

Original article

Detection of *Helicobacter Pylori* Infection in Patients with Peptic Ulcer Disease through Serological and Stool Antigen Tests

Behnam Hashemi¹, Maryam Abdollahi², Eisa Nazar³, Mohammad Ahanjan^{3*}

1. Graduate Student of Microbiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Graduate Student of Biostatistics, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Department of Microbiology, Cellular and Molecular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

***Corresponding author:**

Mohammad Ahanjan, Department of Microbiology, Cellular and Molecular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Email: ahanjan2007@gmail.com

Received: 23 April 2016

Revised: 4 August 2016

Accepted: 13 September 2016

ABSTRACT

Background & Objectives: *Helicobacter pylori* is a gram negative, microaerophilic and flagellated bacillus, which causes digestive diseases, such as peptic ulcer and gastric cancer. This study aimed to detect *Helicobacter pylori* in patients with ulcer disease through stool antigen and serological tests in Sari, Iran.

Materials and Methods: In this study, 120 patients (aged 15-66 years) with symptoms of peptic ulcer referring to the gastroenterology clinic were selected. *H. pylori* antigen stool, as well as IgG and IgA antibodies produced against this bacterium were determined in patients.

Results: In this study, nine (7.5%) patients were regarded as negative for *H. pylori*, six (5%) individuals were suspected and 105 (87.5%) cases were positive. Moreover, participants with negative stool antigen were also negative in terms of IgA antibody. However, patients with suspected stool antigen were IgG positive. Frequency of IgA and IgG was reported to be 32 (26.6%) and 102 (85%) cases, respectively.

Conclusion: According to the results of this study, *H. pylori* stool antigen test is a non-invasive procedure, which could be applied as a valid diagnostic method.

Keywords: Antibody, *Helicobacter pylori*, Stool antigen

► **Citation:** Hashemi B, Abdollahi M, Nazar E, Ahanjan M. Detection of *Helicobacter Pylori* Infection in Patients with Peptic Ulcer Disease through Serological and Stool Antigen Tests. *Tabari J Prev Med.* Autumn 2016;2(3): 44-50.

تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به زخم معده با استفاده از آزمایش‌های سرولوژی و آنتی‌ژن مدفوعی

بهنام هاشمی^۱، مریم عبداللهی^۲، عیسی نظر^۳، محمد آهنگان^۴

چکیده

مقدمه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، میکروآتروفیلیک و تاژک‌داری است که عامل بیماری‌های گوارشی مثل زخم معده و سرطان معده می‌باشد. هدف از این مطالعه، تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از آنتی‌ژن مدفوعی و سرولوژیک در شهر ساری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ۱۲۰ بیمار مراجعه‌کننده به درمانگاه گوارش با علائم زخم معده و با متوسط سن ۱۵ تا ۶۶ سال، انتخاب شدند. سپس میزان آنتی‌ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری و آنتی‌بادی IgA و IgG تولیدشده بر ضد این باکتری در بیماران تعیین گردید.

نتایج: از ۱۲۰ بیمار مورد ارزیابی، ۹ بیمار (۷/۵ درصد) تیتراژ آنتی‌ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری منفی داشتند، ۶ بیمار (۵ درصد) مشکوک و ۱۰۵ بیمار (۸۷/۵ درصد) مثبت بودند. بیمارانی که آنتی‌ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری نداشتند، از نظر آنتی‌بادی IgA نیز منفی شدند؛ اما بیمارانی که مشکوک به آنتی‌ژن مدفوعی، IgG مثبت داشتند. فراوانی تیتراژ آنتی‌بادی از کلاس IgA و IgG به ترتیب ۳۲ مورد (۲۶/۶ درصد) و ۱۰۲ مورد (۸۵ درصد) گزارش شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر، تیتراژ آنتی‌ژن مدفوعی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری یک روش غیرتهاجمی بوده و به‌عنوان یک روش تشخیص، قابل اعتماد است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی، آنتی‌ژن مدفوعی، هلیکوباکتر پیلوری

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

نویسنده مسئول: محمد آهنگان، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

پست الکترونیک:

ahanjan2007@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۵/۲/۴

اصلاحیه: ۱۳۹۵/۵/۱۴

ویراستاری: ۱۳۹۵/۶/۲۳

◀ **استناد:** هاشمی، بهنام؛ عبداللهی، مریم؛ نظر، عیسی؛ آهنگان، محمد. تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به زخم معده با استفاده از آزمایش‌های سرولوژی و آنتی‌ژن مدفوعی. مجله طب پیشگیری طببری، پاییز ۱۳۹۵؛ ۲(۳): ۵۰-۴۴.

مقدمه

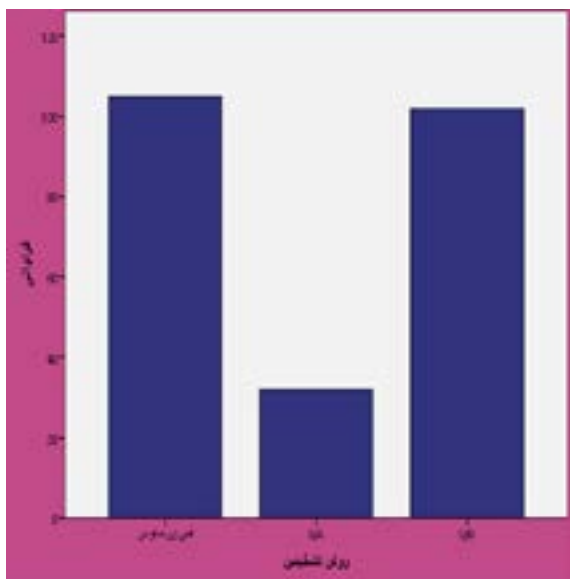
هلیکوباکتر پیلوری یک باسیل گرم منفی، خمیده‌ای (S شکل) است که در سطح مجرای پوشش معده دیده می‌شود. اولین بار این باکتری، در سال ۱۹۸۳ از بیوپسی مخاط معده بیماران مبتلا به گاستریت توسط Warren و Marshall یافت شد (۱). عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های انسان است که با سن، وضعیت اجتماعی و اقتصادی کشور ارتباط دارد؛ بنابراین شیوع عفونت در سنین بالاتر و در افرادی که کودکی خود را در وضعیت اجتماعی-اقتصادی پایین سپری کرده‌اند، بیشتر است و در نتیجه در نقاط مختلف جهان بسیار گوناگون می‌باشد. عفونت با این باکتری عامل طیف گسترده‌ای از اختلالات دستگاه گوارش (گاستریت، اولسر پپتیک، اولسر دئودنوم و سرطان معده) در کودکان و بزرگسالان بوده که تقریباً نیمی از جمعیت جهان را آلوده نموده است (۲-۶). عفونت هلیکوباکتر پیلوری در خیلی از افراد بدون علامت می‌باشد و بیشتر بیماران دچار عفونت هلیکوباکتر پیلوری، هرگز دچار عوارض مهم بالینی نخواهند شد (۷).

اهمیت بالینی زیاد آلودگی به این باکتری منجر به توسعه روش‌های تشخیصی متعددی شده است. در حال حاضر روش‌های آزمایشگاهی متفاوتی برای تشخیص عفونت با هلیکوباکتر پیلوری موجود است که می‌توان به روش‌های تهاجمی و غیرتهاجمی اشاره کرد و انتخاب هر یک از این روش‌ها به هزینه‌ی روش، در دسترس بودن، موقعیت بیمار، شیوع بیماری بستگی دارد (۸،۹). از روش‌های تهاجمی بر پایه اندوسکوپی می‌توان بیوپسی، کشت و آزمایش اوره‌از تنفسی را نام برد. روش کشت، شرایط خاصی را می‌طلبد و دارای حساسیت متغیر تا ۸۰ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد می‌باشد (۱۰). آزمایش اوره‌از تنفسی بهترین روش مطالعه هلیکوباکتر می‌باشد؛ ولی به دلیل گران بودن آن و همچنین نیازمندی به دستگاه‌های ویژه جهت انجام آزمایش، همه جا امکان دسترسی به این روش وجود ندارد. حساسیت آزمایش اوره‌از تنفسی بیش از ۹۰ درصد و ویژگی این

آزمایش بیش از ۹۵ درصد می‌باشد (۱۱،۱۲). در سال‌های اخیر شناسایی آنتی‌ژن‌های باکتری در مدفوع به‌عنوان یک آزمایش تشخیصی ارزشمند در آمده است (۱۳-۱۵) که طی مطالعات قبلی انجام‌شده برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری با روش آنتی‌ژن مدفوعی، حساسیت ۹۳-۹۱ درصد و ویژگی ۹۶/۸-۹۳ درصد به‌دست آمد (۱۶-۱۸). همچنین روش سرولوژی به واسطه‌ی سهولت در انجام آن و سرعت در پاسخ‌دهی، یک روش استاندارد طلایی برای تشخیص شناخته شده است (۱۹). پس از کولونیزاسیون معده توسط هلیکوباکتر پیلوری، سیستم ایمنی میزبان تحریک شده و یکی از پاسخ‌های آن تولید آنتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن‌های این باکتری است که براساس تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG، IgA، IgM بر ضد آنتی‌ژن‌های هلیکوباکتر پیلوری در خون، ادرار و بزاق می‌باشد (۲۰، ۲۱). آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی از نظر هزینه، قابلیت انجام و در دسترس بودن در اولویت می‌باشد (۲۲)؛ بنابراین هدف از انجام مطالعه حاضر، تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری به‌وسیله روش‌های سرولوژیک و آنتی‌ژن مدفوعی در بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌ها در سطح شهرستان ساری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۱۲۰ نفر (۴۵ نفر مرد و ۷۵ نفر زن) از بیماران مراجعه‌کننده به چندین آزمایشگاه خصوصی در شهرستان ساری در سال ۱۳۹۲، به‌صورت تصادفی خوشه‌ای چندمرحله‌ای، پس از پر کردن پرسشنامه و کسب رضایت، وارد مطالعه شدند. بیماران مورد مطالعه، از لحاظ توزیع سنی بین ۱۵ تا ۶۶ سال بودند که ۸۲/۸ درصد بیماران مورد مطالعه، بالای ۳۰ سال و ۱۷/۲ درصد زیر ۳۰ سال بودند. نتایج منفی کاذب در صورت مصرف مهارکننده‌ی پمپ پروتون یا مصرف اخیر آنتی‌بیوتیک یا ترکیبات بیسموت محتمل است؛ به همین خاطر این افراد از مطالعه حذف شدند. مقدار ۲ سی سی خون از بیماران گرفته و در لوله آزمایش ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۱ تا ۲ ساعت در



نمودار ۱: توزیع فراوانی موارد مثبت آنتی‌ژن مدفوعی و آنتی‌بادی‌های ضد هلیکوباکتر پیلوری

مشاهده شد. نتایج به‌دست آمده از مقایسه‌ی آنتی‌بادی اختصاصی IgG و IgA با آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی نشان داد که تفاوت معناداری بین IgG و آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی وجود دارد؛ ولی با IgA تفاوت معناداری وجود ندارد. موارد مثبت IgG نسبت به IgA، بالاتر بوده که دلیلی بر وجود میکروارگانیزم در معده و بیماری فعال نمی‌باشد. این آزمون در تأکید ریشه‌کنی عفونت، ارزش ناچیزی دارد؛ زیرا آنتی‌بادی‌ها ماه‌ها بعد از ریشه‌کنی و گاهی بیشتر، پایدار می‌مانند. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزایش IgG توأم با افزایش موارد مثبت آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی است؛ ولی با افزایش IgA ارتباط ندارد. همچنین در این مطالعه، با بررسی آماری ضریب همبستگی ساده پیرسون نشان داده شد که میزان IgG و IgA با سن افراد در ارتباط است؛ در واقع هر چقدر سن افراد بیشتر باشد، احتمال مثبت بودن این دو آنتی‌بادی بیشتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به شیوع زیاد هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران، شناسایی دقیق و به موقع

انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند سپس لوله‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت سرم به‌دست آمده به مقدار یک میلی‌لیتر با سمپلر جدا گردید و با استفاده از کیت الایزای پیش‌تاز طب ساخت کشور ایران با ویژگی ۹۷ درصد و حساسیت ۸۴ درصد، میزان آنتی‌بادی‌های IgA و IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری تعیین گشت. همچنین همزمان از بیماران یک نمونه مدفوع گرفته شد و با کمک کیت الایزای Straformedic ساخت کشور ایالات متحده آمریکا با ویژگی ۹۹/۵ درصد و حساسیت ۹۹/۵ درصد، آنتی‌ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری مشخص گردید. براساس دستورالعمل کیت مورد استفاده، مقادیر بیشتر و مساوی ۱/۱، مثبت و کمتر از ۱/۱ منفی، در نظر گرفته شد. نتیجه نهایی به کمک دستگاه Elisa Reader مدل Stat fax 2100 ساخت کشور آمریکا با طول موج ۴۵۰ نانومتر و فیلتر کمکی ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. برای افرادی که تیتراژ آنتی‌بادی مشکوک داشتند؛ آزمایش‌های مورد نظر، دوباره روی همان سرم‌ها تکرار گردید. داده‌ها با کمک روش‌های آماری ضریب همبستگی پیرسون و آزمون ناپارامتری و همچنین به وسیله‌ی نرم‌افزار آماری SPSS 20 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و سطح معناداری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در بررسی آنتی‌ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری، از مجموع ۱۲۰ بیمار مورد ارزیابی، ۱۰۵ نفر آن‌ها، معادل ۸۷/۷ درصد دارای آنتی‌ژن مدفوعی مثبت بودند؛ به‌طوری که ۳۲ بیمار از کل بیماران معادل ۲۳/۶ درصد، دارای IgA مثبت و ۱۰۲ مورد از کل نمونه‌ها معادل ۸۵ درصد، از نظر آزمایش IgG بودند؛ همچنین نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که تفاوت معناداری در سطح $P < 0/05$ بین IgA زنان و مردان وجود دارد؛ درحالی که تفاوت معناداری در IgG زنان و مردان دیده نشد. ۹ بیمار که از نظر آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی منفی بودند، IgG مثبت داشتند؛ ولی IgA این بیماران منفی

این عفونت و ریشه‌کنی باکتری در طی دوره‌ی بیماری مثل گاستریت و زخم معده در بالغین و کودکان اهمیت پیدا کرده است (۲۳). در حال حاضر روش‌های تشخیصی متعددی برای حضور میکروارگانیسم هلیکوباکترپیلوری و کلونیزاسیون در معده وجود دارد. در بین روش‌های غیرتهاجمی، روش سرولوژی یک روش آسان و سریع است که از نظر اقتصادی نیز، مقرون به صرفه و قابل اعتماد می‌باشد و انجام آن می‌تواند به حل مشکل تشخیص موجود در عفونت هلیکوباکترپیلوری کمک نماید. با توجه به این مطالعه، استفاده از تیتر آنتی‌بادی اختصاصی و آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی، روش‌های مناسبی برای بررسی وضعیت این عفونت می‌باشد (۲۴،۲۵). همچنین در مطالعه حاضر، نشان داده شد که میزان IgG با آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی در ارتباط است؛ یعنی هرچه تیتر آنتی‌بادی IgG بالاتر باشد، میزان آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی نیز بیشتر می‌شود؛ ولی در مورد کلاس IgA چنین ارتباطی دیده نمی‌شود. همچنین تفاوت معناداری در آنتی‌بادی IgA زنان و مردان مشاهده شد؛ به طوری که مردان نسبت به زنان موارد مثبت بیشتری داشتند. بین میزان آنتی‌بادی IgG زنان و مردان، تفاوت معناداری وجود نداشت. در بعضی از مطالعات، مرد بودن یک ریسک فاکتور برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری است. در مطالعه‌ای میزان شیوع عفونت و آنتی‌بادی در مردان بیشتر از زنان بود که علت تفاوت آن می‌تواند مربوط به تفاوت در سیستم ایمنی و یا در معرض قرارگیری با عفونت باشد (۲۶،۲۷). مشارکت مستمر مردها در فعالیت‌هایی مانند تماس فیزیکی، مواجهه این باکتری را افزایش می‌دهد. مطالعه دیگر در استان گلستان، میزان موارد مثبت در مردها ۶۶/۳ و در زن‌ها ۶۶/۶ بود که از نظر آماری رابطه معناداری مشاهده نشد (۲۸). قاسمی کبریا در پژوهشی نشان داد که ۶۶/۸ درصد از افراد مورد مطالعه، IgG مثبت داشتند (۲۹). نورائی در مطالعه خود، فراوانی IgG در شهروندان تهرانی را، ۶۹ درصد گزارش نمود (۲۹). در مطالعه حاضر، میزان IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری نسبت به سایر مطالعات انجام‌شده در ایران بیشتر می‌باشد. در مطالعه مهیار و همکاران در سال

۲۰۰۶، با عنوان تعیین آنتی‌بادی ضد هلیکوباکتر پیلوری روی کودکان شهری و روستایی، تیتر IgA در کودکان شهری مورد مطالعه، مشاهده نکردند و فقط در کودکان روستایی، ۴ مورد از ۷۵ نفر مشاهده نمودند که با نتایج مطالعه حاضر، ارتباط نزدیکی دارد (۲۵). در مطالعه Farugui و همکاران با افزایش تیتر آنتی‌بادی اختصاصی IgG، حساسیت آزمایش آنتی‌ژن مدفوعی بیشتر شده که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۳۰). راهبرد غیرتهاجمی عفونت هلیکوباکتر پیلوری در مورد بیمارانی که علائم گوارشی دارند؛ اما فاقد علائم خطر هستند، منطقی است. به همین خاطر در صورت نبود نیاز به انجام روش‌های تخصصی، آنتی‌ژن مدفوعی با روش الیزا تکنیک انتخابی برای تشخیص این عفونت در بیماران توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی تشکر و قدردانی می‌گردد.

حمایت مالی

معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، حمایت مالی این طرح را به عهده داشته‌اند.

ملاحظات اخلاقی

تمام ملاحظات اخلاقی رعایت گردید.

تضاد منافع

این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

References

1. Marshal BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*1983 ; 1(8336):1273-5.
2. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*1984 ;8390(1):1311-5.

3. Kosunen TU, Seppala K, Sarna S, Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992; 339(8798):893-5.
4. Marshall BJ, McGeachie DB, Rogers PA, Glancy RJ. Pyloric campylobacter infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* 1985; 142(8):439-44.
5. Marshall BJ, Warren JR, Francis GL, Langton SR, Goodwin CS, Blincow ED. Rapid urease test in the management of Campylobacter pyloridis-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 1987; 82(3):200-10.
6. Mégraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 215:57-62.
7. Saltik IN, Demir H, Engin D, Ertunç OD, Akyön Y, Koçak N. The cagA status *Helicobacter pylori* isolated from dyspeptic children in Turkey. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 36(3):147-9.
8. Xia HH, Kalantar JS, Wyatt JM, Adams S, Cheung K, Eslick GD, et al. High sensitivity and Specificity of a laboratory-based serological test, pylori DTECT ELISA, for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 2(36):64-74.
9. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004; 9(4):347-68.
10. Kisa O, Albaya A, Mas MR, Celasun B, Dogancia L. The evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43(4)5-251:.
11. Sütö G, Vincze A, Pakodi F, Hunyady B, Karádi O, Garamszegi M, et al. 13C-Urea breath test is superior in sensitivity to detect *Helicobacter pylori* infection than either antral histology or rapid urease test. *J Physiol Paris* 2000; 94(2):153-6.
12. Vaira D, Vakil N. Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; 3(48):287-9.
13. Agha-Amiri K, Peitz U, Mainz D, Kahl S, Leodolter A, Malfertheiner P. A novel immunoassay based on monoclonal antibodies for the detection of *Helicobacter pylori* antigens in human stool. *Z Gastroenterol* 2001; 8(39):555-60.
14. Leodolter A, Peitz U, Ebert MP, Agha-Amiri K, Malfertheiner P. Comparison of two enzyme immunoassays for the assessment of *Helicobacter pylori* status in stool specimens after eradication therapy. *Am J Gastroenterol* 2002; 7(97):1682-6.
15. Versalovic J. *Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies. *Am J Clin Pathol* 2003; 3(119):403-12.
16. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systemic review. *Helicobacter* 2004; 9(4):347-68.
17. Al-Humayed SM, Ahmed ME, Bello CS, Tayyar MA. Comparison of 4 laboratory methods for detection of *Helicobacter pylori*. *Saudi Med J* 2008; 29(4):530-2.
18. Faruqi AN, Majid U, Ahmad L, Khalil M, Hassan MU. *Helicobacter pylori* stool antigen test (HpSA) for the diagnosis of gastric infection. *J Coll Physicians Surg Pak* 2007; 17(6):316-9.
19. Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F, Axon AT, Deltenre M, Hirschl AM, Gasbarrini G, O'Morain C, Garcia JM, Quina M, Tytgat GN. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. *The Lancet*. 1999 Jul 3; 354(9172):30-3.
20. Stone MA. Non-invasive testing for *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J* 1999; 75(880):74-7.
21. Sharma TK, Young EL, Miller S, Cutler AF. Evaluation of a rapid, new method for detecting serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori*. *Clin Chem* 1997; 43(5):832-6.
22. Kagnoff MF, Kiyono H. Essentials of mucosal immunology. New York: Academic Press; 1996. P. 399-403.
23. Mitcehl H, Megraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2002; 7(Suppl 1):8-16.
24. Koletzko S, Konstantopoulos N, Bosman D, Feydt-Schmidt A, van der Ende A, Kalach N, et al. Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool from children. *Gut* 2003; 52(6):804-6.
25. Mahyar A, Tayefe N. Comparison of *Helicobacter pylori* antibody in rural and urban children in Qazvin. *Res Med* 2006; 30(3):213-6.
26. de Martel C, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* infection and gender: a meta-analysis of population-based prevalence surveys. *Dig Dis Sci* 2006; 51(12):2292-301.
27. Replogle ML, Glaser SL, Hiatt RA, Parsonnet J. Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am J Epidemiol* 1995; 142(8):856-63.
28. Ghasemi-Kebria F, Asmar M, Angizeh A, Behnam-Pour N, Bazouri M, Tazike E, et al.

- Seroepidemiology and determination of age trend of *Helicobacter pylori* contamination in Golestan province in 2008. *Govaresh* 2009; 14(3):143-7.
29. Nourai M, Latifi-Navid S, Rezvan H, Radmard AR, Maghsudlu M, Zaer-Rezaii H, et al. childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Iran. *Helicobacter* 2009; 14(1):40-6.
30. Faryugai AN, Majid U, Ahmad L, Ichali M, Hassan MU. *Helicobacter* stool Ag for the diagnosis of Gi inf. *J Coll Phys Surg Pak* 2007; 17(6):316-9.