Comparative studay for diagnostic *Helicopacter pylori* isolation from the stool by using PCR techneque reaction and stool antigen test

دراسة مقارنة لتشخيص بكتريا*Helicobacter pylori* المعزولة من الغائط بأستخدام تقنية تفاعل PCR وفحص مستضدات *Helicobacter pylori* .

ابرار علي حسين أ.م . د هيام عبد الرضا كريم العواد
أ.م. د ياسمين خضير الغانمي
جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة- قسم علوم الحياة
بحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

المستخلص:

الدراسة الحالية تهدف الى عزل وتشخيص بكتريا الملوية البوابية *Helicobacter* pylori من الخزع النسيجية وعينات البراز وقد استخدم اختباري فحص اليوريز السريع وتقنية الزرع في تشخيص بكتريا *H.pylori* وكذلك استخدام اختباري فحص اضداد البراز وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل في تشخيص بكتريا *H.pylori* من عينات البراز,وقد جمعت61عينة من الخزعات النسيجية من المرضى في وحدة الناظورلفحص اليوريز السريع والزرع وجمعت 114عينة من عينات البراز من المرضى المراجعين لمستشفى الأمام الحسين (ع) في محافظة كربلاء للفترة من (كانون الثاني 2014الى كانون الثاني 2015).وقد تم المقارنة بالاصابة من حيث دقة الاختبار باستخدام اختبار اليوريز السريع والزرع للخزعة النسيجية وفحص مستضدات البراز وتفاعل البلمرة المتسلسل لعينات الخروج.اوضحت النتئج ات اختبار اليوريز السريع واختبار مستضدات البراز هو الاسرع والاكفأ في كشف الأصابة ببكتريا *H.ylori* ثم ياتي بعدهما تقنية زرع الخزعة النسيجية ومن ثم تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لعينات البراز.

Abstract:

The current study is aimed to isolation and diagnosis bacteria *Helicobacter pylori* from biopsies and stool samples. Rapid urease test(R.U.T) and biopsy culture ,stool antig test(StAg) and poly chain reaction(PCR) used for this study .Biopsy sample were taken from 61 patients of endoscop unit for (R.U.T) and culture.Stool sample were collected From 114 patients at parasite library within Al-hussein hospital during one year started in January 2014. The studies refers for compare infection according acuracy of test a for stool sample and biopsies According to this study the (R.U.T) and StAg is more efficient according to time ,facility and sensitivity compared with culture and PCR .

Introduction المقدمة

Helicobacter pylori هي بكتريا مرضية توجد في المعدة ولهذه البكتريا دور خطير وبليغ في ظهور امراض التهاب المعدة gastritis وقرحة المعدة peptic ulcer disease وتلف الانسجة اللمفاوية المرتبطة بمخاطية المعدة MALTC Mucos – associated lymphoid tissue (1). ان الاصابة المزمنة chronic infection ببكتريا *H.pylori* تعد من الامراض المستوطنة endemic ،نصف سكان الكرة الارضية تقريباً مصابون بهذه البكتريا وخصوصاً الذين يعيشون في البلدان النامية developing countries ،يرتبط انتشار بكتريا *H.pylori* بشكل كبير بالحالة الاقتصادية والاجتماعية socioeconomic status ان التطور الاقتصادي يحد من انتشار البكتريا (2).تحدث الاصابة المزمنة في المعي antrum في حالة وجود بكتريا *H.pylori* والتي تؤدي الى منع افراز هرمون somatostatin من الجزء الامامي التي تفرز من قبل خلايا delta cell وبالنتيجة يؤدي الى انتاج مفرط من gastrin ، ان زيادة مستوى gastrin يؤدي الى رفع مستوى افراز الحامضية في المعدة مما يعرض بالشخص المصاب ببكتريا *H.pylori* الى خطورة الاصابة بقرحة الاثني عشري والمعدة peptic and duodenal ulcer،صنفت بكتريا *H.pylori* من قبل منظمة الصحة العالمية بالمرتبة الاولى لحدوث الاورام السرطانية carcinogen (3).

لوحظ ان 75% من سرطان المعدة الذي يحدث في العالم هو سببه بكتريا *H.pylori* (4).تسبب هذه البكتريا سرطان الغدد المعدية – المعوية intestinal – type gastric adenocarcinomas من خلال الضمور atrophy والتلف النسيجي meta plasia والنمو الشاذ dysplasia والورم السرطاني carcinoma وهذه سلسلة تطور المرض (5). ولتشخيص بكتريا *H.pylori* يكون اما بتقنيات غازية (بأستخدام الناظور لاستئصال الخزعة النسيجية واخضاعها للفحص النسيجي او زراعتها culture او اجراء اختبار اليوريز السريع rapid urease test (6).او يكون تشخيص البكتريا بتقنيات غير غازية وهي الاختبار المصلي serological ، اختبار التنفس السريع (urea breath test) (7) . والذي يكون حساس وذات خصوصية في الفحص (8) . وتقنية انزيم البلمرة المسلسل(polymerase chain reaction(PCR ، والتي تستخدم على نحو واسع في تشخيص بكتريا *H.pylori* بأخذ عينة من الخزعة النسيجية للمعدة او اللعاب او الخروج (7) .ان تقنية PCR تعطي معلومات عن وجود عوامل فوعة فعالة في السلالة البكتيرية من خلال مضاعفته للجينات المرضية قيد الدراسة (9).وبسبب انتشار الاصابة ببكتريا الملوية البوابية *H.pylori* جاءت هذه الدراسة والتي تهدف الى ايجاد طريقة تشخيصية سريعة للكشف عن هذه البكتريا وعزلها وبالطرق التالية :

1-اجراء اختبار اليوريز السريع للخزعة النسيجية في المعدة.
2-زراعة الخزعة النسيجية في المعدة.
3-القيام بالكشف عن المستضدات في الغائط .
4-استخدام تقنية PCR للكشف عن وجود الجينات المرضية في عينات الغائط المأخوذة من المصابين ببكتريا الملوية البوابية .

المواد وطرائق العمل material and methods

تم جمع 60 خزعة من وحدة الناظور في مستشفى الامام الحسين (ع) للمرضى الذين يعانون من اعراض سوء الهضم او الم في البطن ومن ثم تم تثبيت البيانات للمرضى المشمولين بالدراسة فيما يخص اعمارهم واجناسهم والاعراض التي يعانون منها وتشخيص الاصابة وتراوحت الفئات العمرية للمرضى ما بين (18 – 72)سنة وشملت الدراسة كلا الجنسين ، اذ تم اخذ عينتين من الخزعات النسيجية لكل مريض من قبل الطبيب المختص بأستخدام الملقط وكان حجم كل عينة ما يقارب 2 ملم فخضعت العينة الاولى للنسيج المفحوص بأستخدام تقنية اليوريز السريع Rapid urease test والخزعة الثانية حفظت في وسط Thioglycolate ومن ثم نقلت للمختبر لزراعتها .

تم جمع 114 عينة من البراز للأشخاص المشتبه بأصابتهم ببكتريا الملوية البوابية من مختبر الطفيليات في مستشفى الامام الحسين (ع) وتم جمع البيانات للمرضى فيما يخص اعمارهم واجناسهم وكانت تتراوح اعمارعم بين (10 – 75) من كلا الجنسين حيث خضعت عينة البراز الى الفحص بأستخدام تقنية مستضدات البراز stool antigen والفحص بتقنية ال stool PCR حيث وضعت العينات في انابيب جمع ومن ثم اجري عليها كلا الفحصين لعينة البراز العائدة لنفس المريض .

تم اخذ عينة خزعة نسيجية من غار المعدة Antrum من قبل الطبيب الجراح في صالة العمليات و وضعت على سطح شريط الفحص وبعد خمس دقائق تقرأ النتيجة من خلال التغير اللوني الحاصل .

- وضعت الخزعة النسيجية المأخوذة من غار المعدة للمريض في وسط Thioglycolate brothe حيث حفظت العينات فيه لمدة ثلاث ساعات لحين وصولها الى المختبر .
- وضعت العينات على شريحة زجاجية ومن ثم سحقت برفق crushing gently بواسطة هاون معقم .
- اخذ جزء من النسيج المسحوق بواسطة عروة ناقلة loop وزرعت في وسط الدم blood agar المحضر مسبقاً ومن ثم وضعت الاطباق المرزوعة في وعاء Jar ووضع فيه شمعة وكميات متساوية من بيكاربونات الصوديوم وحامض ctric acid في كيس اضيف اليه كمية قليلة من الماء لتوليد غاز ثنائي اوكسيد الكاربون ومن ثم غلق الجار Jar ووضع في الحاضنة بدرجة 37 مْ ولمدة (5– 7) أيام .
- شخصت البكتريا على اساس وجود مستعمرات صغيرة واعتماداً على صبغة غرام والاختبارات البايوكيميائية (10) .

- اختبار الاوكسديز Oxidase test
- اختبار الكاتليز catalase test
- اختبار اليوريز Urease test
- بعد وضع عينة البراز stool sample في انبوبة جمع تم نقل ما يقارب 250 ملغم من العينة بواسطة عود خشبي الى انبوبة جمع تحتوي على معلق متعادل ثلاثي يتكون من 0.05m من محلول (1) الفوسفات الملحي (2) محلول الفوسفات الملحي الذي يحوي على 0.1% Tritone X – 100 و(3) glyein buffer 1.5 m .
- رجت الانبوبة كي يمتزج السائل بالعينة .
- رفع الغطاء الخارجي لشريط الفحص قبل الاستخدام مباشرة .
- وضعت 4 قطرات من العينة المخففة على شريط الفحص في المنطقة الدائرية من الشريط حتى نرى السائل يتحرك خلال منطقة التفاعل .

- قرأت النتيجة بعد 10 دقائق حيث لوحظ التغير اللوني .

تم استخلاص DNA من بكتريا *H.Pylori* بأستخدام عدة الفحص Stool DNA Extraction kit المجهزة من قبل شركة Bionner .

* اختبار البادئات primersوكما موضح في الجدول رقم (3-4) لغرض اجراء الكشف الجزيئي

جدول (3 – 4) لتسلسل البرايمرات المستخدمة في انجاز البحث العلمي والمجهز من قبل شركة Bionner (14) .

الجين	التسلسل
Cag A	F – 5 – ATAATGCTAAATTAGACAACTTGAGCGA – 3 R-5-AGAAACAAAGCAATACGATGATTC-3
glm M	F : 5 – GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGG – 3 R – 5 – GCTTACTTTCTAACACTAACGCGCGC-3

تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل Polymares chain reaction

- تم تحضير محاليل stok solution ومحلول العمل working solution حسب تعليمات شركة Bionner للبادئين cag A وglmM .
- اضيف 7 مايكروميتر من DNA العينة الى Primex والذي يحوي 25 مايكروليتر مزيج التفاعل PCR
- اضيف 12 مايكروليتر ماء مقطر .
- اضيف 3 مايكروميتر لكل من F-primer و R-primer من محلول العمل .

جدول (3-5)يوضح البرنامج الذي استخدم للكشف عن الجين cagA (14).

Steps	temprature	Time	No. Of cycle
Initial denaturation	94C°	5min	
denaturation	94C°	1min	40
Annealing	First 54C° Last 72C°	1min 1min	
Extension	72C°	5min	

جدول(3-6)يوضح البرنامج الذي استخدم للكشف عن الجين glmM

Steps	Temprature	Time	No.of cycle
Initial denaturation	94C°	5min	
Denaturation	94C°	1min	35
Annealing	56C°	1min	
Extension	72C°	2min	
Final extension	72C°	7min	1

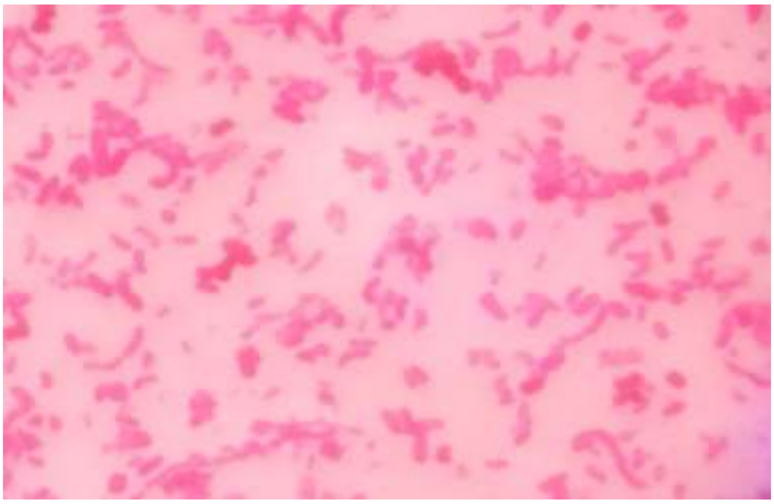
لغرض تحليل النتائج احصائياً،تم استخدام اختبار Chi-square على مستوى معنوية p=0.05 لتحديد الفروقات الاحصائية والمعنوية للنتائج .

النتائج والمناقشة Result and discusion

وهو فحص اليوريز السريع Rapid urease test ويسبب تغير لوني بالتدريج لمؤشرPH في عينة الخزعة النسيجية biopsy وتعد النتيجة موجبة بحصول التغير اللوني دلالة على انتاج اليوريا.

الشكل (4-1)يوضح العدة التشخيصية لبكتريا *h.pylori* باستخدام الخزعة النسيجية

أظهرت نتائج الاختبارين(فحص اليوريز وتقنية الزرع) والتي اجريت على 61 عينة أن هناك 60 (98.4) حالة اصابة في فحص اليوريز السريع و 23(37.7)% حالة اصابة في استخدام طريقة الزرع للعينة وقد ظهر أن هناك 23 حالة اصابة مشتركة بين فحص اليوريز السريع وتقنية الزرع وكانت النسبة الاحصائية هي (38.3%) وهناك حالة واحدة من عدم الاصابة مشتركة بين الاختبارين وقد ظهر أن هناك 37 حالة اصابة (16.7%) في فحص اليوريز السريع ولم تظهرفي تقنية الزرع . ولم يظهر بين الاختبارين فروقات معنوية من حيث النسب الاحصائية 0.05> 0.4.



الشكل (4-3) يوضح شكل بكتريا *H.pylori* الماخوذة من الخزعة النسيجية بعد عملية زرعها

جدول (4-1) نسب تشخيص بكتريا *H.pylori* باستخدام فحص اليوريز السريع وتقنية الزرع لعينات الخزعات النسيجية.

	فحص اليوريز السريع	
تقنية الزرع	وجود اصابة	عدم وجود اصابة
وجود إصابة	23(38.3%)	0(0.0%)
عدم وجود إصابة	37(61.7%)	1(100%)

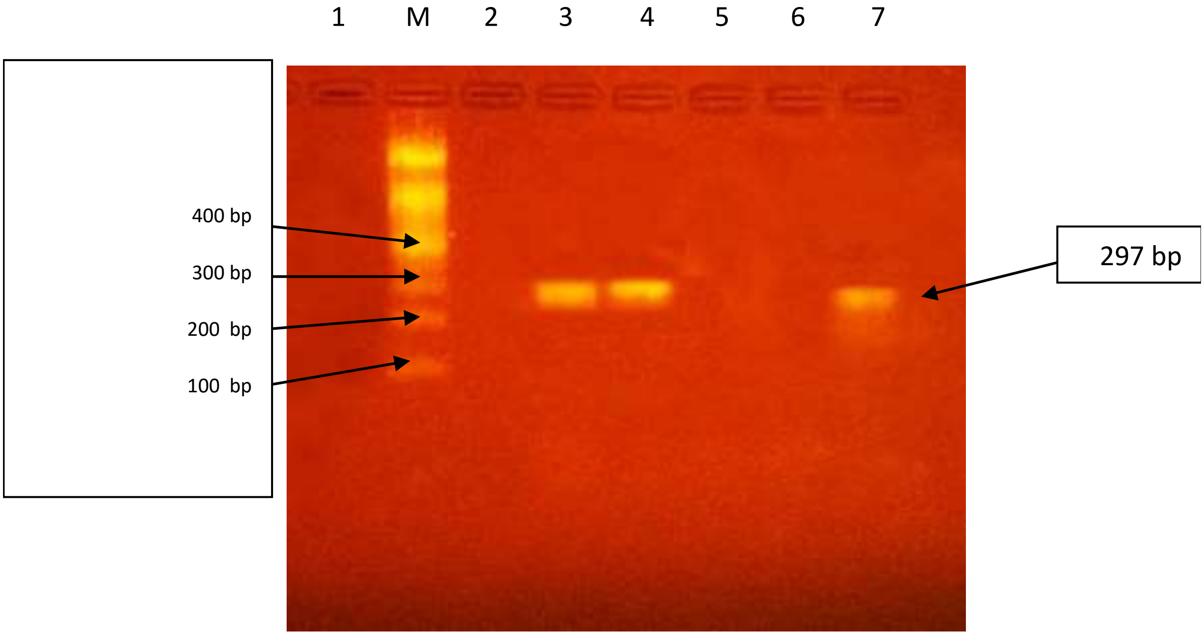
يعتبر فحص اليوريز السريع من الطرق الشائعة المستخدمة في تشخيص بكتيريا *H.pylori* الموجود في الخزعات النسيجية ويمتاز بكونه ذات خصوصية وحساسية عالية إضافة إلى توفره ورخص ثمنه (15). لقد كانت نتيجة الفحص اليوريز هو ظهور 60 حالة اصابة 98.4% من أصل 61 عينة ويمتاز هذا الفحص بفائدته لكونه من طرق التشخيص السريعة للإصابة ببكتريا *H.pylori* ونتيجة فحص اختبار اليوريز تأثره بأعداد البكتيريا الموجودة في الخزعة النسيجية وهذه الدراسة تتوافق مع (16) في هذه الدراسة وصلت حساسية اختبار اليوريز السريع إلى 100% وخصوصيته إلى 97% وهي مقاربة للنسب التي توصل إليها (17). يعتقد (18) بعدم حصول أي نتيجة موجبة تحدث باستخدام هذا الاختبار على عكس الدراسات الأخرى.

وتوصل (19) بالحصول على نتيجة خاطئة سالبة عند حدوث نزف في المعدة أو أخذ مضادات حيوية أو مضاد افراز المعدة . تعد عملية عزل بكتيريا *H.pylori* من الخزعات النسيجية هي عملية صعبة بسبب صعوبة زراعة هذه البكتيريا حيث ظهرت 23 حالة (38.3%) إصابة عند إجراء اختبار الزراعة وهذه النسبة قريبة من الدراسة التي قام بها (20)حيث كانت نسبة زرع البكتيريا الموجب (31.9%), إن من أسباب صعوبة زراعة هذه البكتيريا هو التوزيع غير المنظم لهذه الأحياء المجهرية في الطبقة المخاطية للمعدة وتلوث الملقط الذي يستخدم في حمل الخزعة النسيجية وفقدان حيوية بكتريا *H.pylori* أثناء نقلها كل تلك العوامل قد تكون هي المسؤولة في إظهار نتائج سالبة عند زراعة هذه البكتيريا (21).وقد يحصل تلوث من قبل بكتريا أخرى في الوسط الزرعي مثل بكتريا *Pseudomonas SPP* و *Klebsiella SPP* والتلوث قد يحدث أثناء تحضير الوسط الزرعي وإضافة دم الخراف إلى الوسط . حساسية فحص اليوريا ودقته وصلت إلى 100% و 97% على التوالي وهي مقاربة إلى ما توصل إليه (22) بأن حساسية فحص اليوريز ودقته تصل إلى (97.4%) و (96.1%) على التوالي لذلك يوصي هذا الباحث باستخدام اختبار الزرع وفحص اليوريز السريع للتأكيد في تشخيص بكتيريا *H.pylori* واتضح أن فحص اليوريز السريع هو اختبار جيد وفعال . إن اختبار الزرع يعتبر ذو دقة عالية ولكنه قد يكون قليل الحساسية بسبب عدم كفاية العينة المنقولة إلى الوسط الزرعي ، يحتاج اختبار الزرع عادة إلى فريق متخصص وخبراء في هذا المجال ، وتعد مكلفة ومواردها غير متوفرة غالباً (15). لقد وصلت حساسية ودقة اختبار الزرع إلى 95% و 100% على التوالي وقد اختلفت مع دراسة (9) من حيث حساسية الاختبار ولكن اتفقت مع دقة الاختبار حيث كانت (47.3%)و(100%)على التوالي .

يستخدم لتشخيص البكتيريا في عينات البراز Feces Sample, وينتج عنه تغير لوني في منطقة حزمة السيطرة والتي تعطي اللون الأخضر دائماً ففي حالة عدم وجود الإصابة بالبكتريا يظهر اللون الأخضر فقط عند الحرف Control line C أما في حالة وجود إصابة بالإضافة إلى وجود حزمة السيطرة للون الأخضر سوف تظهر حزمة حمراء عند الحرف T result) . line)

الشكل (4-2)يوضح الشكل العدة التشخيصية لبكتريا *H.pylori* لعينات البراز

أظهرت نتائج الاختبارين والتي اجريت على 114 عينة أن هنالك7 حالات(33.3%) اصابة في فحص مستضدات البراز و 4 (43%)حالة اصابة في اختبار Stool PCR للجين CagA ولم تظهر أي نتيجة للجين glmM وقد ظهر أن هناك 25(32.8)% حالة اصابة مشتركة لكلا الاختبارين معاً ولم تظهر في 14 36.8% عينة حالة اصابة في كلا الاختبارين بينما ظهر 51 (67.1%) حالة إصابة في فحص مستضدات البراز ولم تظهر في تقنية PCR وبالمقابل ظهرت 24 (63.2%) حالة اصابة في تقنية PCR لجين CagA ولم يظهرفي فحص مستضدات البراز. عند مقارنة كلا الفحصين من حيث النسب الاحصائية ظهرت فروقات معنوية بين الفحصين في اختبار عينات البراز 0.05>0.002.



شكل (4-3) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل انزيم اللمرة المتسلسل لجين CagA

الجدول (4-2) مقارنة نتائج اختباري فحص مستضدات البراز وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدمة لتشخيص بكتيريا *H.pylori* من عينات البراز:

	فحص اضداد البراز	
اختبار Pcr للجين Cag A	وجود إصابة	عدم وجود إصابة
وجود إصابة	25(32.8%)	24(63.2%)
عدم وجود إصابة	51(67.1%)	14(36.8%)

من خلال النتائج التي توصل إليها يعتبر اختبار مستضدات البراز من الاختبارات ذات الخصوصية والحساسية العالية في تشخيص بكتيريا *H.pylori* إضافة إلى أنه سهل الاستعمال ويعطي نتيجة سريعة خلال 5-10 دقائق وذا تكلفة منخفضة وقد اتفقت الدراسة الحالية مع الدراسة(23)و(24) بأن هذا الاختبار يكون ذو تكلفة منخفضة بالمقارنة مع اختبار Stool PCR وقد بينت الدراسة (25) بأن اختبار أضداد البراز هو من الطرق المناسبة غير الغازية noninvasive لتشخيص الاصابة ببكتريا *H.pylori*.بينت الدراسة (26)بأن اختبار مستضدات البراز يتمكن من تشخيص البكتيريا *H.pylori* بصورة مباشرة باستخدام الاضداد ضد المستضدات البكتيرية الموجودة في البراز والذي يعمل على تحفيزها . النتائج التي ظهرت باستخدام تقنية Stool PCR لتشخيص الجين CagA لبكتيريا *H.pylori* هو 49 حالة (43%) اصابة وقد توافقت نتائج الدراسة الدراسة مع الدراسة الحالية (27)حيث بين أن نسبة ظهور جين CagA في عينات البراز لبكتريا *H.pylori* قليل نسبياً مقارنة بالدراسات الأخرى حيث وصل نسبة ظهورها بمقدار يتراوح بين (53.8%) و(70.8%)وقد أشار الباحث (28) ان انخفاض نسبة اكتشاف DNA البكتيري بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل من المحتمل أن يعود إلى أختلاف مستضدات DNA البكتيري التي تستخدم في الكشف عنها ووجود مواد مثبطة للـ PCRعند استخلاص DNA من العينة .

إن ظهور الجينCagA لبكتيريا *H.pylori* في فحص PCR يعود إلى ارتباطه بخطورة المرض وهو المسؤول عن تطوره إلى سرطان المعدة في جسم الانسان .لتعيين الطراز الوراثي لبكتيريا *H.pylori* يفضل أن يتم عن طريق اختبارPCR من خلال عامل الفوعة (Cag A) (29) .

لقد كانت نسبة الاصابة ببكتريا *H.pylori* في فحص مستضدات البراز (66.7%) وهي متوافقة مع ما توصل إليه الباحث (30)وقد وجد باحث أخر (31) ان نسبة الاصابة هو (70%)

Refrences

1- Suerbaum ,S.and Michetti ,P.(2003). *Helicobactor py*;ori infection . N. Engl. J. Med., 347(15) : 1175-1186 .

2- De Martel, C.;forman, D.and plummer ,M.(2013). Gastric cancer : epidemiology and risk factors . Gastroenterol Clin North Am.,42 (2): 219-240 .

3- IARC(International Agency for Research on Cancer).(2012). working group on the Evaluation of carcinogenic risks to Humans Biological agents . vol .100 B.A review of human carcinogens . IARC monoger eval carcinog risks hum , 100 :1-441 .

4- De Martel ,C.;Ferlay, J.; Franceschi, S., S.;Vignat,;J.Bray,F.;Forman,D.and Plummer,M.(2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008 : a review and synthetic analysis . lancet Oncol .13 (6) : 607-615

5- Peek, R.M.; Fiska,J.R.; Wilson, K.T.(2010). Role of innate immunity in *Helicobactor pylori*-induced gastric malignancy . physiol Rev .,90(3):831-858

6- Vakil and Vaire,D.(2004).Non-invasive tesrs forb the diagnosis of *Heicobacter pylori* infection .rev Gastroenterol.Disord.,4:1-6.

7- Zsikla,V.;Hailemariam,S.and Baumann,M.(2006).Increased rate of *Helicobacter pylori* infection detected by PCR in biopsies with chronic gastritis. *Am. J. Surg. Pathol*., 30:242– 8.

8- Krogfelt, K.A.; Lehours, P.and Meggaurd, F.(2005). Diagnosis of *Helicobactor pylori* infection *Helicobactor* , 1:5-13 .

9- Ricci, C.; Holton ,J. and Varia,D.(2007). Diagnosis of *Helicobactor pylori* : invasive and non-invasive tests. Best pract . Res. Clin. Gastroenterol., 21 : 299-313 .

10- Collee,J.; Fraser, A.; Marmion, B, and Simon.;A.(1996). practical.Medical microbiology.14th ed. Churchill. Liver stone .New York .978PP.

11-Smith,S.l.;Fowora,M.A.;Lesi,O.A.;Agbebaku,E.;Odeigah,P.; Abdulkareem,F.B;Onykwere,C.A.;Agoma.C.A.andConteras,M.(2012). Application of stool-PCR FOR *Helicobacter pylori* from stool in Nigeria-apilo.1:78.

12- Khalifehgholi,M.; Shmsipour ,F.Ajhdarkosh,H.;Ebrahimi,D.N;Pourmand, M.R.;Hosseini,M.;Ghasemi,A. And Shirazi,M.(2013).comparison of five Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* .Iran.J.Microbiol.,5(4):396 -410.

13-Megraud,F.andlehours,P.(2007).*Helicobactor pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing clin microbial rev.,20:280-322.

14- Choi,J.;Kim,C.H.;Kim,D.;Chung,S.J.;Song, J.H.;Kang,J.Yang,J.I.;Kim, Y.S.;Yim,J.Y.;Lim,S.H.;Kim,J.S.;Jung,H.C.and Song,I.S.(20011). Prospective evaluation of a new stool antigen for the detection of *Helicobacter pylori* ,in coparison with histologymrapid urease test ,(13) C-urea breath test ,and sereology .J.Gastroenterol.Hepatol.,26:1053-1059.

15-Mendoza-Ibarra,S.i.;Perez-Perez,G.I.;Bosques-padilla,F.J.;Urquidi-Rivera,M.;Rodriguez-Esquivel,Z.andGarza-Gonzalez,E.(2007).Utilityof diagnostic tests for detection of *Helicobactor pylori* in children in northeastern Mexico.Pediatr Int.49: 869-874.

16-Kagar,M.M.;Bagdernejad,A.Doosti andDaliani,S.G.(2011). clarithromycin resistance and 23S r RNA mutation in *Helicobactor pylori* isolates in Iran . Afr. Microbiol .Res.,5:853-850 .

17-Meunier,O.;Walter,P.;Chamouard,P.;Piemont,Y.andMonteil,H.(1997). Isolation of *Helicobacter pylori* :Necessity of control of transport condition. Pathologie-Biologie.45:82-85.

18-Van keeken,N.;Van hattum,E.and De bore,W.(2006).Validation of a new , commercially availabledry rapid urease test for the diagnosis of *Helicobactor pylori* infection in gastric biopsies .Neth.J.Med.64(9):329-33 .

19-Shimoyama,T.(2013).Stool antigen testsfor the management of *Helicobacter pylori* Infection.world J.Gastroentrol.,19:8188-8191.

20- Korkmaz,H.; kesli, R.;Karabagli, P.and Terzi ,Y.(2013).comparasion of the diagnostic accuracy of five different stool antigen tests for the diagnosis of *Helicobactor pylori* infection *Helicobactor*,18,384-91.

21-Cardenas,V.M.;Dominguez,D.C.;Puentes,F.A.;Aragaki,C.C.;Goodman, K.J.;Graham,D.Y.and Fukuda, Y.(2008). Evalution of anovel stool native antigen test for *Helicobacter pylri* infection in asymptomatic North American children.*J Pediatr gastroenterol*. Nutr.,46:399-402.

22-MaKay,W.G.;Willimas,C.L.;Mcmillan,M.;Ndip,R.N.;Shepherd ,A.J. and Weaver, L.T. (2003). Evaluation of protocol using gene capture and PCR for detection of *Helicobacter pylori* DNA infection .J.Clin.Microbial.,41:4589-4593.

23-Kabir,S.(2004).Detection of *Helicobactor pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction : a review.*Helicobactor.* 9:115 – 123 .

24-Yamazaki,S.;Kato,S.;Matsuku,N.;Ohtani,M.;Ito,Y.;Suto,H.;Yamazaki,Y.; Yamakawa,A.;Tokudome,S.;Higashi,H.;Hatakeyama,M.andAzuma,T .(2005) Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensetive real-time PCR as anew diagnostic tool.FEMS Immunol Med Mic 44:261-268.

25-Ibrahim,N.H.;Gomaa,A.;Abu-Sief,M.A.;Hifnawy,T.M.andTohamy,T.M. (2012).The use of different laboratory methods in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection; a comparative study. *Life Science Journal*,9*(4)*.

26- Refaay,H.A.; Nouh,H.H.;Abdel-salam,S.M.and Samy,H.A .(2006). Evaluation of Different Methods for Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Dyspeptic Patients. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 15(4): 751-762.

27-Shmuely,H.;Obure,S.;Passaro,D.J.etal.(2003).Dyspepsia symptoms and *Helicobactor pylori* infection , Nakuru , Kenya . Emerging infection disease, 9 (19): 1103-1107 .

28-Broutet,N.;Sarasqueta,A.M;Sakarovitch,C.; cantet,F. and lethuaire,D.and Méqraud,F.(2001).*Helicobactor pylori* infection inpatients consulting gastroenterologisis in france:prevalence is linked to gender and region of residence.Eur.J.Gastroenterol Hepatol.,13:677-684.

29-Blanchard ,S.S. and Czinn , S.J. (2007) . peptic ulcer disease in children . In Kliegman , R.M : Behrnan R. E : Jenseon H.B. and Stanton B.F. Nelson text book of pediatrics : 18 th ed , ch 332 :1527-1537 .

30-Malaty,H.M.;El-Kasabany,A.;Graham,D.Y.;Miller,C.C.;Reddy,S.G.; Srinivasan, S.R.;Yamaoka ,Y .and Berenson, G.S. (2002) .Age at acquisition of *Helicobactor pylori* infection : a follow-up study from infancy to adulthood. Lancet,359: 931-935 .

31- Refaay, H.A., Hanan, H., Nouh ,*et al*.(2006) Evaluation of Different Methods for Detection Of *Helicobacter pylori infection in dyspeptic patient .Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 15(4): 751-762.