جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره ۱ بهار ۱۳۸۸، صفحات ۳۰- ۲۵

ارزیابی نقش موتاسیون ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت نسبت به مترونیدازول در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*

محمد کارگر [*1] ، مریم باقرنژاد[1]، عباس دوستی[2]

۱) گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم
۲) گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد
نویسنده رابط: محمد کارگر ، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم
همراه : ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ microkargar@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۳/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۰/۱۲

چکیده:

زمینه و اهداف: برای درمان زخم معده ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* ، مترونیدازول یکی از آنتی بیوتیک‌های کلیدی است. هدف از این مطالعه تعیین میزان مقاومت سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* به مترونیدازول با روش دیسک دیفیوژن و ارزیابی نقش ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت به مترونیدازول بود.

روش بررسی: این مطالعه مقطعی – توصیفی در سال ۱۳۸۶ بر روی ۲۶۳ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد . *هلیکوباکتر پیلوری* با روش رنگ آمیزی گرم ، اوره آز، کاتالاز ، اکسیداز و PCR تعیین هویت شد. برای ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. در انتها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ، غیرفعال شدن ژن *rdxA* در اثر موتاسیون در سویه‌های مقاوم و نیمه حساس به مترونیدازول ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ازتست دقیق فیشر استفاده شد.

یافته ها: از ۸۴ سویه جدا شده ۴۹ سویه مقاوم (۵۸/۳۳) و ۷ سویه نیمه حساس (۸/۳۳) شناسایی شد . در دو سویه مقاوم (۴٪) ، حذف ۲۰۰ جفت بازی در ژن *rdxA* مشاهده گردید. با آزمون آماری مشخص شد که بین مقاومت به مترونیدازول و علایم بالینی ($P>0.05$)و همچنین حذف ژن *rdxA* ($P>0.05$)ارتباط معنی دار وجود ندارد .

نتیجه گیری: با توجه به فراوانی اندک میزان موتاسیون در ژن *rdxA* ، ارزیابی سایر مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به مترونیدازول به نظر ضروری می‌رسد.

کلید واژه ها: *هلیکوباکتر پیلوری* ، مترونیدازول، مقاومت ، ژن *rdxA*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

درمان عفونت *هلیکوباکترپیلوری* بر اساس رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی است، که ترکیبی از مهارکننده‌های پمپ پروتونی و آنتی بیوتیک‌ها می‌باشند . مترونیدازول یکی از مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌هایی است که در این رژیم‌ها به کار می‌رود. مهم‌ترین عامل شکست این رژیم‌های درمانی مقاومت دارویی است (۱). مکانیسم‌های زیادی در مورد مقاومت به مترونیدازول وجود دارد که مهم‌ترین آنها شامل پمپ یونی (efflux) ، جهش در ژن NADPH غیر حساس به اکسیژن (*rdxA*) ، فلاوین اکسیدوردوکتاز(*frxA*)، پروتئین‌های شبه فری دوکسین (*fdxA* و *fdxB*) و پیروات اکسیدوردوکتاز (*porA,porB*) است. از بین مکانیسم‌های یاد شده مهم‌ترین مکانیسم گزارش شده، غیرفعال شدن ژن *rdxA* می‌باشد (۲) . به منظور دستیابی به حداکثر میزان حذف عفونت *هلیکوباکترپیلوری* آگاهی از میزان حساسیت ضد میکروبی سویه‌های جدا شده در هر منطقه ضروری است. برای اولین بار Ossenokop و همکارانش در سال۱۹۹۹ در کشور هلند ،غیرفعال شدن ژن *rdxA* را در ایجاد مقاومت به مترونیدازول مورد ارزیابی قرار دادند (۳). Kown در ایالت متحده امریکا (۲۰۰۰) و Kato در ژاپن (۲۰۰۲) هم نشان دادند که جهش در ژن *rdxA* مهم‌ترین عامل ایجاد مقاومت به مترونیدازول است(۴و۵) . مقالات نمایه شده در سایت‌های معتبر (SID و ISI) نشان می‌دهد که مطالعه بر روی تعیین مقاومت هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول در ایران مربوط به روش‌های دیسک دیفیوژن و یا حداقل غلظت بازدارنده (MIC) است . هدف از این مطالعه، ارزیابی نقش ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری بود.

مواد و روش ها:

این مطالعه مقطعی- توصیفی در تابستان ۱۳۸۶ بر روی بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد. بیماران به خاطر مشکلات گوارشی مانند درد شکم ، حالت‌های تهوع و غیره به پزشک مراجعه کرده بودند. پس از معاینه، پزشک متخصص انجام اندوسکوپی را جهت درمان ضروری تشخیص داد . قبل از انجام اندوسکوپی مشخصات دموگرافیک بیماران (از قبیل جنس ،سن ، سابقه مصرف دارو و غیره) ثبت گردید. برای انجام اندوسکوپی از دستگاه ویدیواندوسکوپ مدل الیمپوس استفاده شد . از هر بیمار سه نمونه بیوپسی از قسمت آنتروم معده جمع‌آوری شد .یک قطعه بیوپسی به لوله‌های آزمایش اوره‌آز برای انجام تست اوره آز سریع(RUT) منتقل گردید. سپس برای کشت و آزمون PCR یک قطعه از نمونه بیوپسی به ویال‌های جداگانه حاوی فسفات بافر سالین استریل(PBS) اضافه شد . نمونه‌ها در دمای پایین و در کمتر از سه ساعت به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروب شناسی و بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال داده شد . برای کشت نمونه‌ها از محیط بروسلاآگار حاوی ۱۰٪ خون گوسفند واجد وانکومایسین(۶mg/L) ، تری متوپریم (۵mg/L) وآمفوتریسین B (۲mg/L) استفاده شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه گذاری گردید . تعیین هویت مقدماتی کلنی‌ها با آزمون اوره‌آز ،رنگ‌آمیزی گرم ،تست کاتالاز و اکسیداز انجام گردید. از کلنی‌های جدا شده، استخراج DNA با روش boiling انجام شد. به منظور استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی از کیت استخراج DNA ساخت شرکت فرمنتاز (لیتوانی) استفاده گردید . سپس برای شناسایی وجود ژن *ureC* در نمونه‌های بیوپسی و نیز تایید کلنی‌های جدا شده از آزمون PCR استفاده شد (۶) . روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط : حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه (Hot start)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه(Denaturation) ، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه(Annealing)، ۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) انجام شد. برای این منظور ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X ،۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار) ، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار) ، ۲/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱۶/۷میکرولیتر آب مقطر اضافه شد . پس از شناسایی و تایید هویت کلنی‌های *هلیکوباکتر پیلوری*، آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) انجام گردید. میزان حساسیت کلنی‌ها به مترونیدازول با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشدها با توجه به دستور شرکت سازنده دیسک(Himedia , India)بررسی شد.

استخراج DNA از باکتری های حساس ،نیمه حساس و مقاوم به مترونیدازول با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد. از پرایمرهای *rdxA1* و *rdxA2* (جدول۱) به منظور ارزیابی میزان مقاومت به ژن *rdxA* استفاده شد . تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی نشان دهنده حذف ۲۰۰ جفت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بازی در ژن *rdxA* و تکثیر قطعه ۸۰۰ جفت بازی نشان دهنده عدم ارتباط ژن *rdxA* با مقاومت به مترونیدازول است (۵ و۶).

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ازتست دقیق فیشر استفاده شد.

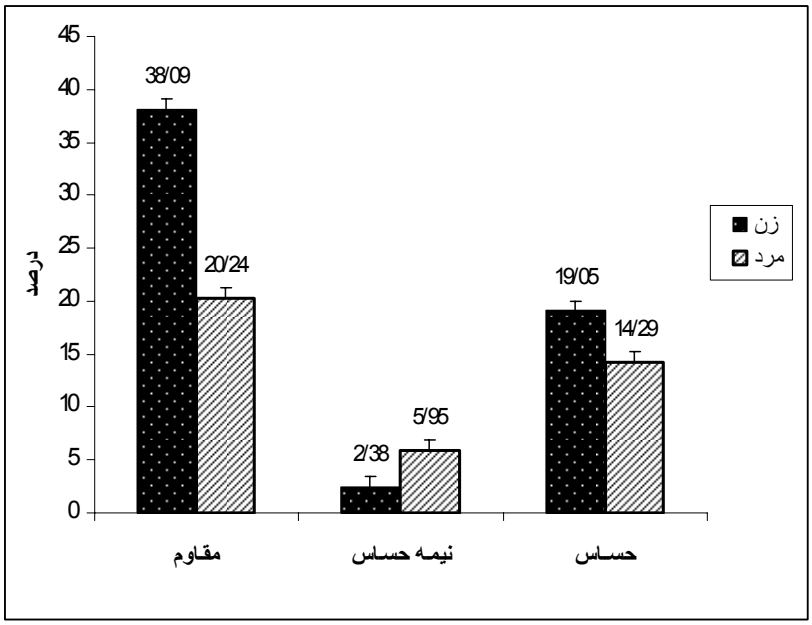
جدول ۱ : پرایمرهای مقاومت به مترونیدازول در *هلیکوباکتر پیلوری*

ژن	پرایمر	آمپلیکون (bp)
ureC	F : 5' - GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG- 3' R :5' – GCT TAC TTT CTA ACA ACG CGC- 3'	295
rdxA	RdxA1 : 5' – AATTTGAGCATGGGGCAGA-3' RdxA2 : 5' – GAAACGCTTGAAAACACCCCT-3'	800

یافته‌ها:

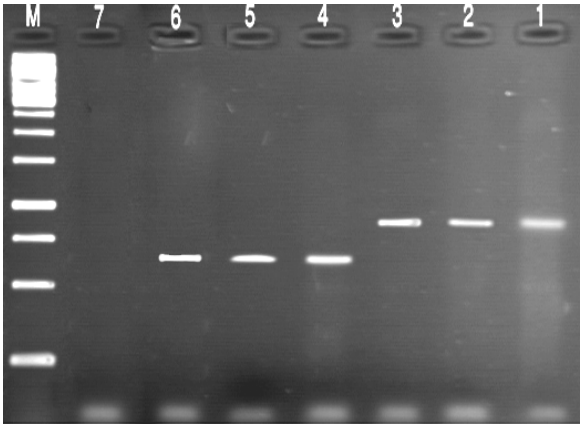
در این مطالعه، ۲۶۳ نفر بررسی شدند. از این تعداد ۱۵۷ زن(۵۹/۷۰٪) ، با میانگین سنی ۴۶/۸۳ سال و ۱۰۶ مرد(۴۰/۳۰٪) با میانگین سنی ۴۷/۲۱ سال بودند . جوان‌ترین بیمار ۱۲ سال و مسن‌ترین ۸۶ سال سن داشت . در گروه سنی ۴۰ تا ۵۰ سال بیشترین تعداد (۲۴/۷۰٪) و در گروه سنی ۸۰ تا ۹۰ سال کمترین تعداد (۱/۱۴٪) قرار داشتند. آزمون مربع کای نشان داد بین تعداد بیماران و گروه‌های سنی مختلف ارتباط معنادار وجود دارد (P=0.007). بین گروه‌های سنی و جنسیت بیمار ارتباط معنا دار مشاهده نشد (P=0.324). از مجموع نمونه‌های بیوپسی مورد بررسی با روش PCR ،تعداد ۲۲۳ نفر (۸۴/۸ ٪) از بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری بودند . از کشت ۲۶۳ نمونه بیوپسی بر روی محیط انتخابی بروسلاآگار ۱۰۰ سویه (۳۸٪) از طریق تست های اوره‌آز، کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم شناسایی شد. پس از انجام PCR، ۸۴ سویه (۸۴٪) تایید شدند.

از کل نمونه‌های مثبت شناسایی شده با روش PCR، ۴۹ نمونه (۵۸/۳٪) مربوط به بیماران زن و ۳۵ نمونه (۴۱/۷٪) مربوط به بیماران مرد بود . از ۸۴ سویه شناسایی شده، ۴۹ سویه مقاوم (۵۸/۳٪) به مترونیدازول و ۷ سویه نیمه حساس (۸/۳٪) شناسایی گردید(نمودار۱). ۴۹ سویه جدا شده (از ۳۲ زن و ۱۷ مرد) مقاوم به مترونیدازول بودند. با آزمون دقیق فیشر مشخص گردید که بین مقاومت به مترونیدازول و جنس مونث ارتباط معنی داری وجود دارد(P=0.043).



نمودار۱ : درصد مقاومت *هلیکوباکتر پیلوری* به مترونیدازول با روش دیسک دیفیوژن به تفکیک جنسیت بیماران

از مجموع سویه‌های مقاوم به مترونیدازول در دو سویه حذف در ژن *rdxA* شناسایی شد (شکل ۱) . در هیچکدام از سویه‌های نیمه حساس به مترونیدازول حذف ژن *rdxA* مشاهده نشد .



شکل ۱: الکتروفورز محصول **PCR** ژن ***rdxA*** . ستون های ۱ تا ۳ قطعه ۸۰۰ جفت بازی سویه‌های مقاوم (فاقد جهش) ، ستون‌های ۴ و ۵ قطعه ۶۰۰ جفت بازی سویه‌های مقاوم (دارای جهش) ، ستون ۶ کنترل مثبت ، ستون ۷ کنترل منفی و ستون ۸ سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی را نشان می دهد

بحث:

مترونیدازول یک نیتروایمیدازول سنتتیک و یکی از داروهای مهم رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی درمان عفونت های ناشی از *هلیکوباکترپیلوری* است . ظهور سویه‌های مقاوم به مترانیدازول مهم‌ترین مسأله در درمان عفونت *هلیکوباکترپیلوری* است . از نظر بالینی مقاومت به مترونیدازول بسیار مهم است، زیرا موجب کاهش ۵۰ درصدی رژیم‌های درمانی می‌شود. میزان مقاومت به مترونیدازول با توجه به ناحیه جغرافیایی و موقعیت بیماران از ۱۰ تا ۹۰ درصد متفاوت است . در کشورهای در حال توسعه میزان مقاومت بالاست که احتمالا به علت استفاده مکرر از این دارو در درمان عفونت‌های ناشی از پروتوزاها است (۷). میزان مقاومت در مکزیک ، برزیل و سنگاپور به ترتیب ۷۶/۳درصد ، ۵۳ درصد و ۶۲/۷ درصد می باشد(۱۰-۸) . میزان مقاومت در کشورهای توسعه یافته کمتر از کشورهای در حال توسعه است . به عنوان مثال میزان مقاومت در آلمان ، ایتالیا و پرتغال به ترتیب ۲۶/۲۰درصد ، ۳۲٪ درصد و ۱۴/۹۰ درصد گزارش شده است (۱۳-۱۱). در ایران مقاومت به مترونیدازول بسیار شایع است. به طوری که ۴۶ تا ۵۱ درصد از سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* به این دارو مقاومند. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان مقاومت در سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* جدا شده از شهرکرد (۵۸/۳۳درصد) ، مطابق با میزان مقاومت در کشورهای در حال توسعه است . محمدی و همکاران با روش دیسک دیفیوژن در سال ۱۳۸۲ در تهران میزان مقاومت را ۶۰ درصد گزارش کردند. همچنین مهاجری و همکاران در کرمانشاه در سال ۱۳۸۲ با روش یاد شده میزان مقاومت به مترونیدازول را ۳۴ درصد گزارش نمودند (۱۴) . میزان مقاومت در مناطق مختلف دنیا با توجه به الگوی استفاده از نیتروایمیدازول‌ها به خصوص مترونیدازول متفاوت است (۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان مقاومت به مترونیدازول در زنان و مردان یکسان نیست. در این بررسی میزان مقاومت در زنان بیشتر از مردان بود. این مسأله ممکن است به خاطر تجویز نیتروایمیدازول‌ها به ویژه مترونیدازول در درمان عفونت حاصل از باکتری‌های بی هوازی در زنان باشد.

مترونیدازول برای فعال شدن بایستی به شکل متابولیت سمی احیا شود. چندین نیتروردوکتاز توسط *هلیکوباکترپیلوری* بیان می‌شود که یکی از مهم‌ترین نیتروردوکتازهای *هلیکوباکترپیلوری*، NADPH غیرحساس به اکسیژن است که به وسیله ژن *rdxA* رمزدهی می شود (۴) در پروتوزاها و باکتری‌های پاتوژن ، احیای گروه نیترو برای فعال شدن احیایی و به دنبال آن تشکیل حدواسط های هیدروکسیل آمین ضروری است. در واقع به خاطر ایجاد حدواسط‌های احیایی غیر پایدار است که آسیب ، شکست و باز شدن مارپیچ DNA و در نهایت مرگ سلول باکتری ایجاد می‌شود (۱و۴). مهم‌ترین مکانیسم‌های پیشنهاد شده در مورد مقاومت به مترونیدازول، حذف رادیکال‌های سمی اکسیژن توسط کاتالازها یا سوپراکسید دیسموتازهای تغییریافته،

مکانیسم ترمیم کارآمد DNA و فقدان عملکرد ردوکتازهای می‌باشد(۴). Goodwin و همکاران در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد کردند که اغلب مقاومت به مترونیدازول با جهش‌های نقطه‌ای در ژن *rdxA* رمزدهی کننده نیتروردوکتاز غیر حساس به اکسیژن در ارتباط است (۱۵) .

Kown و همکاران نقش سه ژن *rdxA* ، *frxA* و *fdxA* را در ایجاد مقاومت به مترونیدازول در ۵۴۴ سویه بالینی بررسی کردند. آنها نشان دادند که غیرفعال شدن ژن *frxA* مشابه غیرفعال شدن ژن *rdxA* و موجب افزایش MIC (تا ۳۲ میکروگرم در میلی لیتر) و غیر فعال شدن ژن *fdxB* باعث ایجاد مقاومت متوسط در سویه‌های مقاوم به مترونیدازول می‌شود(۱۶). در سال ۲۰۰۱ ، Jeong و همکاران نشان دادند که غیر فعال شدن ژن *frxA* موجب افزایش مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های حامل ژن ناقص *rdxA* می شود. اما اثر کمی بر حساسیت به مترونیدازول در سویه‌های حامل الل سالم و کارآمد *rdxA* می‌شود(۱۷).

علاوه بر این Yang وهمکارانش در سال ۲۰۰۴ ژن ناقص *rdxA* را در سویه های حساس به مترونیدازول شناسایی کردند (۱۸). Kim و همکارانش در سال ۲۰۰۹ ژن ناقص *frxA* را در سویه‌های حساس *هلیکوباکترپیلوری* شناسایی کردند . نتایج پژوهش این محققین با بررسی‌های Yang و Jeong و همکاران مطابقت داشت (۱۹) . در رابطه با نقش *rdxA* در ایجاد مقاومت به مترونیدازول بحث زیادی وجود دارد . Kown و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که جهش ژن *rdxA* در تمام سویه‌های مقاوم جدا شده از شمال امریکا وجود دارد . این در حالی است که در سال ۲۰۰۹ ، Kim و همکاران جهش‌های تغییر کدون را در سویه‌های مقاوم و حساس به مترونیدازول شناسایی کردند . تاثیر جهش بر حساسیت و یا مقاومت به مترونیدازول وابسته به تنوع ژنتیکی طبیعی (natural genetic diversity) سویه است . به همین دلیل حتی اثر جهش‌های مشابه با توجه به تنوع ژنتیکی طبیعی متفاوت خواهد بود. به عنوان مثال، جهش‌های تغییر کدون ممکن است فعالیت پروتئین حاصل را کاهش دهد در حالی که جهش‌های دیگر ممکن است تاثیر چندانی بر عملکرد پروتئین نگذارد. جالب توجه است که Kim و همکاران سویه‌های مقاوم با MIC بالا (بیشتر از ۲۵۶ میکروگرم در میلی لیتر) را که ژن سالم و کارآمد *rdxA* داشتند، جدا کردند (۱۹). این نتایج با بررسی Marais و همکاران مطابقت داشت . Marais و همکاران بیان کردند که مقاومت به مترونیدازول در *هلیکوباکترپیلوری* ممکن است مستقل از ژن‌های *rdxA* و *frxA* رخ دهد. بنابراین، امکان دارد مکانیسم‌های دیگری مانند *fdxA* (فری دوکسین) ، *fld* (فلاودوکسین) و... در مقاومت به مترونیدازول نقش داشته باشد (۲۰) . علاوه بر این Van Amestrang و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که جهش ژن‌های *HPO97* (پروتئین شبه Tol C) در ایجاد مقاومت به مترونیدازول نقش دارد(۲۱).

در این مطالعه نقش موتاسیون ژن *rdxA* در ایجاد مقاومت مترونیدازول ارزیابی شد. نتایج نشان دهنده میزان اندک موتاسیون ژن *rdxA* در سویه‌های مورد بررسی می‌باشد. اما با این روش امکان شناسایی سایر مکانیسم‌های یاد شده وجود نداشت. بنابراین، به منظور شناسایی دقیق‌تر موتاسیون حذفی ، تعیین توالی ژن *rdxA* سویه‌های جدا شده و ارزیابی سایر مکانیسم‌های مقاومت به مترونیدتزول در پژوهش‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد .

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که به دلیل میزان بالای مقاومت نسبت به مترونیدازول در بیماران مورد پژوهش ضرورت جایگزینی آن با سایر آنتی بیوتیک‌ها در رژیم‌ها درمانی وجود دارد . با توجه به فراوانی اندک موتاسیون ژن *rdxA* سویه‌های مقاوم به مترونیدازول در شهرکرد، ارزیابی سایر مکانیسم‌های مقاومت به منرونیدازول از طریق کاهش جذب به‌واسطه پمپ‌های یونی ، بیان بیش از حد پروتئین ترمیمی RecA و بررسی جهش در سایر نیتروردوکتازها مانند *frxA* در پژوهش‌های بعدی در منطقه مورد پژوهش و سایر مناطق کشور پیشنهاد می‌گردد .

تقدیر و تشکر:

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل پشتیبانی اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می‌دارند .

فهرست مراجع:

1.Canton R ,Argilia C, Rafael L , Baquero F. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* .*Rev Med Microbio* 2001;**12** : 47-61.

2. Collins, J,Ali-Ibrahim A, Smoot DT .Antibiotic therapy for *Helicobacter pylori* .*Med Clin Am* 2006;**90**:11-25.

3. Ossenkopp YJ, Pot RGJ , Westerloo DJ, Goodwin A, Grauls CMJE, Berg D. Insertion of mini- IS605 and deletion of adjacent sequence in the nitroreductase (*rdxA*) gene causes metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637 .*Antimicrob Agents Chemother*1999;**11**:2657-2662.

4. Kown DH, EL-Zataari F.K , Kato M. , Osato M, Reddy R ,Yamaoka Y. Analysis of *rdxA* and involvement of additional gene encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*frxA*) and ferredoxin-like protein (*fdxB*) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;**44** :2133- 2144

5. Kato S,Fujimura S , Udagawa H,Shimizu T, Maisawa S,Ozawa K,Linuma K. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanes Children J *Clinic Microbiol* .2002; **40**:649-653.

6. Smith SI ,Oyedeji KS, Arigbabu AO,Cantet F, Megraud F,Ojo O *et al* . Comprasion of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens.*World J Gastrol* 2004;**10**(13):1958-60.

7. Cavallaro L.G,Egan B,O'Morain C,Di Mario F. Treatment of *Helicobacter pylori* infection .*Helicobacter* , 2006;11:36-39.

8. Torres J , Camorlinga-Ponce M , Perez Perez G , Garaza A.M , Dehesa M , Gonzale V , *et al* .Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico . J *Clini Microbiol* , 2001 ;**39**: 2677-2680.

9. Prazeres Magalhaes , De Magalhaes D.M , Compos Barbosa D.V , Aguiar Rocha G , Nogueria Mendes , Santos A *et al* . *H.pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil . *Antimicrob Agents Chemother* , 2002;**46**(6):2021-2023.

10. Teo E.K , Fock K.M , Ng .M, Khor J.L , Tan A.L . Mertronidazole – resistant *Helicobacter pylori* in an Urban Asian population . *Gastroentrol Hepatol* , 2002, **15:**494-497 .

11. Wolle K, Leodolter A, Malfertheiner P , Konig W .Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori* in Germany : stable primary resistance from 1995 to 2000.J *Med Microbiol* 2000 ; **51**:705-709.

12. Toracchio S, Marziol L . 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.

13. Cuchi Burgos E , Forne Bardera M , Qulntana Riera S , Lite Lite J , Garau Alemany J . Evolution of the sensitivity of 235 strains of the *Helicobacter pylori* from 1995 to 1998 and impact of antibiotic treatment . *Enferm Infect Microbiol Clin* .2002;20 :157-160 .

۱۴. مهاجری پ، نوابی ج ، سلیمی ق ، قمری م ، عبـدلی غ . میزان مقاومت آنتی بیوتیکی *هلیکوباکترپیلوری* بدست آمده از بیوپسی معده مراجعین به بیمارستان امام خمینی (ره) کرمانشاه ، *فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی لرستان*، سال ۱۳۸۳، شـماره ۲۱ . صص ۱۸-۹ .

15. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJO, Berg DE , Hoffman PS .Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutation in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol* 1998; 28:383-393.

16. Kown DH, Pena J, Osato MS, Fox G , Graham DY , Versalovice J .Frameshift mutations in *rdxA* and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates . *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **46:793**-796.

17. Jeong JY, Mukhopadhyay AK, Akada H, Fox J, Hoffman P, Berger D .Role of *frxA* and *rdxA* nitroreductase of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to Metronidazole . *J Bacteriol* 2001; **183**:5155-5162.

18. Yang Y.J , Wu J.J ,Sheu B.S , Kao A.W , Huang A . The *rdxA* gene plays a more major role than *frxA* gene mutation in high-level metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan .*Helcobacter* , 2004 ;9:400-407 .

19. Kim S.Y , Joo Y M , Lee H S ,Chung I , Yoo Y J , Merrel D.S *etal* . Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional *rdxA* . *J Antibiotics* , 2009 ; 62:43-50 .

20. Marais A , Mendz G.L , Hazell S.L , Megraud F . Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori* : the genome era . *Microbiol Mol Biol Rev* , 1999;63:642-647.

21. van Amesterdam K , Bart A and van der Ende A.A . *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole . *Antimicrobe Agents Chemother* , 2005**;49**:1477-1482.