مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۲ شماره ۶ بهمن و اسفند ۱۳۸۹ صفحات ۶۵- ۶۱

الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به دیس پپسی مزمن در شمال شرق ایران

فریده مرادی مقدم: گروه داخلی، دانشکده پزشکی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
حسن سعادت نیا: گروه داخلی، دانشکده پزشکی مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
حسین اربابی: پزشک عمومی، نویسنده رابط
E-mail:moradif@mums.ac.ir

دریافت: ۸۸/۲/ ۱۳ ، **پذیرش**: ۸۸/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و اهداف: افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها، باعث تفاوت روشهای درمانی در مناطق مختلف شده است. این مطالعه به تعیین حساسیت هلیکوباکتر به چهار آنتی بیوتیک کلاریترومایسین، مترونیدازول، آموکسی سیلین و تتراسیکلین که معمولاً در درمان ریشه‌کنی بکار می‌روند، بصورت آزمایشگاهی کمک می کند.

روش بررسی: بیماران با دیس پپسی مزمن که برای آندوسکوپی فوقانی به کلینیک ما ارجاع شده بودند وارد مطالعه شدند. از بین آنها کسانی که در دو هفته اخیر، آنتی بیوتیک و مهار کننده پمپ پروتون مصرف کرده بودند یا دچار بدخیمی بودند از مطالعه خارج شدند. هنگام آندوسکوپی، سه نمونه نسجی برای هیستولوژی، تست اوره آز سریع و کشت تهیه شد. پس از کشت مقاومت آنتی بیوتیکی بوسیله دو روش رقت آگار و انتشار دیسک بررسی شد.

یافته ها: از میان ۱۸۵ بیمار، ۱۲۴ نمونه (۶۷٪) با روش هیستولوژی مثبت شدند. در مطالعه ما حساسیت و ویژگی کشت در مقایسه با هیستولوژی، بترتیب ۶۶/۱٪ و ۱۰۰٪ بود. مقاومت به کلاریترومایسین ۱۷/۱٪ مترونیدازول ۶۴/۶٪ و آموکسی سیلین ۹/۸٪ بود. هیچگونه مقاومتی به تتراسیکلین مشاهده نشد. مقاومت به مترونیدازول در بیماران جوانتر از ۵۰ سال شایعتر بود (P=0/01). ۶۴٪ نمونه‌های مقاوم به کلاریترومایسین، همزمان به مترونیدازول نیز مقاوم بودند.

نتیجه گیری: با توجه به مقاومت بالای هلیکوباکتر پیلوری به مترونیدازول، خصوصاً در بیماران جوان، طبق مطالعه آزمایشگاهی ما، این دارو بعنوان خط اول درمانی توصیه نمی شود. پیشنهاد می شود؛ در شکست درمانی با رژیم کلاریترومایسین، کشت و حساسیت میکروبی انجام شود.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، دیس پپسی مزمن، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باسیل گرم منفی خمیده است که می تواند سبب گاستریت مزمن سطحی، گاستریت مزمن آتروفیک، زخم معده و اثنی عشر، سرطان معده و لنفوم بافت لنفاوی مخاطی[1] شود [۱-۳] و ریشه کنی آن در بسیاری از این موارد توصیه می‌شود [۳-۵]. اگرچه در توصیه به ریشه کنی این عفونت در بیماران مبتلا به دیس پپسی مزمن اختلاف نظر وجود دارد، اما به نظر می رسد توصیه محققین در سالهای اخیر بیشتر دلالت بر ریشه کنی عفونت هلیکوباکتر دارد [۶،۷]. برای پرهیز از شکست درمانی و گسترش مقاومت ثانویه به آنتی بیوتیک ها، باید رژیم درمانی مناسبی بعنوان خط اول درمان انتخاب شود. این انتخاب می بایست بر پایه اطلاعات و دانش حاصل از بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی هلیکوباکتر در هر منطقه جغرافیایی باشد [۸- ۱۰]. افزایش مقاومت

1. MALToma

این باکتری به رژیم های آنتی بیوتیکی معمول و اختلاف در الگوی مقاومت در مناطق مختلف، سبب اختلاف در رژیم های درمانی مورد استفاده در مناطق مختلف شده است [۱۲،۱۱،۹]. این مطالعه در تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی هلیکوباکتر پیلوری به چهار آنتی بیوتیک شایع مورد استفاده در ریشه کنی هلیکوباکتر (کلاریترومایسین، مترونیدازول، آموکسی سیلین و تتراسیکلین) بصورت آزمایشگاهی، در منطقه شمال شرق ایران کمک خواهد کرد.

مواد و روش ها

این مطالعه در سالهای ۸۶ و ۸۷ (اسفند ماه سال ۸۶ تا خرداد ماه سال ۸۷) بر روی بیماران مبتلا به دیس پپسی مزمن که جهت انجام آندوسکوپی به کلینیک گوارش بیمارستان قائم (عج) دانشگاه علوم پزشکی مشهد ارجاع شده بودند، و بر اساس معیارهای شناخته شده (مانند سن بالا، مدت علایم، علایم هشدار دهنده) اندیکاسیون انجام آندوسکوپی داشتند و تا آن زمان رژیم‌های استاندارد ۳ یا ۴ دارویی ضد هلیکوباکتر پیلوری را دریافت نکرده بودند و همچنین سابقه مصرف آنتی بیوتیک، بیسموت و یا مهار کننده پمپ پروتون (PPI)[۱] را در دو هفته اخیر نداشتند، انجام شد. همچنین بیمارانی که دچار کانسر دستگاه گوارش بودند از مطالعه خارج شدند.

در حین آندوسکوپی سه نمونه بافتی بطور همزمان جهت انجام هیستولوژی، تست سریع اوره آز (RUT)[۳] و کشت میکروب از بیمار گرفته شد. بیوپسی هایی که برای کشت تهیه شده بودند، با استفاده از محیط انتقال استوارت در کیسه یخ به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند تا جداسازی میکروب، کشت و آنتی بیوگرام انجام شود. تا زمان استفاده از آنها، نمونه ها در یخچال و در دمای ۴°C نگهداری شدند [۱۳]. نمونه ها حداکثر تا ۲۴ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند. جهت کشت، نمونه را از محیط انتقال خارج کرده و آن را با یک تیغ بیستوری استریل و چند قطره نرمال سالین استریل به صورت سوسپانسیون در آورده و یک قطره آن را بر روی محیط کشت جامد تلقیح و با روش Streaking pattern کشت شدند [۱۴]. محیط های کشت مورد استفاده در این مطالعه عمداً بروسلا آگار یا کلمبیا آگار همراه با مکمل های آنتی بیوتیکی (وانکومایسین، پلی میکسین B و آمفوتریسین B) و خون اسب (۷٪) بود. محیط های کشت شده، به جار بی هوازی (anaerobic jar) که در آنها شرایط میکروآئروفیلیک بوسیله گاز پک‌ها (gas pack) ایجاد شده بود، منتقل شده و به مدت ۵ روز در دمای ۳۷°C نگهداری شدند و سپس آلودگی باکتریها با علائم ۱+، ۲+، ۳+، و ۴+ ارزیابی شد. کلنی های باکتری هلیکوباکتر پیلوری بر اساس مورفولوژی، اوره آز مثبت، آزمون‌های DNAase، Oxidase و رنگ آمیزی گرم تشخیص داده شدند [۱۴،۱۳].

حساسیت آنتی بیوتیکی به چهار آنتی بیوتیک معمول مورد استفاده در ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری (کلاریترومایسین، مترونیدازول، آموکسی سیلین، و تتراسیکلین) به دو روش رقت آگار و انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا برای تهیه مایع تلقیح، با آنس نوک گرد در کنار شعله، از پلیت های حاوی میکروب چند کلنی برداشته و به لوله های حاوی محیط مایع Brain heart infusion (BHI) همراه با ۱۰٪ خون اسب برده در در دمای ۳۷°C و شرایط میکروآئروفیلیک برای ۱۵ ساعت برای رسیدن به فاز لگاریتمی نگهداری شد. سپس با افزودن نرمال سالین استریل با لوله مک فارلند 1 همرنگ شد (غلظت = cfu/ml 5×10^8). با تلقیح یک میلی لیتر باکتری رقیق شده به ۵۰۰ میلی لیتر محیط BHI broth استریل، سوسپانسیون رقیق شده ای با غلظت 10^6 cfu/ml بدست آمد. در روش دیسک، حدود ۰/۵ میلی لیتر (یک سواپ آغشته) از سوسپانسیون رقیق شده برداشته شد و در پلیت حاوی آگار مولر-هینتون و ۱۰٪ سرم جنین گوساله به مدت ۵ دقیقه کشیده شد تا باکتری ها کاملاً پخش شوند و ۵-۱۰ دقیقه اجازه داده شد که خشک شود. پس از خشک شدن بوسیله یک پنس استریل دیسک ها در فواصل معینی بر روی پلیت قرار داده شد. چهار دیسک مختلف با استفاده از آموکسی سیلین (۲۵ µg)، کلاریترومایسین (۱۵ µg)، مترونیدازول (۵ µg) و تتراسیکلین (۳۰ µg) مورد سنجش قرار گرفتند. ۱۵دقیقه بعد از گذاشتن دیسک ها، پلیت برگردانده و تحت شرایط میکروآئروفیلیک و دمای ۳۷° C به مدت ۵ روز نگهداری شد. برای تشخیص وجود مقاومت، منطقه روشن اطراف دیسک ها اندازه گیری شد و قطر دوایر بدست آمده با جداول ویژه مقایسه شد. در روش MIC (Minimum inhibitory concentration) ابتدا غلظت های متفاوتی از آنتی بیوتیک ها بین ۰/۰۰۸ µg/ml تا ۱۲۸ µg/ml تهیه شد. سپس یک میلی لیتر از مایع تلقیح رقیق نشده، بر روی پلیت های حاوی آنتی بیوتیک ها قرار داده شد و پلیت ها در شرایط میکروآئروفیلیک برای مدت ۳ روز نگهداری شدند. بررسی پلیت ها از غلظت کم به زیاد انجام شد. کمترین مقدار از غلظت آنتی بیوتیکی که باکتری در آن قادر به رشد نبود، بعنوان MIC ماده ضد میکروبی گزارش شد. در این روش از آگار مولر-هینتون محتوی خون هپارینیزه شده اسبی استفاده گردید. محدوده غلظت آنتی بیوتیکی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت بدین ترتیب بود؛ کلاریترومایسین (۰/۰۶٤-۰/۲۵ µg/ml)، مترونیدازول (۰/۲۵-٦٤ µg/ml)، آموکسی سیلین (۰/۰۰۸-۳۲µg/ml) و تتراسیکلین (۰/۰۱٦-۰/٦٤ µg/ml). مرز مقاومت آنتی بیوتیکی (cutoff) به هر یک از این داروها بدین ترتیب در نظر گرفته شد: آموکسی سیلین (MIC≥ ۳۲µg/ml)، کلاریترومایسین (MIC≥۰/۲۵ µg/ml)، مترونیدازول (۶۴ µg/ml ≥MIC) و تتراسیکلین (MIC≥ ۰/۶۴ µg/ml). داده های بدست آمده بوسیله نرم افزار آماری SPSS version 11.5 تحت آزمون

1. Proton Pump Inhibitor
2. Rapid Urease Test

های ، Chi-Square، و Fisher Exact Test قرار گرفت. در این مطالعه مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.

یافته ها

از ۱۸۵ بیمار مبتلا به دیس پپسی مزمن که جهت آندوسکوپی مراجعه کرده بودند، ۱۲٤ بیمار (٦۷٪) از نظر عفونت هلیکوباکتر پیلوری دارای هیستولوژی مثبت بودند که وارد مطالعه شدند. ۶۵ بیمار (۵۲/۴٪) زن و ۵۹ بیمار (۴۷/۶٪) مرد بودند. نمونه های مثبت تحت کشت باکتریایی قرار گرفتند که در ۸۲ مورد کشت و جداسازی باکتری با موفقیت انجام گرفت و سپس تحت آزمون های حساسیت سنجی نسبت به آنتی بیوتیک ها قرار گرفتند. باکتری های جدا شده در ۴۸ مورد (۵۸/۵٪) مربوط به بیماران زن و در ۳۴ مورد (۴۱/۵٪) مربوط به بیماران مرد بودند. سن بیماران بین ۱۹ تا ۸۲ سال و متوسط سن آنها ۱۵/۲±۴۱/۳ سال بود. در این مطالعه حساسیت و ویژگی کشت در مقایسه با هیستولوژی بعنوان استاندارد طلایی به ترتیب ٦٦/۱٪ و ۱۰۰٪ بود. جدول ۱ خلاصه ای از نتایج حساسیت میکروب های جدا شده به داروهای ضد میکروبی آزمایش شده را نشان می دهد. در میان ۸۲ هلیکوباکتر پیلوری جدا شده، مقاومت به کلاریترومایسین، مترونیدازول و آموکسی سیلین به ترتیب ۱۷/۱٪، ٦٤/٦٪ و ۹/۸٪ بود. اما هیچگونه مقاومتی به تتراسیکلین دیده نشد. در یک مورد نسبت به هر سه آنتی بیوتیک فوق مقاومت همزمان مشاهده شد. فراوانی مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به مترونیدازول، کلاریترومایسین و آموکسی سیلین در جنس مؤنث اندکی بیشتر بود ولی از نظر آماری رابطه معنی داری بین جنس و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مذکور وجود نداشت. در ۲۱ مورد از باکتریهای جدا شده، به هیچ یک از آنتی بیوتیک ها مقاومتی دیده نشد. از ١٤ مورد جدا شده، که به کلاریترومایسین مقاوم بودند، ۹ مورد (٦٤/۲٪) همزمان به مترونیدازول نیز مقاومت داشتند.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که مقاومت به مترونیدازول و کلاریترومایسین به ترتیب ٦٤/٦٪ و ۱۷/۱٪ است. این مشاهده با نتایج بدست آمده از سایر مطالعاتی که در مناطق دیگر کشورمان انجام شده است مطابقت دارد [۱٤-۱۷]. از سوی دیگر، این یافته با یافته های اکثر مطالعاتی که مدعی وجود مقاومت بالا نسبت به مترونیدازول هستند موافق است [۱۴،۱۸،۱۹]. مطالعه ما نشان داد که مقاومت به مترونیدازول در جوان تر ها شایعتر است و با افزایش سن کاهش می یابد (جدول ۲). بطوری که ۸۸٪ باکتری های جدا شده از نمونه های کشتی بدست آمده از افراد زیر ۳۰ سال نسبت به مترونیدازول مقاوم بودند در حالیکه میزان این مقاومت در افراد بالای ۵۰ سال ٤۷٪ بود (P =0.01). این واقعیت همچنین در برخی از مطالعات خارجی بخوبی نشان داده شده است [۲۰] و با توجه به اینکه اکثر بیماران مراجعه کننده به کلینیک ما زیر ۵۰ سال سن دارند، در کسانی که رژیم درمانی بر پایه مترونیدازول دریافت می کنند، مقاومت دارویی و شکست درمانی قابل توجه ای قابل انتظار است. بنابراین، کاربرد رژیم درمانی بر پایه مترونیدازول در ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری، خصوصاً در افراد جوان بعنوان خط اول درمان توصیه نمی شود [۱۸،۲۱].

جدول ۱: مقاومت آنتی بیوتیکی با دو روش MIC و انتشار دیسک

آنتی بیوتیک	حساسیت	مقاومت
کلاریترومایسین	۶۸ (۸۲/۹٪)	۱۴ (۱۷/۱٪)
آموکسی سیلین	۷۴ (۹۰/۲٪)	۸ (۹/۸٪)
مترونیدازول	۲۹ (۳۵/۴٪)	۵۳ (۶۴/۶٪)
تتراسیکلین	۸۲ (۱۰۰٪)	۰ (۰/۰٪)

جدول ۲: مقاومت آنتی بیوتیکی با دو روش MIC و دیسک؛ در گروههای سنی مختلف در بیماران با دیس پپسی مزمن

	گروه سنی				
	زیر ۳۰ سال	۳۰-۵۰ سال	بیشتر از ۵۰ سال	کل نمونه	
آنتی بیوتیک	**مقاومت**	**مقاومت**	**مقاومت**	**مقاومت**	P value
کلاریترومایسین	۱۶٪ (n=۴)	۱۸٪ (n=۷)	۱۶٪ (n=۳)	۱۷٪ (n= ۱۴)	۰/۹
مترونیدازول	۸۸٪ (n=۲۲)	۵۸٪ (n=۲۲)	۴۷٪ (n=۹)	۶۵٪ (n= ۵۳)	۰/۰۱
آموکسی سیلین	۸٪ (n=۲)	۱۱٪ (n=۴)	۵٪ (n=۱)	۹٪ (n=۷)	۰/۶

از سوی دیگر، از آنجا که همزمانی مقاومت به مترونیدازول در بیمارانی که به کلاریترومایسین مقاوم هستند بالا است (٦٤/٢٪)، در بیمارانی که به رژیم درمانی بر پایه کلاریترومایسین مقاومت نشان دادند، کشت و آنتی بیوگرام جهت ارزیابی حساسیت میکروبی به سایر آنتی بیوتیک ها یا استفاده از تتراسیکلین بعنوان داروی جایگزین توصیه می شود. توصیه اخیر به آن علت است که در مطالعه ما هیچگونه مقاومتی به تتراسیکلین مشاهده نشد همانگونه که اکثر مطالعات دیگر در این زمینه نیز مقاومت پائینی را نسبت به این آنتی بیوتیک گزارش کرده اند [۸، ۲۲-۲۵]. با وجود آنکه از زمان استفاده کلاریترومایسین مدت زیادی نمی گذرد، ولی مقاومت به این آنتی بیوتیک رو به افزایش است (١٧/١٪)، همچنانکه در سایر نقاط کشور ما نیز مقاومت بالا به این آنتی بیوتیک (بین ٢٤-٢/٤٪) بخوبی تأیید شده است [۱۶،۱۷،۲۴،۲۵]. فاکتور اصلی در افزایش مقاومت به کلاریترومایسین مصرف قبلی ماکرولیدها بخصوص اریترومایسین در نظر گرفته می شود [۲۲]. بنابراین توصیه می شود که در زمان وجود اندیکاسیون استفادهٔ این داروها در همه گروههای سنی (کودکان و بالغین)، بطور مناسب و درست استفاده شوند. چرا که استفاده بی رویه و نادرست از این داروها، همچنانکه در سایر کشورها گزارش شده است باعث افزایش بیشتر مقاومت به کلاریترومایسین در سالهای آینده خواهد شد[۸، ۲۶-۲۸]. این توصیه در مورد آموکسی سیلین نیز صادق است چرا که بر اساس مطالعه ما مقاومت به آموکسی سیلین ۹/۸٪ بود که در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده چه در داخل کشور و چه در خارج از کشور، بالاتر بود و شاید نشانی از افزایش تدریجی مقاومت به این آنتی بیوتیک باشد [۸، ۲۲-۲۴]. اشاره شد که در مطالعه ما حساسیت و ویژگی کشت در مقایسه با هیستولوژی بعنوان استاندارد طلایی به ترتیب ٦٦/١٪ و ١٠٠٪ بود. لازم به یاد آوری است که حساسیت کشت در مطالعات مختلف از ٢٣/٥٪ تا ٩٧٪ گزارش شده است [۲۹]. دلیل این اختلاف می تواند ناشی از موارد گوناگونی نظیر، تهیه بیوپسی، شرایط، محیط و روش کشت باشد.

نتیجه گیری

با توجه به مقاومت بالای هلیکوباکتر پیلوری به مترونیدازول، خصوصاً در افراد جوان، بر اساس مطالعه آزمایشگاهی ما این دارو برای ریشه کنی عفونت هلیکوباکتر پیلوری بعنوان خط اول درمانی توصیه نمی شود. ما پیشنهاد می کنیم در بیمارانی که در درمان با رژیم حاوی کلاریترومایسین شکست خورده اند، کشت و آنتی بیوگرام انجام شود تا آنتی بیوتیک مناسب بر اساس حساسیت باکتری انتخاب شود.

تقدیر و تشکر

منابع مالی این مطالعه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأمین شده است. ما صمیمانه از آن معاونت محترم، اعضای محترم کمیته پژوهشی دانشکده پزشکی مشهد، خانم دکتر مهرانگیز خواجه کرم‌الدینی، استاد محترم میکروبیولوژی، خانم دکتر منور افضل آقایی، متخصص محترم پزشکی اجتماعی و دکتر ابوالفضل زنده دل که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند تشکر و قدردانی می کنیم.

References:

1. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; **54**: 615-640.
2. Hunt RH. The role of Helicobacter pylori in pathogenesis: the spectrum of clinical outcomes. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; **220**: 3-9.
3. Makola D, Peura DA, Crowe SE. Helicobacter pylori infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; **41**(6): 548-558.
4. Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Fujioka T. Guidelines for the management of Helicobacter pylori--Maastricht III-2005 and Japanese guidelines. *Nippon Rinsho* 2008; **66**(4): 804-810.
5. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; **56**(6): 772-781.
6. Maconi G, Sainaghi M, Molteni M, Bosani M, Gallus S, Ricci G, et al. Predictors of long-term outcome of functional dyspepsia and duodenal ulcer after successful Helicobacter pylori eradication - a 7-year follow-up study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; **21**(4): 387-393.
7. Moayyedi P, Soo S, Deeks J, Delaney B, Harris A, Innes M, et al. Eradication of Helicobacter pylori for non-ulcer dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; **19**(2): 2096.
8. Romano M, Iovene MR, Russo MI, Rocco A, Salerno R, Cozzolino D, et al. Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant Helicobacter pylori clinical isolates. *J Clin Pathol* 2008; **61**(10): 1112-1115.

9. Chisholm SA, Teare EL, Davies K, Owen RJ. Surveillance of primary antibiotic resistance of Helicobacter pylori at centres in England and Wales over a six-year period (2000-2005). *Euro Surveill* 2007; **12**(7): 3-4.
10. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; **26**(3): 343-357.
11. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Davidkov L, Kamburov V, Jelev C, et al. Prevalence and evolution of Helicobacter pylori resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; **60**(4): 409-415.
12. Bang SY, Han DS, Eun CS, Kim JE, Ahn SB, Sohn JH, et al. Changing patterns of antibiotic resistance of Helicobacter pylori in patients with peptic ulcer disease. *Korean J Gastroenterol* 2007; **50**(6): 356-362.
13. Aboderin OA, Abdu AR, Odetoyin B, Okeke IN, Lawal OO, Ndububa DA, et al. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori from patients in Ile-Ife, South-west, Nigeria. *Afr Health Sci* 2007; **7**(3): 143-147.
14. Kohanteb J, Bazargani A, Saberi-Firoozi M, Mobasser A. Antimicrobial susceptibility testing of Helicobacter pylori to selected agents by agar dilution method in Shiraz-Iran. *Indian J Med Microbiol* 2007; **25**(4): 374-377.
15. Rafeey M, Ghotaslou R, Nikvash S, Hafez AA. Primary resistance in Helicobacter pylori isolated in children from Iran. *J Infect Chemother* 2007; **13**(5): 291-295.
16. Moosavian M, Tajbakhsh S, Samarbaf-Zadeh AR. Rapid detection of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori in patients with dyspepsia by fluorescent in situ hybridization (FISH) compared with the E-test. *Ann Saudi Med* 2007; **27**(2): 84-88.
17. Mohammadi M, Doroud D, Mohajerani N, Massarrat S. Helicobacter pylori antibiotic resistance in Iran. *World J Gastroenterol* 2005; **11**(38): 6009-6013.
18. John Albert M, Al-Mekhaizeem K, Neil L, Dhar R, Dhar PM, Al-Ali M, et al. High prevalence and level of resistance to metronidazole, but lack of resistance to other antimicrobials in Helicobacter pylori, isolated from a multiracial population in Kuwait. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **24**(9): 1359-1366.
19. Huang LP, Zhuang ML, Gu CP. Antimicrobial resistance of 36 strains of Helicobacter pylori in adolescents. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2009; **11**(3): 210-212.
20. Cameron EA, Powell KU, Baldwin L, Jones P, Bell GD, Williams SG. Helicobacter pylori: antibiotic resistance and eradication rates in Suffolk, UK, 1991-2001. *J Med Microbiol* 2004; **53**(6): 535-538.
21. Nista EC, Candelli M, Zocco MA, Cremonini F, Ojetti V, Finizio R, et al. Levofloxacin-based triple therapy in first-line treatment for Helicobacter pylori eradication. *Am J Gastroenterol* 2006; **101**(9): 1985-1990.
22. Mégraud F H. pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 2004; **53**(9): 1374-1384.
23. Kulsuntiwong P, Chomvarin C, Chaicumpar K, Namwat W, Kaewkes W, Mairiang P, et al. Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori isolated from gastric biopsies in dyspeptic patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2008; **39**(6): 1102-1109.
24. Siavoshi F, Safari F, Doratotaj D, Khatami GR, Fallahi GH, Mirnaseri MM. Antimicrobial resistance of Helicobacter pylori isolates from Iranian adults and children. *Arch Iran Med* 2006; **9**(4): 308-314.
25. Fallahi GH, Maleknejad S. Helicobacter pylori culture and antimicrobial resistance in Iran. *Indian J Pediatr* 2007; **74**(2): 127-130.
26. Sung H, Chung HJ, Kim MN, Lee GH. Clinical Usefulness of Antimicrobial Susceptibility Test for Helicobacter pylori. *Korean J Lab Med* 2006; **26**(3): 179-184.
27. Kobayashi I, Murakami K, Kato M, Kato S, Azuma T, Takahashi S, et al. Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of Helicobacter pylori strains in Japan between 2002 and 2005. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(12): 4006-4010.
28. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Burattini O, et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains over a 15 year period in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**(4): 783-785.
29. Yin Y, He LH, Zhang JZ. Successful isolation of Helicobacter pylori after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2009; **15**(12): 1528-1529.