukla SK, Prasad KN, Tripathi A, et al. Quantitation of *Helicobacter pylori* ureC gene and its comparison with different diagnostic techniques and gastric histopathology. *J Microbiol Methods* 2011;86:231-237.
38. Ren L, Liao YL, Song Y, et al. High frequency variations of *Helicobacter pylori* isolates in individual hosts in a Chinese population. *Int J Infect Dis* 2012;16:e358-e363.
39. Chaudhry S, Idrees M, Izhar M, et al. Simultaneous amplification of two bacterial genes: more reliable method of *Helicobacter pylori* detection in microbial rich dental plaque samples. *Curr Microbiol* 2011;62:78-83.
40. Yucebilgili K, Mehmetoglu T, Gucin Z, Salih BA. *Helicobacter pylori* DNA in gallbladder tissue of patients with cholelithiasis and cholecystitis. *J Infect Dev Ctries* 2009;3:856-859.
41. Iriz E, Cirak M, Engin E, et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in aortic and left internal mammary artery biopsies. *Tex Heart Inst J* 2008;35:130-135.
42. Rocha M, Avenaud P, Menard A, et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* 2005;54:396-401.
43. Chan CC, Smith JA, et al. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) molecular signature in conjunctival mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *Histol Histopathol* 2004;19:1219-1226.
44. Kim YS, Kim N, Kim JM, Kim MS, et al. *Helicobacter pylori* genotyping findings from multiple cultured isolates and mucosal biopsy specimens: strain diversities of *Helicobacter pylori* isolates in individual hosts. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:522-528.
45. Homan M, Luzar B, Kocjan BJ, et al. Prevalence and clinical relevance of cagA, vacA, and iceA genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Slovenian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:289-296.
46. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, et al. CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:369-378.
47. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Papadacos K, et al. CagA and VacA polymorphisms do not correlate with severity of histopathological lesions in *Helicobacter pylori*-infected Greek children. *J Clin Microbiol* 2009;47:2426-2434.
48. Leung WK, Chan MC, To KF, et al. *H. pylori* genotypes and cytokine gene polymorphisms influence the development of gastric intestinal metaplasia in a Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2006;101:714-720.
49. Kamali-Sarvestani E, Bazargani A, Masoudian M, et al. Association of *H. pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12:5205-5210.