

مقایسه روش‌های هیبریداسیون موضعی و آزمون E در تشخیص سریع سویه‌های هلیکوباکتریلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین در بیماران مبتلا به اختلال گوارشی

دکتر سید مجتبی موسویان* سعید تاجبخش** علی رضا سمریاف زاده***

Rapid detection of Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients by fluorescent in situ hybridization (FISH) compared with E-test

S.M Moosavian☆ S Tajbakhsh AR Samarbafzadeh

دریافت: ۸۳/۸/۳۰ پذیرش: ۸۴/۸/۲۶

*Abstract

Background: Rapid detection of *H. pylori* is important for determining of resistant are susceptible strains to clarithromycin and recovery of patients will be acelerated, if clarithromycin is added to therapeutic protocol.

Objective: Rapid detection of susceptible or resistant strains of *Helicobacter pylori* to clarithromycin in patients with dyspeptic ulcers by FISH technique and also comparison of FISH results with E-test technique.

Methods: Frozen sections of gastric biopsies from 50 patients with dyspeptic ulcers were hybridized in situ with 5 fluoresecent oligonucleotide probes (FISH). Following staining with DAPI, the slides were examined using fluoresecent microscopy. Also, susceptibility and resistance of isolated strains of *H. pylori* to clarithromycin was determined by E-test. The results obtained from both E-test and FISH techniques were compared.

Findings: Twenty five out of 50 examined gastric biopsy samples were positive for *H. pylori* by FISH. Out of 25 *H. pylori* strains, 17 strains (68%) were susceptible, 6 strains (24%) resistant and 2 strains (8%) showed intermediate response to clarithromycin. This study showed that there was no significant difference between FISH and E-test results in terms of the number of susceptible or resistance strains.

Conclusion: Regarding the results of this study, it seems that the FISH technique to be a suitable method to determine the susceptibility are *H. pylori* to clarithromycin, especially when a quickly decision is necessary for treating of dyspeptic patients.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Hibridization, Clarithromycin, Peptic Ulcer, Digestion

* چکیده

زمینه: استفاده از کلاریترومایسین در روند درمانی چند دارویی زخم‌های پپتیک باعث تسریع درمان می‌شود و تشخیص سریع سویه‌های هلیکوباکتریلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین بیماران حائز اهمیت است.

هدف: مطالعه به منظور مقایسه روش FISH و آزمون E در تشخیص سریع سویه‌های هلیکوباکتریلوری مقاوم یا حساس به کلاریترومایسین در نمونه های بیوپسی حاصل از معده بیماران مبتلا به اختلال گوارشی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه که در سال ۱۳۸۳ در آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه جندی شاپور اهواز انجام شد، برش‌های منجمد شده حاصل از نمونه برداری معده ۵۰ بیمار مبتلا به اختلال گوارشی و نیز سویه‌های حساس یا مقاوم به کلاریترومایسین با استفاده از محلول حاوی مخلوطی از ۵ پروب الیگونوکلوئیدی فلورسنت تحت هیبریداسیون قرار گرفتند. پس از رنگ آمیزی لام‌ها با محلول رنگی DAPI و مشاهده با میکروسکپ فلورسنت، حساسیت سویه‌های هلیکوباکتریلوری جدا شده نسبت به کلاریترومایسین با روش‌های E-test و FISH مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: در حداقل ۲۵ نمونه از ۵۰ نمونه معده مورد آزمایش به روش FISH، هلیکوباکتریلوری مشاهده گردید. در بین نمونه‌های مثبت، ۱۷ نمونه (۶۸٪) سویه حساس، ۶ نمونه (۲۴٪) سویه مقاوم و ۲ نمونه (۸٪) مخلوطی از سویه‌های حساس و مقاوم به کلاریترومایسین تشخیص داده شدند. علاوه براین، مقایسه نتایج حاصله از FISH با نتایج E-test نشان داد که بین تشخیص ژنوتیپی (FISH) و تشخیص فنوتیپی (E-test) مغایرتی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد روش FISH برای تعیین حساسیت یا مقاومت هلیکوباکتریلوری روش مناسبی است، به ویژه هنگامی که تصمیم‌گیری سریع برای درمان بیماران ضروری است.

کلیدواژه‌ها: هلیکوباکتریلوری، هیبریداسیون، کلاریترومایسین، زخم پپتیک، گوارش

** استادیار میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر

* دانشیار میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

*** استادیار ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور دانشکده پزشکی، تلفن ۵۰ - ۳۳۶۷۵۴۳ - ۰۶۱۱

*** مقدمه :**

هلیکوباکتریلوری میکروارگانیسمی ماریپیچی شکل و میکرواُتروفیل است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ از انسان جدا شد. محل زندگی این باکتری لایه مخاطی پوشاننده سطح اپی تلیوم معده و گاهی دوازده (دئودنوم) و مری است. عوامل مختلفی باعث تجمع و بقای باکتری در مخاط معده می‌شوند و ممکن است این باکتری برای چند سال و گاهی تا آخر عمر در معده تثبیت شود. هلیکوباکتریلوری در بیش از ۹۰ درصد بیماران مبتلا به زخم دوازدهه، مشاهده می‌شود و دلایل محکمی نیز نشان می‌دهند که بین وجود این باکتری با زخم دوازدهه ارتباط قوی وجود دارد. همچنین بعضی از بیماری‌های دستگاه گوارش مانند گاستریت مزمن فعال، زخم معده، سرطان معده و لنفوم معده را نیز به وجود هلیکوباکتریلوری نسبت داده‌اند.^(۱)

درمان‌های چند دارویی مختلفی برای بیماران مبتلا به عفونت هلیکوباکتریلوری، به ویژه افراد دارای زخم معده یا دوازدهه پیشنهاد شده است؛ از جمله ترکیب رانیتیدین، سیترات بیسموت و کلاریترومایسین و همچنین ترکیب دیگری شامل یک ممانعت کننده پمپ پروتون (Proton Pump inhibitor) همراه با آموکسی سیلین و کلاریترومایسین یا همراه با مترونیدازول و کلاریترومایسین.^(۲،۳) کلاریترومایسین به دلیل مقاومت نسبی در مقابل pH اسیدی معده، جذب خوراکی مناسب، نیمه عمر نسبتاً بالا و بالاخره آثار جانبی کم در دستگاه گوارش به عنوان دارویی مفید جهت ریشه کن کردن عفونت هلیکوباکتریلوری معرفی شده است.^(۴)

استفاده از روش‌های مولکولی از جمله PCR در تشخیص عفونت‌های هلیکوباکتریلوری به جای روش‌هایی نظیر آندوسکوپی، بافت‌شناسی، کشت، تشخیص سریع اوره آز و غیره سرعت تشخیص این باکتری را در نمونه‌های بافتی یا نمونه‌های عفونی افزایش داده است. با معرفی روش هیبریدزاسیون در موضع با استفاده از پروب‌های فلوروسنت یا FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)، بدون نیاز به استخراج و تکثیر DNA بر سرعت تشخیص هلیکوباکتریلوری افزوده شده است.^(۵) این بررسی با هدف استفاده از روش FISH برای تشخیص سویه‌های حساس و مقاوم هلیکوباکتریلوری به کلاریترومایسین، در نمونه‌های

بافت معده بیماران و مقایسه نتایج حاصل از FISH با E-test (Epsilonometer test) انجام شد.

*** مواد و روش‌ها :**

در این مطالعه توصیفی گذشته‌نگر که در سال ۱۳۸۳ انجام شد، از نواحی آنتروم و کورپوس معده ۵۰ بیمار مبتلا به اختلال گوارشی، از قبیل گاستریت، اریتم آنتروم معده، زخم‌های پپتیک و خون‌ریزی معده توسط پزشک متخصص گوارش در بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی اهواز نمونه‌برداری شد. پس از تهیه برش‌های بافتی از نمونه‌ها، لام‌های حاوی برش‌ها به بخش میکروپزشناسی دانشکده پزشکی منتقل و آزمایش شدند. همچنین نمونه‌های جداگانه‌ای از آنتروم و کورپوس معده این بیماران جهت کشت و جداسازی هلیکوباکتریلوری و انجام E-test بر روی آنها، تهیه شد.

به منظور ثابت کردن، نمونه‌های بافتی اخذ شده از بیماران بلافاصله در یک محیط انتقال نیمه جامد به نام پورتاچرم پیلوری (Portagerm pylori Biomerieux, Marcy, l'Etoile-France) قرار گرفتند و خیلی سریع به آزمایشگاه منتقل شدند. با قرار دادن هر نمونه در یک ویال ویژه انجماد حاوی ترکیب مخصوص (Tissue - Tek Compound-USA) و با استفاده از نیتروژن مایع در ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، به شکل یک بلوک منجمد شدند.^(۱) در نهایت از هر بلوک نمونه، توسط دستگاه کرایومیکروتوم، برش‌های بافتی به ضخامت ۴ میکرومتر تهیه و بر روی لام‌های باردار به نام Superfrost Plus (Menzel Glaser, Germany) قرار داده شدند.^(۲)

برای تشخیص هلیکوباکتریلوری، از یک پروب الیگونوکلئوتیدی نشان‌دار شده با ماده فلوروسنس سبز Fluos یا Flu به نام Hpy (TLB Molbiol) و برای تشخیص مقاومت یا حساسیت این باکتری در مقابل کلاریترومایسین، از یک سری پروب‌های الیگونوکلئوتیدی نشان‌دار شده با ماده Cy3 (با فلوروسانس قرمز) به نام ClaR1، ClaR2، ClaR3 و ClaWT از کمپانی Metabion نیز پروب فاقد ماده نشان‌دار (جدول شماره ۱). استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات پروب‌های الیگونوکلوئوتیدی برای تشخیص هلیکوباکتریلوری و مقاومت آن به کلاریترومایسین

پروپ	سکانس پروپ (5'-3')	جایگاه هدف
Hpy	CAC ACC TGA CTG ACT ATC CCG	16S rRNA
ClaR1	CGG GGT CTT CCC GTC TT	23S rRNA (جهش یافته G → A 2143)
ClaR2	CGG GGT CTC TCC GTC TT	23S rRNA (جهش یافته G → A 2144)
ClaR3	CGG GGT CTT GCC GTC TT	23S rRNA (جهش یافته C → A 2143)
ClaWT	CGG GGT CTT TCC GTC TT	23S rRNA (وحشی)

۵ دقیقه توسط بافر PBS، شستشو و دردمای اتاق خشک شدند.^(۱۰) این لام‌ها پس از تثبیت با ماده مانیتینگ DAKO، زیر میکروسکوپ فلوروسنس مجهز به فیلترهای گوناگون استاندارد، مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

به منظور کشت، نمونه‌های بافت معده بیماران در محیط انتقالی تایوگلیکولات به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل و پس از آماده‌سازی، بخشی از آنها به محیط‌های انتخابی کلمبیا آگار (Difco) و بروسلا آگار (Merck) تلقیح شدند.^(۱۰ و ۱۵ و ۱۶ و ۱۷) متعاقب نگره‌داری در شرایط میکروآئروفیلیک به منظور تشخیص قطعی، کلنی‌های مشکوک به هلیکوباکتریلوری، با آزمایش‌های دیگری از جمله رنگ‌آمیزی گرم، آزمون اوره آز سریع، کاتالاز و اکسیداز و در نهایت آزمایش حساسیت به سفالوتین و نالیدیکسیک اسید بررسی شدند.^(۱۰ و ۱۸ و ۱۹)

با استفاده از نوار E-test، آنتی بیوتیک با شیب غلظت مشخص بود هلیکوباکتریلوری جدا شده از نمونه هر بیمار از نظر حساسیت به کلاریترومایسین، مورد سنجش قرار گرفت. باکتری‌هایی که MIC (Minimal Inhibitory Concentration) کلاریترومایسین برای آنها بیش از ۲ میکروگرم در میلی لیتر بود به عنوان مقاوم و کمتر از این حد، به عنوان حساس در نظر گرفته شدند.^(۱۰ و ۲۰ و ۲۱)

سویه‌های شاهد مقاوم (هلیکوباکتریلوری جهش یافته ClaR1-3) و سویه‌های شاهد حساس (هلیکوباکتریلوری وحشی) و نیز کمپیلوباکتر ژرونی (شاهد منفی) از طریق مرکز کلکسیون میکروبی مؤسسه ماکسون پتن کوفر (مونخ - آلمان) تهیه و پس از کشت خالص آنها در محیط جامد، این سویه‌ها با استفاده از پارافرمالدهید (PFA) ۴ درصد، ثابت و لام شاهد ۶ حفره‌ای از آنها تهیه شد.^(۱۱ و ۱۲ و ۱۳ و ۱۴) آگیری از این سویه‌ها و لام‌های آماده دیگر با استفاده از اتانول در سه رقت، صورت گرفت و سپس لام‌های شاهد و لام‌های حاوی برش‌های نمونه معده در دمای اتاق یا ۴۶ درجه سانتی‌گراد خشک شدند.^(۲) یکی از محلول‌های بافر هیبریدیزاسیون متشکل از تریس - اسید کلریدریک (۲۰ میلی‌مول)، کلرور سدیم (۹/۰ مول)، فرامید (۲۰ درصد) و SDS (۰/۰۱ درصد)، و دیگری حاوی مخلوطی از ۵ پروب فوق (با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر برای هر کدام) تهیه شد. ۱۰ میکرولیتر از مخلوط هیبریدیزاسیون به هر حفره لام شاهد و ۴۰ میکرولیتر از آن بر روی هر لام حاوی نمونه بافت معده اضافه و پس از قرار دادن لام به مدت ۹۰ دقیقه، در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد در محفظه مرطوب نگره‌داری شد و سپس لام‌ها با محلول بافر تریس-اسید کلریدریک (۲۰ میلی‌مول) با pH 8، کلرور سدیم (۲۲۵ میلی‌مول) و SDS (۱ درصد) شستشو و در دمای اتاق خشک شدند.^(۱۰ و ۲۱)

هر حفره لام شاهد و همچنین هر لام حاوی نمونه با محلول DAPI رنگ آمیزی شده و پس از

* یافته‌ها :

از آنجا که سویه‌های مقاوم هلیکوباکتریپیلوری (جهش یافته در مولکول RNA ریبوزومی از نوع 23S)، یعنی سویه‌های ClaR1، ClaR2 و ClaR3 به ترتیب با پروب‌های ClaR1، ClaR2 و ClaR3 (نشان‌دار شده با Cy3) هیبرید شده بودند، بنابراین سیگنال قرمز را آشکار ساختند و به علت آن که این سویه‌ها با پروب Hpy (با سیگنال سبز) نیز هیبرید شده بودند، لذا در فیلتر مخلوط میکروسکوپ فلوئورسنت، به رنگ زرد نارنجی مشاهده شدند. سویه‌های حساس (وحشی) هلیکوباکتریپیلوری نیز با دو پروب Hpy (سبز) و پروب ClaWT (فاقد رنگ فلوئورسنت) هیبرید شدند که در نتیجه فلوئورسنس سبز Hpy را آشکار نمودند. بنابراین در عفونت‌های مخلوط، سویه‌های مقاوم و حساس به کلاریترومایسین به خوبی از یکدیگر قابل تشخیص بودند. کمپیلوباکترژرونی (شاهد منفی) توسط هیچ کدام از پروب‌های Hpy و ClaR هیبرید نشد لذا فاقد سیگنال سبز و قرمز بود و تنها سیگنال آبی (مربوط به DAPI) را آشکار ساخت.

نتایج حاصل از FISH در ۵۰ نمونه مورد آزمایش نشان داد که حداقل ۲۵ نمونه حاوی هلیکوباکتریپیلوری بودند. در این ۲۵ نمونه، ۱۷ مورد سویه حساس، ۶ مورد سویه مقاوم و ۲ نمونه مخلوطی از عفونت‌های هلیکوباکتریپیلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین تشخیص داده شد. نتایج به دست آمده از طریق FISH بسیار نزدیک یا منطبق با نتایج حاصل از کشت و نیز آزمون E بودند. به طوری که از کشت ۵۰ نمونه مورد بررسی، ۲۴ مورد هلیکوباکتریپیلوری جدا شد و نتایج آزمون E نیز نشان داد که ۱۷ مورد سویه حساس، ۵ مورد سویه مقاوم و ۲ مورد نیز سویه‌های حساس و مقاوم به کلاریترومایسین (عفونت مخلوط) تشخیص داده شد (جدول شماره ۲). در این مطالعه حساسیت FISH در مقایسه با آزمون E، ۹۴ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد تعیین شد.

این مطالعه نشان داد که هیچ‌گونه تفاوتی بین تشخیص ژنوتیپی (FISH) و تشخیص فنوتیپی (E-test) وجود ندارد.

جدول ۲- نتایج مربوط به تعیین حساسیت یا مقاومت

هلیکوباکتریپیلوری به کلاریترومایسین با دو روش

FISH و آزمون E

نوع آزمون	تعداد کل سویه‌ها	تعداد نمونه‌های دارای سویه	
		حساس	مقاوم
FISH	۲۵	۱۷ (۶۸٪)	۶ (۲۴٪)
E	۲۴	۱۷ (۷۱٪)	۵ (۲۱٪)

* عفونت مخلوط

* بحث و نتیجه‌گیری :

در این بررسی، نتایج به دست آمده از طریق آزمون‌های FISH و E همسویی کاملی را با یکدیگر نشان دادند. در واقع تمام سویه‌هایی که با روش آزمون E به عنوان حساس (۱۷ سویه)، مقاوم (۵ سویه) یا مخلوطی از سویه‌های مقاوم و حساس (۲ سویه) تعیین شده بودند، با روش FISH نیز به‌طور مستقیم در نمونه‌های مربوطه مشخص شدند. علت تشخیص یک مورد اضافی از سویه‌های مقاوم در روش FISH، نسبت به روش E این بود که اصولاً از آن نمونه هلیکوباکتر جدا نشده بود. از آنجا که برای کشت و جداسازی هلیکوباکتریپیلوری به‌طور متوسط ۵ روز وقت لازم است و انجام آزمون E نیز به ۲ روز زمان نیاز دارد، بنابراین با روش FISH حدوداً یک هفته زودتر می‌توان وضعیت مقاومت یا حساسیت باکتری را در مقابل کلاریترومایسین تعیین نمود.

نکته دیگر این که علت پیدایش سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین، ایجاد جهش‌هایی در حلقه پپتیدیل ترانسفراز مربوط به مولکول rRNA از نوع 23S است که در نهایت پروتئین‌سازی را در این باکتری مختل می‌نماید.^(۴) بروز چنین اختلالی موجب کاهش رشد سویه‌های جهش یافته (مقاوم) در مقابل سویه‌های

با توجه به موارد ذکر شده و در نظر گرفتن این نکته که تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی هلیکوباکتریلوری با روش E مواد مختلفی از جمله محیط های کشت غنی، آنتی بیوتیک های مختلف، نوارهای E-test و مواد و وسایل لازم برای برقراری شرایط میکروآتروفیلیک نیاز دارد، به نظر می رسد روش FISH می تواند به علت داشتن سرعت عمل، حساسیت و ویژگی بالا (در این مطالعه به ترتیب ۹۴ و ۱۰۰ درصد)، به خصوص در هنگام تصمیم گیری سریع برای درمان بیمار جایگزین مناسبی برای آن باشد.

* سیاست گذاری :

بدین وسیله از همکاری و حمایت مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در اجرای این طرح صمیمانه قدردانی می شود.

* مراجع :

1. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and related organisms. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). Principle and practice of infectious diseases. 5th ed, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, 2285-92
2. Trebesius K, Panthel K, Strobel S et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by Fluorescent In Situ Hybridization. Gut 2000; 46: 608-14
3. Anonymous. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection, the Maastricht consensus report. European *Helicobacter pylori* Study Group. Gut 1997; 41: 8-13
4. Lind T, Veldhuyzen van Zanten S, Unge P et al. Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining

وحشی (حساس) می شود و در نتیجه هنگام کشت و جداسازی هلیکوباکتریلوری از نمونه های بافتی بیماران، نسبت میکروارگانیزم های حساس به مقاوم در عفونت های مخلوط افزایش می یابد. راسمن و همکاران نشان دادند که تعداد باکتری های حساس به مقاوم ممکن است ۲۰۰ به ۱ باشد و اغلب نیز کلنی های مربوط به سویه های مقاوم کوچک تر از سویه های حساس هستند که در این قبیل موارد هم دستیابی به این کلنی ها آسان نیست.^(۱۰) بنابراین در آزمون E، ممکن است فقط سویه های هلیکوباکتریلوری حساس به کلاریترومایسین شناسایی و به پزشک گزارش شوند که این امر از نظر درمانی بسیار حائز اهمیت است، زیرا با تجویز دارو، فقط سویه های حساس از بین رفته و سویه های مقاوم باقی می ماند و در نتیجه درمان بیماران منتهی به شکست خواهد شد.^(۱۰) این محدودیت در FISH وجود ندارد، زیرا سویه های حساس و مقاوم (حتی به تعداد اندک) به طور هم زمان قابل مشاهده و تشخیص هستند.

میزان مقاومت هلیکوباکتریلوری نسبت به کلاریترومایسین، ۱۵ درصد گزارش شده است بنابراین ۸۵ درصد سویه ها نسبت به این آنتی بیوتیک حساس هستند.^(۲۰) نتایج به دست آمده در این تحقیق که از یک طرف نشان دهنده مقاومت ۲۴ درصد سویه ها و از طرفی بیان گر حساسیت ۶۸ درصد آنها نسبت به کلاریترومایسین است با گزارش های فوق هماهنگی نسبی نشان می دهد. بنابراین با استفاده از روش FISH در اکثر موارد می توان وضعیت باکتری را نسبت کلاریترومایسین به سرعت مشخص نمود.

علاوه بر این، استفاده از این روش برای تعیین حساسیت یا مقاومت باکتری نسبت به کلاریترومایسین، در کشور ما از اهمیت بیش تری برخوردار است، زیرا در ایران کشت، جداسازی و آنتی بیوگرام هلیکوباکتریلوری به طور معمول انجام نمی شود و چون کلاریترومایسین نیز داروی گران قیمتی است، بنا بر این به عنوان داروی خط دوم درمان تجویز می شود.

FISH method. J Microbiol Methods 2001; 47:281-2

13. Moreno Y, Botella S, Alonso JL et al. Specific detection of Arcobacter and Campylobacter strains in water and Sewage by PCR and Fluorescent In Situ Hybridization. Appl Environ Microbiol 2003; 69 (2): 1181-6

14. Russmann H, Adler K, Haan R et al. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by Fluorescent In Situ Hybridization. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4142-4

15. Glupezynski Y. Infection with Helicobacter. In: Collier L, Balows A, Sussman M, (eds). Microbiology and microbial infections. 9th ed, London, Arnold, 1998; 581-91

16. Heatly RV, Wyatt JJ. Gasteritis and duodenitis. In: Haubirch WS, Sahfe-ner F, Berk JE, (eds). Gastroenterology. 5th ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 1995, 635-99

17. Williams CL. *Helicobacter pylori*: bacteriology and laboratory diagnosis. J Infect 1997; 34: 1-5

18. Forbes BA, Sahn DF, Wissfeld AS. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 11th ed, Philadelphia, Mosby, 2002, 169-201, 285-96, 274-81

19. Carnahan AM, Andrews G. Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas and Campylobacter species. In: Mahon CR, Manuselis G (eds). Textbook of Diagnostic microbiology 2nd ed, Philadelphia: WB Saunders Co, 2000; 515-37

omeprazole with two antimicrobials: the MACH 1 study. Hlicobacter 1996; 1: 138-44

5. Bene VD, Manos J, Virella G. Inhibitors of 50S Ribosomal Unit. In: Virella G, (ed). Microbiology and infectious diseases. 3rd ed, Egypt, Williams & Wilkins, 1997, 50-1

6. Vester B, Douth Waite S. Macrolide resistance- conferred by base substitution in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1): 1-12

7. Steigbigel NH. Macrolides and clindamycin In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). Principle and practice of infectious diseases. 5th ed, Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, 366-82

8. Volkhard A, Kempf J, Trebesius K, Autenrieth I B. Fluorescent In Situ Hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000; 38: 830-8

9. Russmann H, Feydt-Schmidt A, Adler K et al. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by Fluorescent In Situ Hybridization. J Clin Microbiol 2003; 41:813-5

10. Russmann H, Kempf VAJ, Koletzko S et al. Comparison of Fluorescent In Situ Hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 2001; 39(1): 304-8

11. Moter A, Gobel UB. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods 2000; 41: 85-112

12. Perry O, keefe H, Rigby S, Oliveria K et al. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA