

Helicobacter pylori: neinvazivno molekularno ugotavljanje odpornosti za klaritromicin iz vzorcev blata

Helicobacter pylori: non-invasive molecular detection of clarithromycin resistance from stool samples

Sebastijan Plušček^{1,2}, Karolina Kostanjšek^{1,2}, Samo Plut², Samo Jeverica*¹

¹Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

²Klinični oddelek za gastroenterologijo, Interna klinika, UKC Ljubljana

Gastroenterolog 2019; 2: 43–49

Ključne besede: *Helicobacter pylori*, Molekularna diagnostika, Odpornost za klaritromicin, Blato

Key words: *Helicobacter pylori*, Molecular diagnostics, Clarithromycin resistance, Stool testing

IZVLEČEK

Antibiotično zdravljenje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) temelji na izkustveni izbiri. Usmerjeno zdravljenje okužbe je težavno, saj z neinvazivnimi metodami ne moremo določiti antibiograma. Blato je neinvazivna kužnina, ki jo uspešno uporabljamo za dokaz antigena bakterije. Molekularno testiranje iz blata ni pogosto, rezultati tovrstnih metod so si v literaturi nasprotujoči. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti osnovne značilnosti detekcije HP in odpornosti za klaritromicin z molekularnim testom v odrasli populaciji. Izvedli smo laboratorijsko in klinično validacijo PCR testa (TIB Molbiol) za sočasno detekcijo bakterije in odpornosti iz blata. V prvem delu raziskave smo donorskim vzorcem blata dodali znane koncentracije različnih sevov povzročitelja. V drugem delu raziskave smo nov test primerjali z obstoječimi invazivnimi testi (histologija, kultura z antibiogramom, PCR iz biopata želodčne sluznice)

ABSTRACT

Targeted treatment of *Helicobacter pylori* (HP) infection is problematic, since we are not able to detect antibiotic resistance with non-invasive diagnostic methods. Molecular methods using stool as a specimen are rarely used and results are often contradictory in the literature. In our study we aimed to determine basic characteristics of the detection of HP and resistance to clarithromycin using a molecular test (TIB Molbiol) in an adult population. We have conducted a laboratory and clinical validation of the novel test. In the first part, donor stool samples were spiked with known concentrations of different strains of bacteria. In the second part, we compared the novel test with conventional invasive tests (histology, culture and antibiogram, PCR on biopsy specimens) and non-invasive tests (serology, stool antigen test). In our prospective sample of 31 consecutive patients, the prevalence of HP infection was 41,9% and resistance to clarithromycin

*asist. dr. Samo Jeverica, dr. med

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana

E-mail: samo.jeverica@mf.uni-lj.si

in neinvazivnimi testi (serologija, antigenski test iz blata). V testiranem vzorcu 31 prospektivno zbranih zaporednih preiskovancev je bila prevalenca okužbe 41,9 % in odpornost za klaritromicin 15,4 %. Občutljivost in specifičnost testa je znašala 53,8 % in 100 %. Odpornost za klaritromicin določena z novim testom PCR iz blata se je v vseh pozitivnih rezultatih ujemala s fenotipsko odpornostjo. Potrdili smo, da je blato lahko ustrezna kužnina za detekcijo okužbe s HP in odpornosti za klaritromicin z molekularno metodo PCR. Občutljivost metode je bila slabša od obstoječih diagnostičnih metod. Odpornost za klaritromicin določena s PCR iz blata je bila skladna z odpornostjo določeno s fenotipskimi testi. Nov test bi lahko v prihodnosti postal glavni test za neinvazivno usmerjanje eradikacijskega zdravljenja.

UVOD

Z bakterijo *Helicobacter pylori* (HP) je okužena polovica svetovne populacije in zato predstavlja velik javnozdravstveni problem (1). Diagnostika okužbe je kompleksna z veliko različnimi diagnostičnimi metodami, ki jih uporabljamo v različnih kliničnih okoliščinah (2). Diagnostične metode v grobem delimo na invazivne metode (hitri ureazni test, histologija, kultura, PCR iz biopata želodčne sluznice [v nadaljevanju biopata]) in neinvazivne metode (serologija, urea dihalni test, antigenski test iz blata). Zlatega standarda ne poznamo, zato moramo v ta namen pogosto uporabiti kombinacijo različnih diagnostičnih metod (3).

Odpornost bakterij za antibiotike postaja eden izmed največjih problemov moderne medicine in predstavlja grožnjo, da bomo ostali brez učinkovitih antibiotikov za zdravljenje običajnih okužb (4). Svetovna zdravstvena organizacija je med najpomembnejše odpornosti za človeštvo nedavno uvrstila tudi odpornost HP za klaritromicin (5). Ta je večinoma posledica 3 točkastih mutacij gene 23S rRNA, ki jih lahko dokažemo z metodo PCR. Zaradi odpornosti za klaritromicin in ostale antibiotike postaja zdravljenje okužbe s HP čedalje bolj kompleksno in v današnjem času še

cin 15,4%. Sensitivity and specificity of the stool-PCR test were 53,8% and 100%, respectively. Resistance to clarithromycin as determined by the novel stool-PCR test showed perfect agreement with the current phenotypical methods. Stool sample is a suitable specimen for the detection of HP infection and clarithromycin resistance with the PCR method. Sensitivity of the method was lower compared to existing methods. However, resistance to clarithromycin determined by stool-PCR test corresponded perfectly to the resistance determined by phenotypical tests. The novel stool-PCR test could become a primary non-invasive method for guiding HP eradication therapy.

vedno večinoma temelji na izkustveni izbiri antibiotikov (2, 4).

Blato se je v preteklosti izkazalo kot odlična neinvazivna kužnina za dokaz antigena bakterije. Manj pa je podatkov o uspešnosti dokaza genoma HP v blatu. Na splošno velja, da je molekularna mikrobiološka diagnostika iz vzorcev blata kompleksna, vendar smo v zadnjih letih preko njene uporabe na področju diagnostike gastroenteritisov, na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo ULMF pridobili številne praktične izkušnje, ki zajemajo fazo predpriprave, transporta, kontrole inhibitorjev in načinov prezervacije vzorca blata. Nimamo pa veliko podatkov ali molekularni testi delujejo tudi v okviru neinvazivne diagnostike HP (6).

V naši raziskavi smo želeli ugotoviti osnovne značilnosti detekcije HP s pomočjo PCR iz blata v odrasli populaciji.

METODE

Laboratorijska validacija

Prvi korak raziskave je bila laboratorijska validacija blata kot ustreznega kliničnega vzorca za detekcijo

okužbe s HP in odpornosti za klaritromicin z metodo PCR. Za novi test smo določili osnovne laboratorijske parametre: standardno krivuljo, analitično občutljivost, analitično specifičnost, ponovljivosti in obstojnosti kužnine v PCR mediju.

Klinična validacija

Klinični del raziskave je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (0120-506/2018). V prospektivno raziskavo smo vključili 31 zaporednih preiskovancev. Od preiskovancev smo ob gastroscopiji pridobili naslednje klinične podatke: jemanje antibiotikov v zadnjem mesecu, predhodno zdravljenje okužbe s HP in gastroscopsko oceno patologije želodčne sluznice. Po zaključku gastroscopije smo jim izročili testni komplet z dvema zbiralnikoma za blato in navodili za odvzem blata. Celotna obravnava je potekala po sledečem vrstnem redu: (i) odvzem bioptata, (ii) histopatološka in mikrobiološka analiza bioptata (kultura z antibiogramom, PCR iz bioptata), (iii) izročitev izvidov pacientom, odvzem blata in krvi, (iv) analiza vzorca blata in krvi.

Diagnostični testi

Histološki pregled tkiva smo opravili na Inštitutu za patologijo ULMF in sicer nas je zanimala stopnja vnetja in intestinalne metaplazije. Pri ocenjevanju smo uporabili Sydneyško HP in OLGIM lestvico. Mikrobiološko diagnostiko smo opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo ULMF. Kulturo in antibiogram smo naredili po standardnem postopku, in sicer smo tkivo homogenizirali, nacepili na dve gojišči in inkubirali za 3–12 dni pri 37 °C v mikroaerofilnih pogojih (2). Občutljivost za antibiotike smo določili fenotipsko z gradient difuzijsko metodo z Etesti za amoksisilin, klaritromicin, metronidazol, tetraciklin, levofloksacin in rifampicin (2).

Za molekularno detekcijo HP in odpornosti smo uporabili testni komplet LightMix Modular HP (TIB Molbiol, Nemčija), ki smo ga testirali z aparatom LightCycler 480 (Roche, Nemčija). S testom smo pomnožili 106 baznih parov dolg fragment gena za 23S

rRNA in s pomočjo specifične temperature taljenja določili genotip (7). Analizo antigena iz blata smo opravili s testnim kompletom Ulcognost Ag (Biognost, Hrvaška) (8). Za serologijo smo uporabili testni komplet Serion ELISA classic *Helicobacter pylori* IgA/IgG (Virion-Serion, Nemčija) (9).

REZULTATI

Laboratorijska validacija

Iz blata smo uspešno dokazali bakterijo in odpornost za klaritromicin z metodo PCR. Meja detekcije je znašala 10–100 CFU/mL. Bakterijska DNA je bil znotraj transportnega medija obstojna najmanj 5 dni pri sobni temperaturi in pri 4 °C. Za preverjanje analitične specifičnosti v kužnini smo testirali 12 različnih sevov rodu *Campylobacter* in 19 različnih sevov rodov normalne človeške bakterijske flore. Vsi testi so bili negativni, torej je bila analitična specifičnost 100 %.

Klinična validacija

Okužbo smo ob upoštevanju sestavljenega zlatega standarda (2/3 pozitivnih testov izmed histologije, kulture ali PCR iz bioptata) ugotovili pri 13 od 31 preiskovancev (povprečna starost 55 let [26–87], 58 % žensk). Prevalenca okužbe v vzorcu je bila 41,9 %. Primarno odpornost za klaritromicin smo v preiskovanem vzorcu ugotovili pri 2 preiskovancih od 13 pacientov z okužbo in je znašala 15,4 %. Diagnostični parametri uporabljenih testov so prikazani v Tabeli 1.

Izmed uporabljenih diagnostičnih metod se je najbolje izkazala serologija, ki preverja specifična IgG protitelesa proti HP, saj je prišlo do popolnega ujemanja rezultatov s sestavljenim zlatim standardom. Naša preiskovana metoda PCR iz blata je imela relativno nizko občutljivost (53,8 %) in negativno napovedno vrednostjo (75,0 %), a visoko specifičnostjo in pozitivno napovedno vrednost (oboje 100 %).

S statistično analizo smo želeli preveriti povezavo med rezultati izvedenih diagnostičnih metod in rezultatom sestavljenega zlatega standarda. Povezavo smo izrazili

s Cohenovim koeficientom kappa (κ). Ta je za serološko metodo, ki preverja specifična IgG protitelesa zaradi 100 % ujemanja rezultatov znašal natanko 1, za metodo, ki preverja specifična IgA protitelesa 0,729 (precejšnje ujemanje). Za metodo antigena iz blata je znašal 0,868 (skoraj popolno ujemanje), za metodo PCR iz blata pa le 0,575 (zmerno visoko ujemanje). Vse vrednosti kappa so bile statistično značilne ($p < 0,05$).

V naši raziskavi smo tudi preverili diagnostične parametre potencialnega novega sestavljenega zlatega

standarda iz neinvazivnih testov, ki bi bil sestavljen iz metode PCR iz blata, serologije IgG in določitve antigena iz blata. Po enakem principu kot pri dosežanju zlatem standardu, sta za potrjeno okužbo morala biti pozitivna dva diagnostična testa od treh. Diagnostični parametri novega zlatega standarda so prikazani v Tabeli 1 in izkazujejo 100 % ujemanje z dosedanjim zlatim standardom.

Odpornost za klaritromicin smo testirali z genotipsko metodo iz blata in bioptata, ter fenotipsko iz bioptata. Rezultati so prikazani v Tabeli 2. S fenotipsko

Tabla 1. Primerjava diagnostičnih parametrov in statistična analiza rezultatov izvedenih diagnostičnih metod glede na sestavljeni zlati standard (histologija, kultura in PCR iz bioptata; 2/3 pozitivna testa)

Table 1. Comparison of diagnostic parameters and a statistical analysis of results of different diagnostic methods with regard to the golden standard (histology, culture, PCR from biopsy; 2/3 tests positive).

Diagnostična metoda		Diagnostični parameter				
		OBČ (%)	SPE (%)	PNV (%)	NNV (%)	κ
Serologija (n=30)	IgA	84,6	88,2	84,6	88,2	0,729
	IgG	100	100	100	100	1
Antigen iz blata (n=31)		92,3	94,4	92,3	94,4	0,868
PCR iz blata (n=31)		53,8	100	100	75,0	0,575
Nov sestavljen zlati standard (n=31)		100	100	100	100	1

OBČ, občutljivost (sensitivity); SPE, specifičnost (specificity); PNV, pozitivna napovedna vrednost (positive predictive value); NNV negativna napovedna vrednost (negative predictive value); κ koeficient kappa (kappa); Nov sestavljen zlati standard: 2/3 pozitivnih testov izmed serologije, antigena iz blata in PCR iz blata.

Tabela 2: Rezultati in statistična analiza povezave med detekcijo odpornosti za klaritromicin s kulturo, fenotipskim testom (Etest) ter z metodama PCR iz bioptata in vzorca blata.

Table 2: Results and a statistical analysis of correlation between the detection of clarithromycin resistance using phenotypic test (Etest) and both PCR methods from biopsy and stool sample.

Diagnostična metoda	Odpornosti za klaritromicin		Genotip 23S rRNA		κ
	S n (%)	R n (%)	WT n (%)	M3 n (%)	
Fenotipsko (Etest)	11 (84,6)	2 (15,4)	/	/	/
PCR iz bioptata	12 (92,3)	1 (7,7)	12	1	0,938
PCR iz blata	6 (85,7)	1 (14,3)	6	1	0,597

PCR, verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction); S, občutljiv (sensitive); R, odporen (resistant); WT, divji tip (wild type); M3, mutacija A2164G (mutation A2146G); κ koeficient kappa (kappa) med fenotipskim testom in obema metodama PCR (glej tekst)

Note: Po HDR smo ugotovili še dodaten mešan sev WT/M3, ki ga prej nismo zaznali. (glej tekst).

metodo smo odpornost ugotovili pri dveh sevih (2/13). Pri enem smo ugotovili visoko stopnjo odpornosti (MIK = 256 mg/L), pri drugem pa nizko stopnjo odpornosti (MIK=12 mg/L). Z metodo PCR iz bioptata in iz blata smo uspeli zaznati odpornost prvega seva, ne pa tudi drugega seva. V primeru PCR iz bioptata smo v fazi razreševanja diskrepantnih rezultatov ugotovili prisotnost heterogene populacije dveh različnih genotipov (WT in M3); medtem ko je bil PCR iz blata ponovno negativen.

Analiza rezultatov je pokazala visoko ujemanje med fenotipsko metodo in PCR iz bioptata – koeficient kappa je znašal 0,938 (skoraj popolno ujemanje) in zmerno visoko ujemanje med fenotipsko metodo in PCR iz blata (kappa 0,597).

RAZPRAVA

V okviru raziskave smo preučili možnost uporabe metode PCR iz blata za neinvazivno ugotavljanje prisotnosti HP in odpornosti za klaritromicin. Ugotovili smo slabšo od pričakovane občutljivosti nove metode v primerjavi s trenutno uporabljeno invazivno diagnostiko. V primerih, ko je bilo pomnoževanje HP iz blata uspešno, smo v vseh primerih ugotovili genotip skladen z referenčnima testoma (fenotipskim in genotipskim). Naši rezultati v praksi pomenijo, da bi lahko v več kot polovici primerov tudi z neinvazivnimi diagnostičnimi metodami usmerili antibiotično zdravljenje okužbe s HP.

Na podlagi rezultatov testiranja analitične občutljivosti smo ugotovili, da je v splošnem meja detekcije v vzorcu blata z metodo PCR reda velikosti $10-10^2$ CFU/mL PCR medija v katerega smo dodali za grahovo zrno blata. Z uporabo enakega LightMix testnega kompleta kot smo ga uporabili mi, v literaturi navajajo mejo detekcije pri 10^3 CFU/mL kužnine (7).

Iz tega lahko sklepamo, da so naši rezultati primerljivi in je v naši lokalni postavitvi LightMix PCR metoda visoko analitično občutljiva. Potrdili smo tudi visoko analitično specifičnost testa, saj z metodo nismo zaznali helikobaktru sorodnih bakterij in bak-

terij, ki so običajno prisotne v črevesu in blatu. Iz rezultatov testiranja ponovljivosti PCR reakcije in obstojnosti kužnine v PCR mediju (rezultati niso prikazani) lahko sklepamo, da je analit v blatu dobro stabilen najmanj 5 dni na sobni temperaturi in na temperaturi 4 °C. Na splošno velja, da detekcija HP v blatu ni optimalna, saj bakterija izvira iz želodca in mora dalj časa potovati skozi tanko in debelo črevo pri temperaturi približno 37 °C, kar bi lahko negativno vplivalo na njeno detekcijo. Poleg tega je bakterijsko breme HP v blatu bistveno nižje od bremena povzročiteljev gastroenteritisev v akutni fazi.

V našem vzorcu preiskovancev smo ugotovili prevalenco okužbe 41,9 %, kar je nekoliko višji odstotek kot je bil ocenjen za Slovenijo leta 2005 (25,1 %) (10) in se približuje splošnemu odstotku prevalence na svetu (~50 %). Primarna odpornost za klaritromicin je znašala 15,4 %, kar je primerljivo z državami v naši okolici in se sklada z novejšimi podatki v našem okolju, kjer je bila odpornost 15–30 % (11–14). Pri vrednotenju teh rezultatov moramo biti previdni, saj je naš vzorec preiskovancev majhen ($n = 31$) in je bilo bolnikov z okužbo samo 13.

Z raziskavo smo ugotovili relativno nizko občutljivost preiskovane metode (53,8 %), kar je nekoliko nižja občutljivost v primerjavi z objavami iz literature v katerih poročajo o občutljivosti 80 % ali več (7, 8, 15–17). V nasprotju z občutljivostjo metode, je bila specifičnost naše metode odlična (100 %), kar se ujema s podatki iz literature (7, 8, 16). Zelo pomembna pa je tudi visoka pozitivna napovedna vrednost preiskovane metode, kar pomeni, da je ob pozitivnem testu pri bolniku vedno bila prisotna okužba in smo z metodo lahko določili odpornost za klaritromicin.

Razlogi za nižjo občutljivost od pričakovane so lahko številni: neustrezen odvzem kužnine, prevelika količina blata v PCR mediju, majhna vsebnost intaktne DNA v blatu, prisotnost inhibitorjev PCR (večinoma kompleksni polisaharidi rastlinskega izvora) ali splošno majhno število bakterij v blatu (18, 19).

V naši raziskavi smo želeli preveriti, ali je možno razviti nov sestavljeni neinvazivni zlati standard. Glede na rezultate lahko sklepamo, da smo bili uspešni, vendar je bil prispevek pozitivnih rezultatov serologije IgG (100 % občutljivost in specifičnost) in metode antigena iz blata (92,3 % občutljivost in 94,4 % specifičnost) neprimerljivo večji kot prispevek metode PCR iz blata. Iz tega sklepamo, da zlat standard, ki bi vključeval metodo PCR iz blata, ne bi izboljšal diagnoze okužbe s HP, bi pa pripomogel k detekciji odpornosti za klaritromicin.

Odpornost bakterije HP za klaritromicin smo preverjali s tremi različnimi metodami: fenotipsko s kulturo in antibiogramom, metodo PCR iz bioptata in metodo PCR iz blata. S kulturo in antibiogramom ter metodo PCR iz bioptata, ki sta se razlikovali v diagnostičnem izidu pri enem preiskovancu, smo zaznali 11 oz. 12 občutljivih sevov in 2 oz. 1 sev odporen za klaritromicin, medtem ko smo z metodo PCR iz blata zaznali 6 občutljivih sevov in 1 odporni sev. Naši rezultati so primerljivi z rezultati iz literature, kjer so v nekaterih raziskavah prav tako ugotovili neujemanje molekularnih metod s fenotipskim antibiogramom (20, 21).

Zaradi majhnega števila preiskovancev odstotek odpornosti nima velike praktične vrednosti, saj je zaradi razlike enega samega preiskovanca razlika v odstotku odpornosti med kulturo z antibiogramom (15,4 %) in metodo PCR iz bioptata (7,7 %) kar 7,7 %. Podobno velja, da zaradi majhnega števila zaznanih okužb z metodo PCR iz blata ($n = 7$), zaznan odstotek odpornosti (14,3 %) nima povedne vrednosti. Prisotnost heterogene bakterijske populacije lahko oteži interpretacijo rezultatov, s čimer tudi pojasnjujemo razliko v številu zaznanih odpornih sevov med metodo PCR iz bioptata ($n = 1$) in kulturo z antibiogramom ($n = 2$) (2).

Glavno slabost naše raziskave predstavlja majhno število vključenih preiskovancev. Končno število zgolj 31 bolnikov predstavlja bolj pilotni tip raziskave, v katerem preverimo, ali je izbrana raziskovalna metoda ustrezna. Še posebej je to vidno pri upoštevanju zgolj okuženih bolnikov in ugotavljanju natančnosti

genotipskega antibiograma v primerjavi s fenotipskimi testi.

Kljub temu smo z našo pilotno raziskavo dokazali, da je metoda detekcije HP in odpornosti za klaritromicin z metodo PCR iz blata možna in je zato nadaljevanje raziskave z vključitvijo dodatnih bolnikov smiselno. Ključno bi bilo tudi spremeniti navodila za preiskovance za odvzem vzorcev blata ali urediti bolnišnični odvzem vzorca, s katerim bi lahko dobili kakovostnejše vzorce za analizo in bi s tem lahko pripomogli k zvišanju občutljivost metode.

ZAKLJUČEK

Z raziskavo smo preverili ali je možno na neinvaziven način določiti odpornost HP za klaritromicin in tako usmeriti zdravljenje za posameznega bolnika. Ugotovili smo nekoliko slabšo občutljivost in odlično specifičnost testirane metode za detekcijo HP ter dobro ujemanje genotipske in fenotipske določitve odpornosti za klaritromicin. Raziskavo bi bilo smiselno nadaljevati z vključitvijo dodatnih pacientov. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da bo v prihodnosti okužbo s sevom HP odpornim za klaritromicin možno zanesljivo dokazati tudi z uporabo neinvazivnih metod, kot je metoda PCR iz blata.

ZAHVALA

Raziskavo je podprla Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (P3-0083). Zahvaljujemo se Borutu Štabucu za podporo in koristne napotke, Nini Zidar za histološki pregled bioptatov, Saši Simčič za testiranje serologije in antigena iz blata, Urši Dolinar in Petri Čamernik za pomoč pri izvedbi PCR testiranja, Olgi Križaj za pomoč pri izvedbi kulture in antibiograma in Evi Mihajlovič Mislej za pomoč pri klinični obravnavi bolnikov. Naloga je bila nagrajena s fakultetno Prešernovo nagrado.

Literatura

1. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:449–90.
2. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:280–322.
3. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J Gastroenterol.* 2014;20:12847–59.
4. Ducournau A, Bénéjat L, Sifré E, Bessède E, Lehours P, Megraud F. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in 2014 in France detected by phenotypic and genotypic methods. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:715–8.
5. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Genčve, 2017.
6. Kotar T, Pirs M, Steyer A, Cerar T, Šoba B, Skvarc M, et al. Evaluation of rectal swab use for the determination of enteric pathogens: a prospective study of diarrhoea in adults. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25:733–8.
7. Redondo JJ, Keller PM, Zbinden R, Wagner K. A novel RT-PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mediated by mutations in the 23S rRNA gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90:1–6.
8. Khadangi F, Yassi M, Kerachian MA. Review: Diagnostic accuracy of PCR-based detection tests for *Helicobacter pylori* in stool samples. 2017;22:e12444–9.
9. Buruoca C, Delchier J-C, Courillon-Mallet A, de Korwin J-D, Megraud F, Zerbib F, et al. Comparative evaluation of 29 commercial *Helicobacter pylori* serological kits. 2013;18:169–79.
10. Gubina M, Tepeš B, Vidmar G, Ihan A, Logar J, Wraber B, et al. Prevalenca protiteles proti bakteriji *Helicobacter pylori* v Sloveniji v letu 2005. *Zdrav Vestn.* 2006;75:169–73.
11. Butenko T, Jeverica S, Orel R, Homan M. Antibacterial resistance and the success of tailored triple therapy in *Helicobacter pylori* strains isolated from Slovenian children. 2017;22:e12400–6.
12. Nemanič T, Mislej EM, Plut S, Štabuc B, Jeverica S. Usmerjeno zdravljenje okužbe z bakterijo *Helicobacter pylori* – ali še obstaja druga pot? Sistematični pregled literature in metaanaliza. *Zdrav Vestn.* 2016;85:541–52.
13. Tepeš B, Vujasinović M, Šeruga M, Stefanovic M, Forte A, Jeverica S. Randomized clinical trial comparing 10-day sequential, 7-day concomitant and 7-day standard triple therapies for *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2016;28:676–83.
14. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, López-Brea M, Hirschl AM, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut.* 2013;62:34–42.
15. Beer-Davidson G, Hindiyeh M, Muhsen K. Detection of *Helicobacter pylori* in stool samples of young children using real-time polymerase chain reaction. 2018;23:e12450.
16. Beckman E, Saracino I, Fiorini G, Clark C, Slepnev V, Patel D, et al. A novel stool PCR test for *Helicobacter pylori* may predict clarithromycin resistance and eradication of infection at a high rate. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2400–5.
17. George S, Mamani N, Lucero Y, Torres JP, Farfán M, Lagomarcino AJ, et al. Detection of *Helicobacter pylori* by real-time PCR for 16S rRNA in stools of noninfected healthy children, using ELISA antigen stool test as the gold standard. 2016;21:606–12.
18. Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods.* 2001;45:89–94.
19. Giorgio F, Ierardi E, Sorrentino C, Principi M, Barone M, Losurdo G, et al. *Helicobacter pylori* DNA isolation in the stool: an essential pre-requisite for bacterial non-invasive molecular analysis. *Scand J Gastroenterol.* 2016; 51:1429–32.
20. Brennan DE, Omorogbe J, Hussey M, Tighe D, Holleran G, O'moráin C, et al. Molecular detection of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in stool vs. biopsy samples. *WJG.* 2016;22:9214–9.
21. Ierardi E, Giorgio F, Iannone A, Losurdo G, Principi M, Barone M, et al. Noninvasive molecular analysis of *Helicobacter pylori*: Is it time for tailored first-line therapy? *WJG.* 2017;23:2453–7.