

METODELE INVAZIVE ÎN DIAGNOSTICUL INFECȚIEI CU HELICOBACTER PYLORI – MIJLOACE EFICIENTE CE SPORESC RATA DE ERADICARE

Doina Chiriac – medic rezident medicină internă, anul I,

Adela Țurcanu – dr. șt. med., conf. univ.,

Elina Berliba – dr. șt. med., conf. univ.,

Ludmila Tofan-Scutaru – dr. șt. med., conf. univ.,

Eugen Tcaciuc – dr. șt. med., conf. univ.,

Angela Peltec – dr. șt. med., conf. univ.,

Departamentul Medicină Internă,

Disciplina gastroenterologie,

IP USMF „Nicolae Testemițanu”

tel.: +373-79-369-827, doina__1@hotmail.com

Rezumat

Infecția *H. pylori* este o infecție bacteriană comună care a fost recunoscută de Organizația Mondială a Sănătății drept una dintre cele mai frecvente și majore infecții bacteriene dobândite ale sistemului digestiv uman. Infecția cu *H. pylori* este cauza principală al ulcerului peptic și este un factor de risc pentru limfomul gastric de tip MALT (mucosa- associated lymphoid tissue) și adenocarcinomul gastric. Printre metodele invazive folosite pentru diagnosticul infecției *H. pylori* se numără testul rapid la urează, examinarea histologică a biopsiilor gastrice, examenul bacteriologic pentru obținerea culturii *H. pylori* și sensibilității la antibiotice. În ultimii ani, utilizarea tehnicii de cultură ca instrument de diagnostic a fost abandonată în favoarea metodelor neinvazive, sensibile și rapide. Cu toate acestea, se observă o creștere a rezistenței bacteriene la tratament antibacterian. Prin urmare, tehnica de cultură se dovedește utilă ca o metodă de diagnosticare care oferă informații privind profilul de susceptibilitate la antibiotice și joacă un rol important în tratamentul empiric cu antibiotice și gestionarea cazurilor refractare la tratament. O nouă metodă de cultivare a *H. pylori* prin cultivare microcapilară este avantajoasă datorită sensibilității sale înalte de diagnostic în comparație cu celelalte teste invazive. Scopul acestei lucrări este analiza datelor contemporane privind diagnosticul prin metode invazive a infecției *H. pylori* și în special examenul bacteriologic cu aprecierea sensibilității tulpinilor *H. pylori* cultivate la diferite antibiotice. Acest subiect reprezintă un interes pentru societatea medicală în contextul creșterii rezistenței la tratamentele antibacteriene.

Cuvinte-cheie: metode invazive de diagnostic infecția *H. pylori*, cultura clasică, cultura microcapilară

Summary. Invasive methods in diagnosis of helicobacter pylori infection – efficient tools which increase the rate of eradication

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection is a common bacterial infection that has been recognized by the World Health Organization as one of the most common and major acquired bacterial infections of the human digestive system. *H. pylori* is the main cause of peptic ulcer and is a risk factor for mucosa- associated lymphoid tissue (MALT) and gastric adenocarcinoma. Among the invasive methods used for diagnosis of *H. pylori* infection are the rapid urease test, histological examination of gastric biopsies and bacteriological examination to obtain *H. pylori* culture and antibiotic susceptibility. Recently, the use of culture technology as a diagnostic tool has been abandoned in favor of non-invasive methods, which present good sensitivity and rapidity. However, it is observed an increasing rate of bacterial resistance to antibacterial treatment. Therefore, culture technique is considered to be useful as a diagnostic method that provides information about susceptibility profile of antibiotics, plays an important role in the empiric treatment and the management of refractory therapies. A new method of culture of *H. pylori* by microcapillary cultivation is advantageous due to its high diagnostic sensitivity compared to other invasive tests. The aim of this article is to analyze contemporary data about the diagnosis of *H. pylori* infection by invasive methods and especially the bacteriological examination with the evaluation of *H. pylori* strains susceptibility to different antibiotics. This topic represents the interest of the medical society in the context of increasing resistance to antibacterial therapies.

Key words: invasive diagnostical tools for *H. pylori*, classical culture, microcapillary culture

Резюме. Методы инвазивной диагностики инфекции с *helicobacter pylori*, повышающие эффективность эрадикации

Инфекция *H. pylori* является бактериальной инфекцией, которая была признана Всемирной Организацией Здравоохранения в качестве одной из наиболее частых приобретенных бактериальных инфекций пищеварительной системы человека. Инфекция *H. pylori* является главной причиной язвенной болезни и является фактором риска для лимфомы желудка тип MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) и аденокарциномы желудка. К инвазивным методам диагностики инфекции *H. pylori* относятся быстрый уреазный тест, гистологическое исследование биоптата из желудка и бактериологическое исследование с получением культуры *H. pylori* и

чувствительности к антибиотикам. В последние годы, бактериологическое исследование не использовалось широко в связи с использованием неинвазивных методов диагностики, которые имели высокую чувствительность и скорость диагностики. Однако, за последнее время наблюдается увеличение резистентности штаммов *H. pylori* к антибактериальной терапии есть увеличение бактериальной устойчивости к антибактериальной терапии. Новый бактериологический метод диагностики инфекции *H. pylori* называемый культивированием в микрокапillary является предпочтительным из-за его высокой диагностической чувствительности по сравнению с другими неинвазивными тестами. Целью данной работы является анализ современных данных об инвазивной диагностике инфекции *H. pylori*, в особенности бактериологических методов исследования штаммов *H. pylori* с определением чувствительности к различным антибактериальным препаратам. Эта тема представляет интерес для медицинской общественности в свете повышения резистентности к антибактериальной терапии.

Ключевые слова: инвазивные методы диагностики инфекции *H. pylori*, классический бактериологический метод, культивирование в микрокапillary

Introducere

Infecția cu *H. pylori* este o infecție bacteriană comună care a fost recunoscută de Organizația Mondială a Sănătății drept una dintre cele mai frecvente și majore infecții bacteriene dobândite ale sistemului digestiv uman. *Helicobacter pylori* este o bacterie helicoidală gram negativă ce se găsește în mod obișnuit la nivelul epiteliului gastric. Denumirea ei provine de la forma de helix, care se pare că este responsabilă de adaptabilitatea și infectabilitatea în mediul puternic acid de la nivelul stomacului. Infecția cu *H. pylori* este prezentă la 90-95 % din pacienți cu ulcer peptic duodenal și la 70% de pacienți cu ulcer gastric. Prin urmare, infecția cu *H. pylori* este cauza principală al ulcerului peptic. În plus, este un factor de risc pentru limfomul gastric de tip MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) și adenocarcinomul gastric (în majoritate noncardiale) [1]. Reviurile sistemice și meta-analizele recente au arătat că unele patologii extragastrice sunt asociate cu infecția *H. pylori*, cum ar fi anemia fierodeficientă, purpura trombocitopenică, deficitul de vitamina B12 idiopatică și cardiopatia ischemică [2]. Foarte des, infecția se produce în copilărie și persistă pe tot parcursul vieții, dacă nu este tratată. Transmiterea tipică se face pe cale fecal-orală sau oro-orală. Nu toate persoanele infectate cu *H. pylori* dezvoltă patologii clinic exprimate, motivele acestei variații pot fi patogenitatea bacteriană și susceptibilitatea gazdei.

Patogenia *H. pylori* include următoarele: (i) colonizarea bacteriană al epiteliului gastric; (ii) factori de virulență bacteriană, inclusiv citotoxina asociată cu gena A (CagA), Cag L și sistemul de secreție de tip IV (T4SS), citotoxina vacuolizantă A (VacA) și tulpini de insule patogene CAG (PAI) (asociate cu un răspuns inflamator crescut); (iii) modificarea factorilor de virulență în funcție de mediu; (iv) diversitatea genetică specifică virulenței; (v) factorii gazdă implicați în patogeneză, incluzând autofagia, răspunsurile de oxidare și antioxidare, apoptoza și modificările epigenetice [3-6]; (vi) colonizarea cu *H. pylori* a cavității bucale, care se corelează în mod semnificativ cu bo-

lile gastroesofagiene și ar putea provoca re-infecțarea și diminuarea ratelor de eradicare a bolii [7].

Diagnosticul infecției cu *H. pylori* este în general realizat utilizând atât metode invazive, cât și metode neinvazive. Printre metodele invazive se numără testul rapid la urează, examinarea histologică a biopsiilor gastrice și examen bacteriologic pentru obținerea culturii *H. pylori* și sensibilității la antibiotice. Procedurile non-invazive includ testul respirator cu urează marcată, detectarea anticorpilor pentru *H. pylori* în ser și examinarea antigenelor pentru *H. pylori* din materii fecale (tab. 1). Scopul acestei lucrări este analiza datelor contemporane privind diagnosticul prin metode invazive a infecției *H. pylori* și în special examenul bacteriologic cu aprecierea sensibilității tulpinilor *H. pylori* cultivate la diferite antibiotice, ce reprezintă un interes pentru societatea medicală în contextul creșterii rezistenței la tratamentele antibacteriene.

Metodele invazive de diagnostic a infecției *H. pylori*. Testul rapid la urează. Testul rapid la urează sau CLO test – este un test calitativ ce se poate efectua din proba de biopsie obținută în urma endoscopiei digestive superioare (EDS) la pacienții suspecți cu infecție cu *H. pylori* (fig. 1). Testul poate fi făcut lângă pacient imediat după recoltarea biopsiei sau la laborator. Principiul de funcționare a testului se bazează pe schimbarea culorii discului indicator după ce specimenul de biopsie a fost plasat pe suprafața sa. În cazul în care există activitate de urează în specimenul de biopsie, o pată colorată în nuanță de albastru va apărea pe suprafața discului indicator. Examinarea histopatologică la microscop a fragmentelor de mucoasă gastrică prelevate prin biopsie la EDS reprezintă metoda de elecție pentru diagnostic. Acest test poate fi fals-negativ la pacienții care sunt în curs de tratament cu inhibitori de pompă de protoni (omeprazol, lansoprazol, etc); de aceea înainte de efectuarea testării este indicată anularea tratamentului cu antibiotice (inclusiv compuși cu bismut) cu o lună înainte, a citoprotectoarelor cu o săptămână înainte, iar a blocanților H2 (ranitidina, famotidina) și a inhibitorilor pompei de protoni cu 24 ore înainte de efectuarea EDS (19).

Tabelul 1

Metodele diagnostice a infecției H.pylori (adoptat Rana R și colab. (8))

Teste	Sensibilitatea	Specificitatea	Pre-tratament	Post-tratament	Avantaje	Limite
Metode non invazive						
13 C-UBT	95-100%	90-100%	Da	Da	Disponibil, sigur, rapid	Necesitatea echipamentului special
14 C- UBT	92%	100%	Da	Da		Poate prezenta risc în sarcină
Antigen pentru H.pylori în mase fecale	90-95%	90-95%	Da	Da	Simplu, sigur, rapid	Complianță joasă
Anticorpi anti H. pylori IgG	85%	80%	Da	Nu	Disponibil, simplu	Pozitiv după eradicare
Metode invazive						
Testul rapid la urează	90-95%	91-100%	Da	Da	Simplu, rapid	Încărcare bacteriană înaltă
Examenul histopatologic	90-100%	93-99%	Da	Da	Sensibil, diagnostic secundar	Consumă timp
Imunohistochimia	90-100%	93-99%	Da	Da	Sensibilitate excelentă	Costisitor, utilitate limitată
Cultura Helicobacter pylori și sensibilitatea	96% (MCM) 54% (CC)	80% (MCM) 100% (CC)	Nu	Da	Describe sensibilitatea la antibiotice	Disponibilitate limitată, complianță joasă
PCR	97%	91%	Da	Da	Rapid, sensibilitatea la antibiotice	Costisitor, disponibilitate limitată

13/14 C-UBT – test respirator la urează cu uree marcată cu carbon 13/14 (carbon urease breath test); PCR – reacție de polimerizare în lanț; IgG – imunoglobulina G; MCM - Metoda de cultivare microcapilară a H.pylori; CC - Metoda clasică de cultură a H.pylori



Fig. 1. Testul rapid la urează

Examenul histopatologic. Acesta presupune examinarea microscopică de către medicul anatomo-patolog a probelor tisulare prelevate în timpul intervențiilor chirurgicale și microchirurgicale. Etapele principale ale examinării se succed în ordinea următoare: examinare macroscopică/eșantionare; histoprocasare (fixare în formol, includere la parafină, secționare blocuri de parafină, colorare standard hematoxilină-eozină/H&E); examinare microscopică lame colorate H&E; elaborare/redactare rezultat histopatologic final sau, după caz, rezultat histopatologic parțial, în conjuncție cu informații medicale relevante (clinice, imagistice, biochimice) solicitate la recepția

probei/probelor (fig. 2). Examenul histopatologic clasic poate fi urmat de teste complementare (colorații speciale, teste imunohistochimice, test de hibridizare in situ) în funcție de caz. Timpul de eliberare al rezultatului (raport patologic) este în majoritatea cazurilor de minimum 5 zile lucrătoare de la recepția probei/lor în Laboratorul Central. În funcție de complexitatea cazului, timpul de eliberare al rezultatului poate ajunge la 10 zile lucrătoare de la recepția probei/lor în laborator.

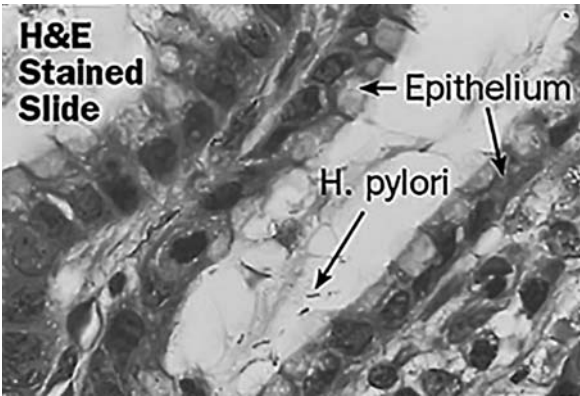


Fig. 2. Examen histopatologic a biopsiatului gastric cu prezența H.pylori

Tehnica PCR. Pentru izolarea ADN-ului s-au colectat colonii transparente (1-2 mm în diametru) în eprubete Eppendorf de 1,5 ml conținând 1 ml PBS (soluție salină tamponată cu fosfat). Eprubetele sunt centrifugate la 3000 g timp de 15 min. Extracția ADN se realizează cu un kit de preparare a șablonului PCR de mare puritate, conform instrucțiunilor producătorului. Se amplifică într-un ciclu termal T100 primerii aparținând regiunii 110 bp a regiunii 16srNA de *H. pylori* – Hp1 (înainte; 5'CTG GAG AGA CTA AGC CCT CC3') și Hp2 (Revers; 5' ATT ACT GAC GCT GAT TGT GC3') (20). Conținutul PCR se prepară cu un kit PCR Master Mix conform instrucțiunilor producătorului. Într-un total de 50 μL de volum de reacție, se utilizează 25 μL de amestec PCR Master Mix, 3 μL primer de înainte, 3 μL primer revers, 5 μL ADN izolat și 14 μL apă de calitate PCR. Procesul de reacție al protocolului de amplificare este de un ciclu la 95°C timp de 3 minute, 38 cicluri la 60°C timp de 1 min, la 95°C timp de 30 s și un ciclu la 72°C timp de 3 minute. Pentru electroforeză se prepară gel de agaroză 2% cu 0,6 g agaroză, 2 μL bromură de etidiu și 30 ml tampon TAE (40 mmol/L Tris-acetat, 1 mmol/L EDTA, pH 8,0). Se introduce 1 μL 6 x colorant de încărcare și 5 μL de amplimer în fiecare godeu. În plus, se adaugă în godeul corespunzător 1 μL ADN de 100 bp. Apoi, gelul este supus timp de 20 minute la 55 mA și 110 V. Benzile sunt vizualizate într-un gel de monitorizare UV Doc EZ System. Benzile similare cu banda de 110 bp cu control pozitiv sunt acceptate ca fiind pozitive.

Cultura *Helicobacter pylori*. Deși cultura *H. pylori* n-ar trebui considerată ca o procedură de rutină în diagnosticul inițial, în multe laboratoare de bacteriologie izolarea *H. pylori* prin cultura probelor de biopsie este o abordare de rutină a celei de-a doua linii de tratament [9,10]. În ultimii ani, utilizarea tehnicii de cultură ca instrument de diagnostic a fost abandonată în favoarea metodelor neinvazive, sensibile și rapide. Această tranziție a apărut din cauza dificultăților proceselor de cultivare a acestui agent patogen, în special consumul excesiv de timp pentru procedura clasică de obținerea culturii și lipsa competențelor profesionale al microbiologului. Cu toate acestea, se observă o creștere a rezistenței bacteriene la tratament antibacterian. Prin urmare, tehnica de cultură se dovedește utilă ca o metodă de diagnosticare care oferă informații privind profilul de susceptibilitate la antibiotice și joacă un rol important în tratamentul empiric cu antibiotice și gestionarea cazurilor refractare la tratament. Profilul de susceptibilitate poate fi obținut numai după cultivarea *H. pylori*.

Datorită caracterului exigent al acestei bacterii, această metodă rămâne totuși o provocare. Această

tehnică, deși este foarte specifică, nu este la fel de sensibilă ca și alte teste, cum ar fi histologia și testul rapid de urează. La fel ca și în scopuri de cercetare științifică, *H. pylori* viu cultivat este utilizat pentru abordări diagnostice și pentru detectarea rezistenței la antibiotice, în caz de eșec al tratamentului [11]. *H. pylori* necesită o atmosferă microaerofilă (5% până la 10% oxigen, 5% până la 12% dioxid de carbon și 80% -90% azot cu umiditate) și un mediu de cultură complex. Cel mai frecvent utilizat mediu conține Brucella, Columbia Wilkins-Chalgren, infuzie creier-înmă sau agar tripticază, suplimentat cu sânge de ovine sau cai [12]. Deoarece izolarea acestui microaerofil din specimene de biopsie gastrică durează mult timp (până la 5-7 zile), pentru a depăși problema creșterii altor concurenți care există în probă, mediul de cultură este suplimentat cu antibiotice specifice.

Deși *H. pylori* ar putea fi cultivat din mase fecale [13,14], prezența și creșterea altor numeroase bacterii și în special microorganismelor fenotipice similare cu *H. pylori*, obligă utilizarea ulterioară a altor metode pentru diferențierea coloniilor. În plus, este posibil ca bacteria să intre într-o formă viabilă care nu poate fi cultivată (formă cocoidă), ceea ce duce la rezultate fals negative [15,16]. *H. pylori* se transformă în forma cocoidă în anumite condiții, cum ar fi insuficiența de substanțe nutritive și mediile care conțin inhibitori de creștere (bismut, inhibitori al pompei de protoni, sau anumite antibiotice). Această formă cocoidă este cunoscută pentru capacitatea sa de a supraviețui timp de mai mulți ani în apă de râu, reprezentând un factor important în transmiterea prin excrețiile fecale și explicând eșecul terapiei.

La momentul actual sunt cunoscute două metode de cultivare a *H. pylori*: cea clasică și metoda de cultivare microcapilară.

Metoda clasică de cultură a *H. pylori*. Biopsiile se introduc în eprubete ce conțin 500 μL bulion Brucella (Biolife) cu 20% glucoză, care apoi sunt omogenizate cu o baghetă de sticlă, într-o hotă cu flux laminar. Trei sau patru fragmente din această probă omogenizată sunt inoculate într-un mediu selectiv (Becton Dickinson, *Helicobacter* Agar, Modified) specific pentru izolarea *H. pylori* și care conține agar-agar Columbia, 10% sânge de cal defibrinat, 10 mg/L vancomicină, 10 mg/L amfotericină B, 5 mg/L cefsulodin, și 5 mg/L trimethoprim și se incubează la 37°C. Atmosfera microaerofilă este asigurată de CampyGen (BD GasPack). După o perioadă de incubare de 72 h, morfologia coloniei de bacterii și caracteristicile lor Gram colorare sunt studiate. Coloniile apar convexe, semitransparente, cu diametrul de 1-2 mm, cele cu activitatea pozitivă la catalază, urează și oxidază, fiind desemnate ca *H. pylori* [17,18].

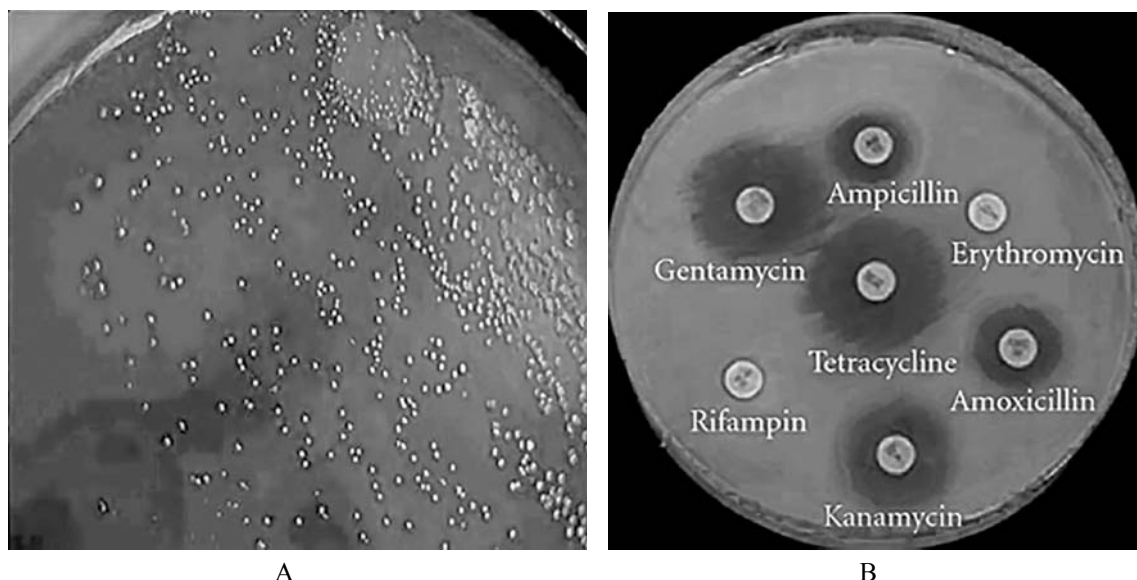


Fig. 3

A. Cultura *Helicobacter pylori* pe mediu Agar cu sânge, a treia zi

B. Testarea sensibilității culturii *Helicobacter pylori* la diferite preparate antibacteriene

Metoda clasică de cultură are o sensibilitate mai mică de 65% comparativ cu cea mai recentă metodă de cultivare microcapilară, care are o sensibilitate și o specificitate de 96% și, respectiv, 80%. Această nouă metodă de cultivare a *H. pylori* prin cultivare microcapilară (microcultură) este avantajoasă datorită sensibilității sale de diagnostic înalte în comparație cu testele de cultură clasică, examinare histopatologică și testarea rapidă la urează. Metoda în sine produce condiții microaerofilice care elimină necesitatea unui kit ce asigură mediul microaerofil.

Metoda de cultivare microcapilară a *H. pylori* (microcultura). Tuburi microcapilare (ISOLAB) sunt puse într-o soluție de cromat de potasiu timp de 1 h, apoi se clătesc cu apă pură. Ele sunt sterilizate într-un cuptor Pasteur la 180°C timp de 1 oră. Biopsiile transportate în gheață uscată, în eprubete conținând 500 μL bulion Brucella (Biolife) cu 20% glucoză, sunt omogenizate cu o baghetă de sticlă într-o hotă cu flux laminar. În fiecare tub microcapilar sunt transfere 60 μL din proba omogenizată, iar capetele tuburilor sunt închise cu silicon steril. Tuburile microcapilare sunt incubate la temperatura de 37°C timp de 48 h, fără utilizarea kiturilor ce asigură atmosfera cu CO₂. După perioada de incubare, capetele tuburilor capilare sunt sparte într-un flux laminar, în condiții sterile, iar conținutul se transferă într-un anumit agar selectiv gata de utilizare pentru izolarea *H. pylori* (Becton Dickinson, *Helicobacter* Agar, modificată) și conținând agar Columbia, 10% sânge de cal defibrinat, 10 mg/L vancomicină, 10 mg/L amfotericină B, 5 mg/L cefsulodin, și 5 mg/L trimethoprim. Mediile sunt incubate la 37°C într-o atmosferă microaerofilă

asigurată de CampyGen. După perioada de incubare coloniile apar convexe, semitransparente, cu diametrul de 1-2 mm, cele cu activitatea pozitivă la catalază, urează și oxidază, fiind desemnate ca *H. pylori*.

Concluzie. În ciuda numeroaselor proiecte de cercetare academică și abordări comerciale, lipsește totuși o metodă standard aplicabilă în mod uniform, în special pentru populațiile în dezvoltare. Acest lucru, împreună cu incidența ridicată a infecției la nivel mondial și nevoia crescândă de tratament individualizat al acestei infecții, demonstrează necesitatea apariției unor metode de diagnosticare performante pentru *H. pylori*.

Bibliografie

1. Ekström AM, Held M, Hansson L-E, Engstrand L, Nyrén O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology*. 2001; 121: 784-91.
2. Zagari RM, Romano M, Ojetti V, Stockbrugger R, Gullini S, Annibale B, et al. Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Italy: the III Working Group Consensus Report 2015. *Digestive and Liver Disease*. 2015; 47: 903-12. doi: 10.1016/j.dld.2015.06.010.
3. Cid TP, Fernández MC, Benito Martínez S, Jones NL. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2013; 18: 12-7. doi: 10.1111/hel.12076.
4. Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2005; 10: 14-20. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00339.x.
5. Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2009; 14: 15-20. doi: 10.1111/j.1523-5378.2009.00702.x.
6. Backert S, Clyne M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2011; 16: 19-25. doi:10.1111/j.1523-5378.2011.00876.x.

7. Zou QH, Li RQ. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric mucosa: a meta-analysis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2011; 40:317-24. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01006.x.
8. Rana R, Wang SL, Li J, Wang YX, Rao QW, Yang CQ. *Helicobacter pylori* infection: A recent approach to diagnosis and management. *J Biomed* 2017; 2(1):45-56. doi:10.7150/jbm.17612. Available from <http://www.jbiomed.com/v02p0045.htm>
9. Samuels, A.L.; Windsor, H.M.; Ho, G.Y.; Goodwin, L.D.; Marshall, B.J. Culture of *Helicobacter pylori* from a gastric string may be an alternative to endoscopic biopsy. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, 38, 2438–2439.
10. Jaup, B.H.; Stenquist, B.; Brandberg, A. *Helicobacter pylori* culture from a positive, liquid-based urease test for routine clinical use: A cost-effective approach. *Helicobacter* **2000**, 5, 22–23.
11. Taj, Y.; Essa, F.; Kazmi, S.U.; Abdullah, E. Sensitivity and specificity of various diagnostic tests in the detection of *Helicobacter pylori*. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **2003**, 13, 90–93.
12. Ndip, R.N.; MacKay, W.G.; Farthing, M.J.G.; Weaver, L.T. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: Review of microbiologic methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2003**, 36, 616–622.
13. Namavar, F.; Roosendaal, R.; Kuipers, E.J.; de Groot, P.; van der Bijl, M.W.; Peña, A.S.; de Graaff, J. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1995**, 14, 234–237.
14. Hänninen, M.L. Sensitivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1991**, 10, 515–518.
15. Thomas, J.E.; Gibson, G.R.; Darboe, M.K.; Dale, A.; Weaver, L.T. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* **1992**, 340, 1194–1195.
16. Azevedo, N.F.; Almeida, C.; Cerqueira, L.; Dias, S.; Keevil, C.W.; Vieira, M.J. Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 3423–3427.
17. McColl KE. Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2010; 362: 1597-1604 [PMID: 20427808 DOI: 10.1056/NEJMcp1001110].
18. Frenck RW, Fathy HM, Sherif M, Mohran Z, El Mohammedy H, Francis W, Rockabrand D, Mounir BI, Rozmajzl P, Frierson HF. Sensitivity and specificity of various tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in Egyptian children. *Pediatrics* 2006; 118: e1195-e1202 [PMID: 16982805 DOI: 10.1542/peds.2005-2925].
19. BMJ 2008; 337.
20. Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 2162-2165 [PMID: 7559969].