

Trong nghiên cứu này, tất cả các trường hợp phẫu thuật đều diễn ra thuận lợi. Thời gian mổ trung bình 97,5 phút. Không có tai biến, biến chứng xảy ra trong và sau mổ. Không có trường hợp nào khó khăn phải chuyển mổ mở. Thời gian nằm viện sau mổ trung bình 5 ngày.

V. KẾT LUẬN

RAML là bệnh lý lành tính, tuy nhiên một số trường hợp RAML nghèo tổ chức mỡ khó phân biệt với RCC bằng cắt lớp vi tính, cộng hưởng từ. Phẫu thuật nội soi là phương pháp điều trị an toàn, hiệu quả đối với RAML bên cạnh các phương pháp can thiệp ít xâm lấn khác. Phẫu thuật nội soi cắt u bảo tồn thận làm giảm các triệu chứng, ngăn ngừa biến chứng chảy máu đồng thời đảm bảo hoạt động chức năng của thận.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Vitaly Margulis, MD, Jose A. Karam, MD, Surena F. Matin, MD, and Christopher G. Wood, MD** (2016): "Benign Renal Tumors"; CAMPBELL-WALSH UROLOGY; Eleventh Edition; Vol.2; Part.X; p 1306 - 1309, .
2. **Nguyễn Bửu Triều, Lê Ngọc Từ** (2007): "Các u thận lành tính"; Bệnh học tiết niệu; Nhà xuất bản Y học; tr 395 - 397. .
3. **Nguyễn Bửu Triều, Trần Chí Thanh** (2009): "U Angiomyolipoma tại thận có biến chứng: Bàn về chẩn đoán và thái độ xử trí ". Tập san của Hội Ngoại khoa Việt Nam; Số 4/2009; Tập 59; Trang 1-7. .
4. **Jinzaki M., Silverman S.G., Akita H., et al.** (2014). Renal angiomyolipoma: a radiological classification and update on recent developments in diagnosis and management. *Abdom Imaging*, 39(3), 588–604.
5. **Fernández-Pello S., Hora M., Kuusk T., et al.** (2020). Management of Sporadic Renal Angiomyolipomas: A Systematic Review of Available Evidence to Guide Recommendations from the European Association of Urology Renal Cell Carcinoma Guidelines Panel. *Eur Urol Oncol*, 3(1), 57–72.
6. **Chronopoulos PN, Kaisidis GN, Vaiopoulos CK, et al.** Spontaneous rupture of a giant renal angiomyolipoma-Wunderlich's syndrome: Report of a case. *International journal of surgery case reports* 2016; 9:140-143.
7. **Lienert AR, Nicol D.** Renal angiomyolipoma. *BJU international* 2012;110 Suppl 4:25-27.
8. **Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, et al.** European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *European urology* 2019;75:799-810.
9. **Sureka B, Khera PS.** Radiologic Classification and Imaging Features of Renal Angiomyolipomas According to the Amount of Fat. *AJR American journal of roentgenology* 2018;210:W136.
10. **Mues AC, Palacios JM, Haramis G, et al.** Contemporary experience in the management of angiomyolipoma. *Journal of endourology* 2010;24:1883-1886.

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT TÍNH CHUYÊN BIỆT CỦA QUY TRÌNH REAL-TIME PCR PHÁT HIỆN HELICOBACTER PYLORI ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ MẪU SINH THIẾT DẠ DÀY

Nguyễn Thùy An^{1,2}, Bùi Thế Trung²,
Lê Thị Thanh Thùy², Nguyễn Tiến Dũng³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xây dựng và đánh giá chỉ số kỹ thuật của quy trình real-time PCR phát hiện vi khuẩn *Helicobacter pylori* được phân lập từ mẫu bệnh phẩm dựa trên trình tự gen 23S rRNA với cặp mồi CRF-4 và CRR-1⁽⁶⁾. **Phương pháp:** Độ đặc hiệu của quy trình real-time PCR phát hiện vi khuẩn *H. pylori* với cặp mồi đã xây dựng được đánh giá với: (1) 25 chủng vi khuẩn

khác với *H. pylori*, vi nấm thường được phát hiện trong các mẫu bệnh phẩm trên đường nội soi lấy mẫu sinh thiết dạ dày; và (2) 150 chủng phân lập được từ mẫu hang vị dạ dày bệnh nhân nhi, trong đó có những chủng được xác định là *H. pylori* và một số chủng nghi ngờ. Độ chuyên biệt đoạn gen mục tiêu trên 23S rRNA của *H. pylori* cũng được khẳng định thông qua việc giải trình tự sản phẩm khuếch đại kích thước 135 bp trên 9 chủng có đặc điểm khác biệt về hình thái nhuộm soi, đặc điểm khuẩn lạc, tính chất của các thử nghiệm sinh hóa định danh. **Kết quả:** Quy trình real-time PCR với cặp mồi CRF-4 và CRR-1 đặc hiệu cho *H. pylori* được khẳng định là đặc hiệu khi thử nghiệm cho kết quả âm tính với các vi sinh vật không phải *H. pylori* phân lập từ mẫu sinh thiết trong quá trình nội soi dạ dày; và dương tính với 150 chủng *H. pylori* được phân lập từ mẫu hang vị dạ dày bệnh nhân nhi bằng phương pháp nuôi cấy. Độ đặc hiệu của các sản phẩm PCR đã được đánh giá dựa theo kết quả so sánh tương đồng trình tự khuếch đại với 10 chủng

¹Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia TP.HCM

²Bệnh viện Nhi Đồng 2

³Trung tâm Chất Lượng Nông Lâm Thủy Sản vùng 4

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thùy An

Email: nguyenthuyan612@gmail.com

Ngày nhận bài: 3.01.2023

Ngày phản biện khoa học: 21.2.2023

Ngày duyệt bài: 6.3.2023

Helicobacter spp., kết quả so sánh cho thấy trình tự gen mục tiêu được khuếch đại có sự tương đồng 97,78% đến 99,26% so với trình tự tương ứng của H. pylori đã được công bố trên ngân hàng gen GenBank.

Kết luận: Quy trình real-time PCR dựa trên gen 23S rRNA với cặp mồi CRF-4 và CRR-1 dùng để phát hiện vi khuẩn H. pylori đã được xây dựng thành công với độ đặc hiệu là 100%.

Từ khóa: real-time PCR, 23S rRNA, phát hiện, Helicobacter pylori.

SUMMARY

INITIALLY EVALUATION OF A REAL-TIME PCR FOR DETECTION OF H. PYLORI ISOLATED FROM THE GASTROENDOSCOPY SAMPLES

Objectives: Design and initially evaluation of a real-time PCR for detection of H. pylori isolated from the clinical samples based on 23S rRNA gene with primers CRF-4 and CRR-1⁽⁶⁾. **Methods:** The specificity of real-time PCR method was evaluated by on: (1) twenty-five strains of non-H. pylori and fungi found in gastroendoscopy samples and (2) one hundred and fifty cultured strains from pediatric gastric antrum samples, which included strains identified as H. pylori and other suspected strains. The coverage of amplified gene fragments was confirmed by sequencing of the 135 bp amplicons from nine strains with differences in staining morphology, colony characteristics and identified biochemical data. **Results:** The specificity of the PCR assay was confirmed by negative results for microbiota on endoscopy pathway and positive for 150 H. pylori isolated strains. The specificity of this assay was measured by comparing the amplified sequence with 10 strains of Helicobacter species. Results showed that the amplified target gene sequences were similar (97.78% - 99.26%) to the H. pylori sequence retrieved from GenBank. **Conclusion:** The real-time PCR assay based on the 23S rRNA gene with primers CRF-4 và CRR-1 for H. pylori detection was successfully established with specificity being 100%.

Keywords: real-time PCR, 23S rRNA, detection, Helicobacter pylori.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Helicobacter pylori (H. pylori) là vi khuẩn Gram âm có hình que xoắn. Dưới kính hiển vi điện tử, vi khuẩn này có kích thước: dài 2-4 μm , đường kính 0,5-1 μm , với 2-6 tiêm mao ở một đầu. Hình dạng que xoắn và các tiêm mao giúp cho vi khuẩn di chuyển trong lớp nhầy. Vi khuẩn sống ở lớp nhầy trên bề mặt niêm mạc dạ dày, một số ít bám trên bề mặt niêm mạc. H. pylori tăng trưởng ở nhiệt độ 34-40°C, tốt nhất là 37°C; phát triển được trong môi trường pH từ 5,5-8,0, tốt nhất là môi trường trung tính⁽⁵⁾.

Khi nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường rắn, các khuẩn lạc nhỏ như đầu đinh ghim, đường kính khoảng 1mm, lồi, bóng, viền đều thường sẽ xuất hiện từ ngày thứ 2 đến ngày thứ 5 trên bề mặt đĩa thạch⁽⁶⁾. Về đặc điểm tế bào, vi khuẩn H.

pylori còn có thể chuyển từ dạng que xoắn sang dạng cầu, khi đó mất hoàn toàn hoạt tính của men urease⁽²⁾, khó có thể nhận diện được vi khuẩn này khi nhuộm soi mô học mẫu sinh thiết⁽⁴⁾, dạng này thường giảm khả năng phát triển trong quá trình nuôi cấy đồng thời không phát triển khi thực hiện kháng sinh đồ⁽⁷⁾. Dạng cầu khuẩn có thể trở lại hình thái xoắn ốc với sự phục hồi hoàn toàn hoạt tính của urease khi được cấy chuyển trong môi trường canh thang vi hiếu khí mới⁽²⁾. Tuy nhiên việc xác định vi khuẩn H. pylori có dạng biến thể dựa theo các tính chất sinh hóa thông thường như oxidase, catalase và đặc biệt là urease sẽ tiêu tốn nhiều thời gian cho việc nuôi cấy phục hồi. Vì vậy cần có một quy trình xét nghiệm nhanh hơn để xác định chính xác H. pylori trong trường hợp bệnh nhân nhiễm thể thoái triển. Dewhirst và cộng sự kết luận rằng dữ liệu trình tự gen 23S rRNA có độ tin cậy đáng kể hơn để định danh, phân loại và phân tích phát sinh loài của các Helicobacter spp. so với dữ liệu trình tự gen 16S rRNA chủ yếu là do số lượng cơ sở thông tin cao hơn gấp ba lần⁽³⁾. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện H. pylori bằng kỹ thuật real-time PCR trên vùng gen bảo tồn 23S rRNA nhằm mục tiêu rút ngắn thời gian và tăng độ chính xác cho xét nghiệm xác định vi khuẩn này, kể cả các dạng biến thể trong mẫu bệnh phẩm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp tiến hành. Mẫu sinh thiết dạ dày của bệnh nhân được tiếp nhận tại khoa Vi Sinh – Bệnh viện Nhi Đồng 2 với chỉ định nuôi cấy phát hiện H. pylori và xác định tính kháng kháng sinh. Chủng H. pylori phân lập sẽ được định danh và thực hiện kháng sinh đồ trong khí trường 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, thay bộ Gaspak™ EZ Campy container system để tạo môi trường vi hiếu khí mỗi 3 ngày. Quy trình phát hiện H. pylori bằng kỹ thuật real-time PCR được xây dựng dựa trên đoạn gen 23S rRNA bằng cặp mồi CRF-4 và CRR-1.

Chủng H. pylori dùng trong nghiên cứu. Nghiên cứu được thực hiện trên 150 chủng vi sinh vật, trong đó có 145 chủng được xác định là H. pylori bằng các thử nghiệm sinh hóa phát hiện oxidase, catalase và urease. Ngoài ra, nghiên cứu cũng được thực hiện trên 24 chủng H. pylori nhưng có các biểu hiện sinh hóa khác biệt so với thông thường, bao gồm: 5 chủng phân lập có tính chất urease âm tính, 9 chủng không đặc trưng khi so sánh giữa kết quả giải phẫu bệnh và nuôi cấy, 6 chủng có đặc điểm sinh hóa đặc

trung nhưng chưa được thử nghiệm kháng sinh đồ, 15 chủng phân lập có đặc tính khuẩn lạc không đặc trưng như: nhỏ li ti, khô đục, không tan khi tạo huyền phù hay khuẩn lạc lan nhẹ, có đỉnh.

Tách chiết DNA từ chủng phân lập. Lấy 100µL huyền dịch vi khuẩn có nồng độ 0,5 McFarland cần tách chiết đem ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút; lấy cặn lắng huyền phù lại trong một lượng TE 1X vừa đủ để đạt được thể tích 180µL; đồng nhất bằng máy lắc trong 15 giây; ủ ống huyền dịch ở 95°C trong 20 phút trong máy ủ nhiệt. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút. Hút 150µL dịch nổi cho sang 1 ống eppendorf vô trùng mới. Đây là phần chứa DNA được sử dụng cho phản ứng real-time PCR sau khi đánh giá chất lượng bằng phương pháp quang phổ với giá trị OD_{260/280} từ 1,6 – 1,8.

Môi phát hiện và giải trình tự trên gen 23S Rrna. Môi CRF-4 [5'-AGTGGAGGTGAAAATTCC-3'] và CRR-1 [5'-TAAGAGCCAAAGCCCTTAC-3'] bắt cặp vào vị trí 2105-2122 và 2221-2239 trên trình tự U27270.1 đã được công bố trên GenBank⁽⁶⁾.

Điều kiện phản ứng real-time PCR. Thành phần dùng trong phản ứng real-time PCR bao gồm: SensiFAST™SYBR® No-ROX Kit (2X), nồng độ mỗi 0,5µM, thể tích DNA sau tách chiết được sử dụng là 6µL trong tổng thể tích phản ứng 20µL; chu trình nhiệt cho khuếch đại là: (95°C-10phút) x 1 chu kỳ; (95°C-10giây, 59°C-30giây, 72°C-1phút) x 40 chu kỳ; kiểm tra độ tinh khiết sản phẩm PCR bằng quy trình nóng chảy (melting) 95°C-1giây, 62°C-15giây, tăng dần nhiệt độ từ 62°C đến 95°C với tốc độ gia nhiệt 0,3°C mỗi 3 giây.

Giải trình tự và phân tích trình tự. Giải trình tự đoạn 135bp bằng kỹ thuật Sanger trên máy giải trình tự tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Trình tự gen 23S rRNA tham chiếu được lấy từ Genbank và trên trang <https://www.atcc.org>, được phân tích bằng phần mềm CLC Main Workbench 5.5.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của phản ứng real-time PCR với các chủng không phải H. pylori. Khảo sát độ đặc hiệu của cặp mồi CRF-4 và CRR-1 trên 7 loài trực khuẩn đường ruột, bao gồm:

E. coli ATCC 25922, Enterobacter cloacae ATCC 35030, K. pneumoniae ATCC 700603, Shigella flexneri ATCC 12022, Proteus vulgaris ATCC 49132, P. mirabilis, Salmonella OMA; trên 3 loài non-Enterobacteriaceae như P. aeruginosa ATCC 27853, P. putida, A. baumannii; trên 8 loài cầu khuẩn như S. aureus ATCC 29213, S. aureus ATCC 25923, S. saprophyticus ATCC 43867, S. pneumoniae ATCC 49619, S. agalactiae ATCC 12386, S. pyogenes ATCC 19615, E. faecalis ATCC 29212, E. faecium ATCC 27270; trên 3 loài vi khuẩn khó mọc như Neisseria meningitidis ATCC 13090, Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae; và trên 4 loài nấm gây bệnh như Candida albicans ATCC 10231, C. parapsilosis ATCC 22019, C. tropicalis, C. dubliniensis. Kết quả khảo sát cho thấy phản ứng real-time PCR được thiết lập với cặp mồi CRF-4 và CRR-1 trên các chủng thử nghiệm như trên không cho tín hiệu khuếch đại (kết quả không trình bày). Kết quả kiểm tra sản phẩm bằng kỹ thuật nóng chảy (melting) cũng không xuất hiện các đỉnh hấp thụ đặc trưng của sản phẩm sau quá trình real-time PCR (kết quả không trình bày).

Kết quả khảo sát khả năng phát hiện các dòng H. pylori khác nhau bằng quy trình real-time PCR. Nghiên cứu đã được thực hiện với 150 chủng H. pylori phân lập từ mẫu sinh thiết hang vị dạ dày của các bệnh nhân nhi. Các chủng này được lưu giữ, nuôi cấy và chuẩn hóa về 0,5 McFarland trước khi thực hiện tách chiết DNA. Đặc điểm các chủng phân lập được ghi nhận bao gồm hình thái khuẩn lạc đặc trưng có đặc điểm: lồi, bóng, viền đều, đường kính nhỏ khoảng 1 mm; và dạng không đặc trưng có đặc điểm khuẩn lạc khô, đục, nhỏ li ti, đường kính tương đương 0,3mm hoặc khuẩn lạc có đỉnh, lan nhẹ, to khoảng 1,5 mm. Ngoài ra các tiêu chí về nhuộm soi, giải phẫu bệnh, tính chất urease âm tính hoặc các chủng có đặc điểm không thực hiện được kháng sinh đồ cũng được ghi nhận để giải trình tự so sánh sự khác biệt.

Khẳng định các chủng H. pylori phân lập được bằng kỹ thuật quan sát hình thái, thử nghiệm sinh hóa định danh và giải trình tự sản phẩm khuếch đại PCR

Chọn 9 chủng H. pylori có các đặc điểm khác biệt trong số 150 chủng phân lập được để xác nhận H. pylori. Đặc điểm sinh học của từng chủng được mô tả chi tiết như trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm các chủng được chọn giải trình tự

Ký hiệu chủng	Kết quả giải phẫu bệnh			Kết quả nuôi cấy	Đặc tính khuẩn lạc (KL)	Ghi chú
	Đơn	Đa	Nhuộm Giemsa			

PCR âm tính nhưng dương tính với URA PCR⁽⁶⁾. Ngoài ra, cặp mồi CRF-4/CRR-1 đã được thiết lập cho kết quả âm tính với 12 chủng không phải *H. pylori* và cho kết quả dương tính với tất cả 57 chủng *H. pylori*⁽⁶⁾.

Theo kết quả trong nghiên cứu này, quy trình real-time PCR với cặp mồi CRF-4/CRR-1 đã xây dựng cho kết quả âm tính với 25 chủng không phải *H. pylori* và dương tính với 150 chủng *H. pylori*. Tuy nhiên, khi quy trình thực hiện ở nhiệt độ bắt cặp 50°C, khuếch đại với 45 chu kỳ thì có sự xuất hiện đường cong tuyến tính với các loại vi khuẩn sau *N. meningitidis* ATCC 13090 tại giá trị Ct 39,62, *S. aureus* ATCC 25923 tại giá trị Ct 40,89 và *A. baumannii* tại giá trị Ct 36,90; nhưng kết quả thử nghiệm nhiệt độ nóng chảy sản phẩm PCR thì không cho đỉnh hấp thụ đặc trưng (kết quả không trình bày). Với kết quả này cho phép thiết lập quy trình khuếch đại tối thiểu với 40 chu kỳ và xác định ngưỡng kết luận dương tính khi Ct < 39.

Kết quả trên Bảng 2 cũng cho thấy vùng trình tự 135 bp của đoạn gen 23S rRNA ở 9 chủng phân lập có tỉ lệ tương đồng 97,78% đến 99,26% với *H. pylori* ATCC 43504. Đối với các *Helicobacter* spp. khác, tỉ lệ tương đồng này giao động trong khoảng 82,96% đến 88,15%; đối với *C. jejuni* thì tỉ lệ tương đồng này đạt dưới 83,70%. Kết quả so sánh này cho thấy vùng gen khuếch đại với cặp mồi CRF-4 và CRR-1 dài 135 bp là đặc trưng và bảo tồn đối với *H. pylori*. Các nucleotide khác biệt được tìm thấy trong 9 chủng *H. pylori* ở Bảng 3 gồm T16C, A57G, T96C (tương ứng với các đột biến A2223G, T2182C và A2143G trên U27270.1). Các đột biến này cũng được tác giả Hà Thị Minh Thi và cộng sự tìm thấy với các tỷ lệ xuất hiện tương ứng 42,9%; 86,5% và 35,3%⁽¹⁾.

Kết quả thực nghiệm quy trình real-time PCR đã xây dựng ở Bảng 4 cũng cho thấy 150 dòng vi khuẩn phân lập từ hang vị dạ dày bệnh nhân nhi, mặc dù có các biểu hiện khác biệt về hình thái tế bào, hình thái khuẩn lạc, đặc điểm sinh hóa và đặc điểm không xác định được kháng sinh đồ, nhưng đều cho kết quả real-time PCR dương tính với *H. pylori*. Trong khi đó phương pháp nuôi cấy chỉ khẳng định được *H. pylori* với 145/150 chủng. Kết quả này cho phép khẳng định quy trình real-time PCR đã xây dựng dựa trên đoạn gen khuếch đại dài 135bp phù hợp để phát hiện *H. pylori*, hỗ trợ việc xác nhận khi thử nghiệm định danh urease âm tính, giúp loại trừ được những kết quả âm tính giả đối với xét nghiệm theo quy trình

nuôi cấy.

V. KẾT LUẬN

Tính chuyên biệt của quy trình real-time PCR phát hiện *H. pylori* với cặp mồi CRF-4 và CRR-1 đã được khẳng định sau khi thực hiện khảo sát với 150 chủng *H. pylori* với các đặc điểm khác nhau và 25 chủng không phải vi khuẩn này. Trong số các chủng *H. pylori* đã khảo sát, có 9 chủng đại diện được lựa chọn để giải trình tự đoạn gen mục tiêu. Kết quả khảo sát cho thấy quy trình real-time PCR được thiết lập với cặp mồi CRF-4 và CRR-1 phù hợp cho khuếch đại trình tự dài 135 bp trên vùng gen 23S rRNA đặc trưng cho *H. pylori*, bao gồm các dòng có đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa, đặc điểm kháng kháng sinh đặc trưng và không đặc trưng. Trình tự đoạn gen mục tiêu khuếch đại tương đồng với trình tự tương ứng của chủng *H. pylori* ATCC 43504 với tỉ lệ 97,78% đến 99,26%. Với kết quả này cho phép kết luận quy trình real-time PCR đã xây dựng dùng để phát hiện *H. pylori* dựa trên gen mục tiêu 23S rRNA có độ đặc hiệu là 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hà Thị Minh Thi và cs, Xác định đột biến gene 23S rRNA của *Helicobacter pylori* và mối liên quan của các đột biến gene này với đề kháng clarithromycin ở bệnh nhân viêm dạ dày mạn, Tạp chí Y dược học, 2015, 5 (4-5), số 28+29, trang 36.
2. Andersen, A.P., et al., Growth and morphological transformations of *Helicobacter pylori* in broth media, J Clin Microbiol, 1997, 35(11):2918-22.
3. Dewhirst, F.E., et al., Discordant 16S and 23S rRNA gene phylogenies for the genus *Helicobacter*: implications for phylogenetic inference and systematics, J Bacteriol, 2005, 187(17):6106-18.
4. Jones, D. and A. Curry, The genesis of coccal forms of *Helicobacter pylori*, Springer, 1990, 29-37.
5. Kusters, J.G., et al., Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, Clin Microbiol Rev., 2006, 19 (3): 449-490.
6. Maeda, S., et al., *Helicobacter pylori* specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance, Gut, 1998, 43 (3): 317-321.
7. Murray, P.R., et al., *Helicobacter*, Manual of Clinical Microbiology (12th edition), American Society for Microbiology, 2019, 59 (1): 1044-57.
8. Ndip, R.N., et al., *Helicobacter pylori* isolates recovered from gastric biopsies of patients with gastro-duodenal pathologies in Cameroon: current status of antibiogram, Trop Med Int Health, 2008, 13 (6): 848-854.
9. Rimbara, E., M. Sasatsu, and D.Y. Graham, PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples, Methods Mol Biol, 2013, 279-287.