نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، دوره ۲، شماره ۴، پاییز ۱۳۹۲ ۱۹۶-۱۹۱

تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری در کودکان و بزرگسالان با استفاده از تست سرولوژیک و تست آنتی‌ژن مدفوعی

غلامرضا عزیزی[۱*]، مهرداد نصیری[۲]، رضا صدریا[۳]، محمد حسن جوانبخت[۴]، مینا کلوندی[۵]، نیکو خان ناظر[۶] و بابک اصغری[۷]

[۱] کارشناس ارشد ایمونولوژی، بیمارستان امام حسن مجتبی(ع)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
[۲] کاردان آزمایشگاه، بیمارستان امام حسن مجتبی(ع)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
[۳] گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۵] بیمارستان تامین اجتماعی شهریار، سازمان تامین اجتماعی تهران، تهران، ایران
[۶] گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۷] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[*] **نویسنده مسئول:** کارشناس ارشد ایمنولوژی، بیمارستان امام حسن مجتبی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۰۹۱۲-۳۶۶۵۵۱۲
E-mail: azizi_g@razi.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۲/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه وهدف: عفونت با هلیکوباکتر پیلوری عامل ایجاد گاستریت مزمن مرتبط با زخم دئودنوم، زخم معده و احتمالا آدنوکارسینومای معده است. تست‌های تشخیصی غیرتهاجمی شامل تست اوره تنفسی و تست‌های سرولوژیک و آنتی‌ژن مدفوعی می‌باشند. تشخیص سرولوژیک عفونت هلیکوباکتر پیلوری در کودکان صحت بالایی ندارد. به منظور بررسی پاسخ ایمنی به هلیکوباکتر پیلوری در کودکان و بزرگسالان، آنتی‌بادی‌های IgG و IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری را با آنتی‌ژن هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع (HpSA) مقایسه کردیم.

مواد و روش‌ها: نمونه مدفوع و سرم از ۲۱۸ بیمار کودک و بزرگسال مراجعه کننده به بیمارستان امام حسن مجتبی که دارای علائم کلینیکی بوده و در محدوده سنی ۴ تا ۷۷ سال قرار داشتند جمع‌آوری شد. نتایج سرولوژیک (IgG و IgA) و HpSA با استفاده از روش‌های ایمنواسی بدست آمدند.

یافته‌ها: از ۲۱۸ نتیجه سرولوژیک و HpSA بدست آمده، ۳۹ مورد مربوط به کودکان (≤۱۷ سال) و ۱۷۹ مورد مربوط به بزرگسالان (≤۱۸ سال) بود. میزان نتایج مثبت مربوط به HpSA (۴۵/۸٪) بطور مشخص (P<0.001) کمتر از نتایج مربوط به IgG (۵۴/۶٪) و بیشتر از IgA (۲۸/۹٪) بود. همچنین ویژگی تست‌های سرولوژیک IgG و IgA در کودکان درمقایسه با بزرگسالان بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه HpSA بعنوان یک ابزار کلینیکی و اپیدمیولوژیکی حساس و اختصاصی جهت ارزیابی عفونت هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد. IgG همبستگی بهتری با HpSA نسبت به IgA داشت و همچنین IgG درکودکان بسیار حساس‌تر از بزرگسالان بود که موید این مطلب، احتمال تماس بیشتر بزرگسالان با هلیکوباکتر پیلوری در گذشته است. با استفاده از HpSA بعنوان استاندارد طلایی ما مشاهده کردیم که عملکرد تست‌های سرولوژیک IgG و IgA نسبت به سن متفاوت است، زیرا پاسخ ایمنی ناکامل یا تحمل به هلیکوباکتر پیلوری در کودکی وجود دارد و بنابراین تشخیص سرولوژیک هلیکوباکتر پیلوری کاربرد کمتری خواهد داشت. بنابراین ما پیشنهاد می‌کنیم که آزمایشگاه‌ها محدوده تیترهای سرولوژیک خود را بر اساس سن بازنگری کنند درحالیکه همبستگی کلینیکی بیشتر در این زمینه جهت تثبیت محدوده‌های اپتیمم لازم است.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، تست‌های سرولوژیک، حساسیت، ویژگی، زخم معده

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری باکتریی گرم منفی و متحرک است که آلودگی با این باکتری در تمام جهان گزارش شده است. این باکتری عامل ایجاد التهابات حاد و مزمن معده‌ای- روده‌ای است که پیامد این التهاب زخم پپتیک، گاستریت مزمن و لنفوم معده در کودکان و بزرگسالان می‌باشد، به طوریکه این باکتری ریسک ابتلا به سرطان معده را تا حدود ۶ برابر افزایش می‌دهد.[۱و۲] همچنین عفونت با هلیکوباکترپیلوری در ارتباط با بیماری‌های غیرگوارشی دیگری از جمله بیماری‌های عروق مغزی و کرونر قلب، فشار خون بالا، سردردهای میگرنی و استفراغ های دوره بارداری گزارش شده است. میزان شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری بسته به منطقه جغرافیایی و سطح بهداشت آن متفاوت است. اطلاعات بدست آمده

حاکی از آن است که تقریباً ۵۰٪ جمعیت جهان به این عفونت مبتلا هستند.[۶-۳] امروزه از ابزاری چون آندوسکوپی، تست اوره‌آز سریع و آزمایشات تشخیصی گوناگونی مانند تست اوره‌تنفسی، تشخیص آنتی‌ژن مدفوعی هلیکوباکترپیلوری (HpSA) از جمله CagA، VacA و تست‌های سرولوژی (IgG, IgA, IgM) و همچنین آزمون‌های ملکولی (PCR) جهت شناسایی هلیکوباکترپیلوری استفاده می‌گردد[۷و۸] که دراین میان با وجود کمتر بودن ارزش تشخیصی آزمون‌های سرولوژیک بخصوص در موارد ارزیابی عفونت فعال، اما بعنوان تست‌های غربالگری ساده و کم هزینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. هرچند که با توجه به شایع بودن این باکتری در سطح جامعه و تولید آنتی بادی‌های IgA و IgG در موارد ابتلا، و باقی ماندن این آنتی بادی‌ها در سرم بیمار بدلیل ایجاد خاطره ایمنی، شاهد بالاتر بودن تیتر این آنتی بادی‌ها در افراد مسن نسبت به افراد جوانتر حتی در غیاب عفونت فعال و عدم وجود بیماری خواهیم بود. در نتیجه استناد بر تیتر IgA و IgG در کودکان نسبت به بزرگسالان بدلیل عدم وجود، و یا کمتر بودن خاطره ایمنی نسبت به عفونت هلیکوباکترپیلوری قابل اعتمادتر است.[۹] با این مقدمه می‌توان دریافت که کارایی و ارزش تشخیصی آزمون‌های سرولوژیک با افزایش سن کمتر شده و نیاز به تعیین محدوده نرمال و غیرنرمال متناسب با رنج‌های سنی مختلف و یا استفاده از تست آنتی‌ژن مدفوعی بعنوان یک روش تشخیصی مناسب و دقیق در کنار آزمون‌های سرولوژیک ضروری می‌باشد.[۱۰و۱۱] هدف از انجام این مطالعه این است تا با استفاده از HpSA بعنوان استاندارد طلایی کارایی تست‌های سرولوژیک IgG و IgA را نسبت به یکدیگر و همچنین در سنین متفاوت مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی توصیفی-تحلیلی بصورت داوطلبانه از ۲۱۸ بیمار که طی سال‌های ۹۰ و ۹۱ به بیمارستان امام حسن مجتبی مراجعه کرده و در محدوده سنی ۴ تا ۷۷ سال قرار داشتند استفاده شد. این افراد دارای علائم کلینیکی مشکوک به عفونت هلیکوباکتر پیلوری، گاستریت و یا سوء هاضمه بودند و همچنین در سابقه آنها عدم مصرف آنتی بیوتیک طی یک ماه اخیر و عدم مصرف بیسموت، مهار کننده های پمپ پروتون و بلوک کننده‌های گیرنده H2 طی دو هفته اخیر لحاظ شده بود (هرچند که بدلیل شیوع کمتر این باکتری در سنین پایین‌تر و بالطبع کمیاب بودن کودکان مشکوک به عفونت، تعداد افراد کودک شرکت کننده در این بررسی بسیار کمتر از افراد بزرگسال بود).[۱۲] از افراد مورد نظر مقدار ۵ سی‌سی نمونه خون وریدی بهمراه نمونه مدفوع جمع آوری شد، سرم‌ها سریعا از سلول‌ها جدا شدند و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه ذخیره شدند. همچنین نمونه‌های مدفوع نیز تا ۲۴ ساعت قبل از آزمایش در دمای ۸-۲ درجه و برای ذخیره سازی طولانی‌تر در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

جهت بررسی کمی تیتر آنتی‌بادی IgG و IgA در سرم افراد، پس از ذوب کردن نمونه‌های سرم، آنها را به نسبت ۱ به ۱۰۱ با بافر موجود در کیت رقیق کرده و سپس از روش آنزیم ایمنو اسی (الیزا) غیر رقابتی با استفاده از کیت‌های شرکت پیشتاز طب زمان *(H.Pylori ELISA KIT, Tehran, Iran)* با حساسیت ۸۴٪ و ویژگی ۹۵٪ در مورد IgA و حساسیت ۸۴٪ و ویژگی ۹۷٪ در مورد IgG اندازه‌گیری انجام شد. در این کیت، آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری به کف چاهک‌ها متصل هستند که با اضافه کردن نمونه رقیق شده به آنها، در صورت وجود آنتی‌بادی مورد نظر در نمونه به این آنتی‌ژن‌ها متصل می‌گردد و سرانجام با افزودن آنتی‌هیومن نشاندار (کنژوگه) این آنتی‌بادی‌های موجود در سرم شناسایی می‌گردد. همچنین جهت بررسی کمی HpSA از کیت آنتی‌ژن هلیکوباکتر پیلوری شرکت *(H.Pylori Stool ELISA KIT, Hannover, Germany)* ACON با روش ساندویچ الیزا استفاده شد. در این چاهک‌ها آنتی‌بادی منوکلونال ضد آنتی‌ژن هلیکوباکترپیلوری متصل شده است و در صورت وجود آنتی‌ژن در مدفوع، به این آنتی‌بادی‌ها متصل شده و با اضافه کردن کنژوگه آنزیمی پلی‌کلونال، وجود آنتی‌ژن شناسایی می‌گردد. این کیت حساسیتی معادل ۹۸/۶٪ و ویژگی آن ۹۵/۴٪ می‌باشد. تمام مراحل انجام آزمایش و محاسبه نتایج بر اساس دستورالعمل موجود در بروشور کیت‌ها انجام شد و اطلاعات بدست آمده از نظر آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۷مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

از ۲۱۸ فرد داوطلب (۴۹٪ زن و ۵۱٪ مرد) که آزمایشات سرولوژی و HpSA برای آنها انجام شده بود ۳۹ نفر سنی برابر با ۱۷ سال یا کمتر(≤۱۷) و ۱۷۹ نفر سن ۱۸ سال و بالاتر(≥۱۸) داشتند. در بررسی سرولوژی IgG و IgA، مقادیر بیشتر از ۲۰ U/ml نشاندهنده وجود آنتی‌بادی اختصاصی در حد قابل تشخیص، مقادیر کمتر از ۱۵ U/ml نشاندهنده این است که آنتی‌بادی در حد قابل تشخیص وجود ندارد و تیترهای آنتی‌بادی بین ۲۰-۱۵ U/ml مشکوک می‌باشند. اما در مورد تست آنتی‌ژن مدفوعی مقادیر کمتر از ۰/۰۴۵ µg/ml منفی، مقادیر بیشتر از ۰/۰۵۵ µg/ml مثبت و مقادیر ۰/۰۵۵-۰/۰۴۵ µg/ml مشکوک در نظر گرفته شدند (در این بررسی تمام نتایج مشکوک هر دو تست سرولوژیک و HpSA از آنالیز آماری حذف شدند).

میزان مثبت بودن آزمون HpSA در افراد مورد بررسی ۴۵/۸٪ بود که این مقدار کمتر از میزان افراد مثبت شناسایی شده در آزمون‌های سرولوژیک IgG (۵۴/۶٪) و بیشتر از IgA (۲۸/۹٪) می‌باشد (جدول ۱).

با استفاده از HpSA بعنوان استاندارد طلایی حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت positive predictive value (PPV)، ارزش اخباری منفی negative predictive value (NPV) و صحت با فاصله اطمینان۹۵٪ برای IgG و IgA بر اساس گروه‌های سنی مختلف (تمام سنین، ≤۱۷و ≥۱۸) محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است.

منحنی Receiver Operating Characteristics (ROC) برای هر آنتی‌بادی مورد سنجش با استفاده از HpSA بعنوان استاندارد طلایی رسم شد (نمودار ۱) که ناحیه سطح زیر منحنی برای IgA (۰/۷۳۸) کمتر از IgG (۰/۸۳۸) بود.

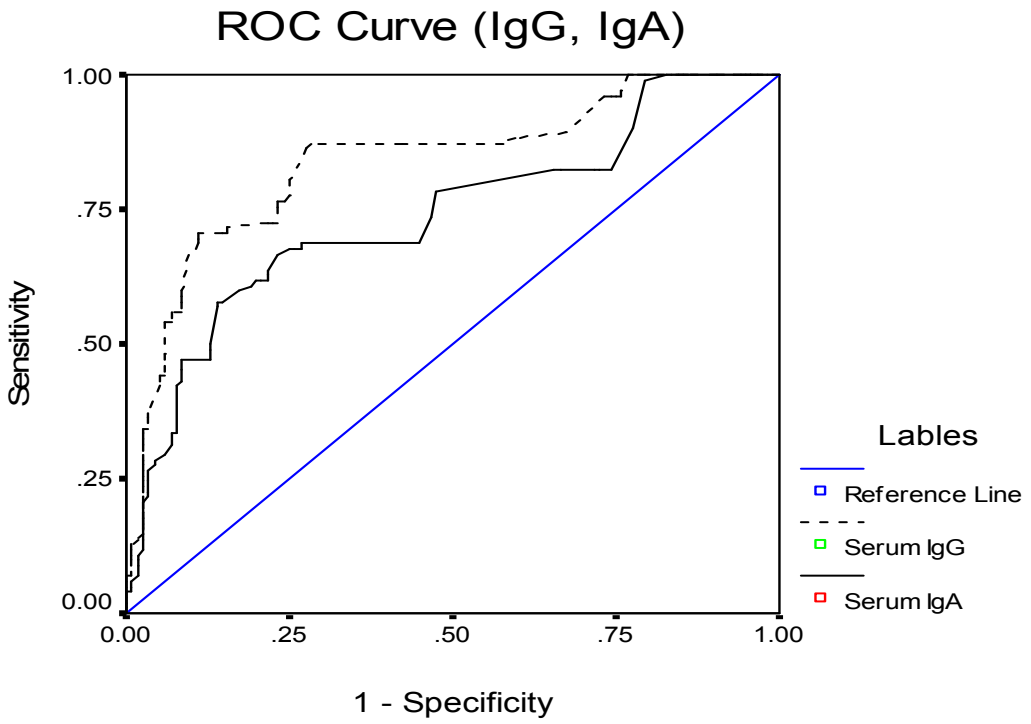
جدول ۱. نتایج مثبت در تست سرولوژیک و HpSA

محدوده سنی	تعداد کل	مقادیر مثبت					
		HpSA		IgG		IgA	
		تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد	٪
تمامی سنین	۲۱۸	۱۰۰	۴۵/۸	۱۱۹	۵۴/۶	۶۳	۲۸/۹
≤۱۷	۳۹	۱۴	۳۵/۹	۱۵	۳۸/۵	۴	۱۰/۳
≥۱۸	۱۷۹	۸۶	۴۸	۱۰۴	۵۸/۱	۵۹	۳۳

جدول ۲. آنالیز آماری نتایج سرولوژیک با استفاده از HpSA بعنوان استاندارد طلایی

سن و آنتی‌بادی	حساسیت (٪)	ویژگی (٪)	صحت (٪)	ارزش اخباری مثبت (٪)	ارزش اخباری منفی (٪)
IgG					
تمامی سنین	۸۷/۲	۷۱/۵	۷۸/۸	۷۲/۹	۸۶/۴
≤۱۷	۷۱/۴	۸۰	۷۶/۹	۶۶/۶	۸۳/۳
≥۱۸	۸۹/۷	۶۹/۲	۷۹/۳	۷۳/۸	۸۷/۵
IgA					
تمامی سنین	۴۷	۸۷	۶۸/۳	۷۶/۱	۶۵/۱
≤۱۷	۲۸/۵	۱۰۰	۶۸/۳	۱۰۰	۷۱/۴
≥۱۸	۵۰	۸۳/۵	۶۷	۷۴/۵	۶۳/۳

HpSA: آنتی ژن مدفوعی هلیکوباکترپیلوری



نمودار ۱. منحنی ROC برای ارزیابی ارزش تشخیصی مقادیر IgG و IgA با استفاده از HpSA به عنوان استاندارد طلایی.

بحث

همانطورکه می‌دانیم تست‌های سرولوژیک در تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری هم بیماری فعال و هم ابتلا به عفونت در گذشته را نشان می‌دهند و بنابراین فراوانی نتایج مثبت آنها نسبت به HpSA که بیماری فعال را نشان می‌دهد بیشتر است.[۱۳] در مطالعه صورت گرفته در دانشگاه علوم پزشکی کاشان یک ارتباط مستقیم بین شدت عفونت هلیکوباکترپیلوری و HpSA مشاهده شد. در این بررسی آقای ارج و همکارانش پیشنهاد کردند که روش تشخیصی عفونت هلیکوباکترپیلوری با استفاده از HpSA می‌تواند روشی جایگزین برای تست‌های سرولوژیک و همچنین روش‌های تهاجمی باشد.[۱۴] همچنین در بررسی صورت گرفته توسط خانم امیرزاده و همکارانش در سال ۸۵ درکودکان شهر سنندج، این نکته اثبات شد که با افزایش سن میزان شیوع عفونت افزایش می‌یابد، بنابراین با افزایش سن میزان خاطره ایمنی باقی مانده از عفونت نیز افزایش یافته که خود باعث مثبت شدن تست‌های سرولوژیک حتی در غیاب عفونت فعال می‌شود.[۱۵] در این تحقیق ما با استفاده از HpSA بعنوان استاندارد طلایی مشاهده کردیم که عملکرد تشخیصی تست‌های سرولوژیک IgG و IgA بر اساس سن متفاوت است. همانطوریکه در کودکان در مقایسه با بزرگسالان دیده شد، IgG نسبت به IgA از ارتباط بهتری با HpSA و بیماری برخوردار است و این مطلب گویای این واقعیت است که تست‌های سرولوژیک و به‌خصوص IgG در تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری دارای صحت بالاتری در کودکان نسبت به بزرگسالان می‌باشند که احتمالاً بدلیل برخوردهای قبلی افراد بزرگسال با این باکتری و ایجاد خاطره ایمنی بصورت تیترهای بالای آنتی‌بادی بوده است.[۱۶و۱۷] تا به حال آزمون های سرولوژیک فراوانی در کودکان و بزرگسالان بیمار مورد بحث و بررسی قرار گرفته است، اما هیچگاه محدوده مقادیر نرمال و غیرنرمال مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها منطبق با محدوده سن افراد بیمار تعیین نگردیده است.[۱۰و۱۳] همانطور که ذکر شد میزان تیتر این آنتی‌بادی‌ها و به‌ویژه IgG در حالت طبیعی و در عدم حضور عفونت فعال در بزرگسالان بواسطه مواجه قبلی با باکتری هلیکوباکترپیلوری بالاتر از کودکان بوده، و از سوی دیگر بدلیل

فروانی متفاوت این باکتری در مناطق با سطح بهداشت متفاوت (در مناطق با سطح بهداشت بالا میزان شیوع عفونت کمتر است)،[۳و۴و۱۸و۱۹] لازم است تا در آزمایشگاه‌ها محدوده تیترهای نرمال متفاوتی جهت تست‌های سرولوژیک در کودکان و بزرگسالان تعیین گردد، بگونه‌ای که سطح Cutoff یا محدوده نرمال پائین‌تری در کودکان در مقایسه با بزرگسالان تعریف گردد زیرا همانطوری‌که بحث شد و نتایج نشان دادند سطح آنتی‌بادی‌ها در بزرگسالان با افزایش سن بدلیل خاطره ایمنی بالاتر است[۱۷و۲۰] که این موضوع (تعیین محدوده‌های نرمال و غیرنرمال بر مبنای سن در کودکان و بزرگسالان) خود به بررسی‌های کلینیکی و انجام تحقیقات گسترده با تعداد نمونه بیشتر نیاز دارد.

References

1. Ferreccio C, Rollan A, Harris PR, Serrano C, Gederlini A, Margozzini P, et al. Gastric cancer is related to early Helicobacter pylori infection in a high-prevalence country. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2007 Apr;16(4):662-7. PubMed PMID: 17416755.
2. Marshall BJ, Windsor HM. The relation of Helicobacter pylori to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. The Medical clinics of North America. 2005 Mar;89(2):313-44, viii. PubMed PMID: 15656929.
3. Go MF. Review article: natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. Alimentary pharmacology & therapeutics. 2002 Mar;16 Suppl 1:3-15. PubMed PMID: 11849122.
4. Baradaran A, Nasri H. Association of Helicobacter pylori IgG antibody with various demographic and biochemical parameters in kidney transplant recipients. Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia. 2011;22(6):1115-20. PubMed PMID: 22089767.
5. DiMARINO AJ. Therapy of digestive disorders: A companion to sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease. Gastroenterology. 2000 Jun;118(6):1275-6. PubMed PMID: 10833506.
6. Pathak CM, Kaur B, Bhasin DK, Mittal BR, Sharma S, Khanduja KL, et al. Superiority of non-capsulated 14C-urea breath test over capsule based method for detection of Helicobacter pylori infection - a preliminary report. Tropical gastroenterology : official journal of the Digestive Diseases Foundation. 2012 Apr-Jun;33(2):123-8. PubMed PMID: 23025059.
7. Pourakbari B, Mirsalehian A, Maleknejad P, Mamishi S, Azhdarkosh H, Daryani NE, et al. Evaluation of a new antigen for diagnosis of Helicobacter pylori infection in stool of adult and children. Helicobacter 2011;16(1):42-6.
8. Dore MP, Negrini R, Tadeu V, Marras L, Maragkoudakis E, Nieddu S, et al. Novel monoclonal antibody-based Helicobacter pylori stool antigen test. Helicobacter. 2004 Jun;9(3):228-32. PubMed PMID: 15165258.
9. Hunt RH, Xiao SD, Megraud F, Leon-Barua R, Bazzoli F, van der Merwe S, et al. Helicobacter pylori in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guideline. Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD. 2011 Sep;20(3):299-304. PubMed PMID: 21961099.
10. She RC, Wilson AR, Litwin CM. Evaluation of Helicobacter pylori Immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM serologic testing compared to stool antigen testing. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2009 Aug;16(8):1253-5. PubMed PMID: 19515865.
11. Gonzalez FC, Serrano HC, Harris PR. [Diagnosis of Helicobacter pylori infection in children based on stool antigen test]. Revista medica de Chile. 2007 Feb;135(2):182-8. PubMed PMID: 17406735.
12. Segal I, Otley A, Issenman R, Armstrong D, Espinosa V, Cawdron R, et al. Low prevalence of Helicobacter pylori infection in Canadian children: a cross-sectional analysis. Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie. 2008 May;22(5):485-9. PubMed PMID: 18478134.
13. Kindermann A, Konstantopoulos N, Lehn N, Demmelmair H, Koletzko S. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays, testing immunoglobulin G (IgG) and IgA responses, for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. Journal of clinical microbiology 2001;39(10):3591-6.
14. Arj A, Ehteram H, Mortazavi TS, Taghadosi M, Mousavi GA , Vakili-Sohr-Foroozani Z. Efficacy of stool antigen test for the non-invasive diagnosis of Helicobacter pylori infection in dyspeptic patients referred to GI clinic of Kashan Shahid Beheshti Hospital during 2007-8. Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences,. 2011;15(1):17-22.
15. Amirzadeh N, Amirzadeh J and Amirzadeh J. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children stool sample in sanandaj city with ELISA method. Journal of Nursing and Midwifery 1385;4(4).

16. Bonamico M, Strappini PM, Bonci E, Ferri M, Crisogianni M, Guido M, 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 Feb;9(1):69-76. PubMed PMID: 15156906.

17. Crabtree JE, Mahony MJ, Taylor JD, Heatley RV, Littlewood JM, Tompkins DS. Immune responses to Helicobacter pylori in children with recurrent abdominal pain. Journal of clinical pathology. 1991 Sep;44(9):768-71. PubMed PMID: 1918408. Pubmed Central PMCID: 496728.

18. World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation Global Guideline: Helicobacter pylori in developing countries. Journal of clinical gastroenterology. 2011 May-Jun;45(5):383-8. PubMed PMID: 21415768.

19. Harris P, Perez-Perez G, Zylberberg A, Rollan A, Serrano C, Riera F, et al. Relevance of adjusted cut-off values in commercial serological immunoassays for Helicobacter pylori infection in children. Digestive diseases and sciences. 2005 Nov;50(11):2103-9. PubMed PMID: 16240223.

20. Adler-Shohet F, Palmer P, Reed G, Edwards K. Prevalence of Helicobacter pylori antibodies in normal children. The Pediatric infectious disease journal. 1996 Feb;15(2):172-4. PubMed PMID: 8822294.

21.