

Gastrik Dokulardaki *Helicobacter pylori* DNA'sının Polimeraz Zincir Reaksiyonu Testi ile Tespitinde Kullanılan İki Farklı Primer Setinin Karşılaştırılması

Comparison of Two Different Primer Sets Used for Detection of *Helicobacter pylori* DNA by Polymerase Chain Reaction Assay in Gastric Tissues

Dr. Erkan YULA,^a
Dr. Toğrul NAĞİYEV,^a
Dr. Fatih KÖKSAL^a

^aMikrobiyoloji AD,
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Adana

Geliş Tarihi/Received: 29.12.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 06.05.2009

Bu çalışmanın bir kısmı 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (24-28 Haziran 2008, Ankara)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Erkan YULA
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji AD, Adana,
TÜRKİYE/TURKEY
erkanyula@gmail.com

ÖZET Amaç: *H.pylori* infeksiyonu dünya genelinde en yaygın görülen bakteriyel infeksiyonlardan biridir. Prevalansı tahminen %40-80 oranındadır ve coğrafi bölge, yaş, cinsiyet, etnik köken ve sosyo-ekonomik yapıya göre değişim gösterir. Gastrik biyopsi örneklerinden *H.pylori* izolasyonunda kullanılan kültür metotları düşük duyarlılıkta, zor ve geç sonuç verdiği için *H.pylori* tanısında moleküler yöntemler giderek önem kazanmaktadır. Klinik örneklerden mikroorganizmanın direkt tanısında kullanılmak üzere birçok polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu geliştirilmiştir. Bu PCR metotlarında hedef genler 16S rRNA geni, random kromozom dizileri, 26 kDa tip spesifik antijen geni, üreaz A (*ureA*) geni ve önceleri üreaz C (*ureC*) olarak adlandırılan phosphoglucosamine mutaz (*glmM*) genidir. Bu çalışmanın amacı; gastrik biyopsi örneklerinde *H.pylori* tanısında *ureA* ve *glmM* bazlı iki PCR yönteminin duyarlılıklarının karşılaştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada 220 gastrik biyopsi (110 antrum, 110 korpus) örneğine ait genomik DNA, Qiagen doku ekstraksiyon kiti ile elde edilmiş ve *H.pylori* hedef *ureA* ve *glmM* genleri PCR ile amplifiye edilmiştir. **Bulgular:** Biyopsi örneklerinde *H.pylori* *glmM* ve *ureA* genleri sırası ile %80.5 ve %71.8 oranında bulunmuştur. **Sonuç:** Bu çalışmada *glmM* bazlı PCR metodunun gastrik biyopsi örneklerinde *H.pylori* araştırılması için faydalı bir yöntem olduğu ve *ureA* bazlı PCR'dan daha üstün olduğu ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Helicobacter pylori*; fosfoglucozamin mutaz; ureA; polimeraz zincir reaksiyonu

ABSTRACT Objective: *H.pylori* infection is one of the most common bacterial infections worldwide. Its prevalence has been estimated to range from 40 to 80% and it varies widely by geographic area, age, race, ethnicity, and socioeconomic status. Since culture methods for isolation of *H.pylori* in gastric biopsy specimens were insensitive, time consuming and cumbersome, molecular methods for detection and typing of *H.pylori* are gaining importance. Many PCR methods have been developed to detect the organism directly in clinical specimens. The targets of these PCR methods include the 16S rRNA gene, the random chromosome sequence, the 26-kDa species-specific antigen (SSA) gene, the urease A (*ureA*) gene, and the phosphoglucosamine mutase (*glmM*) gene, formerly named urease C (*ureC*) gene. The aim of present study was to compared the sensitivities of two different PCR methods based on *ureA* and *ureC* for the detection of *H.pylori* in gastric biopsy specimens. **Material and Methods:** In our study, genomic DNA of 220 gastric biopsy samples (110 antral, 110 corpus) were extracted with QIAGEN tissue kit and *H.pylori* target genes (*ureA* and *ureC*) were amplified by PCR. **Results:** *H.pylori* *ureC* and *ureA* genes were found in 80.5 and 71.8 percent of biopsy samples respectively. **Conclusion:** It appears that *ureC* based-PCR is a useful primary tool to detect and is distinguish *H. pylori* strains from gastric biopsy specimens and it is superior to *ureA* based-PCR.

Key Words: *Helicobacter pylori*; phosphoglucosamine mutase; urea; polymerase chain reaction

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(4):1166-70

H*elicobacter pylori* insanlarda gastrik mukozaya kolonize olarak, nonülser dispepsiden, gastrik adenokarsinomalara kadar değişen geniş bir spektrumda gastroduodenal hastalıklara yol açan, spiral şeklin-

de, gram negatif bir basildir.¹⁻⁶ Dispeptik yakınmaları olan hastalarda *H.pylori* tanısı için, hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip tanı protokollerinin oluşturulması kombine tedavi protokollerinin başarısı ve antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin önlenmesi açısından son derece önemlidir. *H.pylori* infeksiyonlarının tanısında günümüzde farklı duyarlılık ve özgüllüğe sahip, endoskopik muayene ve biyopsi bazlı hızlı üreaz testi, histolojik muayene ve kültür gibi invazif yöntemlerle, üre soluk testi, dışkı antijen testi ve serolojik bazlı testler gibi non-invazif testlerin kombinasyonu kullanılmaktadır.^{1,7} Bakteriyel infeksiyonların tanısında altın standart olarak kabul edilen kültür yöntemi, düşük duyarlılık ve geç sonuç vermesi sebebi ile *H.pylori* infeksiyonlarının tanısında rutin olarak kullanılamamaktadır. Bu sebeple biyopsi materyali, gastrik sıvı, dışkı örnekleri ve diş taşları gibi klinik materyalden doğrudan *H.pylori* tanısında; *ureA*, *glmM*, *16S rRNA*, *23S rRNA* ve *Hsp65* genlerini hedef alan çeşitli primerlerin kullanıldığı PCR bazlı yöntemler uygulanmaktadır.^{1,8-18} Çok sayıdaki araştırmada *H.pylori-ureA* ve *glmM* genlerindeki, spesifik ve iyi korunmuş baz dizilerini hedef alan primerlerin kullanıldığı farklı PCR protokollerinin, yüksek duyarlılık ve özgüllükleri sebebi ile tanı değerlerinin yüksek olduğu vurgulanmıştır.⁷⁻¹⁷ Bizim çalışmamızda, gastrik biyopsi örneklerinden PCR yöntemi ile *H.pylori* tanısında *ureA* genindeki 411 bp'lik spesifik dizileri hedef alan primerler ile *glmM* (eski *ureC*) genindeki 294 bp'lik spesifik bölgeyi hedef alan primerlerin kullanıldığı iki farklı PCR yönteminin duyarlılık ve kabul edilebilirlik değerleri yönünden kıyaslanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmaya, Aralık 2006-Eylül 2007 tarihleri arasında bölgemizdeki üç hastaneye gastroduodenal

yakınmalarla başvuran ve endoskopi endikasyonu alan 110 hastadan biri antrum ve biri de korpus bölgelerinden olmak üzere alınan toplam 220 mide biyopsi örneği dahil edildi. Örnekler steril 1 ml PBS (Phosphate Buffer Saline, pH= 7.4) içeren ependorf tüplerinde, soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

Biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu Qiagen doku DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen QIAamp DNA Mini Kit) ile firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı. Ekstrakte edilmiş DNA içeren tüpler, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda DNA yoğunluğu yönünden incelendi ve yoğunluklarının amplifikasyonlar için yeterli olduğu (>3 µg/ml) teyit edildi. Elde edilen DNA örnekleri kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı. Çalışmada pozitif kontrol suşu olarak *H.pylori* NCTC 99 (Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu, RSKK no: 05017) kullanıldı.

DNA örnekleri, *H.pylori ureA* genine ait 411 bp ve *H.pylori glmM* genine ait 294 bp uzunluğundaki spesifik dizileri hedef alan HPLC pürifiye *ureA* ve *glmM* primer çiftlerinin (Ella Biotech GmbH, Almanya) (Tablo 1) kullanıldığı iki farklı PCR yöntemi ile ayrı-ayrı araştırıldı. Amplifikasyon; 10 mM Tris-HCl (pH= 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2.5 U *Taq* polymerase ve 5 µl kalıp DNA içeren toplam 50 mikrolitre PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon için Applied Biosystems-2720 Termal Döngü cihazı kullanıldı. Amplifikasyon aşamaları 94 °C'de 4 dk, ilk denaturasyonu takiben 35 döngü 93 °C'de 1 dk, 56 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 7 dk son uzama koşullarında gerçekleştirildi. Amplikonlar etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve jel görüntüleme sistemi (Kodak Gel

TABLO 1: PCR testlerinde kullanılan primer setleri ve moleküler özellikleri.

Hedef Bölge	Primer Dizisi	Ürün Uzunluğu	G/C oranı	Tm	Kaynak
ureA	F 5'-GCCAATGGTAAATTAGTTC-3'	411bp	%40.0	59.0°C	8, 9, 10
	R 5'-CTCCTTAATTGTTTTACAT-3'		%25.0	52.2°C	
glmM	F 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTAGGGGTTT-3'	294 bp	%44.0	61.3°C	8, 9, 12
	R 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3'		%37.5	57.6°C	

Logic 1500 Imaging System) ile görüntülenerek kaydedildi (Resim 1).

Bulguların istatistiksel analizi için χ^2 ve Fisher Exact Test kullanıldı ve karşılaştırmalarda istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

BULGULAR

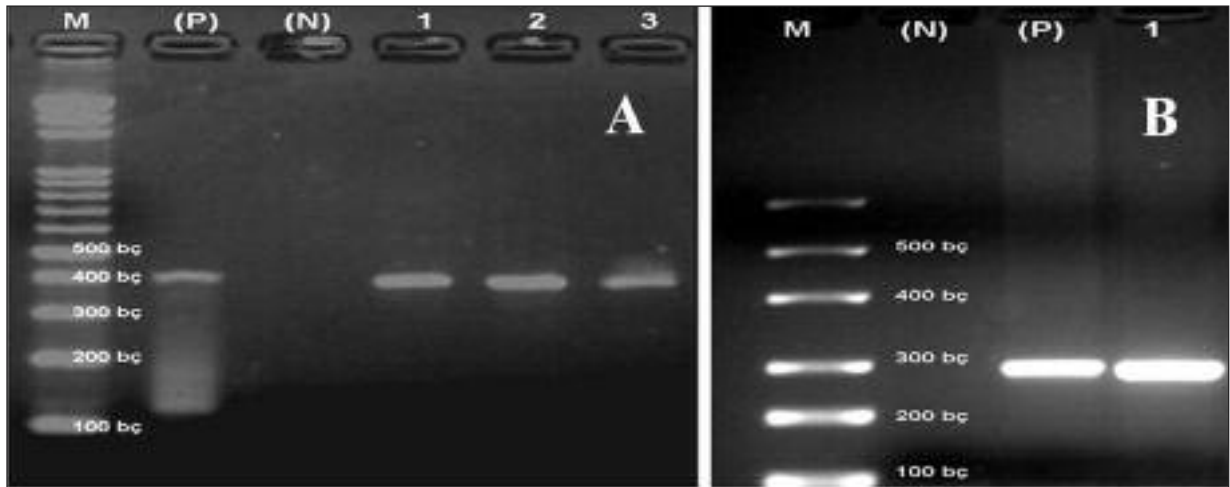
Çalışmaya dahil ettiğimiz 110 hastadan; *ureA*-PCR yöntemi ile 89'unun (%80.9), *glmM*-PCR ile ise 96'sının (%87.3) antrum ve korpus örneklerinden en az birinde *H.pylori* tespit edildi (Tablo 2). *ureA*-PCR ile antrum örneklerinin 84'ünde (%76.4), korpus örneklerinin de 74'ünde (%67.3) *H.pylori* tespit edilmesine karşılık, *glmM*-PCR ile *H.pylori* pozitif örnek sayıları sırası ile 95 (%86.4) ve 82 (%74.5) olarak bulundu (Tablo 2). Böylece, toplam 220 biyopsi örneğinden, *ureA*-PCR ile 158'i (%71.8), *glmM*-PCR ile ise 177'i (%80.5) *H.pylori* yönünden pozitif olarak tespit edildi. Gerek antrum, gerekse korpus örneklerindeki *H.pylori* pozitiflik oranlarının *glmM*-PCR yönteminde daha yüksek olduğu görülse de, bu fark her iki örnek tipi için istatistiksel yönden anlamsız bulundu (sırası ile $p=0.083$ ve $p=0.299$). Ancak, 220 örneğin tamamı ele alındığında, *glmM*-PCR yönteminin tanı değerinin *ureA*-PCR'dan istatistiksel yönden anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü ($p=0.044$).

ureA-PCR ile pozitif bulunan örneklerin, korpus örneği her iki test ile de pozitif bulunan bir has-

taya ait antrum örneği ve antrum örneği her iki test ile de negatif bulunan başka bir hastaya ait korpus örneği dışında tamamı *glmM*-PCR ile de pozitif bulundu. Böylece, *H.pylori* tanısında son derece özgül ve duyarlı olduğu bilinen ve bizim çalışmamızda da yüksek pozitiflik gösteren *glmM*-PCR sonuçları altın standart olarak kabul edildiğinde, *ureA*-PCR'ın duyarlılığının %87-89, özgüllüğünün ise %93-96 oranlarında olduğu belirlendi (Tablo 3).

TARTIŞMA

Gastroduodenal *H.pylori* infeksiyonunun tanısında farklı duyarlılık ve özgüllüğe sahip birçok invazif ve non-invazif test yöntemi geliştirilmiştir.^{1,7-17} Klinik materyallerden *H.pylori*'nin tespitinde kültür ve/veya histolojik muayene altın standart olarak kabul edilir. Ancak histolojik incelemenin sensitivitesinin düşük oluşu, kültürde izolasyon yönteminin de tecrübeli laboratuvarlarda bile duyarlılığının %50-80 oranında olması ve sonuçların uzun sürede alınması gibi dezavantajları bu yöntemlerin rutin tanıda kullanım alanını sınırlandırmaktadır. Son yıllarda tanısında güçlük çekilen birçok bakteriyel ve viral infeksiyonun tanısında olduğu gibi *H.pylori* infeksiyonlarının tanısı ile bakteriyel ve viral infeksiyonun tanısında olduğu gibi *vacA*, *cagA* ve *iceA* gibi virulans genleri ve antibiyotik direncine yol açan mutasyonların tespitinde PCR bazlı moleküler yöntemler başarı ile uygulanmaya başlamıştır. Bu yöntemler direkt tanının ya-



RESİM 1: Amplikonların %2'lik agaroz jelde UV ışığı altındaki görüntüleri: A) *ureA* genine ait 411bp uzunluğundaki spesifik diziler; B) *glmM* genine ait 294 bp uzunluğundaki spesifik diziler (M: 100 bp'lik marker, P: pozitif kontrol, N: negatif kontrol, 1-3: pozitif bulunan örnekler).

TABLO 2: Antrum ve korpus biyopsi örnekleri değerlendirilen 110 hastanın *ureA*-PCR ve *glmM*-PCR test sonuçlarına göre dağılımı.

Hastalar	<i>ureA</i> -PCR		<i>glmM</i> -PCR	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Antrum(+)/Korpus(+)	69	(62.7)	81	(73.6)
Antrum(+)/Korpus(-)	15	(13.6)	14	(12.7)
Antrum(-)/Korpus(+)	5	(4.5)	1	(0.9)
Antrum(-)/Korpus(-)	21	(19.1)	14	(12.7)
Toplam	110		110	

nı sıra üre nefes testi veya hızlı üreaz testi ile pozitif olup kültür sonuçları negatif bulunan olgular gibi uyumsuz sonuçların açıklığa kavuşturulmasında doğrulama test olarak kullanılmaktadır. PCR protokolleri oluşturulurken seçilecek DNA ekstraksiyon yöntemi, hedef gen bölgeleri ve bu bölgeleri tanıyan primerlerin seçimi yöntemin duyarlılığında belirleyicidir.^{1,7,13}

Yaptığımız çalışmada antrum ve korpus biyopsi örneklerindeki *H.pylori* varlığını göstermek için, *H.pylori-ureA* ve *H.pylori-glmM* genlerini hedef alan iki farklı primer setini kullandığımız PCR protokolleri ile biyopsi örneklerinin en az birinde olmak üzere sırasıyla %80.9 ve %87.3 oranlarında pozitiflik tespit edilmiştir. Bu sonuç *glmM*-PCR yönteminin duyarlılığının, biyopsi örneğinin lokalizasyonuna bakılmaksızın *ureA*-PCR'dan istatistiki yönden anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir ($p=0.044$). Benzer bulgular Romero Lopez ve ark.nın *ureA*, *ureA + B* ve *ureC* genlerini hedef alan primerleri kullandıkları üç PCR protokolünü

karşılaştırdıkları bir çalışmada elde edilmiştir. Bu grup, *ureC*-PCR'ın diğer iki teste göre daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir.⁹ Diğer taraftan Smith SI ve ark. Nijerya'da 189 biyopsi örneğini, *ureA*, *ureC* ve *SSA* genlerini hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR protokolleri ile değerlendirdikleri çalışmalarında, PCR protokollerinin duyarlılık ve özgüllüğünü hem kendi aralarında hem de, hızlı üreaz testi ve kültür sonuçları ile karşılaştırmışlardır.¹³ Bu grup, *ureA* ve *ureC*-PCR protokolleri ile elde ettikleri pozitiflik oranlarının %91 olduğunu, ancak *ureC*-PCR ile %56 olan negatif anlamlılık oranının, %44'lük orana sahip *ureA*-PCR'dan daha yüksek olduğunu belirterek *ureC*-PCR'ın kabul edilebilirlik değerinin daha yüksek bulunduğunu vurgulamışlardır.¹³ Singh ve arkadaşlarının *Hsp60* gen bölgesini hedef alan bir nested-PCR yöntemi geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmalarında ek olarak *ureC*-PCR ve *ureA*-PCR yöntemlerinin duyarlılıklarını da kıyaslamışlar ve *ureC*-PCR ile pozitiflik oranını % 95, *ureA*-PCR pozitiflik oranını ise %63 olarak bulmuşlardır.¹⁹ Brooks ve ark.nın yaptığı bir başka çalışmada 134 hastadan elde edilen gastrik biyopsi örneklerinde *H.pylori* varlığı histoloji, kültür, hızlı üreaz testi ve *glmM*-PCR ile araştırılmış ve en iyi sonuçları *glmM*-PCR ile elde etmişlerdir.⁷

Sonuç olarak, mide biyopsi örneklerinde *H.pylori* kolonizasyonunun tespiti için *H.pylori-glmM* geni üzerindeki 784 ile 1077 bazları arasında yer alan 294 bp'lik kısa fragmenti hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR protokollerinin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu görülmüştür.

TABLO 3: Antrum ve korpus biyopsi örneklerinde *ureA*-PCR ve *glmM*-PCR test sonuçlarının karşılaştırılması.

Biyopsi Örnekleri	<i>glmM</i> -PCR (+)		<i>glmM</i> -PCR (-)		Toplam	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Antrum	<i>ureA</i> -PCR (+)	83 (87.4)	1 (6.7)		84 (76.4)	
	<i>ureA</i> -PCR (-)	12 (12.6)	14 (93.3)		26 (23.6)	
	Toplam	95	15		110	
Korpus	<i>ureA</i> -PCR (+)	73 (89.0)	1 (3.6)		74 (67.3)	
	<i>ureA</i> -PCR (-)	9 (11.0)	27 (96.4)		36 (32.7)	
	Toplam	82	28	110		
Toplam	<i>ureA</i> -PCR (+)	156 (88.1)	2 (4.7)		158 (71.8)	
	<i>ureA</i> -PCR (-)	21 (11.9)	41 (95.3)		62 (28.2)	
	Toplam	177	43		220	

KAYNAKLAR

1. Tuncer M, Hatemi İ. [Tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori*]. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005;1(51):10-3.
2. Karasu Z, Akarca US, Ersöz G, Kızılkant M, Aydın A, Özütemiz Ö, et al. [The incidence of *Helicobacter pylori* infection among gastric carcinoma patients; detection of the bacteria in cancer tissue by PCR]. *Türkiye Klinikleri J Gastroenterohepatol* 2001;12(1):1-7.
3. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, DiMaggio EP, Carpenter HA, Perez-Perez GI, et al. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *J Natl Cancer Inst* 1991;83(23):1734-9.
4. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994;330(18):1267-71.
5. van Amsterdam K, van Vliet AH, Kusters JG, van der Ende A. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30(1):131-56.
6. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991;29(11):2543-9.
7. Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA, Barbezzat GO. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction: is it worth it? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;50(1):1-5.
8. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):772-4.
9. Romero Lopez C, Owen RJ, Banatvala N, Abdi Y, Hardie JM, Davies GR, et al. Comparison of urease gene primer sequences for PCR-based amplification assays in identifying the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Cell Probes* 1993;7(6):439-46.
10. Dönmez-Altuntaş H, Güven K. Detection of *Helicobacter pylori* using nested polymerase chain reaction and rapid urease test in gastric biopsy samples. *Turk J Gastroenterol* 2002;13(2):94-7.
11. Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins ML. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. *Lett Appl Microbiol* 2004;39(3):221-5.
12. Lim CY, Lee KH, Cho MJ, Chang MW, Kim SY, Myong NH, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 2003;41(7):3387-91.
13. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, et al. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1958-60.
14. Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol* 1993;46(6):540-3.
15. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995;33(10):2752-6.
16. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 1993;39(5):338-44.
17. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD, Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30(1):192-200.
18. Lehours P, Ruskone-Fourmestraux A, Lavergne A, Cantet F, Mégraud F; Groupe d'Etude des Lymphomes Digestifs (GELD) for the Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD). Which test to use to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? *Am J Gastroenterol* 2003;98(2):291-5.
19. Singh V, Mishra S, Rao GR, Jain AK, Dixit VK, Gulati AK, et al. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. *Helicobacter* 2008;13(1):30-4.