

# “NUEVA TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DEL ANTIGENO DE Helicobacter pylori EN HECES”.

## **AUTORES:**

**D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. Vicenta Coso Pardos.**

**D<sup>a</sup>. Felisa Deval Cerve ra.**

**D<sup>a</sup>. C. Pascual Ferrer.**

**D. Francisco. Aguirre Cepeda.**

**D. Fernando Grossón García.**

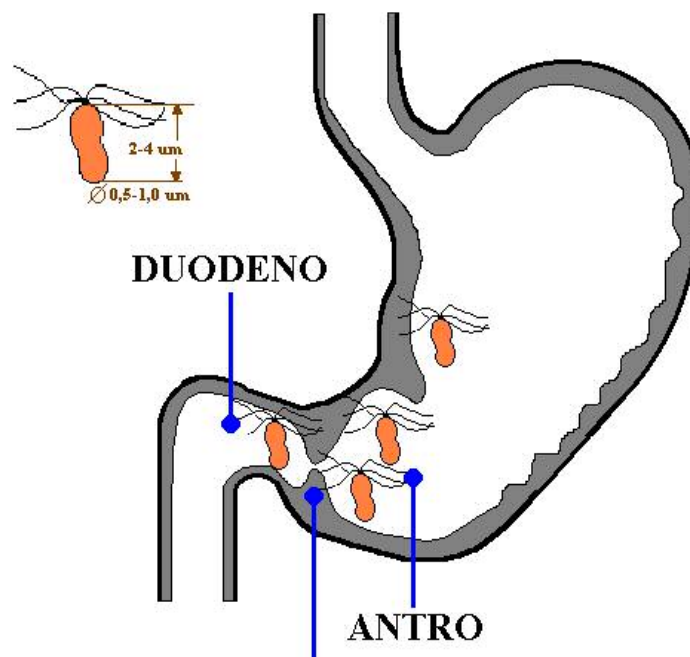
**HOSPITAL GENERAL DE VALENCIA.**

## **1.-INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Helicobacter pylori**

La importancia de *H. pylori* en enfermedades gastrointestinales ha aumentado grandemente desde que Marshall y Warren describieron la presencia de organismos parecidos a *Campylobacter* en la mucosa antral de pacientes con evidencia histológica de gastritis antral y úlceras pépticas, especialmente úlceras duodenales. La estrecha correlación entre la presencia de *H. pylori* y gastritis confirmada histológicamente y úlcera péptica, tanto como la resolución de la enfermedad tras la erradicación de ésta bacteria, indican una interrelación causal. (úlceras gástricas, 75%; úlceras duodenales, 90% y carcinoma gástrico, 60%).

## **PÍLORO**



*H. pylori*, bacilo Gram negativo con forma de espiral (con 6-7 flagelos polares, 2-4  $\mu\text{m}$  de longitud y 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro), creciendo en medio alcalino (pH 6,9-8) a 34-40°C, presenta elevada actividad ureasa.

El nicho ecológico en humanos parece estar restringido al estómago y al duodeno. Los pacientes que albergan el organismo son divididos en dos grupos. El

primero lo forman aquellos en los que se sabe que están “colonizados”. Estos pacientes tienen el organismo, aunque no tienen aún signos de enfermedad gastrointestinal.

La colonización de la mucosa se ve favorecida por factores intrínsecos a la bacteria: movilidad por flagelos, actividad enzimática (lipasas, proteasas, ureasas) y por la actividad antigénica (lipopolisacáridos superficiales). También por factores extrínsecos, ligados al individuo colonizado/ble, como son factores socioculturales, raciales, la edad, factores genéticos, el tabaco, la ingestión de antiinflamatorios no esteroideos, etc.)

Aquellos con síntomas y presencia de *H. pylori* son considerados como infectados. El proceso por el cual un paciente colonizado se vuelve infectado permanece poco claro. Y está bajo investigación (cepas CagA, VacA, y citotoxinas).

La transmisión de la infección se estima:

**-Oro-Fecal:** se ha encontrado DNA de *H. pylori* en el agua de abastecimiento de

Perú, donde la infección de la población en general es elevada.

**-Oro-oral:** se ha encontrado infecciones en familias, siendo transmitidas de padres a hijos.

**-Nosocomial:** se ha encontrado en mayor porcentaje en enfermeras que en grupos de control de la misma edad debido a la exposición a material fecal, al manejo de tubos nasointestinales y endoscopios.

**-Zoonosis:** no se ha encontrado ningún reservorio animal, por lo que no se contempla la transmisión de animal a hombre.

El 50% de la población Española presenta la infección, aunque sólo el 15-25% de ella desarrollan úlcera péptica.

Más del 7-10% de los pacientes infectados no presentan síntomas de enfermedad ulcerosa cuando son evaluados y más del 40% de los pacientes que han tenido un cráter, niegan haber tenido dolor abdominal significativo.

La curación espontánea de la infección es rara.

La mayoría de los pacientes con úlcera péptica tienen una constelación de signos, síntomas y hechos clásicos en su historial médico.

## 1.2 Métodos Diagnósticos

Las estrategias diagnósticas de *H. pylori* se han desarrollado en dos líneas. La primera implica la detección directa del organismo siendo invasiva. La segunda, no invasiva implica la detección de anticuerpos frente a la bacteria o por detección de la actividad ureasa del organismo.

### A.-MÉTODOS INVASIVOS

#### BIOPSIA (ENDOSCOPIA)

##### A.1-HISTOLOGIA

##### A.2-CULTIVO

### A.3-UREA RÁPIDA

#### B.-METODOS NO INVASIVOS

B.1-ACTIVIDAD UREASA EN ALIENTO (UBT)

B.2-SEROLOGIA

B.3-PREMIER PLATINUN HpSA

B.4-P.C.R.

#### A.-METODOS INVASIVOS

El diagnóstico endoscópico consiste en la introducción de un tubo que contiene una fibra óptica flexible por la boca hasta el estómago, para obtener una biopsia.

Como precisa de la administración de un anestésico o relajante muscular, no se considera un método diagnóstico de rutina.

Este método se limita a ciertos pacientes en función de diversas características:

- Edad avanzada.
- Pérdida de peso.
- Sangrado gastrointestinal.
- Vómitos significativos.
- Estudios radiológicos inciertos.

La mayor ventaja es que el estudio endoscópico permite la visualización directa y apreciación del grado de inflamación de la mucosa.

El coste inherente y la disconformidad del paciente, son sus mayores desventajas. Además, la presencia de *H. pylori* en el estómago como manchas de leopardo hace necesarias varias muestras de biopsias, pudiéndose obtener resultados falsos negativos.

La sensibilidad se ve reducida con la terapia al reducirse el número de bacterias.

#### A.1-HISTOLOGIA

Una porción de la biopsia es invertida en la realización de un frotis, al que se aplican alguna de estas tinciones : Gram, Hematoxilina-Eosina, tinción de plata de Warthin-Starry, Giemsa. También se pueden utilizar técnicas inmunohistoquímicas (Anticuerpos monoclonales).

Con la tinción de Gram aparecen bacilos de color rojo (Gram negativos) de forma espiral. La presencia de formas atípicas lleva a resultados falsos positivos y negativos.

La sensibilidad y especificidad es mayor del 80%.

#### A.2-CULTIVO

El resto de la biopsia no utilizada para realizar el frotis, se corta en trozos o se machaca en un mortero estéril con una solución glucosada al 20 % y se siembra.

La sensibilidad de los métodos de cultivo depende de diversos factores como son:

-**Temperatura:** 35-37°C, no se desarrollan a 25°C, 30°C ni 42°C.

-**Humedad:** 100%.

-**Transporte:** inmediato o bien, utilizar medios de transporte.

Como medio de transporte se pueden utilizar:

puede  
horas sin  
afecta

-Solución salina al 0,9% .Cuando el transporte es rápido, este  
resultar un medio adecuado y barato, pudiendo aguantar 24  
pérdida de rendimiento. El mayor inconveniente es que se ve  
do por la temperatura.

hipertónica  
forma

-Solución de glucosa al 20%. Se trata de una solución  
que mantiene la estructura de la biopsia de la mucosa, de  
que las bacterias y la capa mucosa no se separan.

-Caldo tioglicolato.

-Caldo brucella con suero de caballo.

En estos medios se mantienen viables 5 horas a 4°C.

-**Medio de cultivo:** Los siguientes medios son aptos para el aislamiento de *H.pylori*.

-Agar BHI con 7% de sangre caballo.

-Agar Mueller-Hinton con 5% sangre carnero.

-Agar Brucella con 1% almidón soluble.

para in-  
acompañantes  
usa,  
con  
antibio\_  
Martin,

Es conveniente incluir antibióticos en los medios selectivos  
hibir el crecimiento del resto de microorganismos  
(Vancomicina, Anfotericina B, etc.).Como medio selectivo se  
-Medio BeloHorizonte: compuesto por agar cerebro-corazón  
10% sangre carnero, cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolico y  
ticos.  
*H.pylori* aparece como colonias doradas. Crece bien en Agar  
sangre, Agar chocolate, Medio Skirrow y Medio Thayer-  
suplementados con suero o almidón.

La incubación se realiza en condiciones reducidas de oxígeno dado el carácter microaerofílico de la bacteria.

Una atmósfera idónea es 5% de oxígeno, 10% de bióxido de carbono, y 85% de nitrógeno.

**-Tiempo desde la biopsia:** el rendimiento es mayor cuando se transporta al laboratorio inmediatamente y se incuba lo más rápidamente posible.

Se han propuesto vario métodos para la conservación:

**-Congelación a 70°C,** útil cuando se almacenan durante varias horas, aunque se pierden bacterias.

**-Liofilización en presencia de ácido glutámico.** Se trata de un método engorroso.

**-Congelación con cultivo previo en caldo líquido.** Es fácilmente contaminable.

El cultivo tiene un 70-90% de sensibilidad y es utilizado siempre que se desee estudiar la sensibilidad antibiótica en casos recalcitrantes.

Los resultados falsos negativos se pueden obtener cuando la muestra es pobre; con la ingesta del anestésico utilizado en la endoscopia y debido a interferencia con los antibióticos.

### A.3- UREA RAPIDA

*Helicobacter pylori* es capaz de producir grandes cantidades de ureasa para convertir la urea en amonio.

Esta transformación conduce a un cambio del pH, que en presencia de un indicador como el rojo fenol hace que este vire de color.

Entre los test más característicos destacan:

**-CLOtest**, que tiene una especificidad y sensibilidad del 90% pasada una hora.

Consta de una bolita de gel que contiene urea, rojo de fenol y un bacteriostático

selectivo( evita la actividad del resto de microorganismos).

En presencia de la bacteria se produce ureasa que hidroliza la urea a amonio,

aumenta el pH del medio y se produce el viraje de color amarillo a rosa.

*H.pylori* es el único microorganismo que coloniza el estómago que tiene suficiente ureasa para producir éste cambio.

**-Caldo de urea de Cristianasen 2%.** Método similar al anterior, con especificidad del 100% y sensibilidad del 70%, tras una hora.

El test de la urea rápida da resultados falsos negativos en presencia de sangre, insuficiente inóculo o espécimen de otra zona del estómago no infectada. Se ha de confirmar con la serología un test negativo.

## **B.-METODOS NO INVASIVOS**

### **B.1-PRUEBA DEL ALIENTO (UBT)**

Consiste en la ingestión de urea marcada, la cual es sometida a hidrólisis por *H. pylori*, dando como resultado la producción de CO<sub>2</sub> y amonio. El bióxido de carbono es absorbido por la sangre de los vasos gástricos, llegando por ella hasta los pulmones donde es excretado por el aire exhalado.

Para el marcaje de la urea se puede utilizar carbono 13 o carbono 14, necesiándose para su valoración un espectrofotómetro de masas o bien un contador de centelleo, en el segundo caso. En ambas situaciones la sensibilidad es del 90-100% y su especificidad es superior al 95 %.

Aunque la exposición a la radiación del test radioactivo es similar a la de una radiografía, la prueba con carbono 13 es el método preferido en niños y embarazadas ya que es incruento, no implica radiación y es repetible, pudiéndose utilizar en el seguimiento de la erradicación tras el tratamiento y en estudios epidemiológicos.

La difusión de la prueba se ve frenada por el elevado coste de la espectrofotometría de masas, obligando a remitir la muestras a otros laboratorios.

Los inconvenientes de ésta prueba son:

- Noche de ayuno.
- No tomar antibióticos ni bismuto por lo menos 4 semanas antes .
- Ingestión de 75 mg. de urea marcada.
- Se toma en una bolsa de aliento las muestras 15 minutos antes de la ingestión y 30 minutos después de la ingestión de la urea marcada.(mucho tiempo para el paciente)
- Material caro.
- Falsos positivos por, presencia de bacterias productoras de ureasas (*Proteus*), por la flora normal de la boca, presencia de aclorhidria (atrofia del cuerpo gástrico o por toma de omeprazol).
- Falsos negativos debido a que el marcado ha desaparecido del estómago, después de haber ingerido antibióticos o después de cirugía gástrica.

### **B.2.-SEROLOGIA**

Ante la infección por un microorganismo, el cuerpo humano responde activando la respuesta inmunitaria. La mucosa responde produciendo IgA, como respuesta inmediata, mientras que la presencia de IgG en el suero del paciente infectado por *H. pylori*, indica una infección iniciada a más largo plazo. El título de estos anticuerpos disminuye 6 meses después de la erradicación y puede ser negativo un año después del tratamiento eficaz.

Las determinaciones serológicas incluyen:

-Aglutinación por látex.

-Pruebas colorimétricas rápidas (cualitativas ,es decir, positivo/negativo).

-ELISA (titulación anticuerpos, es decir, cuantitativas).

Una reducción del título de anticuerpos de más de un 60% de los valores previos al tratamiento, en seis meses, confirman la erradicación.

Se pueden obtener resultados falsos negativos en niños, ya que su sistema inmunitario es inmaduro o en adultos con deficiencias en su sistema inmunitario.

Los resultados falsos positivos se obtienen a lo largo de la terapia ya que el título de anticuerpos desciende poco a poco.

Las ventajas principales son su bajo coste y que el tratamiento no afecta a los resultados.

### **B.3-PREMIER PLATINUM HpSA**

El Premier Platinum HpSA es un enzimmunoensayo en microplaca que detecta antígenos de *H. pylori* cualquiera que sea la forma (cocoides o flageladas) presente en las heces humanas. No se requieren cálculos y el cambio visual de color permite la interpretación objetiva y simple de los resultados.

La técnica Premier HpSA utiliza anticuerpos policlonales anti-*H. pylori* unidos a micropocillos. Las muestras diluidas de los pacientes y los anticuerpos policlonales conjugados a la peroxidasa son añadidos a los pocillos e incubados durante una hora a temperatura ambiente. El lavado permite eliminar el material no unido. Se añade el sustrato y se incuba diez minutos a temperatura ambiente. Aparece color en presencia de enzima unido. Tras añadir la solución de parada, el resultado se puede leer visualmente o por medio de un espectrofotómetro.

### **MANEJO DE LA MUESTRA**

Las heces deberían ser recibidas en un contenedor y almacenadas a 2-8°C hasta ser procesadas. Las muestras deberían ser procesadas tan pronto como fuera posible, pero como máximo dentro de 72 horas. De lo contrario deben ser congeladas inmediatamente y permanecer así (-20°C a -80°C) hasta ser testadas.

**NOTA:** Las heces en medio de transporte, isopos o conservantes son inapropiados para su procesamiento.

### **PREPARACIÓN DE MUESTRA**

1. Añadir 200 µl de diluyente de muestra un tubo de ensayo (12 x 75mm).
2. Vortear las heces y tomar con el **asa de siembra** una porción (en el ojal del asa) si las heces son pastosas.  
Si fuesen **líquidas** se toman **100 µl** con una pipeta Pasteur desechable. De ser **sólidas**, tan solo **5-6 mm**.

3. Dejar las asas de siembra o las pipetas con la muestra, en el diluyente de la muestra. Vortear 15 segundos los tubos.

## PROCESO

1. Separar el número de micropocillos necesarios, uno por muestra más uno para el control positivo y otro para el negativo. Situarlos en el soporte de la placa y marcarlos.
2. Añadir **50 µl del sobrenadante** del vorteadado de cada muestra en su respectivo pocillo.
3. Poner una gota del control positivo (tapón amarillo) y del negativo (tapón azul) en sus respectivos micropocillos.
4. Añadir una gota del Enzima conjugado (tapón rojo) a cada pocillo. Agitar 30 segundos. Tapar con el film adhesivo y dejar **incubar durante una hora a temperatura ambiente (22-24°C)**.
5. Hacer de 5 a 7 lavados con tampón de lavado. Deben quedar los micropocillos con el fondo transparente. Secar golpeando sobre papel
6. Añadir dos gotas de substrato (tapón azul) a cada pocillo. **Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.**
7. Añadir una gota de solución de parada y leer, **visualmente color amarillo es positivo y trasparente negativo**; con lector a **450 nm** sin necesidad de blanco, **positivo es mayor de 0,130** y **negativo menor de 0,130 nm**

Premier HpSA es un enzimmunoensayo en microplaca de pocillos separables, que permite detectar Ag de *H. pylori* directamente de la heces de los pacientes. Se trata de un buen método diagnóstico para la detección de la infección activa, permitiendo hacer un seguimiento a la terapia erradicadora de la infección.

El kitt posee controles positivos y negativos, estando los reactivos listos para su uso ( el tampón de lavado se diluye en el momento de su utilización). Los resultados se obtienen en menos de 90 minutos.

Se recomienda su utilización antes de la instauración del tratamiento y después del mismo, como alternativa a la endoscopia-biopsia( o realizarla solo en los casos más necesarios) y a la prueba UBT.

El Premier Platinum HpSA fue comparado a un EIA en micropocillo que detecta IgG a *H. pylori*. La población estaba compuesta de pacientes con y sin úlcera duodenal. La tasa de positividad de una población similar se estableció con el test de la urea en aliento (UBT) con una sensibilidad del 84%.

	<b>Anticuerpo de H. pylori</b>	
<b>Premier Platinum</b>	Positivo	Negativo

<b>HpSA</b>		
Positivo	41	0
Negativo	8	97

n= 146

Sensibilidad relativa = 83.4% (41/49)

Especificidad relativa =100% (97/97)

Correlación relativa = 94.5% (138/146)

Un segundo estudio fue conducido comparando premier Platinum HpSA al test de la urea en aliento (UBT) o a métodos endoscópicos: cultivo microbiológico, histopatología y al CloTest.

	<b>UBT/CLO/HIS/CULTIVO</b>	
<b>Premier Platinum HpSA</b>	Positivo	Negativo
Positivo	156	0
Negativo	17	49

n= 222

Sensibilidad relativa = 90.2% (156/173)

Especificidad relativa =100% (49/49)

Correlación relativa = 92.3% (205/222)

## REPRODUCTIBILIDAD

La reproductibilidad del Premier Platinum HpSA fue determinada usando muestras negativas (n=2), positivas bajo (n=2), positivas medio (n=2) y positivas alto (n=1) testadas por triplicado en tres baterías /runs separadas de al menos dos lugares separados. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron determinados y se presentan en la siguiente tabla (los rangos son el resultados de dos muestras diferentes).

	Intraensayo			Interensayo		
	Reproductibilidad: leer a			Reproductibilidad: leer a		
Tipo muestra	450nm	450/630 nm	visible	450nm	450/630 nm	visible
Negativa	4.3%-5.1%	8.1%-13.5%	100%	10.6%-13.2%	51.0%-57.5%	100%
Positivo Bajo	9.2%-14.8%	11.0%-16.6%	100%	15.3%-27.9%	18.0%-32.9%	100%
Positivo Medio	8.8%-9.0%	9.6%-9.6%	100%	17.6%-19.3%	19.7%-19.7%	100%
Positivo Alto	11.2%	11.6%	100%	19.8%	20.0%	100%
Control Negativo	6.2%	20.2%	100%	15.3%	60.2%	100%

Control Positivo	2.2%	1.9%	100%	22.8%	23.9%	100%
------------------	------	------	------	-------	-------	------

#### B.4.-P.C.R.

La reacción en cadena de la polimerasa tienen la ventaja de ser rápida si se combina con un buen método de detección y altamente sensible y específica, pudiéndose obtener resultados con solo unos pocos cientos de bacterias.

El inconveniente es la presencia de falsos positivos por contaminaciones cuando se realiza un mal manejo de las muestras.

Tiene la ventaja de poder evaluar la erradicación cuando quedan pocas bacterias.

De momento se considera una prueba de investigación.

METODO	MUESTRA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
HISTOLOGIA	BIOPSIA	98%	98%
UBT	AIRE ESPIRADO	95-98%	95-98%
CULTIVO	BIOPSIA	70-90%	100%
CLOtest	BIOPSIA	89-95%	90-98%
SEROLOGIA CUALITATIVA	SUERO	100%	99%
SEROLOGIA CUANTITATIVA	SUERO	99%	96%
PREMIER HpS	HECES	90%	100%
PCR	DNA	100%	100%

## 2.-OBJETIVO

- 1.-**Evaluar una nueva técnica** (Premier Platinum HpSA, Meridian Diagnostics, Inc.) para detectar antígeno (Ag) de *H. pylori* (HP) en heces (infección activa), comparando los resultados con la UBT con C<sup>13</sup> y el CloTest.
- 2.-**Aplicación de ésta técnica al laboratorio de Microbiología.**

## 3.-MATERIAL Y MÉTODOS

Desde el Servicio de Patología Digestiva se remitieron muestras fecales correspondientes a 38 pacientes (29 varones y 9 mujeres) entre 18-84 años (53,5 años de media), diagnosticados de úlcera duodenal por endoscopia y Clotest en la biopsia antral, positivas.

Las muestras fueron testadas usando el kit comercial de ELISA “Premier Platinum HpSA” (Meridian Diagnostics, Inc.) y la positividad fue evaluada por espectrofotómetro y lectura visual (color amarillo).

Antes del tratamiento se determinó el Ag en heces a las muestras de los 38 pacientes. Tras el tratamiento erradicador (29 pacientes Omeprazol, Amoxicilina, Azitromicina y 9 pacientes Omeprazol, Amoxicilina y Claritromicina), se procesaron muestras a los 10 días de 7 de los pacientes, y a las 12 semanas, de 26 pacientes. A éstos se les realizó también el UBT.

Las muestras fueron almacenadas refrigeradas(2-8°C) dentro de las 48 horas desde su recepción o congeladas (-20°C hasta -80°C) hasta su procesamiento. Las heces fueron diluidas 1/3 en Diluyente de Muestra y vorteadas 15 seg. y 50µl de la dilución de cada muestra se coloca en cada micropocillo de la placa. Una gota de Enzima Conjugado anti-H. pylori es añadido e incubado 1 hora a temperatura ambiente(22-25°C).

Después de realizar 5 lavados con Tampón de Lavado, se añaden dos gotas de Substrato y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente. Se añade una gota de Solución de Parada. Los resultados fueron leídos visualmente (positivo, amarillo y negativo, incoloro) y a 450 nm o 450/630 nm, en un espectrofotómetro (cutoffs 0,140 y 0,100 nm, respectivamente).

## 4.-RESULTADOS

Antes del tratamiento se determinó el Ag de HP en las muestras de los 38 pacientes, siendo en 37 casos positivo (sensibilidad= 97,3 %).

Tras el tratamiento, a los 10 días las muestras de 7 pacientes dieron resultados negativos al Ag en heces y 1 dudosa.

A las 12 semanas post-tratamiento, de los 26 pacientes, 20 fueron UBT positivos y 19 de éstos Ag positivo; 6 UBT negativo y Ag negativo (Especificidad= 100%)

	<b>Pre-Tratam</b>	<b>Post-Tratam.(12 seman.)</b>	
	CloTest + = 100%	UBT + UBT -	Sensibilidad relativa = 95%
<b>HpSA +</b>	37	19    0	Especificidad relativa
	Correlación Relativa= 96%		
<b>HpSA -</b>	1	1    6	

## 5.-CONCLUSIONES

1.-La detección de Ag de HP en heces mediante ELISA es una técnica no invasiva, sencilla, sin

necesidad de suspender el tratamiento ni restringir la alimentación y rápida de realizar en el laboratorio.

2.-Presenta elevada sensibilidad y especificidad relativas al CloTest y UBT, correlacionando perfectamente con éste último.

3.-Detecta infección activa, permitiendo verificar la erradicación de la bacteria inmediatamente tras el tratamiento.

4.-Premier Platinum HpSA es una técnica perfectamente adaptada a la rutina de un laboratorio de Microbiología(muestras congelables, reactivos preparados para su uso, incubaciones a temperatura ambiente, posibilidad de automatizar, rapidez de resultados,...)

## **6.-BIBLIOGRAFIA**

- **Detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool specimens using a novel enzyme immunoassay.** K.Kozak, C. Larka, A. Nickol and A. Yi; Meridian Diagnostic, Inc. Cincinnati, Ohio. American Society for Microbiology 97 th General Meeting –May 4-8,97
- **A novel “antigen” assay based on stool specimen for the detection and the follow-up of *Helicobacter pylori* preliminary report.**  
D. Vaira, M. Menegatti, C. Acciardi, F. Landi, C. Ricci, B. Massardi, F. Mucci, M. Miglioli.  
1<sup>st</sup>. Medical Clinic, Bologna-Italy World Congress of Gastroenterology Austria, Vienna September 6-11, 1998
- **Detection of *Helicobacter pylori* antigen in stools: new non invasive method apparently very promising in monitoring treatment in pediatric age.**  
Musso A.,Kuvidi M.,Balbo L., Ansaldi N., Polverino N., Lerro P.  
Dept. of Pediatric university of Turin- Italy.  
International Congress of Infections Diseases- Boston May 15 th-18 th, 1998
- ***Helicobacter pylori* antigen in stools specimens: a new enzyme immunoassay.**  
Cavallero A., Mezzi G., Fanti L., Gesu G., Bonato C., and Masci E.  
Clinical Microbiology and Gastroenterology Units. San Raffaele Hospital- Milan, Italy.
- **Two Unusual Techniques for Diagnosing *Helicobacter pylori* infection.**  
L. Trevisani, S. Sartor, F. Galvani, M.R. Rossi, M. Ruina and M. Caselli.  
II International Meeting Developing Knowledge on *Helicobacter pylori*.  
Ferrara, December 12-13, 1997