

ارزیابی شیوع جهش‌های A2142G، A2143G و A2142C در ایجاد مقاومت به کلاریترومایسین در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از استان چهارمحال و بختیاری

محمد کارگر^۱، مریم باقرنژاد^۲، عباس دوستی^۳

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، جهرم، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۷۱۱-۶۴۷۶۱۰۶ microkargar@gmail.com

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، جهرم، ایران

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد شهر کرد، جهرم، ایران

چکیده

زمینه و هدف: رژیم‌های درمانی متداول برای ریشه‌کنی هلیکوباکترپیلوری شامل دو آنتی‌بیوتیک، همراه با مهارکننده‌های پمپ پروتونی و ترکیبات بیسموت است. کلاریترومایسین یکی از کلیدی‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در رژیم‌های درمانی در ایران است. هدف از این پژوهش، تعیین مقاومت به کلاریترومایسین و ارزیابی نقش جهش‌های نقطه‌ای متداول A2143G، A2142G و A2142C در ایجاد مقاومت به این دارو می‌باشد.

روش بررسی: این پژوهش به صورت توصیفی - تحلیلی (مقطعی) بر روی ۲۶۳ بیمار مراجعه‌کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان هاجر شهر کرد در تابستان ۱۳۸۶ انجام شد. نمونه‌های بیوپسی بر روی محیط انتخابی بروسلا آگار کشت و گرمخانه‌گذاری گردید. برای تعیین هویت H.pylori از روش رنگ‌آمیزی گرم، اوره آز، کاتالاز، اکسیداز و PCR به منظور شناسایی ژن ureC و برای ارزیابی مقاومت به کلاریترومایسین نیز از روش استاندارد دیسک دیفیوژن (Clinical and Laboratory Standards Institute) استفاده گردید. جهش‌های A2143G و A2142G با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم‌های برش‌دهنده BsaI و MboII با روش PCR-RFLP شناسایی گردید. همچنین برای شناسایی جهش A2142C از پرایمرهای اختصاصی و روش PCR استفاده شد.

یافته‌ها: با آزمون PCR، جداسازی ۸۴ سویه H.pylori (۳۱/۹۴٪) مورد تایید قرار گرفت. از ۱۹ سویه مقاوم، ۱۳ مورد (۶۸/۴۲٪) جهش A2143G، ۳ مورد (۱۵/۷۹٪) جهش A2142G، ۲ مورد جهش A2142C (۱۰/۵۳٪) و ۱ جهش ناشناخته شناسایی گردید. **نتیجه‌گیری:** به دلیل میزان مقاومت قابل توجه به کلاریترومایسین، ضرورت ارزیابی مستقیم این جهش با روش‌های مولکولی در سایر مناطق کشور وجود دارد.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکترپیلوری، کلاریترومایسین، 23SrRNA، PCR-RFLP، مقاومت دارویی

وصول مقاله: ۸۸/۹/۱۱ اصلاحیه نهایی: ۸۸/۱۱/۱۲ پذیرش مقاله: ۸۹/۱/۸

مقدمه

درمان با رژیم‌های دارویی از بین می‌روند و به طور کامل بهبود می‌یابند. از آنجایی که مجرای معده یک محیط اسیدی است، یک آنتی‌بیوتیک تنها به منظور درمان این عفونت به کار نمی‌رود و رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی متشکل از دو یا چند آنتی‌بیوتیک و مهارکننده‌های پمپ پروتونی برای درمان

عفونت H.pylori انتشار جهانی دارد و در تمام گروه‌های سنی، ایجاد می‌شود. عفونت H.pylori با بیماری‌های گوناگونی مانند گاستریت، زخم پپتیک، سرطان معده و لنفوم MALT مرتبط است (۱). بیماری‌های مرتبط با هلیکوباکترپیلوری معمولاً بعد از

هلیکوباکتریلوری جدا شده از استان چهار محال و بختیاری می‌باشد.

روش بررسی

این پژوهش به صورت مقطعی، بر روی ۲۶۳ بیمار مراجعه‌کننده به بخش اندوسکوپي بیمارستان هاجر شهرکرد در تابستان ۱۳۸۶ انجام شد. پس از انجام اندوسکوپي نمونه‌های بیوپسی در فسفات بافر سالین (PBS) جمع‌آوری و در دمای پایین به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد منتقل و در تمامی موارد داده‌های مربوط هر کدام از نمونه‌های تهیه شده در پرسشنامه تنظیمی ثبت گردید. سپس نمونه‌ها بر روی محیط بروسلا آگار حاوی ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند واجد وانکومایسین (۶mg/L)، تری متوپریم (۵ mg/L) و آمفوتریسین B (۲ mg/L) کشت داده شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در شرایط میکروآتروفیل گرمخانه‌گذاری گردید. تعیین هویت مقدماتی کلنی‌های رشد یافته با آزمون اوره آز، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز انجام گردید. سپس برای شناسایی وجود ژن ureC (۹) و تایید کلنی‌های جدا شده استفاده شد از آزمون PCR استفاده شد (جدول ۱).

این عفونت به کار می‌رود (۳ و ۲). مهمترین عاملی که موفقیت رژیم‌های درمانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد مقاومت دارویی است. مقاومت به کلاریترومایسین موجب کاهش ۷۰٪ میزان حذف باکتری در رژیم درمانی و در نتیجه کاهش کفایت درمان می‌شود (۴). کلاریترومایسین به ناحیه پپتیدیل ترانسفراز ۲۳SrRNA زیر واحد بزرگ ریبوزوم باکتری متصل می‌شود و فرآیند پروتئین‌سازی را مهار می‌کند. مقاومت به کلاریترومایسین نتیجه تغییرات ساختمانی در این ناحیه می‌باشد. این تغییرات موجب کاهش تمایل اتصال کلاریترومایسین به جایگاه هدف، ناحیه پپتیدیل ترانسفراز ریبوزوم باکتری و در نتیجه عدم مهار پروتئین‌سازی است و دلیل اصلی این تغییرات ساختاری جهش‌های نقطه‌ای ناحیه 23SrRNA می‌باشد (۵ و ۶). جهش‌های جایگزینی A به G در موقعیت‌های 2143 و ۲۱۴۲ به ترتیب فراوان ترین جهش‌های شناسایی شده در بین سویه مقاوم به کلاریترومایسین می‌باشد. همچنین جهش A2142C با فرکانس کمتری در سوی‌های مقاوم شناسایی شده است (۸ و ۷). هدف از این پژوهش، ارزیابی جهش‌های یاد شده در سویه‌های

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده به منظور شناسایی و ارزیابی مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتریلوری

ژن	پرایمر	آمپلیکون (bp)
23SrRNA	Cla 18: 5'-AGTCGGGACCTAAGGCGAG-3' Cla 21: 5'-TTCCCCTTAGATGCTTTCAG-3'	1400
23SrRNA	Cla 3 : 5'-AGTCGGGACCTAAGGCGAG-3' Cla 18: 5'-AGTCGGGACCTAAGGCGAG-3'	700
ureC	F: 5'- GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG-3' R: 3'- GCTTACTTTCTAACAACGCGC-3'	295

توسط آنزیم MboII نشان دهنده جهش A2142G و ایجاد سه قطعه ۳۰۰،۴۰۰ و ۷۰۰ جفت بازی توسط آنزیم BsaI (شکل ۱) نشان دهنده وجود جهش A2143G می باشد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده نشان داده شده است.

سپس روش PCR پس از مخلوط کردن با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط: حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Hot start)، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Annealing) و ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) انجام شد. به این منظور پنج نانوگرم DNA به مخلوط ۵۰ میکرولیتر (۲ میلی مولار) کلرید منیزیم، ۵۰ میکرو مولار dNTPs، یک میکرولیتر از هر پرایمر و ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq اضافه شد. در مرحله آخر ۱۰ میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ واجد اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه ترانس الیمیناتور مورد بررسی قرار گرفت. سپس نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS Ver14، آزمون مربع کای و آزمون دقیق فیشر آنالیز گردید. مرز معنی داری روی $p < 0/05$ قرار داده شد.

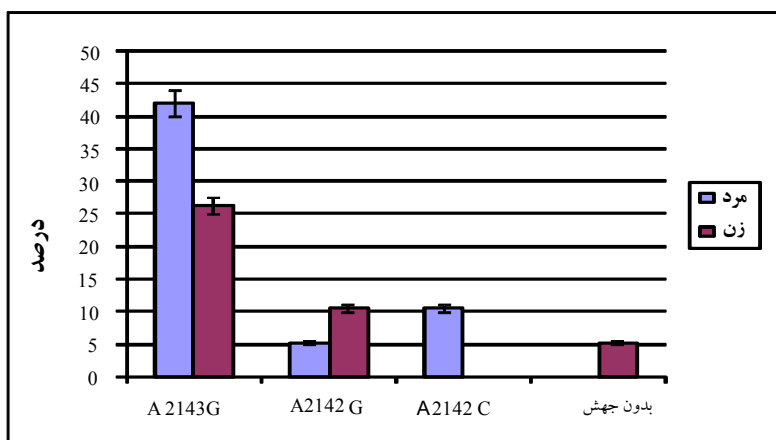
یافته‌ها

از کشت نمونه‌های بیوپسی بر روی محیط بروسلا آگار ۱۰۰ سویه (۳۸/۰۲٪) *H. pylori* با روش‌های اوره آز، کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم شناسایی گردید، اما با روش PCR فقط در ۸۴ (۳۱/۹۴٪) سویه ژن *ureC* شناسایی شد. با روش استاندارد دیسک دیفیوژن از ۸۴ سویه جدا شده، ۶۳ سویه حساس، ۱۹ سویه مقاوم (۲۲/۶۲٪) و دو سویه نیمه حساس (۲/۳۸٪)

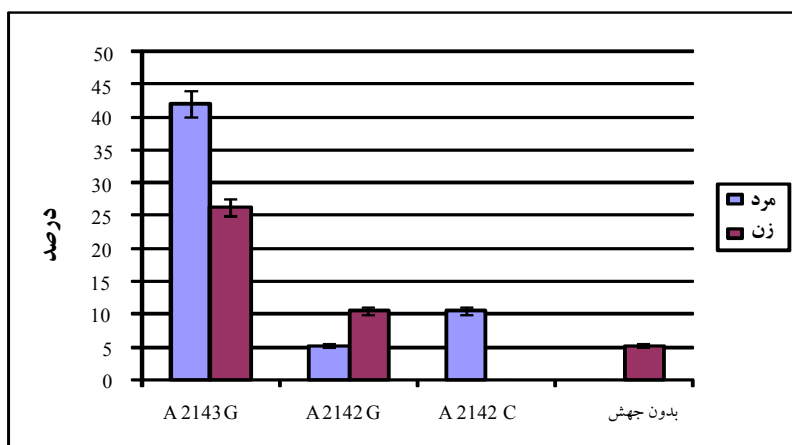
روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط: حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Hot start)، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Annealing) و ۴۷ درجه به مدت ۱ دقیقه (Extension) انجام شد. برای این منظور ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱۶/۷ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. پس از شناسایی و تایید هویت کلنی‌های هلیکوباکتر پیلوری آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI انجام گردید. تعیین حساسیت کلنی‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله‌ها و با توجه به دستور شرکت سازنده دیسک Himedia بررسی شد. سویه‌هایی که حداقل غلظت بازدارنده رشدشان بیشتر از ۴ میکروگرم در لیتر بود به عنوان مقاوم، سویه‌هایی که MIC کمتر از ۴ میکروگرم در لیتر داشتند به عنوان حساس و سویه‌های دارای MIC ۴ میکروگرم در لیتر به عنوان نیمه حساس در نظر گرفته شدند. استخراج DNA از باکتری‌های حساس، نیمه حساس و مقاوم به کلاریترومایسین با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام گردید. به منظور شناسایی جهش A2142C از زوج پرایمرهای Cla18 و Cla3 استفاده شد که در صورت تکثیر قطعه‌ای به طول ۷۰۰ جفت باز، نشان دهنده وجود این جهش می باشد. با استفاده از پرایمرهای Cla18 و Cla21 واکنش PCR به منظور تکثیر یک قطعه ۱۴۰۰ جفت بازی انجام گردید (۸). به منظور شناسایی جهش‌های A2142G و A2143G این قطعه با آنزیم‌های برش دهنده MboII و BsaI برش داده شد. ایجاد دو قطعه ۷۰۰ جفت بازی

مورد (۱۰/۵۳٪) جهش A2142C و یک مورد جهش ناشناخته شناسایی گردید (نمودار ۲). بین جهش A2143G و مقاومت به کلاریترومایسین ارتباط معنی داری وجود داشت (p < ۰/۰۱). در ۶۳ سویه حساس و ۲ سویه نیمه مقاوم به کلاریترومایسین هیچ نوع جهشی شناسایی نگردید. بین مقاومت به کلاریترومایسین سن، جنس و نوع بیماری ارتباط معنی داری وجود نداشت. بیشترین سویه‌های مقاوم جدا شده مربوط به شهرستان‌های شهرکرد و کوهرنگ به ترتیب با فراوانی ۳۶/۸۴٪ و ۲۶/۳۱٪ بود.

به کلاریترومایسین تشخیص داده شد (نمودار ۱). از ۱۹ سویه مقاوم به کلاریترومایسین، ۶ سویه (۳۱/۵۷٪) مبتلا به گاستریت، ۴ سویه (۳۱/۰۵٪) از بیماران مبتلا به زخم معده و ۷ سویه از افراد سالم جداسازی گردید. یک سویه نیمه مقاوم از یک بیمار مبتلا به گاستریت و یک سویه دیگر نیز از یک بیمار مبتلا به زخم معده جداسازی شد. در ۶۳ سویه حساس و ۲ سویه نیمه حساس به کلاریترومایسین هیچ نوع جهشی شناسایی نگردید. از ۱۹ سویه مقاوم ۱۳ مورد (۶۸/۴۲٪) جهش A2143G، ۳ مورد (۱۵/۷۹٪) جهش A2142G، دو



نمودار ۱: میزان درصد مقاومت به کلاریترومایسین با روش CLSI (n=84)



نمودار ۲: مقایسه جهش‌های ژن 23SrRNA در کشت‌های مقاوم به کلاریترومایسین



شکل ۱: نتایج حاصل از برش *Bsal* قطعه ۱۴۰۰ جفت بازی. ردیف شماره ۱ مربوط به سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی و در ردیف‌های ۲ تا ۷ قطعات ۳۰۰، ۴۰۰ و ۷۰۰ جفت بازی جهش A2143G نشان داده شده است.

بحث

میزان مقاومت را قبل از ورود این دارو به بازار مصرف در تهران ۱۷٪ گزارش نمودند (۱۴). اما در این پژوهش با روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI میزان مقاومت ۲۲/۶۲٪ شناسایی گردید. در سال ۲۰۰۵، Lee و همکاران حساسیت ۱۱۴ سویه جدا شده از بیماران ژاپنی را بررسی کردند. ۹۱ سویه (۷۹/۸۲٪) مقاوم و ۲۳ سوش (۲۰/۲٪) مقاوم به کلاریترومایسین بودند. مکانیسم مقاومت در این سویه‌ها با روش PCR-RFLP بررسی شد. جهش A2142G در ۲۰ سویه (۸۷٪) و جهش A2143G در ۳ سویه (۱۳٪) گزارش گردید (۱۵). Kato و همکارانش در سال ۲۰۰۲ با روش PCR-RFLP، مقاومت ۵۱ سویه جدا شده از بیماران ژاپنی را نسبت به کلاریترومایسین، ۲۴ درصد گزارش نمودند. از سویه‌های مقاوم مورد بررسی محققین یاد شده جهش A2142G را در ۱۱ سویه (۹۲٪) شناسایی کردند (۱۶). در سال ۱۳۸۲ برای اولین بار محمدی و همکارانش مکانیسم مقاومت به کلاریترومایسین را در تهران با روش PCR-RFLP بررسی کردند. این محققین جهش‌های A2143G، A2142G و A2142C را در ۷۵، ۵ و ۱۵ درصد از سویه‌های مقاوم شناسایی کردند (۱۴).

رژیم‌هایی که برای درمان عفونت *H. pylori* به کار می‌رود، ترکیبی از مهارکننده‌های پمپ پروتونی و دو یا چند آنتی‌بیوتیک است. کلاریترومایسین یکی از اصلی‌ترین رژیم‌های دارویی مورد استفاده برای درمان هلیکوباکتریلوری می‌باشد. به همین دلیل مقاومت به این دارو یکی از مهمترین عوامل تعیین‌کننده موفقیت یا شکست رژیم‌های درمانی است. در مورد مقاومت به کلاریترومایسین مطالعات زیادی صورت گرفته است. میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در نقاط مختلف دنیا متفاوت است. در سال ۲۰۰۲ Tracchio و همکاران در ایتالیا با روش رقت در آگار (agar dilution)، در سال ۲۰۰۰، Cuchi و همکاران در اسپانیا با روش E-test، در سال ۲۰۰۲ کیم و همکاران در کره با روش رقت در آگار (agar dilution) میزان مقاومت را به ترتیب ۲۳/۴۰٪، ۱۲/۹۰٪ و ۵/۹۰٪ گزارش کردند (۱۲-۱۰). در ایران مهاجری و همکارانش در سال ۱۳۸۱ در کرمانشاه با روش دیسک دیفیوژن میزان مقاومت در ۷۲ سویه *H. pylori* را ۸٪ گزارش کردند (۱۳). همچنین در سال ۱۳۸۲، محمدی و همکاران با روش دیسک دیفیوژن

اریترومایسین است. مقاومت ۲۲/۶۲٪ نسبت به کلاریترومایسین نشان‌دهنده مصرف زیاد ماکرولیدها ویژه اریترومایسین در منطقه مورد پژوهش می‌باشد. این میزان مقاومت اثرات زیادی بر کارایی رژیم‌های درمانی دارد. زیرا فراوانی سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین می‌تواند موجب انتخاب و تنوع بیشتر سویه‌های موتانت و بروز مقاومت ثانویه نسبت به این آنتی‌بیوتیک گردد. به همین دلیل تعیین مقاومت به این دارو قبل از تجویز رژیم‌های درمانی اهمیت زیادی دارد. بدین ترتیب رژیم‌های درمانی مناسب‌تر و کارآمدتر می‌گردد و همچنین از ایجاد مقاومت ثانویه نسبت به این دارو و نیز از تحمیل هزینه‌های اضافی درمان جلوگیری می‌شود. با روش مورد استفاده در این پژوهش امکان ارزیابی جهش‌های متداول مقاومت قبل از درمان و پس از درمان وجود دارد. بدین ترتیب امکان ارزیابی و شناسایی جهش‌های مرتبط با عدم کارایی رژیم‌های درمانی با کلاریترومایسین فراهم می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از پشتیبانی علمی این پژوهش از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد اعلام می‌دارند.

ما در این پژوهش مکانیسم مقاومت به کلاریترومایسین را برای دومین بار در ایران در استان چهارمحال و بختیاری مورد بررسی قرار دادیم. در این پژوهش ۸۴ کشت مقاوم و حساس به کلاریترومایسین از نظر وجود و عدم وجود جهش‌های مرتبط با مقاومت به کلاریترومایسین مورد بررسی قرار گرفت. اما در سویه‌های حساس و دو سویه نیمه مقاوم جدا شده جهش‌های مورد نظر شناسایی نشد. از ۱۹ کشت مقاوم به کلاریترومایسین، ۱۳ مورد جهش A2143G (۶۸/۴۲٪)، ۳ مورد جهش A2142G (۱۵/۷۹٪)، ۲ مورد جهش A2142C (۱۰/۵۳٪) شناسایی گردید. اما در یک سویه مقاوم جهشی شناسایی نشد. این مسأله نشان می‌دهد که جهش دیگری در این سویه وجود دارد که قابل شناسایی با پرایمرهای مورد بررسی نمی‌باشد. در این بررسی ارتباط معنی‌داری بین جهش A2143G و مقاومت به کلاریترومایسین گزارش گردید. در تحقیقات انجام گرفته فراوان‌ترین جهش شناسایی شده مقاومت کلاریترومایسین، جهش A2143G (۶۸/۸۰٪) با میزان شیوع ۵۳ تا ۹۵ درصد است. همچنین جهش A2142G (۱۱/۷۰٪) و جهش A2142C (۲/۶۰٪) به ترتیب فراوان‌ترین جهش‌های گزارش شده می‌باشند (۱۷). مهمترین عامل در ایجاد مقاومت به کلاریترومایسین مصرف قبلی ماکرولیدها به ویژه

References

1. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. N England J Med 2002; 347: 1175-1186.
2. Cavallaro LG, Egan B, O Morain C, Di Mario F. Treatment of helicobacter pylori infection. Helicobacter 2006; 11: 36-39.
3. Gasbarrini A, Ojetti V, Armuzzi A, Branca G, Canducci F, Torre ES et al. Efficacy of a multistep strategy for Helicobacter pylori eradication. Aliment Pharmacol Ther 2000; 14: 79-83.
4. Collins J, Ali-Ibrahim A, Smoot D. Antibiotic therapy for Helicobacter pylori. Med Clin N Am 2006; 90: 1125-1140.
5. Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitution in 23SrRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1-12.

6. Ribeiro ML, Vitiello L, Miranda MC, Benvenuto YH, Godoy AP, Mendonca S, and et al. Mutations in the 23SrRNA gene are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori isolates in Brazil. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003; 2: 1-11.
7. Versalovic J, Shortridge D, Kliber K, Griffy M, Beyer J, Flamm R, et al. Mutation in 23SrRN are associated with clarithromycin resistance in Helicobacter pylori. *Antimicrob Agent and Chemother* 1996; 40: 477-480.
8. Alarcon T, Vega AE, Domingo D. Clarithromycin resistance among Helicobacter pylori strains isolated from children: prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-RFLP analysis. *Clinical Microbiology* 2003; 41: 486-488.
9. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, and et al. Comparison of three PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World Journal of Gastroenterology* 2004; 13: 1958-1960.
10. Toracchio Sonia and Marzio Leonardo. Primary and secondary antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains isolated in central Italy during the years 1998-2002. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 541-545.
11. Cuchi B, Bordera F, Riera Q, Lite Lite J, Alemany J. Evaluation of the sensitivity of 23SrRNA strains of Helicobacter pylori from 1995 to 1998 and impact of antibiotic treatment. *Infect Microbiol Clin* 2002; 20: 157-160.
12. Kim J, Kang J, JO Eun, CS Han DS, Cho TY. Mutation in 23SrRNA gene of Helicobacter pylori associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 599-603.
13. Mohajeri P, Navabi J, Salimi GH, Ghamari M, Abdoli GH. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori through gastric biopsy in Imam Khomeini hospital, Kermanshah. *YAFT-E Summer* 2004; 6: 9-18.
14. Mohhamadi M, Doroud, Massarat S, Farahvash Mj. Clarithromycin resistance in Iranian H.pylori strain before introduction of clarithromycin. *Helicobacter* 2003; 8: 79-80.
15. Lee J.G, Shin J.H., Roe I.H, Sohn S.G, Lee J.H, Kang G.H, et al. Impact of clarithromycin resistance in infected adults. *Antimicrob Agent and Chemotherapy* 2005; 49: 1600-1603.
16. Kato S, Fujimura S, Udagawa H, Shimizu T, Maisawa S, Ozawa K, et al. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains in Japanese children. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 649-653.
17. Megraud F. Helicobacter pylori antibiotic resistance: Prevalence, importance and advance in testing. *Gut* 2004; 53: 1374-1384.