جداسازی و بررسی مقاومت دارویی باکتری *Helicobacter pylori*

معصومه انوری[۱]

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۲۳
تاریخ تصویب: ۸۷/۱۲/۲۱

چکیده

برای تعیین مقاومت دارویی هلیکوباکتر پیلوری[۲]، ۱۰۰ نمونهٔ اندوسکوپی از یک کلینیک خصوصی گاستروسکوپی در شهر رشت تهیه و نمونه‌ها از نظر واکنش گرم، کشت و تعیین حساسیت دارویی، آزمایش سریع اوره آز و هیستولوژی بررسی شد. تعیین حساسیت دارویی با اندازه‌گیری MIC آنتی‌بیوتیک‌های مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین انجام شد.

۴۰ درصد افراد موضوع مطالعه به عفونت هلیکوباکتر پیلوری مبتلا بودند که ۶۰ درصد آن‌ها مرد بودند. تمام سوش‌ها به ۴ آنتی‌بیوتیک استفاده‌شده حساسیت نشان دادند. تشخیص و تعیین حساسیت هلیکوباکتر پیلوری ما را در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری کمک می‌کند. آگاهی از الگوهای حساسیت دارویی باکتری، سبب احتیاط بیشتر پزشکان در انتخاب داروهای خط اول درمانی خواهد شد. اطلاع از تعیین حساسیت آنتی بیوتیک‌ها، در درمان آنتی‌بیوتیکی و مدیریت کنترل عفونت مجدد نقش مهمی خواهد داشت.

واژه های کلیدی: *هلیکوباکتر پیلوری، مقاومت دارویی*

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکدهٔ علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، رشت، صندوق پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵

anvari@yahoo.com

2 . Helicobacter pylori

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری، باکتری گرم منفی است که در مخاط معده کلونیزه می‌شود. بیش از نیمی از جمعیت دنیا به این باکتری مبتلایند (Go, 2002; Poon, et al. 2002). از زمان نخستین جداسازی باکتری در سال ۱۹۸۲، همراه بودن عفونت هلیکوباکتر پیلوری و بروز گاستریت مزمن، بیماری زخم معده و کارسینومای گاستریک و نیز لنفوم MALT [1] موضوع توجه شد (Glupczynski, et al. 2001). از نظر اپیدمیولوژیک مخزن عفونت، معدهٔ انسان و راه انتقال آن، تماس میان‌فردی است (Go, 2002). شیوع عفونت بیشتر در کشورهای در حال توسعه مشاهده می شود و با شرایط اقتصادی، زمینه و سن بستگی مستقیم دارد (Moayyedi, et al. 2002; Adeyemi, et al. 1999).

متأسفانه در کشور ما آمار دقیقی از شاخص‌های اپیدمیولوژیکِ مرتبط با عفونت در دسترس نیست. استفاده از روش‌های رایج کشت، نتایج متفاوتی برای جداسازی باکتری داشته است. درصد موفقیتِ استفاده از این روش‌ها برحسب مهارت و دقت کارکنان آزمایشگاه بین ۳۰ تا ۷۳ گزارش شده است (Grove, et al. 1998; Bailey, et al. 1990). عدم امکان جداسازی ممکن است به خطاهایی، مثل خطا در نمونه‌گیری، انتقال غیرتخصصی نمونه‌ها به آزمایشگاه یا استفاده از محیط‌های کشت نامناسب برای جداسازی و سرانجام ناکافی‌بودن دورهٔ انکوباسیون مربوط باشد (Ozcay, et al. 2004). بیوپسی گاستریک و کشت روزمرّه ، هم‌زمان انجام نمی‌شوند و ترجیحاً از روش‌های سریع‌تر تشخیصی، مثل تست ابگوشت اوره آز، (UBT[2])، روش‌های سرولوژیک و تست تشخیصی آنتی‌ژن مدفوعی استفاده می‌شود؛ اما با توجه به افزایش شیوع سویه‌های مقاوم، به نظر می‌رسد که کشت نمونه‌ها و آزمایش تعیین حساسیت دارویی آن‌ها برای انتخاب درمان جایگزین همواره اهمیت خاصی دارد (Megraud, et al. 1999).

هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی استفاده از کشت در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری در میان بیماران مبتلا به سوءهاضمه است. تعیین حساسیت و اختصاصی‌بودن تکنیک‌های کشت باکتری برای اثبات عفونت و تعیین الگوی حساسیت دارویی سوش‌های بومی جداشده کشت نمونه‌های بیماران در منطقهٔ موضوع مطالعه هدف جزئی‌تر است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: تعداد ۱۰۰ نمونه از بیماران بزرگ‌سال (بالای ۱۸ سال) مبتلا به سوءهاضمه تهیه شد. برای این بیماران که به یک کلینیک خصوصی در شهر رشت مراجعه کرده بودند، اندوسکوپی ضروری تشخیص داده شد.

رنگ‌آمیزی گرم و کشت: از هر بیمار ۲ قطعه بافت گاستریک تهیه و در محیط انتقال استریل کاری بلر (sigma-Aldrich) تلقیح و سریع به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه منتقل شد؛ سپس

1. Mucus associated lymphoid tissue

2. Urea breath test

به محیط کشت BHIA [1] حاوی ۷ درصد خون اسب و BBA [2] حاوی مکمل skirrow (با ۵ درصد خون دفیبرینهٔ گوسفند و ۵ mg/l تری متوپریم، ۱۰ mg/l وانکومایسین و ۲۵۰۰ u/l پلی میگزین) تلقیح شد (Megraud, et al. 1999).

مواد از شرکت sigma-Aldrich تهیه شد. پلیت‌ها به‌مدت یک هفته در ۳۷ درجه در شرایط میکروآنروفیلیک (سیستم pack-microaero، کارخانه میتسوبیشی) انکوبه شد و هر روز، رشد آن‌ها بررسی شد (Tolia, et al. 2000). کلنی‌های باکتری کوچک، مسطح و شفاف تا کمی خاکستری بودند.

پس از روز پنجم کشت‌های منفی دوباره در محیط BHIA غنی‌شده (حاوی خون اسب) دوباره کشت شدند تا در صورتی‌که برخی از سوش‌های احتمالی کندرشد یا پرنیاز [3] بودند، امکان رشد آن‌ها فراهم شود. این پلیت‌ها دوباره به مدت ۵ روز در شرایط میکروائروفیل گرم‌خانه‌گذاری شدند و تا روز دهم (از آغاز اولین کشت) منفی گزارش نشدند. کلنی‌های حاصل از کشت‌ها برای اثبات وجود *H.pylori* از نظر تولید اوره آز، اکسیداز و کاتالاز آزمایش شدند. مشاهدهٔ باسیل‌های خمیدهٔ گرم منفی در آزمایش گرم تأییدی بر وجود باکتری بود (Kwon, et al. 2000).

آزمایش تعیین حساسیت دارویی: برای این کار از آزمایش ام.آی.سی استفاده شد؛ مقادیر MIC > ۸ g/ml برای مترونیدازول و بیش از ۱ g/ml برای کلاریترومایسین و بیش از ۰/۵ g/ml برای آموکسی‌سیلین و بیش از ۲ µg/ml برای تتراسیکلین، نشانهٔ مقاومت سوش‌ها به این آنتی‌بیوتیک‌ها تعریف شد. این مقادیر بر اساس Break points تدوین‌شده در دستورالعمل CLSI [4] انتخاب شد (Wayne, 2007). سوش استاندارد *H.pylori* ATCC 43504 نیز برای کنترل حساس به آنتی‌بیوتیک‌های بالا استفاده شد.

آزمایش سریع اوره آز: برای این کار به ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اورهٔ ۸ درصد (وزنی به حجمی) تهیه‌شده با آب مقطر، یک قطره محلول فنل قرمز یک‌درصد اضافه شد و محلول تا زمان استفاده، در ۴ درجه نگه‌داری شد. محلول‌ها به‌طور روزانه تهیه شد تا از ثبات آن‌ها اطمینان حاصل شود. نمونهٔ بیوپسی بیمار به لولهٔ اپندرف حاوی این محلول اضافه شد؛ در صورت تغییر رنگ سریع، محیط اطراف محل تلقیح و بعد، اندک‌اندک تمام محیط آزمایش مثبت تلقی شد. نمونه‌هایی که به مدت ۲ ساعت، همچنان بدون تغییر رنگ باقی ماندند، منفی تلقی شدند.

آزمایش هیستوپاتولوژیک: نمونه‌ها ابتدا تثبیت و سپس هر نمونه با ۳ رنگ گیمسا، هماتوکسیلین و ائوزین به‌طور جداگانه رنگ‌آمیزی شد. در صورت مشاهدهٔ باسیل‌های خمیده در میکروسکوپیک لام‌ها، نمونه، مثبت در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: از اندازه‌گیری میانگین و انحراف معیار داده‌ها استفاده شد. اندازه‌گیری صحت روش کشت به‌صورت حساسیت و اختصاصی‌بودن و

1. Brain Heart Infusion Agar
2. Brucella Blood Agar
3. fastidious
4. Clinical Laboratory Standards Institute

موارد مثبت و منفی با ۹۵ درصد اطمینان و ۵ درصد عدم قطعیت بیان شد (Fabre et al. 1994).

نتایج

از بین ۱۰۰ بیمار مبتلا به سوء هاضمه، ۴۰ نفر از نظر عفونت مثبت بودند که ۲۴ نفر مرد بودند و از میان آنان، ۸۰ درصد متأهل بودند. ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به عفونت (۳۸ نفر) به آب بهداشتی تصفیه‌شدهٔ شهری دسترسی داشتند.

تشخیص آزمایشگاهی هلیکوباکتر پیلوری: برای تمام بیماران مراجعه‌کننده ۳ آزمایش تشخیصی هیستوپاتولوژی، تست سریع اوره و کشت انجام شد.

از مجموع کل نمونه‌های کشت‌شده، ۱۴نمونه در محیط کشت اختصاصی باکتری رشد کردند. ۸ سوش از ۱۴ سوش جداسازی‌شده از نظر هر دو آزمایش پاتولوژی و تست سریع اوره آز مثبت بودند؛ درحالی‌که در مورد هر ۱۴ نمونه، تست اوره آز به تنهایی مثبت و در مورد ۵ نمونه نیز آزمایش پاتولوژی به تنهایی مثبت بود. برای تأیید نتایج کشت، این نتایج با موارد مربوط به عفونت هلیکوباکتر پیلوری مقایسه شد؛ به عبارت دیگر افرادی مبتلا به عفونت در نظر گرفته شدند که علامت درد شکمی داشتند و دست‌کم یکی از دو آزمایش تشخیصی اوره آز سریع و هیستوپاتولوژی آنان مثبت بوده باشد.

هر ۱۴ سوش جداشده در کشت‌های اولیه رشد کردند و متوسط زمان انکوباسیون آن‌ها در کشت اولیه ۱ ± ۴ روز بود. تمام سوش‌ها به آموکسی‌سیلین (MIC=0.016 µg/ml)، تتراسیکلین (MIC=0.164µg/ml ±0.16)، مترونیدازول (MIC=0.061µg/ml ±0.04) و کلاریترومایسین (MIC=0.16µg/ml) بسیار حساس بودند (شکل شمارهٔ ۱ و جدول شمارهٔ ۱).

شکل شمارهٔ ۱. میانگین درصد حساسیت سوش H14 به چهار آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین (Amx)، تتراسیکلین (Te)، مترونیدازول (M) و کلاریترومایسین (Kl)

جدول شمارهٔ ۱. حساسیت سوش‌های هلیکوباکتر پیلوری به آنتی‌بیوتیک‌های موضوع آزمایش

آنتی‌بیوتیک شمارهٔ سوش	آموکسی‌سیلین (RBP>0.5µg/ml)	تتراسیکلین (RBP>2µg/ml)	مترونیدازول (RBP>8µg/ml)	کلارتیرومایسین (RBP>1µg/ml)
۱	۰/۰۱۵	۰/۰۱۸	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷
۲	۰/۰۱۲	۰/۲۰۰	۰/۲۲۵	۰/۰۱۷
۳	۰/۰۱۴	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	۰/۰۱۷
۴	۰/۰۱۵	۰/۲۷۰	۰/۰۷۱	۰/۰۱۸
۵	۰/۰۱۵	۰/۴۱۰	۰/۰۷۱	۰/۰۱۹
۶	۰/۰۲۱	۰/۲۱۰	۰/۱۴۵	۰/۰۱۸
۷	۰/۰۱۱	۰/۰۲۲	۰/۰۷۱	۰/۲۱۰
۸	۰/۰۱۵	۰/۱۸۰	۰/۰۱۲	۰/۰۱۷
۹	۰/۰۱۳	۰/۰۲۵	۰/۰۵۳	۰/۰۱۸
۱۰	۰/۰۱۱	۰/۴۳۰	۰/۰۱۷	۰/۲۰۰
۱۱	۰/۰۲۲	۰/۵۲۰	۰/۰۱۷	۰/۲۱۰
۱۲	۰/۰۲۲	۰/۰۲۱	۰/۲۲۵	۰/۰۱۵
۱۳	۰/۰۱۸	۰/۰۲۱	۰/۰۷۱	۰/۰۱۵
۱۴	۰/۰۱۷	۰/۰۲۱	۰/۲۲۵	۰/۰۱۵
سوش استاندارد	۰/۰۱۳	۰/۰۱۴	۰/۰۱۲	۰/۰۱۳

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق حساسیت روش کشت ۴۵ درصد و اختصاصیت آن بین ۹۸ تا ۱۰۰ درصد تشخیص داده شد و بنابراین می‌توان آن را همچون ابزار تأییدی مفید در تشخیص قطعی عفونت به‌کار برد.

با توجه به حساسیت نسبتاً پایین کشت، امکان استفاده از آن برای آزمایش غربالگری وجود ندارد؛ اما آزمایش سریع اوره آز ابزاری بسیار حساس و مهم برای غربالگری افراد مظنون به عفونت هلیکوباکتر پیلوری است (Lage, et al. 1995; Weiss, et al. 1994). امروزه مقاومت دارویی علت اصلی شکست در درمان این عفونت است.

اکنون در اغلب کشورهای دنیا بیشترین میزان مقاومت دارویی در برابر دو داروی کلاریترومایسین و مترونیدازول مشاهده می شود (Kato, et al. 2002; Kuo, et al. 2002; Ilkezawa, et al. 1999; Montes, et al. 2003).

تنوع در حساسیت دارویی و الگوی مقاومت سوش‌های مختلف باکتری در یک منطقه جغرافیایی، به‌دلایل مختلفی بستگی دارد؛ مانند تفاوت در روند تجویز دارو، نوع و روش مصرف دارو در جمعیت و اعمال برنامه‌های ریشه‌کنی هلیکوباکتر پیلوری، استراتژی پیش‌گیری از سرطان معده (Kim, et al. 200; Meyer, et al. 2002; Miyaji, et al. 1997). الگوهای حساسیت دارویی در اروپا و امریکا نشان داده‌اند که بیشترین مقاومت به مترونیدازول از ۳۳/۱ تا ۳۶/۹ درصد از سوش‌های جداسازی‌شده و سپس به کلاریترومایسین، حدوداً در ۱۰ درصد از سوش‌های جداسازی شده اختصاص دارد. در آسیا میزان بالای مقاومت، ابتدا به کلاریترومایسین با ۲۹ درصد و سپس به مترونیدازول با ۲۴ درصد اختصاص دارد. کمترین میزان مقاومت در آمریکا، اروپا و آسیا به آموکسی‌سیلین با ۱/۴-۰ درصد تعلق دارد (Pilotto, et al. 2000; Wolle, et al. 2000).

در تحقیقی انجام‌شده در بیمارستان بقیه‌الله اعظم روی ۲۰۰ سوش جداشده از ۴۷۶ نمونه، میزان مقاومت به ترتیب زیر است: مترونیدازول ۵۴/۶٪ (۱۰۷ مورد)؛ آموکسی‌سیلین ۱۶/۴٪ (۳۲ مورد)؛ سیپروفلوکساسین ۴۲/۶٪ (۸۳ مورد)؛ تتراسیکلین ۱۳٪ (۲۵ مورد) گزارش شد. مقاومت به آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین در میان آنتی‌بیوتیک‌های موضوع مطالعه کمتر بوده است (وطن‌خواه، ۱۳۸۰). در تحقیقی دیگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مترونیدازول، تینیدازول، کلاریترومایسین، فورازولیدون، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین سنجیده شده است. نتایج نشان‌دهندهٔ بالاترین مقاومت باکتری به داروهای مترونیدازول و تینیدازول بود (سیاوشی، ۱۳۷۴). نتایج حاصل از این تحقیق دربارهٔ سه آنتی‌بیوتیک کلاریترومایسین، آموکسی‌سیلین، تتراسیکلین با یافته‌های بالا مطابقت دارد، با این تفاوت که سوش‌های جداسازی شده در این تحقیق به مترونیدازول نیز حساس بودند؛ به عبارت دیگر هر ۱۴ سوش جداسازی شده در این تحقیق به همهٔ آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی حساسیت نشان دادند و هیچ سویهٔ مقاومی جداسازی نشد.

یکی از دلایل کاهش میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های موضوع مطالعه در این تحقیق را این واقعیت می‌توان دانست که بیماران انتخاب‌شده برای نمونه‌گیری، پیش‌تر با این آنتی‌بیوتیک‌ها هیچ درمان دارویی نشده بودند. بیماران به‌طور انتخابی غربال شدند؛ زیرا طبق یکی از مقاله‌های منتشرشده از سوی سازمان بهداشت جهانی، بین وقوع مقاومت دارویی باکتری و الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک رابطهٔ مستقیم وجود دارد و مصرف مکرر این آنتی‌بیوتیک‌ها، عامل اصلی خطر در بروز مقاومت دارویی اکتسابی است.

بر اساس نتایج تحقیقی دیگر در همین زمینه، علت کاهش بروز سویه‌های مقاوم، گرانی قیمت این داروها است. گرانی داروها عملاً امکان دسترسی مردم و مصرف دارو را دشوار می‌کند و کاهش مصرف، خود از بروز سوش‌های مقاوم می‌کاهد (viccente et al. 2002).

بر اساس آمار ادارهٔ دارو و غذای وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، کشور ما جزو

آن دسته از کشورهای دنیاست که درصد سرانهٔ مصرف آنتی‌بیوتیک در آن بالاست و لازم است در این زمینه بازنگری اصولی انجام شود.

سپاس‌گزاری

از همکاری بی‌دریغ و یاری‌های معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دکتر امیرتیموری و مدیر امور پژوهشی واحد، دکتر ترکاشوند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم.

منابع

سیاوشی، ف. (۱۳۷۴). *بررسی هلیکوباکترپیلوری در ارتباط با مقاومت نسبت به مترونیدازول و ارزیابی سایر مواد ضدباکتریایی به منظور دست‌یابی به یک نرون درمانی مؤثر*. دانشگاه تهران، علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

وطن‌خواه، ل. (۱۳۸۰). *بررسی فراوانی نسبی مقاومت in vitro هلیکوباکترپیلوری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج ریشه‌کنی در بیماران دیس پپتیک مراجعه‌کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیةالله الاعظم (عج) در سال‌های ۸۰-۱۳۷۸*. پایان نامه(دکتری). دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله (عج)، دانشکدهٔ پزشکی، گروه داخلی.

Adeyemi, E.O. Danial, M.F. Helal, T. Benedict, S. Abdulle, A.M. (1999). "The outcome of a 2-week treatment of *Helicobacter pylori*-positive duodenal ulcer with omeprazole-based antibiotic regimen in a region with high metronidazole resistance rate" European Journal of Gastroenterology Hepatology 11: 1259-1263.

Bailey, A. Scott's, G. (1990). Diagnostic Microbiology 8th edition. Edited by: E B and S F. The C.V. Mosby Company; 440.

Fabre, R. Sobhani, I. Laurent-Puig, P. Hedef, N. Yazigi, N. Vissuzaine, C. Rodde, I. Potet, F. Mignon, M. Etienne, J.P. (1994). "Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests" Gut 35: 905-908.

Glupczynski, Y. Megraud, F. Lopez-Brea, M. Andersen, L.P. (2001). "European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in Helicobacter pylori" European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease 20: 820-823.

Go, M.F. (2002). "Treatment and management of *Helicobacter pylori* infection" Current Gastroenterology Report 4: 471-477.

Grove, D.I. Koutsouridis, G. Cummins, A.G. (1998). "Comparison of culture, histopathology and urease testing for the diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis and susceptibility to amoxycillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline" Pathology 30: 183-187.

Ikezawa, K. Kashimura, H. Kojima, M. Aikawa, T. Nakahara, A. Mutoh, H. Tanaka, N. (1999). "Pretreatment antimicrobial susceptibilities of paired gastric *Helicobacter pylori* isolates: antrum versus corpus" Helicobacter 4: 218-221.

Kato, S. Fujimura, S. Udagawa, H. Shimizu, T. Maisawa, S. Ozawa, K. Iinuma, K. (2002) "Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children" Journal of Clinical Microbiology 40: 649-653.

Kim, J.J. Reddy, R. Lee, M. Kim, J.G. El-Zaatari, F.A. Osato, M.S. Graham, D.Y. Kwon, D.H. (2001). "Analysis of metronidazole, clarithr-omycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea" Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47: 459-461.

Kuo, C.H. Wu, D.C. Lu, C.Y. Su, Y.C. Yu, F.J. Lee, Y.C. Wu, I.C. Lin, S.R. Liu, C.S. Jan, C.M. Wang, W.M. (2002) "The media of rapid urease test influence the diagnosis of *Helicobacter pylori*" Hepatogas-troenterology 49: 1191-1194.

Kwon, D.H. Kim, J.J. Lee, M. Yamaoka, Y. Kato, M. Osato, M.S. El-Zaatari, F.A. Graham, D.Y. (2000). "Isolation and characterization of tetracyclineresistant clinical isolates of *Helicobacter pylori*" Antimicrobial Agents Chemotherapy 44: 3203-3205.

Lage, A.P. Godfroid, E. Fauconnier, A. Burette, A. Butzler, J.P. Bollen, A. Glupczynski, Y. (1995). "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens" Journal of Clinical Microbiology 33: 2752-2756.

Megraud, F. Lehn, N. Lind, T. Bayerdorffer, E. O'Morain, C. Spiller, R. Unge, P. Van-Zanten, S.V. Wrangstadh, M. Burman, C.F. (1999). "Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study" Antimicrobial Agents Chemotherapy 43: 2747-2752.

Meyer, J.M. Silliman, N.P. Wang, W. Siepman, N.Y. Sugg, J.E. Morris, D. Zhang, J. Bhattacharyya, H. King, E.C. Hopkins, R.J. (2002). Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999" Annuals of Internal Medicine 136: 13-24.

Miyaji, H. Azuma, T. Ito, S. Suto, H. Ito, Y. Yamazaki, Y. Sato, F. Hirai, M. Kuriyama, M. Kato, T. Kohli, Y. (1997). "Susceptibility of *Helicobacter pylori* isolates to

metronidazole, clarithromycin and amoxicillin in vitro and in clinical treatment in Japan" Alimentary Pharmacology and Therapeutics 11: 1131-1136.

Moayyedi, P. Axon, A.T. Feltbower, R. Duffett, S. Crocombe, W. Braunholtz, D. Richards, I.D. Dowell, A.C. Forman, D. (2002). "Relation of adult lifestyle and socioeconomic factors to the prevalence of *Helicobacter pylori* infection" International Journal of Epidemiology 31: 624-631.

Montes, H. Salmen, S. Dolfo, W. Sotolongo, A. Petrosino, P. Donis, J. Berrueta, L. (2003) "Evaluation of a liquid urease test (LUT) for detection of *Helicobacter pylori*" Acta Gastroenterology Latinoam 33: 73-76.

Ozcay, F. Kocak, N. Temizel, I.N. Demir, H. Ozen, H. Yuce, A. Gurakan, F. (2004). "*Helicobacter pylori* infection in Turkish children: comparison of diagnostic tests, evaluation of eradication rate, and changes in symptoms after eradication" Helicobacter 9: 242-248.

Pilotto, A. Rassu, M. Leandro, G. Franceschi, M. Di-Mario, F. (2000). "Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Northeast Italy: a multicentre study. GISU. Interdisciplinary Group for the Study of Ulcer" Diagnostic Liver Disease 32: 763-768.

Poon, S.K. Chang, C.S. Su, J. Lai, C.H. Yang, C.C. Chen, G.H. Wang, W.C. (2002). Primary resistance to antibiotics and its clinical impact on the efficacy of *Helicobacter pylori* lansoprazole-based triple therapies" Alimentary Pharmacology and Therapeutics 16: 291-296.

Tolia, V. Brown, W. El-Baba, M. Lin, C.H. (2000) "*Helicobacter pylori* culture and antimicrobial susceptibility from pediatric patients in Michigan" Pediatric Infectious Disease Journal 19: 1167-1171.

Vicente, R. Sicilia, B. Gallego, S. Revillo, M.J. Ducons, J. Gomollon, F. (2002). "*Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer after two treatment failures: a prospective culture-guided study" Gastroenterology Hepatology 25: 438-442.

Wayne, P.A. (2007). "Clinical Laboratory Standards Institue: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria M7-A5" Informational supplement M100-S10. CLSI.

Weiss, J. Mecca, J. da-Silva, E. Gassner, D. (1994) "Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients" Journal of Clinical Microbiology 32: 1663-1668.

Wolle, K. Leodolter, A. Malfertheiner, P. Konig, W. (2000). "Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany: stable primary resistance from 1995 to 2000" Journal of Medical Microbiology 51: 705-709.