ORIGINAL ARTICLE

Presence of CagA Gene and Its Antibiotic Resistance Pattern in Helicobacter Pylori Isolates

Mohammad Shokrzadeh[1],
Ismail Fattahi[2],
Abbas Mohammadpour[3],
Amir Hosein Mashhadban[4]

[1] Associate Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, School of Agriculture and Food Industry, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran
[3] PhD Student in Cell and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] MSc in Microbiology, Imam Khomeini Hospital, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 5, 2017 Accepted September 25, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Helicobacter pylori* is one of the most prevalent agents causing gastric infection. Most of the type I strains genome containing cag pathogenicity island (i.e. cagA) result in peptic ulcer and gastric cancer. Antibiotics are amongst the main treatments but drug resistance may cause treatment failure. The aim of current research was to investigate the presence of cagA in *H. pylori* samples and their antibiotic resistance patterns.

Materials and methods: A descriptive study was performed in 86 patients. The endoscopy specimen was used fosr rapid urease test and culture and preparation of paraffin blocks to observe lam of tissue and performing PCR method. Samples were grown in standard media and grown colonies in culture medium were identified using catalase and oxidase tests. Antibiotic susceptibility tests were performed by antibiogram.

Results: In this study, the rapid urease test, tissue lam observation, culture results and PCR analysis were positive in 45.3%, 53.4%, and 55.9%, and 80.2%, respectively. CagA gene was detected in 69.56% of the samples. Among patients with positive culture, highest rates of resistance were found to metronidazole, amoxicillin, ciprofloxacin, clarithromycin, and furazolidone, while the lowest rate of resistance was to tetracycline.

Conclusion: Compared with other methods, PCR analysis was found to be more appropriate. Current study showed that *H. pylori* strains in Iran are increasingly resistant to clarithromycin, and furazolidone, and metronidazole.

Keywords: gastric cancer, antibiotic resistance, Microaerophile, *Helicobacter pylori*, CagA

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (154): 60-72 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۴ آبان سال ۱۳۹۶ (۷۲-۶۰)

بررسی حضور ژن cagA و الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران

محمدشکرزاده[۱]
اسماعیل فتاحی[۲]
عباس محمدپور[۳]
امیرحسین مشهدبان[۴]

چکیده

سابقه و هدف: یکی از عوامل شایع ایجاد عفونت معده باکتری هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. سویه‌های تایپ Iاین باکتری که در ژنوم آن‌ها جزیره پاتوژنیسیته **cag** وجود دارد.، بیش‌تر منجر به زخم‌های پپتیک و سرطان می‌گردند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از راه‌های درمان این عفونت می‌باشد. و مقاومت دارویی یکی از عوامل شکست درمان است. هدف از این مطالعه بررسی وجود ژن **cagA** و تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه توصیفی، بر روی ۸۶ بیمار انجام شد. نمونه اندوسکوپی جهت انجام تست اوره آز سریع و کشت و تهیه بلوک پارافینه به منظور مشاهده‌ی لام بافتی و انجامPCR صورت گرفت. نمونه در محیط‌های استاندارد کشت شد و کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت، با استفاده از تست کاتالاز و اکسیداز تعیین هویت گردیدند. تست‌های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی با روش آنتی‌بیوگرام انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه تست اوره آز سریع ۴۵/۳ درصد، مشاهده‌ی لام بافتی ۵۳/۴ درصد و انجام کشت ۵۵/۹ درصد افراد مثبت می‌باشد. و هم‌چنین تست PCR، ۸۰/۲ درصد موارد مثبت بیماران را به خود اختصاص داد. ۶۹/۵۶ درصد از نمونه‌های مثبت روش PCRدارای ژن cagA بودند. از بین بیماران مراجعه‌کننده کشت مثبت، به ترتیب بیش‌ترین مقاومت به مترونیدازول، آموکسی سیلین، سیپروفلوکساسین، کلاریترومایسین و فورازولیدون، و کم‌ترین مقاومت به تتراسایکلین می‌باشد.

استنتاج: در این مطالعه، روش PCR مناسب‌تر از روش‌های تشخیصی دیگر می‌باشد. مقایسه اطلاعات این مطالعه با مطالعات گذشته نشان می‌دهد که شیوع مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به کلاریترومایسین، فورازولیدون و مترونیدازول در ایران به شدت رو به افزایش است.

واژه های کلیدی: سرطان معده، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، میکروآئروفیل، هلیکوباکتر پیلوری، cagA

مقدمه

باکتری هلیکوباکتر پیلوری (Helicobacter pilori) (یک باکتری گرم منفی، متحرک، مارپیچی شکلی و بی‌هوازی می‌باشد. اما در شرایط هوازی نیز رشد می‌کند. این میکرو ارگانیسم از پاتوژن‌های عمده دستگاه گوارش محسوب می‌گردد(۱،۶). به‌طور متوسط پنجاه درصد از جمعیت دنیا و بیش از ۸۰ درصد جمعیت کشورهای در حال توسعه به عفونت گوارشی هلیکوباکتر پیلوری آلوده می‌باشند(۷،۸). امروزه

مولف مسئول: امیر حسین مشهدبان–ساری: خیابان امیر مازندرانی ،بیمارستان امام خمینی (ره) Email: amirhosein.mashhadban@gmail.com
۱. دانشیار، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۳. دانشجوی دکتری سلولی ومولکولی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری
۴. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۱۲/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۷/۳

مقاومت آنتی‌بیوتیکی هلیکوباکتر پیلوری به یک مشکل جهانی تبدیل شده است. و یک عامل مهم در تعیین نتیجه‌ی درمان می‌باشد. اگر چه هلیکوباکتر پیلوری به بیش‌تر عوامل ضد میکروبی در شرایط آزمایشگاهی حساس است، اما حذف این میکرو ارگانیسم در بدن مشکل می‌باشد. موثرترین درمان عفونت ناشی از این باکتری استفاده از درمان چند دارویی است. می‌باشد که شامل ترکیبی از کلاریترومایسین و مترونیدازول یا آموکسی‌سیلین به علاوه‌ی یک مهارکننده‌ی پمپ پروتون مثل امپرازول است(۹،۱). با این وجود عفونت مجدد گوارشی، در تعداد زیادی از بیماران درمان شده مشاهده می‌شود و عفونت مجدد، معضل مهمی برای درمان این بیماری محسوب می‌شود(۱۰،۹،۶).

در مورد نقش هلیکوباکتر پیلوری در بروز بیماری‌های گوارشی، تفاوت ژنوتیپ‌های مختلف مطرح شده است. و اعتقاد بر این است که ویرولانس سوش‌های مختلف این میکروارگانیسم برای ایجاد این عوارض متفاوت می‌باشد(۱۱).

cagAیکی از پروتئین‌های سطحی باکتری هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد که از قدرت ایمنی زایی بالایی برخوردار است و پس از ورود به سلول‌های اپی‌تلیال معده منجر به دوکی شدن سلول میزبان، و تداخل در سیستم‌های پیام‌رسانی سلول می‌شود. وجود ژن cagA با بروز بیماری‌هایی نظیر زخم دوازدهه، آتروفی مخاط و سرطان معده مرتبط می‌باشد(۱۲).

دو مطالعه در این زمینه نشان می‌دهد که تأثیر تهاجمی دو سوش دارای ژن‌های CagA(Cytotoxin-associated gene A) و VacA (Vacuolating toxin) بر سلول‌های اپی‌تلیال بیش‌تر است. چنان‌چه عده‌ای از محققان، ژن Cag A را دارای ویرولانس بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های Vac A، و مرتبط با کارسینوم معده دانسته‌اند(۱۵،۱۴). اما گروهی دیگرمعتقد اند، ژن VacA دارای ویرولانس بالاتری است(۱۷،۱۶). در حالی که از دیدگاه گروه سوم، تفاوت معنی‌داری میان ویرولانس این دو سوش یافت نشده است(۱۸). به نظر می‌رسد تفاوت منطقه جغرافیایی در بروز این تناقضات تأثیرگذار است(۱۹،۱۷،۱۳). این باکتری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی، سرطان معده و لنفوم می‌باشد. هم‌چنین عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در ارتباط با بیماری‌های غیرگوارشی نظیر بیماری‌های عروق مغزی و عروق کرونر قلب، فشار خون بالا، سر دردهای میگرنی، کهیر مزمن، استفراغ دوران بارداری و غیره گزارش شده است. شناسایی به موقع و صحیح این عامل باکتریایی کمک زیادی به درمان به موقع و زود هنگام آن می‌نماید(۱۰). بر اساس مطالعات انجام شده در ایران، میزان شیوع آلودگی در افراد ۳۵ تا ۵۵ سال بین ۸۸/۴ تا ۹۳ درصد، در افراد ۶ تا ۲۰ سال استان‌های اردبیل و یزد به ترتیب ۴۷/۵ و ۳۰/۶ درصد و در افراد ۱۰ تا ۲۵ سال شهر تهران ۴۴/۹ درصد گزارش کردند.

هدف از این مطالعه، بررسی وجود ژن cagAو تعیین الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت گوارشی حاصل از این میکرو ارگانیسم می‌باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی، با استفاده از برگه‌ی بیماران مراجعه‌کننده به بخش پاتولوژی بیمارستان امام ساری، تعداد ۸۶ نمونه طی فصل بهار تا اوایل تابستان ۱۳۹۵، با توجه به اطلاعات بیماران از جمله سن، جنس، علت مراجعه و سابقه‌ی بیماری جمع‌آوری گردید. که از این تعداد، ۴۷ نفر مرد ۳۹ نفر زن بودند. این بیماران بر اساس علائم، از جمله درد معده، زخم معده، التهاب معده، سوزش و احساس پری در معده، داشتن تومور و سرطان معده دسته‌بندی شدند.

نمونه در فرمالین برای تهیه ی لام و تشخیص استفاده شد. برای تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی از محیط مولر هینتون آگار (merck) استفاده گردید. با استفاده از کدورت ۰/۵ مک فارلند از سوسپانسیون باکتری مورد

نظـر، اسـتفاده شـد. و بـه محـیط تلقـیح گردیـد. و دیسـک‌هـای آنتـی‌بیـوتیکی کلاریترومایسـین، مترونیـدازول، آموکسـی سـیلین، تتراسـایکلین، سیپروفلوکساسـین و فورازولیـدون (Hi media) بـه فاصله 25 mmاز هم قرار داده و پلیت حاصل بـه مـدت ۷۲ ساعت در شـرایط میکـرو آئروفیلیـک در دمـای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. و سپس بـه بررسـی قطـر هاله عدم رشد پرداخته و با خط کش بر حسب میلی متـر انـدازه گیـری شـد.، سـپس جـدول علائـم بیمـاران مراجعه‌کننده در ارتباط با وجود ارگانیسم تهیه گردید.

برای تهیه‌ی محیط بروسلا آگار از شرکت merck، مقدار ۲۸ گرم از ماده به همـراه یـک لیتـر آب مقطـر بـه خـوبی هـم‌زده، و سـپس بـرای کامـل حـل شـدن آن از حرارت استفاده گردید. در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گـراد به مدت ۱۵دقیقه قرار داده شد و اتوکلاو گردید. سـپس آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسـین آمفوتریپسـین B و تـری متوپریم Himedia)) به ترتیب به مقدار ۲، ۶ و ۸ گرم در آب مقطر حل، و سپس به محیط اضافه شد.

خون دفیبرینه گوسـفندی (آزمـا پرشـین طـب) بـه میزان ۵ درصد به آن اضافه، سپس داخـل پلیـت‌هـا قـرار داده شد. و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. و از لحاظ عدم آلودگی میکروبی بررسـی شـد. سپس بیوپسی از بخش اندوسکوپی را بین دو لام تمیز له کرده و با سوآپ درون پلیت کشت داده شد. به مدت ۵ روز در انکوبـاتور CO_2 بـا میـزان ۵ درصـد در شـرایط میکروآئروفیلیک قرار گرفت. و سـپس کلنـی‌هـای ریـز شـفاف بـا تسـت کاتـالاز و اکسـیداز تاییـد شـدند. بـه طوری‌که ایجاد حباب برای تست کاتالاز و تولید رنـگ بنفش برای تست اکسیداز مثبت گـزارش گردیـد. بـرای تهیه محیط نوترینت براث، ۲۰ گرم پودر را با ۱ لیتر آب مقطر حل کرده سپس از حرارت، برای کامل حل شـدن اسـتفاده گردیـد. سـپس درون لولـه‌هـا انتقـال داده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقـه اتـوکلاو گردیـد. و لولـه‌هـا در دمـای ۴ درجـه درون یخچـال نگهداری شد. برای تهیه محیط مـولر، ۳۶ گـرم پـودر در یک لیتر آب مقطر حل، و تا مرحله شفاف شدن حرارت داده شد. هم‌چنین در دمـای ۱۲۱ درجـه و بـه مـدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید. سپس محیط را داخل پلیت‌ها قرار داده شد.

جهت استخراج DNA، برش بـافتی بـا ضـخامت ۱۰ میکرون از بیوپسی آنتروم تهیـه شـد، بـرش‌هـا در داخـل میکروتیوب ۱/۵ قرار گرفت. و بـرای اسـتخراج DNAاز کیت دنازیست(شرکت تکاپوزیست) استفاده، و مراحـل آن طبق پروتکل کیت عمل گردید.در این مراحـل ابتـدا ۱cc گزیلل ریخته، ۱۰ثانیه ورتکـس، و بعـد از ۵ دقیقـه صبر سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰rpmبه مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. این عمل ۳ بار انجام گردیـد. بـه منظـور پـارافین زدایـی بلـوک پارافینـه، محلـول رویـی را خـارج کـرده سپس جهت آب‌دهی به بافت از الکـل مطلـق ۸۰، ۶۰ و ۴۰ استفاده شـد. بـه ایـن ترتیـب کـه ۱ cc اتـانول مطلـق اضافه نموده و ورتکس گردید. و دوباره بـا دور و زمـان قبلی سانتریفیوژ نموده و سپس این کار به ترتیب با الکل ۸۰، ۶۰ و ۴۰ انجـام گردیـد. و در نهایـت بـا آب دو بـار تقطیر شده به میزان ۱ cc با دور و زمـان قبلـی سـانتریفوژ گردید. سپس بـافتی کـه در تـه تیـوب بـاقی مانـده را بـه تیوب استریل دیگر منتقل شد. برای لیز سلول از محلـول پریلیزیز بافر به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر به همراه ۲۰ میکرو لیتر ریبوتیناز برای هر تیوب استفاده شـد. و تیـوب‌هـا در دمای ۵۵ درجه به مدت ۱۸ ساعت انکوبه گردید.

۴۰۰ میکرو لیتر از محلول لیـز کننـده، بـه مـدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. و سـپس ۳۰۰ میکـرو لیتـر محلـول رسوب دهنده به مدت ۵ ثانیه ورتکـس کـرده و محلـول فوق را برای هـر تیـوب بـه سـتون انتقـال داده شـد. و بـه همراه لوله جمع کننده و بـا دور ۱۳۰۰۰rpm بـه مـدت ۱ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از این مرحلـه بـا اسـتفاده از محلول واش بافر ۱ به میزان ۴۰۰ میکرو لیتر تیوب‌ها را با دور ۱۳۰۰۰ rpm بـه مـدت ۱ دقیقـه سـانتریفوژ گردیـد. سـپس بـا اسـتفاده از محلـول واش بـافر ۲ بـا میـزان ۴۰۰

میکرو لیتر با دور rpm ۱۳۰۰۰ و مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ کرده و این مرحله (واش بافر ۲) با دور rpm ۱۳۰۰۰ مجددا سانتریفوژ گردید. سپس ستون را به تیوب استریل جدید انتقال داده شد. ۵۰ میکرو لیتر محلول الوشن بافر را انتقال داده، و تیوب‌ها را در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه کرده و با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱دقیقه سانتریفوژ گردید. ماده‌ی باقی مانده در ته تیوب DNA استخراج شده‌ی بافت مورد نظر ما است DNA .و آنزیم‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

DNA دارای غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانو گرم و کیفیت ۲-۱/۷، وارد آزمایش PCR گردید. و برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد(۳۴).

در تکنیک PCR، برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی بیماری که با تست اوره آز مثبت بودن آن تأیید شده بود استفاده گردید. سپس نمونه‌های DNA مثبت هلیکوباکتر پیلوری، از نظر حضور ژن‌های Cag A مورد بررسی قرار گرفت. به این‌صورت که از پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی ژن Cag A استفاده گردید (جدول شماره ۱). برای انجام هر PCR، نمونه‌ها داخل دستگاه PCR قرار داده شد. تا قطعات تکثیری مورد نظر به دست آید. پروتکل دمایی در دستگاه ترموسایکلر به ترتیب با استفاده از جدول شماره ۲ انجام گرفت.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهایی که برای ژن cagA طراحی شده‌اند

اندازه محصول PCR	توالی پرایمر	پرایمر
۵۶۱bp	5-TCT TGG AGG CGT TGG TGT AT-3	پرایمر Forward
	5- CTA GGC ATG ATT GGA ACG CC-3	پرایمر Reverce

جدول شماره ۲: پروتکل دمایی برای دستگاه ترمو سایکلر

Denaturing-1	در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه یک سیکل
	در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
Annealing-2	در دمای ۵۵/۵ درجه ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
Extension-3	در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه ۳۵ سیکل
	در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه یک سیکل

در هر آزمایش از نمونه کنترل مثبت و منفی و کنترل آلودگی) بدون (DNA برای تایید PCR استفاده گردید. و برای کنترل آلودگی، آب، به جای DNA الگو استفاده گردید. در انتها محصولات تکثیری با الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفته و پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید باندهای مورد نظر تحت نور ماوراء بنفش رویت گردید.

در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، حجم نهایی برای هر نمونه ۲۵ میکرو لیتر می‌باشد. و مستر میکس طبق جدول شماره ۳ تهیه گردید.

جدول شماره ۳: آماده سازی مستر میکس

مواد مصرفی	مقدار مورد استفاده برای یک تست	حجم کلی	مقدار مورد استفاده برای ۹۰ تست
آب مقطر	۵/۵ میکرو لیتر	۹۰*	۱۱۹۷ میکرو لیتر
PCRbuffer	۱۱ میکرو لیتر	۹۰*	۱۸۰ میکرو لیتر
$Mgcl_2$	۰/۵ میکرو لیتر	۹۰*	۱۰۸ میکرو لیتر
dNTP	۰/۷۵ میکرو لیتر	۹۰*	۳۶ میکرو لیتر
پرایمر F	۱ میکرو لیتر	۹۰*	۴۵ میکرو لیتر
پرایمر R	۱ میکرو لیتر	۹۰*	۴۵ میکرو لیتر
آنزیم Tag	۰/۲۵ میکرو لیتر	۹۰*	۹ میکرو لیتر
DNA	۵ میکرو لیتر		
حجم کل	۲۵ میکرو لیتر		۱۶۲۰ میکرو لیتر
	برای یک نمونه		برای ۸۶ نمونه

محلول‌های مورد نیاز، مطابق با جدول شماره۳، داخل لوله قرار داده و سپس لوله را ۱۰ ثانیه spineگردید. و برای نمونه‌ها، از میکروتیوب‌های ۲ml استفاده شد. هم‌چنین برای آماده‌سازی، با استفاده از لوله‌ی ۱/۵cc طبق تعداد نمونه، مواد مورد نظر اضافه گردید. و با سمپلر، ۲۰ میکرو لیتر از مخلوط به دست آمده را داخل هر میکروتیوب ریخته، و در آخر ۵ میکرو لیتر DNAبر داشته و داخل میکروتیوب‌های مربوط به هر DNAریخته شد. سپس میکروتیوب‌ها ۱۰ ثانیه spine گردید. و میکروتیوب‌ها داخل دستگاه قرار داده شد. ابتدا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی rRNA

16 sمختص گونه هلیکوباکتر، هویت سویه مشخص گردید. در مرحله بعدی جهت تعیین حضور ژن cagA از پرایمرهای اختصاصی ناحیه ی حفاظت شده ژن با استفاده از توالی پرایمر، طبق جدول ۱ عمل گردید. که برای تکثیر ژن cagA مورد استفاده قرار گرفت. در تمام این مراحل، سویه هلیکوباکتر پیلوری cagA مثبت به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

داده ها با استفاده از نرم افزار spss، آنالیز واریانس یک طرفه و با کمک آزمون اسپیرمن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته ها

در مطالعه حاضر تعداد ۸۶ نمونه از بیماران با تشخیص گاستریت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری، جمع گردید. که از این ۸۶ نمونه ۴۷ نفر مرد ۳۹ نفر زن بودند. این بیماران با علائم مختلفی مراجعه کردند، و در چند علائم مشترک دسته‌بندی گردیدند. و میانگین سنی بین ۳۱ تا ۴۲ سال می‌باشد.

بیماران بر اساس علائم، از جمله درد معده، زخم گاستریک، گاستریت، سوزش و احساس پری در معده، و داشتن تومور و سرطان معده دسته‌بندی گردیدند. که به ترتیب شامل ۲۴، ۱۸، ۲۱، ۱۵، ۸ نفر بوده است(جدول شماره ۴). که تست اوره آز سریع (۳۹ نفر) ۴۵/۳ درصد افراد و مشاهده‌ی لام بافتی (۴۶ نفر) ۵۳/۴ درصد و انجام کشت (۴۹ نفر) ۵۵/۹ درصد و تست pcr (۶۹ نفر) ۸۰/۲ درصد بیماران را به خود اختصاص می‌دهند.

جدول شماره ٤: جدول علائم بیماران و تعداد بیماران

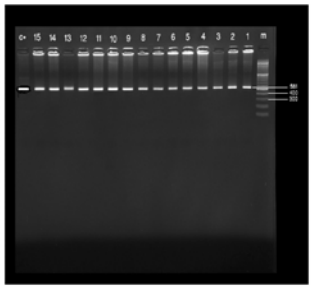
علائم بیماران	تعداد بیمار	درصد
گاستریت	۲۱	۲۴/۴۱
درد در ناحیه معده	۲۴	۲۷/۹۰
زخم گاستریک	۱۸	۲۰/۹۳
سوزش و احساس پری	۱۵	۱۷/۴۴
تومور و سرطان	۸	۹/۳۰
کل	۸۶	۱۰۰

نتایج روش‌های تشخیصی، هلیکوباکتر پیلوری با تست PCR، دارای بیش‌ترین میزان آلودگی با این میکرو ارگانیسم در بیماران را نشان می‌دهد. و هم‌چنین بیش‌ترین میزان آلودگی در تست‌های تشخیصی مربوط به بیماران دارای علامت گاستریت بوده است (جدول شماره ۵).

جدول شماره ٥: نتایج تست‌های تشخیصی برای هلیکوباکتر پیلوری

علائم بیماران	تست اوره آز سریع			لام مستقیم از نمونه بافتی			کشت			PCR		
	تعداد		درصد کل	تعداد		درصد کل	تعداد		درصد کل	تعداد		درصد کل
	مرد	زن		مرد	زن		مرد	زن		مرد	زن	
گاستریت	۹	۷	۷۶/۱	۱۰	۸	۸۵/۷	۱۱	۷	۸۵/۷	۱۱	۹	۹۵/۲۳
درد در ناحیه معده	۸	۴	۵۰	۷	۵	۵۰	۶	۵	۴۵/۸	۱۲	۸	۸۳/۳
زخم گاستریک	۲	۷	۵۰	۴	۷	۶۱/۱	۵	۸	۷۷/۲	۱۰	۶	۸۸/۸
سوزش و احساس پری	–	۲	۱۳/۳	۳	۱	۲۶/۶	۴	۲	۴۰	۴	۶	۶۶/۶
تومور و سرطان	–	–	–	۱	–	۱۲/۵	۱	–	۱۲/۵	۲	۱	۳۷/۵
تعداد و درصد کل	۳۹		۴۵/۳	۴۶		۵۳/۴	۴۹		۵۵/۹	۶۹		۸۰/۲

برای بررسی وجود ژن cagA، از بین۸۶ بیماری که از آن‌ها بلوک پارافینه تهیه، و بر روی آن‌ها تستPcrانجام گردید. و بلوک‌ها از نظر ژن cagA به میزان ۴۸ نفر (۶۹/۵۶ درصد) دارای ژن cagA مثبت بوده است (شکل شماره ۱)



شکل شماره ۱: باند ژن cagA مثبت در دستگاه UV Transilluminator، M = lader100b، 1-15: بیماران دارای ژن cagA، C+: کنترل مثبت

بیش‌ترین درصد وجود ژن cagA، مربوط به بیماران با علامت گاستریت و بعد از آن بیماران دارای زخم معده می‌باشد. (جدول شماره ۶)

جدول شماره ٦: فراوانی ژن cagA در بین مردان و زنان

علائم بیماران	ژن *cagA* در مردان		ژن *cagA* در زنان		ژن *cagA*	در مجموع
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	اعداد	درصد
گاستریت	۱۱	۵۲/۳۸	۹	۴۲/۸۵	۲۰	۴۱/۶۶
درد	۶	۲۵	۲	۸/۳۳	۸	۱۶/۶
زخم	۵	۲۷/۷۷	۷	۳۸/۸۸	۱۲	۲۵
سوزش	۴	۲۶/۶	۱	۶/۶۶	۵	۱۰/۴
تومور	۲	۲۵	۱	۱۲/۵	۳	۶/۲۵
تعداد کل	۲۸	۴۰/۵۷	۲۰	۲۸/۹۸	۴۸	۶۹/۵۶

نتایج آنتی‌بیوگرام درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیماران در جدول شماره ۷ آمده است.

جدول شماره ۷: درصد مقاومت آنتی بیوتیکی بیماران

آنتی بیوتیک	درصد مقاومت
مترونیدازول	۶۳/۹
کلاریترومایسین	۲۲/۴
آموکسیسیلین	۳۲/۶
تتراسایکلین	۱۲/۲
سیپروفلوکساسین	۲۸/۵

نتایج آزمون آماری ضریب همبستگی اسپیرمن نشان می‌دهد که بین جنس و وجود ژن cagA مورد مطالعه با P ۰/۰۸۴ = و r۰/۱۸۷ = ، رابطه خطی معنی‌داری وجود ندارد. هم‌چنین بین سن و وجود cag Aنیزبا P ۰/۵۲۳ = و r۰/۰۷۰ = ، رابطه خطی معنی داری وجود ندارد.

نتایج آزمون آماری ضریب همبستگی اسپیرمن نشان می‌دهد که بین جنس و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با P ۰/۲۶۷ = و r۰/۱۲۱ = ، رابطه خطی معنی‌داری وجود ندارد. هم‌چنین بین سن و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز با P ۰/۸۲۰ = و r۰/۰۲۵ = ، رابطه خطی معنی‌داری وجود ندارد.

نتایج آزمون آماری Chi-Square نشان می‌دهد که بین وجود ژن cag A و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در افراد مورد مطالعه با P <۰/۰۵ ، ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار spss و آنالیز واریانس یک‌طرفه و با کمک آزمون اسپیرمن مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.درصدمقاومت آنتی‌بیوتیکی بیماران برای مترونیدازول(۶۳/۹٪)، لاریترومایسین(۲۲/۴٪) ،آموکسیسیلین(۳۲/۶٪)،تتراسایکلین(۱۲/۲٪)وسیپروفلو کساسین(۲۸/۵٪) می‌باشد.

نتایج آزمون آماری Chi-Square نشان می‌دهد که بین وجود ژن cag A و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در افراد مورد مطالعه با P <۰/۰۵ ، ارتباط معنی‌داری وجود دارد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار spss و آنالیز واریانس یک طرفه و با کمک آزمون اسپیرمن مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.درصدمقاومت آنتی بیوتیکی بیماران برای مترونیدازول(۶۳/۹٪)، لاریترومایسین(۲۲/۴٪)، آموکسیسیلین(۳۲/۶٪)،تتراسایکلین(۱۲/۲٪)وسیپروفلو کساسین(۲۸/۵٪) میباشد.(جدول شماره ۷)

بحث

نتایج حاصل از روش PCR این مطالعه نشان می‌دهد که ۸۰/۲ درصد بیماران دارای میکروب

هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند. و احتمال بیماری‌های گاستریت، درد، سوزش، احساس پری و زخم در شکم توسط این میکرو ارگانیسم می‌باشد. درصد وجود این میکروب در بیماران دارای بدخیمی به میزان بسیار کم بوده است. درصد کمی از افراد توسط این میکروارگانیسم، به سرطان و بدخیمی‌های پاتولوژیک دچار می‌شوند. طبق مطالعات انجام شده اینجانب حضور میکروب در بیماران مبتلا به گاستریت می‌باشد. بررسی‌های صورت گرفته در مورد الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این ارگانیسم، مقاومت به مترونیدازول از همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های دیگر بیش‌تر بوده است. میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک مترونیدازول به طور چشمگیری بالا می‌باشد. و بیماران دارای التهاب بیش‌ترین فراوانی هلیکوباکتر پیلوری را دارند.

از این میان در بیماران مورد مطالعه، بیش‌ترین حضور میکروب در بیماران مبتلا به گاستریت می‌باشد. و کم‌ترین میزان در بیماران سرطانی، و مرتبه‌ی قبل از آن به افرادی که احساس سوزش و پری در معده را داشته‌اند، اختصاص یافته است. که با (۳۰) همکاران مطابقت دارد. بررسی‌های صورت گرفته در مورد تست‌های تشخیصی بیان‌گر این مطلب است که تست مشاهده لام بافتی و کشت میکرو ارگانیسم از نظر تشخیصی در محدوده‌ی نزدیک به هم می‌باشند. و تست اوره آز سریع دارای وجه تشخیصی پایین می‌باشد. به علت شیوع پایین، که در گزارشات مشخص شده است که با مطالعه‌ی (۱۰) مطابقت دارد. و این با حضور این میکروارگانیسم در جوامع امروزی، برابری در بررسی‌های صورت گرفته در مورد الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به این ارگانیسم، مقاومت به مترونیدازول از همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های دیگر بیش‌تر بوده است. که با مطالعات (۲۱)، برابری می‌کند. که این مطلب بیان‌گر این می‌باشد که افراد مبتلا به این میکروارگانیسم آنتی‌بیوتیک مترونیدازول اثر کم‌تری دارد. و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول دیگر و داروی تتراساکلین کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی را دارا می‌باشد. و هم‌چنین داروی مناسبی برای درمان می‌باشد که امروزه برای درمان بیماران از این دارو استفاده می‌گردد.

شیوع بالا ی این این میکروارگانیسم در این مطالعه با مطالعه‌ی (۴) مطابقت دارد(۱۵). به کلنی زایی این میکروب در سطح بافت معده اشاره نمودند که با این مطالعه در خصوص رنگ‌آمیزی گیمسا برای لام بافتی و رویت این میکروب در بافت معده صدق می‌کند.

نتایج مطالعات (۲۱) در مورد بالا بودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی مترونیدازول نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، با نتایج این مطالعه برابری می‌کند.

در مطالعه‌ی (۱۱) میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک مترونیدازول به طور چشمگیری بالا می‌باشد. که با این مطالعه برابری می‌کند. مطالعه‌ی (۱۲) و نیز مطالعه‌ی (۱۴) در مورد میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک مترونیدازول طالعه پیروی می‌کند. به نظر می‌رسد که کاربرد گسترده مترونیدازول هم در عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری و هم در سایر عفونت‌ها مثل عفونت‌های انگلی، باعث ظهور ایزوله‌های با مقاومت بالا به این آنتی‌بیوتیک شده است. در این مطالعه رابطه‌ی معنی‌داری بین جنسیت و آنتی‌بیوتیک مشاهده نگردید. که با مطالعه‌ی (۱۷) برابری می‌کند. و هم‌چنین رابطه‌ی معنی‌داری بین سن بیماران با آنتی‌بیوتیک مشاهده نگردید. که از مطالعه‌ی (۳۲) پیروی می‌کند. با توجه به این که مقاومت به آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری در حال افزایش است. و تست آنتی‌بیوگرام بهترین گزینه‌ی درمانی برای بیماران می‌باشد. رژیم تک دارویی برای درمان باید پرهیز شود. و فرهنگ استفاده از داروها در جامعه اصلاح گردد(۲۶).

فراوانی ژن cagA را در بیماران ۴۳ درصد گزارش کرده است. که با این مطالعه تقریبا برابری می کند. به برخی از علل اختلاف در نتایج آزمایشات مختلف بر این میکرو ارگانیسم می‌توان به شرایط جغرافیایی در

جوامع مختلف، تفاوت کشورهای پیشرفته با جوامع توسعه یافته و اختلاف سطح بهداشت در جوامع اشاره کرد(۲۹).

به عدم مقاومت آنتی‌بیوتیکی آموکسی‌سیلین اشاره کردند که با این مطالعه برابری نمی‌کند. این احتمال می‌رود که تفاوت در میزان آلودگی در کشورهای مختلف و نیز شرایط متفاوت بیماران قبل از انجام آزمایش که موجب اختلال در پروسه‌ی آزمایشگاهی می‌شود، می‌تواند دلیلی بر وجود این اختلاف گردد (۳۳).

نشان دادند که میزان آلودگی به میکروب در افراد دارای دیس پپسی بیش‌ترین فراوانی را دارد. که در این مطالعه صدق نمی‌کند. علت احتمالی این است که علائم بالینی وجه تشخیصی مناسب برای ارزیابی این میکروب نمی‌باشد. زیرا این میکروب علائم مشترک با بیماری‌های دیگر دارد(۳۱) به این نتیجه رسیدند که التهاب در بیماران بیش‌ترین فراوانی هلیکوباکتر پیلوری را دارد. که با نتایج این مطالعه برابری می‌کند.

بیماران مبتلا به این میکروب، در خصوص درمان دارویی این میکروب با مشکل مواجه هستند که انجام تست آنتی‌بیوگرام برای این بیماران به درمان ایشان کمک بسزایی می‌کند. امروزه برای درمان هلیکوباکتر پیلوری به درمان چند دارویی پرداخته‌اند که به ترکیبی از داروهای تتراساکلین، آموکسی سیلین و کلاریترومایسین می‌باشد البته هنوز تجویز مترونیدازول وجود دارد به طوری‌که مدت استفاده از این دارو افزایش یافته است.

یکی از علت‌های احتمالی شیوع این میکروارگانیسم در کشور، عدم رعایت بهداشت و این که کشور ما کشور در حال توسعه است می‌باشد. به‌دلیل این که شیوع این میکروارگانیسم در کشورهای در حال توسعه بالا می‌باشد، انجام تست اوره آز سریع نسبت به بقیه تست‌ها، راحت‌تر و با هزینه کم‌تر و سریعتر می‌باشد. حال این که برای شناسایی دقیق این میکروارگانیسم با توجه به دقت تشخیصی دیگر تست‌ها، همانند PCR یک تست غربالگری محسوب می‌شود. یکی از تست‌های رایج در آزمایشگاه مشاهده‌ی لام بافتی از بیوپسی حاصل از بخش اندوسکوپی می‌باشد. که به میزان نسبتا خوبی می‌توان به شناسایی میکروب در نمونه‌های بافتی پرداخت. با توجه به نحوه ی انتقال میکروب کوشش در جهت رعایت بهداشت و سلامت افراد و آموزش‌های لازم در این زمینه از اهمیت خاصی بر خوردار می‌باشد.

بدین ترتیب که به کارگیری گسترده از مترونیدازول در درمان، ایزوله‌های حساس را از بین می‌برد. و باعث می‌شود که جمعیتی از ایزوله‌ها که به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بوده و در اقلیت بوده‌اند، تکثیریافته و ظهور پیدا کنند. در واقع دارو به عنوان یک عامل خارجی، و طی فرایند انتخاب طبیعی، باعث جایگزین شدن جمعیت اکثریت حساس، به وسیله‌ی جمعیت اقلیت مقاوم می‌شوند.

کلاریترومایسین از آنتی‌بیوتیک‌های گروه ماکرولید است. که طی سالیان گذشته به علت گران بودن، در ایران مصرف چندانی نداشته است. اما امروزه به علت تولید این دارو در کشور، در دسترس قرار گرفته و به طور گسترده‌ای، مخصوصا در عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری استفاده می‌شود. همین موضوع خود می‌تواند علتی برای بروز مقاومت بالا به این آنتی‌بیوتیک باشد. هم‌چنین استفاده از این آنتی‌بیوتیک به صورت تک دارویی خود باعث بروز سویه‌های مقاوم می‌شود.

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به آنتی‌بیوتیک مترونیدازول مطابق با (۲۶) ذکر شده و مطالعات اکثر محققین بالا می‌باشد. که مصرف این آنتی‌بیوتیک کمک چندانی به درمان بیماران آلوده به این میکروارگانیسم نمی‌کند.

بنا به گزارشات مندرج در (۱۹) محققین و این مطالعه، هلیکوباکتر پیلوری که باعث ایجاد علائم گوناگونی می‌گردد. و علامت التهاب بافت معده از

بقیه‌ی عوامل بیش‌تر بوده است. کـه مـی‌توانـد نشـان‌گـر بیماری‌زایی این میکروب بر علیه اپیتلیال معده باشد.

روش تست‌های تشخیصی برای شناسایی این میکرو ارگانیسم بررسی شده که روش PCRاز دقت بـیش‌تـری برخـوردار اسـت. ژن cagA در بیمـاران بـه مقـدار ۶۳/۷ درصد می‌باشد. که بیان‌گر مقادیر بالای مراجعه‌کنندگان به آلودگی با این ژن میکروب می‌باشد. و مـی‌تـوان ایـن ژن را در بیمـاری‌زایـی افـراد دچـار نـاراحتی‌هـای معـده دخالت داد. میزان آلودگی در مردان بیش‌تر بوده که بـه نظر می‌رسد به علت کاهش رعایت بهداشـت نسـبت بـه زنان در قشر جامعه باشد.

بنا به توضیحات داده شده در مطالب فوق و شـواهد موجـود بـرای پیشـگیری و جلـوگیری از آلـودگی بـه میکروب هلیکوباکتر پیلوری در جوامع توسـعه یافتـه از جمله کشور ما رعایت بهداشت حائز اهمیت می‌باشـد. و نیـز افـراد دارای علائـم و نـاراحتی در ناحیـه‌ی معـده بـا مراجعـه بـه پزشـک متخصـص و انجـام اندوسـکوپی و آزمایشات مربوطه از نظر هلیکوباکتر پیلـوری مـی‌تواننـد به بررسی خود از لحاظ آلودگی به این عفونت پرداختـه و از عوامل بیماری زای این بیماری که ممکن است بعـد از مدتی به بدخیمی و تومور در ناحیه‌ی معده منجر شـود در امان بمانند. این میکروب نقش کمی در ایجاد تومـور و سـرطان داشـته اسـت. بنـابراین بـرای بررسـی سـرطان تحقیـق دربـاره‌ی ایـن میکـروب از اهمیـت کـم‌تـری برخوردار است. تتراسایکلین وآموکسی‌سیلین بـه همـراه رژیم‌های غذایی مناسب دارویی می‌تواند کمک بسزایی در درمـان ایـن میکـرو ارگانیسـم کنـد. کـه ایـن امـر از مقاومت آنتی‌بیوتیکی پایین، در نتیجـه حساسـیت بـالای این میکروارگانیسم به این آنتی‌بیوتیـک‌هـا دلالـت دارد. برای درمان آنتی‌بیوتیـک، سیپروفلوکساسـین نیـز داروی مناسبی به شمار می‌رود چون دارای حساسیت میکروبـی قابل قبولی می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات تمـامی افـراد شـرکت‌کننده در ایـن مطالعـه و کارکنـان آزمایشـگاه بیمارسـتان امـام خمینی(ره) ساری ودانشکده داروسـازی علـوم پزشـکی مازندران نهایت قدردانی و سپاس را داریم.

References

1. Czesnikiewicz-Guzik, Bielanski W, Guzik TJ, Loster B, Konturek SJ. Helicobacter pylori in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. J Physiol Pharmacol. 2005. 56(6): 7-89.
2. Gebara EC, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MP, Lima LA. Persistence of Helicobacter pylori in the oral cavity after systemic eradication therapy. J clin periodontol. 2006. 33(5): 329-333.
3. Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, Lima LAet al. Prevalence of Helicobacter pylori detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. Oral microbiol Immunol. 2004. 19(4): 277-280.
4. Kignel S, de Almeida Pina F, André EA, Alves Mayer MP, Birman EG. Occurrence of Helicobacter pylori in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. Oral Dis. 2005. 11(1): 17-21.
5. Cześnikiewicz-Guz M, Karczewska E, Bielański W, Guzik TJ, Kapera P, Targosz A, Konturek SJ, Loster B. Association of the presence the Helicobacter pylori in the oral cavity

and in the stomach. J Physiol Pharmacol. 1(55): 105-115.

6. Umeda, M., et al., High prevalence of Helicobacter pylori detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. J periodontol. 2003. 74(1): 129-134.
7. Anand PS, Nandakumar K, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with Helicobacter pylori infection?. J periodontol. 2006. 77(4): 692-698.
8. Berroteran, A, Perrone M, Correnti M, Cavazza ME, Tombazzi C, Goncalvez R, Lecuna V. Detection of Helicobacter pylori DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. J Med Microbiol. 2002. 51(9): 764-770.
9. Özdemir A, Mas MR, Sahin S, Sağlamkaya U, Ateşkan U. Detection of Helicobacter pylori colonization in dental plaques and tongue scrapings of patients with chronic gastritis. Quintessence Int. 2001. 32(2): 131-134.
10. Chitsazi MT, Fattahi E, Farahani RM, Fattahi S. Helicobacter pylori in the dental plaque: is it of diagnostic value for gastric infection? Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006. 11(4): 325-328.
11. Saxena A, Shukla S, Prasad KN, Ghoshal UC. Virulence attributes of Helicobacter pylori isolates & their association with gastroduodenal disease. Indian J Med Res. 2011. 133(5): 514-520.
12. Goudarzi H, Rezaie H,Rafiezadeh M, Mir samadi E, Mir samadi A. The frequency of cagA gene of H.pylori isolated from biopsy specimen in Tehran during 2008-2010. amuj. 2012;15 (5): p. 42-48.
13. Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the Helicobacter pylori virulence factors VacA and CagA. J Med Microbiol. 2008. 57(2): 145-150.
14. Nagiyev T, Yula E,Abayli B,Koksal F. Prevalence and genotypes of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens from patients with gastroduodenal pathologies in the Cukurova region of Turkey. J Clin Microbiol. 2009. 47(12): 4150-4153.
15. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, Shiratori Y, Omata M. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive inHelicobacter pylori isolates in Japan. Gut. 1998. 42(3): 338-343.
16. Nguyen TL, Uchida T, Tsukamoto Y, Trinh DT, Ta L, Mai BH,et al. Helicobacter pylori infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study. BMC gastroenterol. 2010. 10(1): 114.
17. Uchida T, Nguyen LT, Takayama A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, et al. Analysis of virulence factors of Helicobacter pylori isolated from a Vietnamese population. BMC Microbiol. 2009. 9.
18. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arroniz S, Rodríguez C, Cortés JL, et al. Frequency of vacA, cagA and

babA2 virulence markers in Helicobacter pylori strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2009. 8(1): 14.

19. Yakoob J, Abid S, Abbas Z, Jafri W, Ahmad Z, Ahmed R, et al. Distribution of Helicobacter pylori virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in Pakistan. BMC Gastroenterol. 2009. 9: 87.
20. Wang, Y.-C., et al., In Vitro Activity of 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone and Stigmasta-7, 22-diene-3β-ol from Impatiens balsamina L. against Multiple Antibiotic-Resistant Helicobacter pylori. Evid Based Complement Alternat Med. 2011. 2011.
21. De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C , et al. Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic review. J Gastrointestin Liver Dis. 2010. 19(4): 409-414.
22. Chu YT, Wang YH,Wu JL,Lei HY. Invasion and multiplication of Helicobacter pylori in gastric epithelial cells and implications for antibiotic resistance. Infect Immun. 2010. 78(10): 4157-4165.
23. Kato M, Asaka M. Recent knowledge of the relationship between Helicobacter pylori and gastric cancer and recent progress of gastroendoscopic diagnosis and treatment for gastric cancer. Jpn J Clin Oncol. 2010. 40(9): 828-837.
24. Molina-Infante J, Perez-Gallardo B, Fernandez-Bermejo M, Hernandez-Alonso M, Vinagre G, Dueñas C, et al. Clinical trial: clarithromycin vs. levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for Helicobacter pylori eradication. Aliment Pharmacol Ther. 2010. 31(10): 1077-1084.
25. Rick JR1, Goldman M, Semino-Mora C, Liu H, Olsen C, Rueda-Pedraza E, et al. In situ expression of cagA and risk of gastroduodenal disease in Helicobacter pylori infected children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010. 50(2): 167-172.
26. Amjad N, Osman HA, Razak NA, Kassian J, Din J, bin Abdullah N. Clinical significance of Helicobacter pylori cagA and iceA genotype status. World J Gastroenterol. 2010. 16(35): 4443-4447.
27. maleki P, Saeid Latifi N, Zuhri S. Allelic Variation of Helicobacter pylori babA and cagA Genes and their Association with Clinical Consequences. Govaresh. 2013;17(4):203-212.
28. Shirazi MH,Ghasemi A, Khorammizadeh MR, Daryani NE, Hosseini M, Sadeghifard N. A Study of CagA Gene in Helicobacter Pylori Strains Isolated from Patients with NUD, Peptic Ulcer and Gastric Cancer by PCR method. J Ilam Univ Med Sci.2007;14(3):22-28.
29. John T. Loh, Carrie L. Shaffer, M. Blanca Piazuelo, Luis E. Bravo, Mark S. McClain1,Pelayo Correa, and Timothy L. Cover,2011. Analysis of cagA in Helicobacter pylori Strains fromColombian Populations with Contrasting Gastric Cancer RiskReveals a Biomarker for Disease Severity. Journal of CancerEpidemiology,Biomarkers& Prevention, Volume 11(548) pages2237-2249.

30. Rezaeaian A, Kargar M,Saud N,Ghorbani Dalini S. high-rise honest journalist victim of Dalyny, 1391, Genetic polymorphism of cagA and vacA in Helicobacter pylori strains isolated from gastrointestinal disease in the province of Chahar Mahal and Bakhtiari. J Isfahan Med School.2012;30(197):1027-1019.
31. Baghaee K, Shokrzadeh L, Jafari F, Bolfion M, MASHAYEKHI R, Zojaji H,et al. Association between gastric disorders and cagA or cagE in Iranian patients. Pajuhandeh:2011;4(76):137-142.
32. Peter Malfertheiner, Francis Megraud, Colm A O'Morain, John Atherton, Anthony T R Axon, Franco Bazzoli, Gian Franco Gensini, Javier P Gisbert, David Y Graham, Theodore Rokkas, Emad M El-Omar and Ernst J Kuipers ,2015. Management of Helicobacter pylori infectiondtheMaastricht IV/ Florence Consensus Report,journal of gastroenterology and hepatology, Volume 61(5(,pages 646-664
33. Talebi Bazemanabadi A, Mohabbani Mobarez A, Ajami A, Rafiee A, Taghvai T. Evaluation of Antibiotic resistance of Helicobacter pylori isolated from patients referring to Tooba Sari medical center 2008. J Mazandaran Univ Med Sci. 2009; 19 (70) :26-32.
34. Nasrabadi NN, Ataee R, Abediankenari S, Shokrzadeh M, Najafi M, Hoseini SV, et al. Expression of MT2 receptor in patients with gastric adenocarcinoma and its relationship with clinicopathological features. Journal of gastrointestinal cancer. 2014;45(1):54-60.