Archive of SID

The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sci.
Vol. 10, No. 3, Autumn 2006

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
سال دهم، شماره ۳ (پی‌درپی ٤٠)، پاییز ۱۳۸۵

مقایسه روش‌های هیبریداسیون موضعی و آزمونE در تشخیص سریع سویه‌های هلیکوباکترپیلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین در بیماران مبتلا به اختلال گوارشی

دکتر سید مجتبی موسویان* سعید تاجبخش** علی رضا سمرباف 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 fluorescent oligonucleotide probes (FISH). Following staining with DAPI, the slides were examined using fluorescent 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 sems 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 هلیکوباکترپیلوری حساس و مقاوم به کلاریترومایسین بیماران حائز اهمیت است.

هدف : مطالعه به منظور مقایسه روشFISH و آزمونE در تشخیص سریع سویه‌های هلیکوباکترپیلوری 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 میکروب‌شناسی دانشگاه جندی‌شاپور اهواز انجام شد، برش‌های منجمد شده حاصل از نمونه‌برداری معده ۵۰ بیمار مبتلا به اختلال گوارشی و نیز سویه‌های حساس یا مقاوم به کلاریترومایسین با استفاده از محلول حاوی مخلوطی از ۵ پروب الیگونوکلئوتیدی فلوئورسنت تحت هیبریدیزاسیون قرار گرفتند. پس از رنگ‌آمیزی لام‌ها با محلول رنگی DAPI و مشاهده با میکروسکپ فلوئورسنت، حساسیت سویه‌های هلیکوباکترپیلوری 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، هلیکوباکترپیلوری 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 ازFISH 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 می رسد روش FISH برای تعیین حساسیت یا مقاومت هلیکوباکتر پیلوری روش مناسبی است، به ویژه هنگامی که تصمیم‌گیری سریع برای درمان بیماران ضروری است.

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

* دانشیار میکروبشناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز ** استادیار میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
*** استادیار ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
آدرس مکاتبه : اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور دانشکده پزشکی، تلفن ۵۰ – ۳۳۶۷۵۴۳– ۰۶۱۱
✡E.mail: moosavian_m@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

*** مقدمه :**

هلیکوبـــاکترپیلوری میکروارگانیـــسمی مـــارپیچی شـــکل و میکروآئروفیل است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ از انسان جدا شد. محل زندگی این باکتری لایه مخاطی پوشاننده سطح اپـی‌تلیـوم معده و گاهی دوازده (دئودنـوم) و مـری اسـت. عوامـل مختلفـی باعث تجمع و بقای باکتری در مخاط معـده مـی‌شـوند و ممکـن است این باکتری برای چند سال و گاهی تـا آخـر عمـر در معـده تثبیت شود. هلیکوباکترپیلوری در بیش از۹۰ درصد بیماران مبتلا به زخم دوازدهه، مشاهده می‌شود و دلایـل محکمـی نیـز نـشان می‌دهند که بین وجود این باکتری با زخم دوازدهه ارتباط قـوی وجود دارد. همچنین بعضی از بیماری‌های دستگاه گـوارش ماننـد گاستریت مزمن فعال، زخم معده، سرطان معده و لنفـوم معـده را نیز به وجود هلیکوباکترپیلوری نسبت داده‌اند.[۱و۲]

درمان‌های چند دارویی مختلفی برای بیماران مبتلا به عفونـت هلیکوباکترپیلوری، به ویژه افـراد دارای زخـم معـده یـا دوازدهـه پیشنهاد شده است؛ از جمله ترکیب رانیتیدین، سیترات بیـسموت و کلاریترومایسین و همچنین ترکیب دیگری شامل یک ممانعت کننـده پمـپ پروتـون (Proton Pump inhibitor) همـراه بـا آموکسی سـیلین و کلاریترومایـسین یـا همـراه بـا مترونیـدازول وکلاریترومایسین.[۱و۳و۴] کلاریترومایسین به دلیل مقاومت نـسبی درمقابلpH اسیدی‌معده،جذب‌خوراکی‌مناسب، نیمه‌عمرنسبتاً بـالا وبالاخره‌آثارجانبی‌کم‌دردستگاه‌گوارش‌به‌عنوان‌دارویی‌مفیـد جهـت ریشه‌کن‌کردن‌عفونت‌هلیکوباکترپیلوری‌معرفی‌شده‌است.[۵و۶و۷]

استفاده از روش‌های مولکـولی از جملـه PCR در تـشخیص عفونـت‌هـای هلیکوبـاکترپیلوری بـه جـای روش‌هـایی نظیـر آندوسکوپی، بافت‌شناسی، کشت، تشخیص سریع اوره آز و غیره سـرعت تـشخیص ایـن بـاکتری را در نمونـه‌هـای بـافتی یـا نمونـه‌هـای عفـونی افـزایش داده اسـت. بـا معرفـی روش هیبریدیزاسیون در موضع با استفاده از پروب‌های فلوئورسنت یـا FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)، بدون نیـاز بـــه اســـتخراج و تکثیـــر DNA بـــر ســـرعت تـــشخیص هلیکوباکترپیلوری افزوده شده است.[۸و۹] این بررسـی بـا هـدف استفاده از روشFISH برای تـشخیص سـویه‌هـای حـساس و مقاوم هلیکوباکترپیلوری بـه کلاریترومایـسین، در نمونـه‌هـای بافت معده بیماران و مقایسه نتایج حاصـل از FISH بـا E-test (Epsilometer 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 میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی منتقل و آزمایش شدند. همچنین نمونه‌های جداگانه‌ای از آنتروم و کورپوس معده این بیماران جهت کشت و جداسازی هلیکوباکترپیلوری و انجام E-test بر روی آنها، تهیه شد.

به منظور ثابت کردن، نمونه‌های بافتی اخذ شـده از بیمـاران بلافاصله دریک محیط‌انتقال نیمه‌جامد به‌نام پورتـاجرم پیلـوری (Portagerm pylori Biomerieux, Marcy, I'Etoile-France) قرار گرفتند و خیلی سریع به آزمایشگاه منتقـل شـدند. بـا قـرار دادن هـر نمونـه در یـک ویـال ویـژه انجمـاد حـاوی ترکیـب مخصوص(Tissue -Tek Compound-USA) و با اسـتفاده از نیتروژن مایع در ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، به شکل یـک بلـوک، منجمد شدند.[۱۰] در نهایت از هر بلوک نمونـه، توسـط دسـتگاه کرایومیکروتوم، برش‌های بافتی به ضخامت ۴ میکرومتـر تهیـه و بر روی لام‌های باردار به نام Superfrost Plus (Menzel -Glaser,Germany) قرار داده شدند.[۲]

برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری، از یک پروب الیگونوکلئوتیدی نشان‌دار شده با ماده فلوئورسنس سبزFluos 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 فلوئورسانس قرمز) به نام ClaR2، ClaR3، ClaR1 و نیز پروب فاقد ماده نشان‌دار ClaWT از کمپانی Metabion استفاده شد(جدول شماره ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مشخصات پروب‌های الیگونوکلئوتیدی برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری و مقاومت آن به کلاریترومایسین

پروب	سکانس پروب (`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)

سویه‌های شاهد مقاوم (هلیکوباکترپیلوری جهش یافته ClaR1-3) و سویه‌های شاهد حساس (هلیکوباکتر پیلوری وحشی) و نیز کمپیلوباکترژژونی (شاهد منفی) از طریق مرکز کلکسیون میکروبی مؤسسه ماکس‌ون‌پتن کوفر (مونیخ ـ آلمان) تهیه و پس از کشت خالص آنها در محیط جامد، این سویه‌ها با استفاده از پارافرمالدئید (PFA) ۴ درصد، ثابت و لام شاهد ۶ حفره‌ای از آنها تهیه شد.[۱۱و۱۲و۱۳و۱۴] آبگیری 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 ـ اسیدکلریدریک (۲۰ میلی‌مول)، کلرور سدیم (۰/۹مول)، فرامید (۲۰ درصد) و SDS (۰/۰۱ درصد)، و دیگری حاوی مخلوطی از ۵ پروب فوق (با غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر برای هرکدام) تهیه شد. ۱۰میکرولیتر 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 لامل به مدت ۹۰ دقیقه، در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد در محفظه مرطوب نگه‌داری شد و سپس لام‌ها با محلول بافر تریس‌ـ اسید کلریدریک (۲۰ میلی مول) با pH8 ، کلرور سدیم (۲۲۵ میلی‌مول) وSDS (۱درصد) شستشو و در دمای اتاق خشک شدند.[۲و۱۰]

هر حفره لام شاهد و همچنین هر لام حاوی نمونه با محلول DAPI رنگ آمیزی شده و پس از ۵ دقیقه توسط بافرPBS، شستشو و دردمای‌اتاق خشک شدند.[۱۰] این لام‌ها پس از تثبیت با ماده مانتینگ DAKO، زیر میکروسکوپ فلوئورسنس 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.[۲و۱۰و۱۵و۱۶و۱۷] متعاقب نگه‌داری در شرایط میکروآئروفیلیک به منظور تشخیص قطعی، کلنی‌های مشکوک به هلیکوباکترپیلوری، 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.[۱۰و۱۸و۱۹]

با استفاده از نوار E-test، (AB Biodisk, Solna, Swden) که اشباع از آنتی بیوتیک با شیب غلظت مشخص بود هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه هر بیمار از نظر حساسیت به کلاریترومایسین، مورد سنجش قرارگرفت. باکتری‌هایی که MIC، (Minimal Inhibitory Concentration) کلاریترومایسین برای آنها بیش از ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر بود به عنوان مقاوم و کم‌تر از این حد، به عنوان حساس در نظر گرفته شدند.[۲و۱۰و۱۴]

www.SID.ir

Archive of SID

* یافته‌ها :

از آنجا که سویه‌های مقاوم هلیکوباکترپیلوری (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) هلیکوباکترپیلوری نیز با دو پروب Hpy (سبز) و پروب ClaWT (فاقد رنگ فلوئورسنت) هیبرید شدند که در نتیجه فلوئورسنس سبز Hpy را آشکار نمودند. بنابراین درعفونت‌های مخلوط، سویه‌های مقاوم و حساس به کلاریترومایسین به خوبی از یکدیگر قابل تشخیص بودند. کمپیلوباکترژژونی (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 هلیکوباکترپیلوری بودند. در این ۲۵ نمونه، ۱۷ مورد سویه حساس، ۶ مورد سویه مقاوم و ۲ نمونه مخلوطی از عفونت‌های هلیکوباکترپیلوری 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 هلیکوباکترپیلوری 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 هلیکوباکترپیلوری به کلاریترومایسین با دو روش FISH و آزمون E

نوع آزمون	تعداد کل سویه‌ها	تعداد نمونه‌های دارای سویه		
		حساس	مقاوم	حساس‌ومقاوم*
FISH	۲۵	۱۷ (۶۸٪)	۶ (۲۴٪)	۲ (۸٪)
E	۲۴	۱۷ (۷۱٪)	۵ (۲۱٪)	۲ (۸٪)

*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 (۱۷سویه)، 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 هلیکوباکترپیلوری به‌طور متوسط ۵ روز وقت لازم است و انجام آزمون E نیز به ۲ روز زمان نیاز دارد، بنابرین با روش FISH حدوداً یک هفته زودتر می‌توان وضعیت مقاومت یا حساسیت باکتری را در مقابل کلاریترومایسین تعیین نمود.

نکته دیگر این‌که 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.[۶] بروز چنین اختلالی موجب کاهش رشد سویه‌های جهش یافته (مقاوم) در مقابل سویه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

وحشی (حساس) می‌شود و در نتیجه هنگام کشت و جداسازی هلیکوباکترپیلوری از نمونه‌های بافتی بیماران، نسبت میکروارگانیسم‌های حساس به مقاوم در عفونت‌های مخلوط افزایش می‌یابد. راسمن و همکاران نشان دادند که تعداد باکتری‌های حساس به مقاوم ممکن است ۲۰۰ به ۱ باشد و اغلب نیز کلنی‌های مربوط به سویه‌های مقاوم کوچک‌تر از سویه‌های حساس هستند که در این قبیل موارد هم دستیابی به این کلنی‌ها آسان نیست.[۱۰] بنابراین در آزمون E، ممکن است فقط سویه‌های هلیکوباکترپیلوری حساس به کلاریترومایسین شناسایی و به پزشک گزارش شوند که این امر از نظر درمانی بسیار حائز اهمیت است، زیرا با تجویز دارو، فقط سویه‌های حساس از بین رفته و سویه‌های مقاوم باقی می‌مانند و در نتیجه درمان بیماران منتهی به شکست خواهد شد.[۱۰] این محدودیت درFISH وجود ندارد، زیرا سویه‌های حساس و مقاوم (حتی به تعداد اندک) به‌طور هم‌زمان قابل مشاهده و تشخیص هستند.

میزان مقاومت هلیکوباکترپیلوری نسبت به کلاریترومایسین، ۱۵ درصد گزارش شده است بنابراین ۸۵ درصد سویه‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک حساس هستند.[۱۰و۲] نتایج به‌دست آمده در این تحقیق که از یک طرف نشان دهنده مقاومت ۲۴ درصد سویه‌ها و از طرفی بیان‌گر حساسیت ۶۸ درصد آنها نسبت به کلاریترومایسین است با گزارش‌های فوق هماهنگی نسبی نشان می‌دهد. بنابراین با استفاده از روش FISH در اکثر موارد می‌توان 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 بیش‌تری برخوردار است، زیرا در ایران کشت، جداسازی و آنتی‌بیوگرام هلیکوباکترپیلوری به‌طور معمول انجام نمی‌شود و چون کلاریترومایسین نیز داروی گران قیمتی است، بنا براین به‌عنوان داروی خط دوم درمان تجویز می‌شود.

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

* سپاسگزاری :

بدین وسیله از همکاری و حمایت مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در اجرای این طرح صمیمانه قدردانی می‌شود.

* 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 etal. Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining

www.SID.ir

Archive of SID

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 Flu orescent In Situ Hybridization. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4142- 4

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

16. Heatly RV, Wyatt JI. 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, Sahm 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, Aeromonase, 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 etal. 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 etal. 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

www.SID.ir