View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد / دوره اول، شماره ۲ / ۷-۱ / تابستان ۱۳۷۸

تشخیص عفونتهای *H.pylori* بر اساس روش HM-CAP ELISA و مقایسه آن با کیت تجارتی

دکتر محمدرضا نفیسی*، دکتر سید علی فاضلی**، دکتر کامبیز حاذقی*، دکتر احمد قوامی نژاد**

چکیده:

تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که *Helicobacter pylori* از عوامل اختلالات معدی - روده‌ای بوده و با کارسینومای معده و لنفوم MALT (Mucosal-Associated Lymphatic Tissue) در ارتباط است. ابداع یک روش غیر تهاجمی معتبر بر اساس ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)، تشخیص عفونتهای این باکتری و انجام مطالعات غربالگری گسترده در بین جمعیت‌های مختلف جامعه را امکان‌پذیر می‌سازد. در این تحقیق از باکتریهای *H.pylori* جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده، پروتئینهای متصل به غشاء باکتری توسط دترجنت NOG (*n*-Octyl-β-D-Glycopyranoside) استخراج شد و سپس از این مجموعه پروتئینهای با وزن مولکولی زیاد HM-CAP (High Molecular-Cell Associated Proteins)، منجمله آنزیم اوره‌آز به طریق کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون تخلیص گردید تا از آن به عنوان آنتی‌ژنی برای پوشش دادن پلیت‌های میکروتیتر ELISA استفاده شود. سرم ۲۴ بیمار از نظر وجود آنتی‌بادی علیه *H.pylori* به دو روش بر اساس ELISA، یک روش حاصل از این تحقیق و دیگری کیت تجارتی RADIM ، مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه نتایج کیفی سرم بیماران تست شده با این روشها نشان می‌دهند که در ۱۵ مورد هر دو روش جواب مثبت و در ۵ مورد هر دو روش جواب منفی داشته و در بقیه موارد جواب یکی از روشها مشکوک بوده است. به بیان دیگر نتایج کیفی سرمهای تست شده به روش HM-CAP ELISA نسبت به کیت تجارتی از نظر حساسیت و ویژگی مطابقت دارد. همچنین مقایسه نتایج کمّی این دو روش، ضریب همبستگی r=0.89 را بین آنها نشان می‌دهد که این ضریب همبستگی از نظر آماری معنی‌دار است ($P<0.001$). بنابراین می‌توان ادعا کرد که روش ابداعی این تحقیق برای تشخیص عفونتهای *H.pylori* دارای اعتبار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکترپیلوری، الایزا، اوره‌آز

مقدمه:

Helicobacter pylori گونه‌ای از باکتریهای گرم منفی، خمیده‌ای شکل، متحرک و اوره‌آز مثبت است که در انسان گاستریت حاد و گاستریت مزمن با پیامدهائی نظیر بیماریهای زخم پپتیک ایجاد می‌کند (۱۲،۱۴)، بطوریکه ۹۵٪ از زخمهای اثنی عشر و ۷۰٪ الی ۸۰٪ از زخمهای معده در ارتباط با عفونت این باکتری هستند (۱۱).

همچنین ارتباط نزدیک عفونتهای این باکتری با کارسینومای معده و لنفوم MALT به قدری مستدل گشته است که سازمان بهداشت جهانی (WHO) و مؤسسهٔ بین‌المللی تحقیق بر روی سرطان (IARC)، باکتری *H.pylori* را در گروه ۱ عوامل کارسینوژن طبقه بندی نموده‌اند (۳،۱۱).

*عضو هیأت علمی گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
** استادیار گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
☆ دانشیار گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
☆☆ استادیار گروه ایمنولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

زخم معده، زخم اثنی عشر و سوء هاضمهٔ بدون زخم، بیماریهائی هستند که تظاهرات مشترکی به صورت ناراحتیهای گوارشی دارند. این ناراحتیها یک مشکل جهانی بوده و بدین خاطر هر ساله بودجهٔ زیادی از سازمانهای بهداشتی و درمانی صرف هزینه‌های داروئی، معاینات پزشکی و از دست رفتن نیروی کار می‌شوند.

بررسی هیستولوژی و کشت، از روشهای استاندارد طلایی برای تشخیص *H.pylori* هستند، ولیکن این روشها تهاجمی بوده و نیاز به انجام آندوسکوپی و برداشت نمونهٔ بیوپسی معده دارند (۲). روشهای غیر تهاجمی نظیر تستهای تنفسی به نمونهٔ بیوپسی معده نیازی ندارند و برای بررسیهای تشخیصی و اپیدمیولوژی در سطح وسیعی از جمعیت‌های جامعه مناسب هستند. تستهای تنفسی بر مبنای خورانیدن اوره با کربن نشاندار به بیمار ابداع گردیده‌اند و حساسیت و ویژگی قابل قیاس با روشهای تهاجمی دارند. از نقاط ضعف این روشها، نیاز به وسایل گران قیمت برای اندازه‌گیری کربن نشاندار در هوای بازدم، وقت‌گیر بودن تست برای بیمار و نیز خطر مصرف کربن رادیواکتیو در تست تنفسی با کربن ^{14}C برای خانمهای باردار و اطفال است (۱۰،۱۵).

تحقیقات Crabtree و Rathbone نشان می‌دهند که تشخیص عفونتهای *H.pylori* با روشهای سرولوژی امکان‌پذیر است (۵،۱۳). تستهای سرولوژی تشخیص *H.pylori* نسبت به روشهای تهاجمی از مقبولیت همگانی برخوردار هستند، اما محدودیتهای این تستها در رابطه با میزان حساسیت و اختصاصی بودن ضعیف آنها است (۷،۹). جستجوی آنتی‌بادیهای علیه باکتری به طریق آگلوتیناسیون، ثبوت مکمل و ایمونوفلورسانس قابل اجرا است، ولی این روشها اغلب غیر حساس‌اند و یا انجام آنها در سطح وسیع عملی نیستند (۲). تستهایی که بر اساس سنجش ایمنی به روش اتصال آنزیمی (ELISA) طراحی شده‌اند، بر این ضعف فائق آمده‌اند، اما نکتهٔ حائز اهمیت انتخاب آنتی‌ژن به کار برده شده در تست است تا ویژگی تست (specificity) افزایش یابد و جوابهای صحیح و معتبری به دست آیند.

در تحقیق قبلی که در این دپارتمان انجام گرفت، برای تشخیص *H.pylori* تستی بر اساس whole-cell ELISA ابداع گردید که گرچه از حساسیت خوبی برخوردار بود، ولی جوابهای مثبت کاذب (specificity=55%) فراوان داشت (۱). در این تحقیق به منظور بهبود روشهای تشخیص *H.pylori* اوره‌آز باکتری به طور نسبی خالص گردید و از آن به عنوان آنتی‌ژن جهت بررسی آنتی‌بادی علیه باکتری موجود در سرم بیماران، به روشی بر اساس ELISA استفاده شد.

مواد و روشها:

به منظور جدا سازی اولیه باکتری، نمونه‌های بیوپسی معده را پس از له کردن به محیط خوندار BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ساخت شرکت Oxoid حاوی آنتی‌بیوتیکهای Skirrow ساخت شرکت Merck تلقیح نموده و به مدت ۳ الی ۵ روز در شرایط میکروائروفیلیک (Anoxomat system) در $37^{\circ}C$ انکوبه گردید. سپس پنج ایزوله باکتری به طور راندوم انتخاب شدند و کشت مجدد هر کدام از آنها بر روی 200^{cc} محیط BHIB (Brian Heart Infusion Broth) ساخت شرکت Oxoid که با ۵٪ سرم اسب (مؤسسه رازی – حصارک) و ۲٪ سرم گوسالهٔ جنینی (دانشکده دامپزشکی تهران) تکمیل شده بود، انجام گرفت. انکوباسیون در شرایط میکروائروفیلیک و انکوباتور شیکردار (۷۰rpm) و $37^{\circ}C$ به مدت ۳ الی ۵ روز بود تا سلولهای باکتری به مقدارکافی به دست آیند. سلولهای باکتری دو بار با PBS (Phosphate Buffer Saline 0.05mol/L, pH 7.4) و سانتریفوژ یخچال‌دار (HITACHI 20PR) با دور ۸۰۰۰rpm و مدت ۱۲ دقیقه، شسته شدند. سپس ته‌نشین سلولی را با دترجنت NOG (Merck) به غلظت ۱٪ در PBS، به

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

جدول شماره ۱: میزان آنتی‌بادی علیه *H.pylori* موجود در سرم بیماران (U/ml)

شماره بیمار	HM-CAP ELISA	کیت تجارتی	شماره بیمار	HM-CAP ELISA	کیت تجارتی	شماره بیمار	HM-CAP ELISA	کیت تجارتی
۱	۴/۷	۸	۹	۵۸/۷	۱۰۹	۱۷	۵۸	۱۲۱
۲	۱۷/۳	۱۲	۱۰	۶۵/۳	۱۴۶	۱۸	۶۵/۳	۹۳
۳	۵۰/۳	۵۵	۱۱	۱۰	۸	۱۹	۵۸	۱۰۱
۴	۶۰/۷	۱۲۹	۱۲	۳۵	۲۵	۲۰	۶۴/۷	۱۴۴
۵	۲/۳	۱۰	۱۳	۶۳	۱۴۱	۲۱	۲۲/۷	۱۱
۶	۴	۷	۱۴	۶۵/۳	۱۷۵	۲۲	۶۵/۳	۱۷۵
۷	۵۰	۴۷	۱۵	۶۰/۳	۶۶	۲۳	۵۲/۷	۷۷
۸	۱۴/۴	۹	۱۶	۶۵/۳	۱۶۱	۲۴	۲۰	۱۴

صورت سوسپانسیون در آورده و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق نگه داری شدند. پس از سانتریفوژ کردن سوسپانسیون مزبور (به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰rpm در ۴°C)، مایع رویی حاوی پروتئینهای متصل به غشاء باکتری از بقایای سلولی جدا گردیدند (۸). این عصارهٔ خام پس از دیالیز به مدت یک شب بر علیه PBS، با به کار بردن پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰۰۰ تغلیظ گردید تا میزان پروتئینهای آن به غلظت مناسب برای کروماتوگرافی برسند.

برای تخلیص نسبی اوره‌آز از عصارهٔ تغلیظ شدهٔ فوق، ژل فیلتراسیون بر روی ستونی به ابعاد ۱/۶×۷۰cm (Pharmacia) و ژل سفاکریل S 300 HR ساخت شرکت Sigma با به کار بردن بافر تریس (۰/۰۵ مول در لیتر با pH=8) انجام گرفت (۸،۶). فراکسیونهای مختلف در حجمهای $2/5^{cc}$ جمع آوری شدند. فراکسیونهای ۱۵ الی ۱۷ یا حجمهای $37/5^{cc}$ تا $42/5^{cc}$ از بافر elute شده، باعث تغییر رنگ معرف RUT (Rapid Urease Test) از زرد به قرمز طی مدت کمتر از ده دقیقه شدند، بنابراین اوره را تجزیه کرده و لذا حاوی آنزیم اوره‌آز بودند، و چون بلافاصله پس از Void Volume از ستون خارج شدند، پس حاوی پروتئینهای با وزن مولکولی زیاد متصل به غشاء (HM-CAP) می‌باشند. از این پروتئینها به عنوان آنتی‌ژن برای انجام تست ELISA استفاده گردید (۴).

به منظور ارزیابی میزان اعتبار نتایج روش HM-CAP ELISA حاصل از این تحقیق، وجود آنتی‌بادی علیه باکتری *H.pylori* در سرم ۲۴ بیمار به روش مزبور و کیت تجارتی RADIM تعیین و با یکدیگر مقایسه شدند.

هر پلیت میکروتیتر حاوی یک سرم کنترل منفی و چهار سرم کنترل مثبت با مقادیر مختلف آنتی‌بادی بود (۱۵U/ml، ۳۰U/ml، ۶۰U/ml، ۱۲۰U/ml)، تا با تعیین میزان جذب نوری مربوط به آنها بتوان منحنی استاندارد را رسم نمود. از روابط آماری زیر میزان حساسیت، ویژگی و صحت تست ابداعی حاصل از این تحقیق نسبت به کیت تجارتی تعیین گردید.

$$Sensitivity=[TP/(TP+FN)]\times100$$

$$Specificity=[TN/(TN+FP)]\times100$$

$$Accuracy=[(TP+TN)/(TP+FN+FP+TN)]\times100$$

TP=True Positive TN=True Negative

FN=False Negative FP=False Positive

همچنین مقادیر کمّی میزان آنتی‌بادی علیه باکتری که توسط دو روش مزبور به دست آمدند با تست آماری paired T-test مقایسه گردیدند، تا ضریب همبستگی بین آنها تعیین شود.

جدول شماره ۲: پراکندگی میزان آنتی‌بادی نمونه‌ها (U/ml) به تفکیک HM-CAP ELISA و کیت تجارتی RADIM

HM-CAP ELISA	کیت تجارتی					
	۰-۲۹/۹	۳۰-۵۹/۹	۶۰-۸۹/۹	۹۰-۱۱۹/۹	۱۲۰-۱۴۹/۹	۱۵۰-۱۷۹/۹
۰-۹/۹	۴	-	-	-	-	-
۱۰-۱۹/۹	۲	-	-	-	-	-
۲۰-۲۹/۹	۲	-	-	-	-	-
۳۰-۳۹/۹	۱	-	-	-	-	-
۴۰-۴۹/۹	-	-	-	-	-	-
۵۰-۵۹/۹	-	۲	۱	۲	۱	-
۶۰-۶۹/۹	-	-	۱	۱	۴	۳

نتایج:

جدول شماره ۱ مقادیر کمّی آنتی‌بادی IgG ضد *H.pylori* به روش HM-CAP ELISA و کیت تجارتی را نشان می‌دهد. این مقادیر بر حسب U/ml بیان شده‌اند و با استفاده از میزان جذب نوری مربوط به هر سرم و منحنی استاندارد به دست آمده‌اند.

جدول شماره ۲ پراکندگی میزان آنتی‌بادی موجود در هر سرم بیمار به تفکیک روش HM-CAP ELISA (ستون عمودی) و کیت تجارتی (ستون افقی) را نشان می‌دهد. این جدول بر اساس داده‌های جدول شماره ۱ به نحوی تنظیم شده است تا بتوان مقادیر آنتی‌بادی هر نمونه را که به روش HM-CAP ELISA و کیت تجارتی به دست آمده‌اند، با یکدیگر مقایسه نمود. مثلاً میزان آنتی بادی چهار نمونه به روش HM-CAP ELISA در محدوده ۰-۹/۹U/ml قرار گرفته در صورتی که میزان آنتی‌بادی همین نمونه‌ها به روش کیت تجارتی در محدوده ۰-۲۹/۹U/ml قرار دارند.

با استفاده از داده‌های لیست شده در جدول شماره ۲، خط همبستگی (regression) مقادیر آنتی‌بادی نمونه‌ها که به دو طریق HM-CAP ELISA و کیت تجارتی به دست آمده‌اند در نمودار شماره یک ترسیم شده است. این نمودار ضریب همبستگی r=0.89 را نشان می‌دهد.

داده‌های لیست شده در جدول شماره ۱ را با در نظر گرفتن نقطه cut-off که مقادیر کمتر از ۱۵U/ml منفی، و بین ۱۵U/ml الی ۳۰U/ml مشکوک، و بیش از ۳۰U/ml را مثبت تلقی می‌کند، می‌توان به صورت کیفی (مثبت، مشکوک، منفی) در جدول شماره ۳ بیان کرد و سپس از روی روابط آماری میزان حساسیت، ویژگی و صحت تست HM-CAP ELISA را نسبت به کیت تجارتی تعیین کرد.

مقایسهٔ نتایج کیفی ۲۴ بیمار آزمایش شده به دو روش مزبور، (جدول شماره ۳) نشان می‌دهند که ۱۵ مورد در هر دو روش جواب مثبت داشته‌اند (مثبت حقیقی)، ۵ مورد در هر دو روش منفی بوده‌اند (منفی حقیقی) و در ٤ مورد غیر منطبق (nonconcordance) هستند. کیت تجارتی یک مورد مشکوک و سه مورد منفی جواب داده است، در صورتی که همان موارد در روش حاصل از این تحقیق به صورت یک مورد مثبت و سه مورد مشکوک نشان داده شده‌اند. به بیان دیگر در مقایسهٔ نتایج، هیچگونه جواب ناجور (disconcordance)

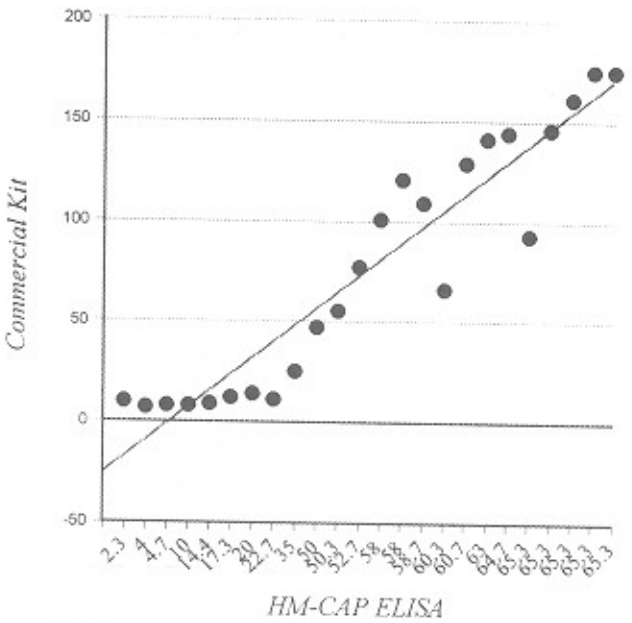
Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

جدول شماره ۳: مقایسه نتایج کیفی تعیین آنتی‌بادی علیه *H.pylori* به روش HM-CAP ELISA و کیت تجارتی RADIM

نوع تست		کیت تجارتی			
	نتایج	منفی	مشکوک	مثبت	مجموع
HM-CAP ELISA	مثبت	-	۱	۱۵	۱۶
	مشکوک	۳	۱	۱	۳
	منفی	۵	-	-	۵
	مجموع	۸	۱	۱۵	۲۴

دیده نمی‌شود. با توجه به این موضوع که موارد مشکوک در معادلات آماری تعیین حساسیت، تعیین ویژگی و تعیین صحت تست در نظر گرفته نمی‌شوند، پس می‌توان گفت: حساسیت، ویژگی و صحت تست حاصل از این تحقیق نسبت به کیت تجارتی صد در صد است.



نمودار شماره ۱: پراکندگی و خط regression نتایج اندازه‌گیری آنتی‌بادی (بر حسب U/ml) به روش HM-CAP ELISA و کیت تجارتی RADIM

بحث:

مقایسه نتایج کیفی حاصل از روش HM-CAP ELISA با یک کیت معتبر تجارتی نشان می‌دهد که حساسیت، ویژگی و صحت روش ابداعی حاصل از این تحقیق نسبت به کیت مزبور کاملاً با یکدیگر منطبق هستند. البته این موضوع بدین معنی نیست که این روش می‌تواند تمام موارد مثبت واقعی و منفی واقعی بین نمونه‌ها را تعیین کند، زیرا برای سنجش دقیق حساسیت و ویژگی هر تست باید پارامترهای مزبور را در مقایسه با روشهای استاندارد طلایی تعیین کرد. چنانچه ما در یک تحقیق دیگر، نتایج به دست آمده به روش HM-CAP ELISA را با روشهای بررسی هیستولوژی و کشت به عنوان روشهای استاندارد طلایی مقایسه نموده و حساسیت و ویژگی آن را به ترتیب ۹۵/۱٪ و ۹۳/۳٪ تعیین نمودیم (داده‌های مربوطه هنوز منتشر نشده‌اند). به هر حال آنچه که در استاندارد کردن تست‌های ELISA حائز اهمیت می‌باشند، انتخاب آنتی‌ژنی است که برای پوشانیدن پلیت‌های میکروتیتر به کار می‌روند. چنانچه در تحقیق قبلی که در دپارتمان ما انجام گرفت از آنتی ژن Whole-Cell باکتری *H.pylori* برای رد یابی آنتی‌بادیهای موجود در سرم بیماران به روش ELISA استفاده شد و موارد متعددی از جوابهای مثبت کاذب ملاحظه گردید (۱).

بنابراین لازمه افزایش حساسیت و ویژگی یک تست تشخیصی بر مبنای روش ELISA، انتخاب آنتی‌ژن اختصاصی است. آنتی‌ژنی که با سایر عوامل عفونت‌زا واکنش‌های تقاطعی نداشته باشد و وجود آن برای بقاء باکتری ضروری باشد به طوری که در طی زمان دستخوش تغییرات تکاملی نشود و توسط تمام سویه‌های باکتری مورد نظر بیان شود. بدین خاطر در این تحقیق از پروتئین‌های با وزن مولکولی زیاد متصل به غشاء باکتری به عنوان آنتی‌ژن برای پوشش دادن میکروپلیت‌های ELISA استفاده شد. این پروتئینها عمدتاً شامل آنزیم اوره‌آز باکتری و به میزان کمتری یک پروتئین شوک حرارتی هستند که ایمنوژنهای قوی بوده و اختصاص برای *H.pylori* می‌باشند (۹،۷).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

تحقیقات Evans و همکارانش نیز نشان داده است که تست HM-CAP (anti urease) ELISA نسبت به تست تنفسی اوره، از حساسیت و ویژگی یکسانی برخوردار می‌باشد (۸).

ضریب همبستگی بین مقادیر آنتی‌بادی موجود در نمونه‌هایی که به دو روش HM-CAP ELISA و کیت تجارتی به دست آمده‌اند، از نظر آماری معنی دار است ($P<0.001$). به بیان دیگر افزایش مقدار آنتی‌بادی نمونه‌هایی که توسط HM-CAP ELISA تعیین شده‌اند، توسط کیت تجارتی نیز افزایش یافته‌اند و بالعکس.

همچنین اختلاف اندازه‌ها در هر دو روش، به وسیله آزمون t- زوج (paired T-test) مقایسه گردید و نتیجه شد که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است ($P<0.001$)، لذا می‌توان میانگین مقادیر آنتی‌بادی که توسط روش کیت تجارتی تعیین شده را نسبت به HM-CAP ELISA بیشتر دانست. به عبارت دیگر مقادیر آنتی‌بادی که توسط کیت تجارتی به دست آمده‌اند به طور متوسط بالاتر از روش HM-CAP ELISA می‌باشند. با توجه به دامنه تغییر اندازه‌ها که برای کیت تجارتی در فاصله (۱۷۵ تا ۷) و روش HM-CAP ELISA در فاصله (۶۵/۳ تا ۲/۳) است، این تفاوت به خوبی آشکار می‌گردد.

اما جدول شماره ۲ توزیع پراکندگی داده‌ها، نشان می‌دهد که به ازاء مقادیر کوچک‌تر از ۳۰ در هر دو روش، اندازه‌ها تقریباً به هم نزدیک است و اختلاف شدید تنها در اندازه‌های مربوط به مقادیر بسیار بزرگ هر دو متغیر مشاهده می‌شود، و چون در تشخیص نهایی بیماری و با استناد به نقطه cut off که مقادیر بالای ۳۰ مثبت تلقی می‌شوند، لذا اختلاف موجود در این میدان از نتایج چندان مؤثر نبوده و می‌توان قضاوت کرد که این دو روش به طور یکسان موارد مثبت عفونت را تشخیص می‌دهند.

تشکر و قدردانی:

هزینهٔ مالی این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی تأمین گردیده است.

در به سرانجام رسیدن پژوهش مزبور از راهنماییها و مساعدتهای اساتید زیادی بهره‌مند شده‌ایم، خصوصاً از آقای دکتر دقاق زاده و آقای دکتر دانشگر متخصصین دستگاه گوارش، آقای دکتر ساسان عسگری متخصص گیاه درمانی، آقای مهندس علی فرزان متخصص علم آمار، خانم محبوبه نفیسی مسئول بخش الیزا آزمایشگاه مهدیه و آقای فرزاد عریضی کارشناس ارشد ایمنی شناسی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

۱ـ امامی سید حمید. بکارگیری تکنیک الیزا جهت تشخیص هلیکوباکترپیلوری در بیماران مبتلا به ناراحتیهای دستگاه گوارش فوقانی. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، خرداد ۱۳۷۵.

2- Barthel JS.; Everett ED. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: the "gold standard" and the alternatives. Rev Inf Dis, 12(1): 107-14, 1990.

3- Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: its role in disease. Clin Infect Dis, 15: 386-93, 1992.

4- Carpenter AB. Enzyme-linked immunoassay. In: Rose NR, de Macario EC, Fahey JL (eds). Manual of clinical laboratory immunology. American society for microbilogy: USA, 4th ed. 5-15, 1992.

5- Crabtree JE.; Phil D.; Shallcross TM. Mucosal humoral immune response to *Helicobacter pylori* in patients with duodenitis. Diges Dis & Sci, 36(9): 1266-73, 1991.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 10:07 +0430 on Tuesday September 5th 2017

6- Dunn BE.; Sung CC.; Taylor NS. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* urease. Inf & Immun, 59(9): 3343-5, 1991.

7- Dunn BE.; Roopii RM.; Sung CC. Identification and purification of a cpn 60 heat shock protein homolog from *Helicobacter pylori*. Inf & Immun, 60(5): 1946-51, 1992.

8- Evans DJ.; Evans DG.; Graham DY. A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. Gastroenterol, 96: 1004-8, 1989.

9- Evans DJ.; Evans DG.; Graham DY.; Engstrand L.; et al. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter Pylori*. Inf & Immune, 60(5): 2125-7, 1992.

10- Lopez - Brea M.; Alercon T.; Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Curr Opin Gastroenterol, 13: 13-19, 1997.

11- McColl KEL. *Helicobacter pylori*: clinical aspects. J Infect, 34: 7-13, 1997.

12- Nedrud JG.; Czinn SJ. *Helicobacter pylori*. Curr Opin Gasterointerol, 13: 71-8, 1997.

13- Rathbone BJ.; Wyatt JI.; Worsley BW. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. Gut, 27: 642-7, 1989.

14- Rautelin H.; Kosunen Tu. *Helicobater pylori* and associated gastroduodenal diseases. APMIS, 99: 677-95, 1991.

15- Thijs J.; Van Zwet AA.; Thijs WJ. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*: a prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. Am J Gastroenterol, 91(10): 2125-9, 1996.