

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 نمونه 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 اندازه گیری MIC آنتی بیوتیک‌های مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی سیلین و تراسیکلین انجام شد.

۴۰ درصد افراد موضوع مطالعه به عفونت هلیکوباکتر پیلوری مبتلا بودند که ۶۰ درصد آن‌ها مرد بودند. تمام سوش‌ها به ۴ آنتی بیوتیک استفاده شده 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 آنتی بیوتیکی و مدیریت کنترل عفونت مجدد نقش مهمی خواهد داشت.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، مقاومت دارویی

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

مقدمه

هم‌زمان انجام نمی‌شوند و ترجیحاً از روش‌های سریع‌تر تشخیصی، مثل تست ابگوشت اوره آز، (۲UBT)، 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 اختصاصی بودن تکنیک‌های کشت باکتری برای اثبات عفونت و تعیین الگوی حساسیت دارویی سوش‌های بومی جداشده کشت نمونه‌های بیماران در منطقه 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، اندوسکوپي ضروری تشخیص داده شد.

رنگ آمیزی 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 میکروبی‌شناسی دانشگاه منتقل شد؛ سپس

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^۱ موضوع توجه شد (Glupczynski, et al. 2001). از نظر اپیدمیولوژیک مخزن عفونت، معده انسان و راه انتقال آن، تماس میان‌فردی است (Go, 2002). شیوع عفونت بیشتر در کشورهای در حال توسعه مشاهده می‌شود 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 اپیدمیولوژیک مرتبط با عفونت در دسترس نیست. استفاده از روش‌های رایج کشت، نتایج متفاوتی برای جداسازی باکتری داشته است. درصد موفقیت 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 ناکافی بودن دوره انکوباسیون مربوط باشد (Ozcay, et al. 2004). بیوپسی گاستریک و کشت روزمره،

برای کلاریترومایسین و بیش از ۰/۵ g/ml برای آموکسی سیلین و بیش از ۲ µg/ml برای تتراسیکلین، نشانه مقاومت سوش ها به این آنتی بیوتیک ها تعریف شد. این مقادیر بر اساس Break points تدوین شده در دستورالعمل CLSI^۴ انتخاب شد (Wayne, 2007). سوش استاندارد *H.pylori* ATCC 43504 نیز برای کنترل حساس به آنتی بیوتیک های بالا استفاده شد.

آزمایش سریع اوره آز: برای این کار به ۰/۵ میلی لیتر محلول اوره ۸ درصد (وزنی به حجمی) تهیه شده با آب مقطر، یک قطره محلول فنل قرمز یک درصد اضافه شد و محلول تا زمان استفاده، در ۴ درجه نگه داری شد. محلول ها به طور روزانه تهیه شد تا از ثبات آن ها اطمینان حاصل شود. نمونه بیوپسی بیمار به لوله اِپندرف حاوی این محلول اضافه شد؛ در صورت تغییر رنگ سریع، محیط اطراف محل تلقیح و بعد، اندک اندک تمام محیط آزمایش مثبت تلقی شد. نمونه هایی که به مدت ۲ ساعت، همچنان بدون تغییر رنگ باقی ماندند، منفی تلقی شدند.

آزمایش هیستوپاتولوژیک: نمونه ها ابتدا تثبیت و سپس هر نمونه با ۳ رنگ گیمسا، هماتوکسیلین و ائوزین به طور جداگانه رنگ آمیزی شد. در صورت مشاهده باسیل های خمیده در میکروسکوپی لام ها، نمونه، مثبت در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: از اندازه گیری میانگین و انحراف معیار داده ها استفاده شد. اندازه گیری صحت روش کشت به صورت حساسیت و اختصاصی بودن و

به محیط کشت BHIA^۱ حاوی ۷ درصد خون اسب و BBA^۲ حاوی مکمل skirrow (با ۵ درصد خون دفیبرینه 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. پلیت ها به مدت یک هفته در ۳۷ درجه در شرایط میکروآنروفلیک (سیستم pack-microaero، کارخانه میتسوبیشی) انکوبه شد و هر روز، رشد آن ها بررسی شد (Tolia, et al. 2000). کلنی های باکتری کوچک، مسطح و شفاف تا کمی خاکستری بودند.

پس از روز پنجم کشت های منفی دوباره در محیط BHIA غنی شده (حاوی خون اسب) دوباره کشت شدند تا در صورتی که برخی از سوش های احتمالی کندرشد یا پریناز^۳ بودند، امکان رشد آن ها فراهم شود. این پلیت ها دوباره به مدت ۵ روز در شرایط میکروآنروفل گرم خانه گذاری شدند و تا روز دهم (از آغاز اولین کشت) منفی گزارش نشدند. کلنی های حاصل از کشت ها برای اثبات وجود *H.pylori* از نظر تولید اوره آز، اکسیداز و کاتالاز آزمایش شدند. مشاهده باسیل های خمیده 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

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

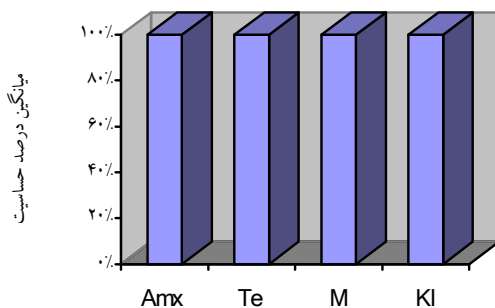
از بین ۱۰۰ بیمار مبتلا به سوء هاضمه، ۴۰ نفر از نظر عفونت مثبت بودند که ۲۴ نفر مرد بودند و از میان آنان، ۸۰ درصد متأهل بودند. ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به عفونت (۳۸ نفر) به آب بهداشتی تصفیه شده شهری دسترسی داشتند.

تشخیص آزمایشگاهی هلیکوباکتر پیلوری:

برای تمام بیماران مراجعه کننده ۳ آزمایش تشخیصی هیستوپاتولوژی، تست سریع اوره و کشت انجام شد. از مجموع کل نمونه‌های کشت شده، ۱۴ نمونه در محیط کشت اختصاصی باکتری رشد کردند. ۸ سوش از ۱۴ سوش جداسازی شده از نظر هر دو آزمایش پاتولوژی و تست سریع اوره آز مثبت بودند؛ درحالی که 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 دست کم یکی از دو آزمایش تشخیصی اوره آز سریع و هیستوپاتولوژی آنان مثبت بوده باشد.

هر ۱۴ سوش جداسازی شده در کشت‌های اولیه رشد کردند و متوسط زمان انکوباسیون آن‌ها در کشت اولیه 1 ± 4 روز بود. تمام سوش‌ها به آموکسی‌سیلین ($MIC=0.016 \mu g/ml$)، تتراسیکلین ($MIC=0.164 \mu g/ml \pm 0.16$)، مترونیدازول ($MIC=0.061 \mu g/ml \pm 0.04$) و کلاریترومایسین ($MIC=0.16 \mu g/ml$) بسیار حساس بودند (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۱).



نوع آنتی بیوتیک

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

جدول شماره ۱. حساسیت سوش های هلیکوباکتر پیلوری به آنتی بیوتیک های موضوع

آزمایش

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

بحث و نتیجه گیری

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).

در این تحقیق حساسیت روش کشت ۴۵ درصد و اختصاصیت آن بین ۹۸ تا ۱۰۰ درصد تشخیص داده شد و بنابراین می توان آن را همچون ابزار تأییدی مفید در تشخیص قطعی عفونت به کار 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

سنجیده شده است. نتایج نشان‌دهنده بالاترین مقاومت باکتری به داروهای مترونیدازول و تینیدازول بود (سیاوشی، ۱۳۷۴). نتایج حاصل از این تحقیق درباره 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 همه آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی حساسیت نشان دادند و هیچ سویه 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 رابطه 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 (vicente et al. 2002).

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

تنوع در حساسیت دارویی و الگوی مقاومت سوش‌های مختلف باکتری در یک منطقه جغرافیایی، به دلایل 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. 1997; Miyaji, et al. 2002; Meyer, et al. 2000). الگوهای حساسیت دارویی در اروپا و امریکا نشان داده‌اند که بیشترین مقاومت به مترونیدازول از ۳۳/۱ تا ۳۶/۹ درصد از سوش‌های جداسازی شده 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 جداسازی شده 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، کلاریترو-مایسین، فورازولیدون، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین

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 amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline” *Pathology* 30: 183-187.

آن دسته از کشورهای دنیاست که درصد سرانه 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 امیر تیموری و مدیر امور پژوهشی واحد، دکتر ترکشوند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌کنم.

منابع

سیاوشی، ف. (۱۳۷۴). بررسی هلیکوباکتریلوری 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* هلیکوباکتریلوری به آنتی‌بیوتیک‌های رایج ریشه‌کنی در بیماران دیسپتیک مراجعه‌کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیه‌الله الاعظم (عج) در سال‌های ۸۰-۱۳۷۸. پایان‌نامه (دکتری). دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، دانشکده 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

- 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, clarithromycin 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*" *Hepato-gastroenterology* 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" *Annals 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. Rassa, 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 Institute: 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. König, W. (2000). "Antibiotic
susceptibility of *Helicobacter pylori*
in Germany: stable primary
resistance from 1995 to 2000"
Journal of Medical Microbiology 51:
705-709.