Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 30, No. 3, Autumn 2020 ORIGINAL ARTICLE

Investigation of frxA gene mutations in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* strains in Tabriz City

***Farshid Ardabili*[1,2], *Reza Malekoughli*[3], *Jalal Zaman*[2]**
[1]*Young Researchers Club, Aligudarz Branch, Islamic Azad University, Aligudarz, Iran*
[2]*Orumiyeh Military Hospital, Health Administration of Army (NEZAJA), Tehran, Iran*
[3]*MSc, Department of Microbiology, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran*

Abstract

Background: Due to the high rate of *Helicobacter pylori* infection in our country and its treatment failure, and also because of the high prevalence of antibiotic resistance of this bacterium, evaluating causes of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and its effect on the therapeutic course is necessary.
Materials and methods: A biopsy sample was obtained from 275 suspected patients referred to Imam Reza Hospital in Tabriz. After identification of *Helicobacter pylori*, bacterial suspension (4 McFarland Standard) was poured onto plates and then antibiotic discs of metronidazole and E-test were placed on it. Metronidazole-resistant strains were detected and mutations in the frxA gene were detected by PCR.
Results: Of 112 isolated strains, 85 resistant strains were identified. Resistance to metronidazole was more prevalent in women (50%) than males (35%). Of 85 resistant strains, 70 strains (82.35%) had MIC≥8 in the E-test; while in the DDA, 88 strains were resistant. Of the 20 randomly selected metronidazole-resistant strains, mutation was proved in the frxA gene in 4 strains, but mutagenesis was not proved in susceptible strains.
Conclusion: *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole is high in this area and the frequency of this resistance is higher in women than in men. One of the mechanism of resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole is the occurrence of a mutation in the frxA gene, but this mutation is not the only factor in developing resistance to metronidazole and the evaluation of other molecular mechanisms of resistance to metronidazole seems to be necessary.
Keywords: *Helicobacter pylori, Antibiotic resistance, Metronidazole, frxA gene.*

Cited as: Ardabili F, Malekoughli R, Zaman J. Investigation of frxA gene mutations in metronidazole resistant *Helicobacter pylori* strains in Tabriz City. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(3): **281-286.**

Correspondence to: Farshid Ardabili
Tel: *+98 9103781468*
E-mail: farshidardabili1375@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-8058-0655
Received: 27 Apr 2019; **Accepted:** 18 Mar 2020

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۰، شماره ۳، پاییز ۹۹، صفحات ۲۸۱ تا ۲۸۶

Original Article

بررسی جهش‌های ژن frxA در سویه های هلیکوباکترپیلوری مقاوم به مترونیدازول در شهرستان تبریز

فرشید اردبیلی[۱،۲]، رضا ملک اوغلی[۳]، جلال زمان[۲]

[۱] باشگاه پژوهشگران جوان، واحد الیگودرز، دانشگاه آزاد اسلامی، الیگودرز، ایران
[۲] بیمارستان ارتش ارومیه، اداره بهداشت ارتش (نزاجا)، تهران، ایران
[۳] کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به بالا بودن میزان شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری در کشور ما و شکست درمانی آن، به علت شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری، بررسی علل مقاومت هلیکوباکترپیلوری نسبت به مترونیدازول و تاثیر آن در روند درمانی ضروری است.*

روش بررسی: *از ۲۷۵ بیمار مشکوک که به بیمارستان امام رضا تبریز مراجعه کرده بودند، نمونه بیوپسی تهیه شد. بعد از تعیین هویت هلیکوباکترپیلوری، سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد ۴ مک فارلند روی پلیت‌ها ریخته شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مترونیدازول و نوارهای Etest روی آن قرار داده شد. سویه‌های مقاوم به مترونیدازول شناسایی شد و با روش PCR وقوع جهش در ژن frxAآنها ردیابی شد.*

یافته‌ها: *از ۱۱۲ سویه جداشده، ۸۵ سویه مقاوم شناسایی شدند که مقاومت به مترونیدازول در زنان (۵۰٪) بیشتر از مردان (۳۵٪) بود. در روش E-test تعداد ۷۰ (۸۲/۳۵٪) سویه از ۸۵ سویه مقاوم به مترونیدازول که دارای MIC≥8 بودند یافت شد، ولی در روش DDA تعداد ۸۸ سویه مقاوم یافت شد. از۲۰ سویه تصادفی مقاوم به مترونیدازول، در ۴ سویه موتاسیون در ژن frxAثابت شد، ولی در سویه‌های Susceptible موتاسیون تثبیت نشد.*

نتیجه‌گیری: *میزان مقاومت هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول در این منطقه بالا است و شیوع مقاومت در خانم‌ها بیشتر از آقایان است. یکی از مکانیسم‌های مقاومت هلیکوباکترپیلوری نسبت به مترونیدازول، وقوع جهش در ژن frxA است، ولی این تنها عامل مقاومت به مترونیدازول نیست و ارزیابی سایر مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به مترونیدازول ضروری به نظر می‌رسد.*

واژگان کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری، مقاومت آنتی بیوتیکی، مترونیدازول، ژن frxA*

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری باکتری گرم منفی، مارپیچی، تاژک‌دار، متحرک و میکروآئروفیل است (۱). این باکتری یکی از شایع‌ترین عفونتهای باکتریایی در انسان است و حدود نیمی از جمعیت جهان حامل این ارگانیسم هستند. عفونت عمدتا از راه مدفوعی-دهانی در کشورهای در حال توسعه و از راه دهانی-دهانی در کشورهای توسعه یافته منتقل می‌شود (۱). این باکتری با بیماری‌های گوارشی نظیرگاستریت، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده، لنفوم MALT و بیماری‌های غیرگوارشی گوناگونی از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های پوستی، بیماری‌های خودایمنی تیروئید، آنمی، پورپورای ترمبوسیتوپنیک، آنمی کمبودآهن، اسکلرودرما و میگرن در ارتباط است. این باکتری در سال ۱۹۹۴ به عنوان کارسینوژن درجه یک توسط آژانس بین المللی سازمان بهداشت جهانی برای تحقیق روی سرطان طبقه بندی شده است (۲).

آدرس نویسنده مسئول: الیگودرز، دانشکده علوم پزشکی، واحد الیگودرز، دانشگاه آزاد اسلامی، فرشید اردبیلی (**email**: farshidardabili1375@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0001-8058-0655
تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۲/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۱۲/۲۷

برای درمان عفونت می‌توان از آنتی بیوتیک‌هایی مثل تتراسایکلین، مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی سیلین، نیتروفورانتوئین، اریترومایسین، ریفامپین و سیپروفلوکساسین در یک دوره ۱۴ روزه و همراه با ترکیبات آنتی اسید مثل رانیتیدین/ سایمتدین/ فاموتیدین/ امپرازول/ پنتو پرازول/ لانزو پرازول استفاده کرد (۳).

بین آنتی بیوتیک‌های ذکر شده مترونیدازول، آموکسی سیلین، تتراسیکلین و کلاریترومایسین بیشترین عوامل ضد میکروبی مورد استفاده در درمان هستند که در ترکیب با یک مهار کننده پمپ پروتون یا نمک بیسموت برای درمان عفونت H.pylori استفاده می‌شوند. اگر چه باکتری در بیش از ۹۰ ٪ موارد با این رژیم درمانی ریشه کن می‌شود، با این حال اثرات جانبی دارو، تحمل پایین بیماران به دارو و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج، دلایل اصلی شکست درمان هستند (۴).

مترونیدازول یکی از داروهای نیتروایمیدازول و از مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌ها، با توان درمان بیماری‌های عفونی ایجاد شده در اثر ارگانیسم‌های حساس به این دارو، به ویژه باکتری‌های بی هوازی و پروتوزوآ هاست. مترونیدازول درگذشته همیشه بر هلیکوباکترپیلوری موثر واقع می‌شد، اکنون با بروز مقاومت میکروبی روبه رو شده است و بنابراین پزشکان آن را تنها برای بیمارانی که نمی‌توانند آموکسی سیلین مصرف کنند، به کار می‌برند. دوز معمول این دارو برای هلیکوباکترپیلوری ۵۰۰ میلی گرم و دو بار در روز است (۵).

مهم‌ترین عامل شکست این رژیم‌های درمانی، مقاومت آنتی بیوتیکی است. 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)، پروتئین های شبیه فری دوکسین (fdxA و fdxB) و پیروات اکسیدوردوکتاز (proA و proB) است، که از همه مهم‌تر غیرفعال شدن ژن frxA و ژن rdxA است (۶).

در این مطالعه، ما میزان مقاومت سویه های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران به مترونیدازول و ارتباط آن را با ژن‌های frxA تحت بررسی قرار دادیم.

مواد و روشها

این مطالعه توصیفی-تحلیلی در سال ۱۳۹۱ روی ۲۷۵ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا (ع) تبریز، با علائم گاستروآنتریت، زخم دئودنال، زخم معده و رفلاکس گاستروازوفاژیال انجام شد. پس از معاینه پزشک معالج، انجام آندوسکوپی معده صورت گرفت و تعداد ۲۷۵ نمونه بیوپسی اخذ شد. بیماران دارای علایم، در دو هفته اخیر هیچ آنتی بیوتیکی دریافت نکرده بودند و قبل از انجام آندوسکوپی و نمونه برداری، فرم رضایت توسط بیماران امضاء شد.

باکتری شناسی

نمونه‌های بیوپسی اخذ شده از بیماران بلافاصله بعد از آندوسکوپی به محیط کشت استوارت آگار (آماده شده طبق دستورالعمل سازنده)، منتقل شدند و در کمتر از ۳ ساعت به آزمایشگاه میکروب شناسی ارسال شدند. نمونه‌های بیوپسی که اوره آز مثبت بودند، جداشده و در محیط کشت بروسلا آگار کشت داده شدند و در شرایط میکروآئروفیلیک ایجاد شده توسط دستگاه آنوکسومات و به مدت ۷ روز انکوبه شدند. بعد از اتمام دوره انکوباسیون، پلیت‌های دارای کلنی‌های رشد یافته به دقت بررسی شدند و با انجام آزمایشات تاییدی و تکمیلی (رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز و اوره آز) ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری شناسایی شدند.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده، جهت انجام تست‌های آنتی بیوگرام، دوباره در محیط کشت بروسلا آگار کشت داده شدند و بعد از ۳ روز انکوباسیون از کلنی‌های رشد یافته سوسپانسیون میکروبی معادل ۴ مک فارلند تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار حاوی ۵٪ خون گوسفندی کشت داده شد و از دیسک‌های آنتی بیوتیکی مختلف و نیز نوارهای E-test روی این محیط کشت به طور جداگانه قرار داده شد و بعد از ۵-۳ روز انکوباسیون قطر هاله عدم رشد و میزان MIC مترونیدازول ثبت شد.

جهت انجام کارهای ژنوتیپی، مقدار قابل توجهی از کلنی‌های هلیکوباکترپیلوری رشد یافته در سطح محیط کشت را جمع کرده و به داخل میکروتیوب‌های حاوی آب دیونیزه منتقل کرده و

جدول ۱. پرایمر های ژنهای glmM و frxA

Gene	Primer	Sise(Bp)	Ref
glmM	F:GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG R:GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC	294 (25)	(7)
FrxA (hp0642)	F: 5′ TCTAGGTTCGCTCA AATCAT-3′ R: 3′ AATAACTTCTGTCT TCCAGC- 5′	303 (25)	(8)

جهت استخراج DNA و انجام آزمایشات ژنوتیپی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA

عمل استخراج DNA از سویه‌های جدا شده با روش Boiling و با استفاده از کیت تجاری ترمو شرکت سیناژن، بر اساس پروتکل موجود در داخل کیت انجام گرفت. جهت صحه گذاشتن به تشخیص ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری، شناسایی ژن glmM به روش PCR نیز انجام گرفت و از این ژن در تعیین هویت باکتری استفاده شد. سپس به منظور تشخیص موتاسیون در ژن frxA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR انجام گرفت.

پرایمرهای استفاده شده جهت آمپلی‌فای ژن‌های glmM و frxA در این تحقیق مطابق جدول ۱ به کار برده شد.

بعد از استخراج DNA ردیابی ژن‌های frxA و glmM به روش multiplex-PCR انجام گرفت. به این صورت که بعد از تهیه مسترمیکس و افزودن DNA الگو به آن، میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر تاکارا قرار گرفت و روش PCR با شرایط ۳ دقیقه در ۹۴ درجه، سپس ۳۵ سیکل تکراری ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه (denaturation)، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه برای glmM (annealing) و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه (extension) و در نهایت ۳ دقیقه در ۷۲ درجه برای ژن glmM و یک سیکل در ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰ سیکل در ۹۵ درجه برای ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه، و برای فاینال الانگیشن ۷۲ درجه بمدت یک دقیقه برای ژن frxA انجام شد.

بعد از اتمام کار دستگاه محصول PCR، الکتروفورز شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک اندازه باندهای تشکیل شده در مقایسه با DNA سایز مارکر محاسبه شد.

مطالعه با کد اخلاق IR.LUMS.REC.1398.256 مورد تایید قرار گرفت.

یافته ها

از ۲۷۵ نمونه بیوپسی جمع آوری شده، ۱۱۲ نمونه (۴۰ درصد) با میانگین سنی ۱۷±۳۵ سال دارای تست اوره آز و کشت مثبت به دست آمد. از این تعداد، ۶۰ نفر مرد و ۵۲ نفر زن بودند. تمامی بیماران حداقل دو هفته قبل از انجام آندوسکوپی، آنتی بیوتیک دریافت نکرده بودند. این نمونه‌ها جهت انجام تست‌های حساسیت آنتی بیوتیکی و آزمایشهای ژنوتیپی وارد مطالعه شدند.

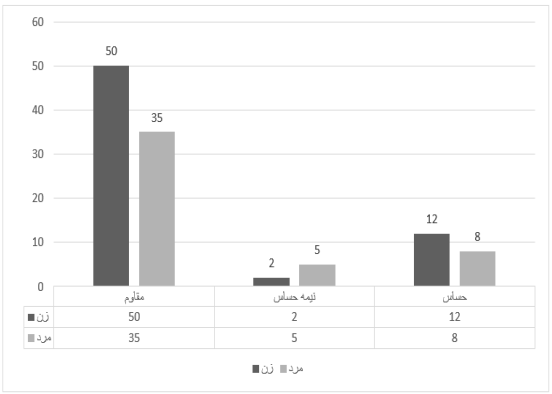
تعداد کل سویه‌های مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک مترونیدازول، ۸۵ (۸۵٪) بود که مقاومت به مترونیدازول در زنان (۵۰٪) بیشتر از مردان (۳۵٪) بود (نمودار ۱). ولی در کل ارتباط معنی‌داری بین مقاومت به آنتی بیوتیک با جنس یافت نشد ($p>0/05$).

نتایج تست‌های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی تمام سویه-های هلیکوباکترپیلوری جدا شده در این مطالعه در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج تست اوره آز و کشت در ۸۸٪ موارد با هم مطابقت داشتند. بین مقاومت به مترونیدازول و جنس زن ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<0/0001$). بین تعداد بیماران و گروه‌های سنی مختلف ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<0/0001$). اما بین گروه‌های سنی و جنسیت ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۲. نتایج تست‌های تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی تمام سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده

بیماران	تعداد سویه های مقاوم به مترونیدازول
مرد	۳۵ (۴۶/۱۱٪)
زن	۵۰ (۶۵/۸۸٪)
جمع	۸۵ (۸۵٪)



نمودار۱. مقاومت هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول به روش E-test

کمترین غلظت مهار کنندگی مترونیدازول برای سویه‌های هلیکوباکترپیلوری با روش E-test مشخص کرد که محدوده تغییرات MIC برای مترونیدازول در ۱۱۲ سویه ۰/۰۱۶µg/ml تا ۲۵۶ µg/ml است.

در تعیین MIC با روش E-test، تعداد ۷۰ (۸۲/۳۵٪) سویه از ۸۵ سویه مقاوم به مترونیدازول، دارای MIC≥256 بودند (شکل ۱)، ولی در انجام تست دیسک دیفیوژن آگار، ۸۸ سویه مقاوم یافت شد. بر اساس مطالعات انجام شده، تشکیل هاله عدم رشد به قطر >16mm برای مترونیدازول در تست DDA و MIC < 8mg/L مقاوم در نظر گرفته شد.

شکل ۱. مقاومت به مترونیدازول با روش E-test

ردیابی ژن glmM در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده

برای تایید وجود DNA مربوط به هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های استخراج شده، از ردیابی ژن glmM با استفاده از پرایمر اختصاصی اشاره شده در جدول ۱ استفاده شد (۷).

ردیابی موتاسیون در ژن frxA با روش PCR

از پرایمر با سایز 303_{bp} جهت شناسایی تمامی سکانس‌های ژن frxA (hp0642) استفاده شد. وجود موتاسیون در سکانس‌های ژن frxA با سکانس‌های ژن سویه حساس ATCC26695 مقایسه شد.

از ۲۰ سویه مقاوم (نمونه‌برداری تصادفی) و ۱۰ سویه حساس استاندارد ATCC26695 با MIC≤8 به عنوان کنترل و با روش PCR انجام شد. از ۲۰ سویه مقاوم به مترونیدازول در ۴ سویه موتاسیون (Indel Mutation) در ژن frxA ثابت شد. از ۴ سویه دارای موتاسیون، ۲ سویه دارای MIC≥256 µg/ml بودند و دو سویه دیگر دارای MIC=۶۴µg/ml و MIC=۳۲ µg/ml بودند ودر سویه‌های Susceptible موتاسیون ثابت نشد.

پس می‌توان تخمین زد که سویه‌های موتانت با MIC≥256 µg/ml دارای موتاسیون در ژن frxA هستند که با یافته های Kown و همکارانش (۹) مطابقت دارد. البته این موضوع نیازمند تحقیق بیشتر است. علت اینکه از کل سویه‌های مقاوم به مترونیدازول، جهت مشخص کردن وقوع موتاسیون در ژن frxA بررسی با PCR صورت نگرفت و تصادفی بیست مورد انتخاب شد، این است که این مطالعه اپیدمیولوژیک نیست و آمار برای ما در قسمت بررسی عوامل موثر بر مقاومت نسبت به مترونیدازول مهم نیست و مهم نقش موتاسیون است، لذا از ۲۰ مورد استفاده شد.

بحث

شکست درمان عفونت‌های هلیکوباکترپیلوری در تطابق با گسترش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها و ضعف رژیم‌های درمانی است. آنتی بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در درمان این عفونت‌ها، مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی‌سیلین و تتراسایکلین هستند. در طی چند سال گذشته، مقالات بسیاری از نقاط مختلف جهان مرتبط با میزان مقاومت آنتی بیوتیکی هلیکوباکترپیلوری به چاپ رسیده است که مقایسه نتایج مختلف به دست آمده از آنها مشکل است، به طوری که ممکن است در بسیاری از موارد، روش‌های مختلفی استفاده شده باشد.

Kwon و همکارانش نقش سه ژن fdxA، frxA و rdxA را در ایجاد مقاومت به مترونیدازول در ۵۴۴ سویه بالینی بررسی کردند. آنها نشان دادند که غیرفعال شدن ژن frxA مشابه غیر فعال شدن ژن rdxA موجب افزایش MIC و غیر فعال شدن ژن fdxB باعث ایجاد مقاومت متوسط در سویه‌های مقاوم به مترونیدازول می‌شود (۹).

در سال ۲۰۰۱ Jeong و همکارانش نشان دادند که غیر فعال شدن ژن frxA موجب افزایش مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های حامل ژن ناقص rdxA می‌شود. اما اثر کمی بر حساسیت به مترونیدازول در سویه‌های حامل آلل سالم rdxA دارد (۱۰).

نتایج مشابهی توسط فلاحی و همکارانش از تهران نیز گزارش شده است که نشان می‌دهد فراوانی مقاومت به مترونیدازول در زنان ۵۴٪ و در مردان ۴۶٪ است (۱۱). این میزان در مناطق مختلف جغرافیائی بین ۸۰-۱۰٪ متفاوت است (۱۲).

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 MIC است. در مطالعه Siavashi و همکارانش در تهران و Savari و همکارانش در کرمان و Rafeey و همکارانش در دانشگاه تبریز، میزان مقاومت نسبت به مترونیدازول را در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده به ترتیب ۹۵ ٪، ۷۱ ٪ و ۱۶/۵۴ ٪ گزارش کردند (۱۵-۱۳). در این مطالعه، مشابه مطالعه قبلی (۱۶)، میزان مقاومت به مترونیدازول بالا بود (۸۶٪).

نتایج ما حاکی از این است که مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری در بین نمونه بیوپسی‌های مثبت ۸۵ درصد است که این آمار نشان می‌دهد میزان مقاومت در بیماران مورد پژوهش بین زنان، شایع‌تر از مردان است که احتمالا شیوع بالای مقاومت به این آنتی بیوتیک در کشور ما و برخی دیگراز کشورهای آسیایی به علت مصرف زیاد این دارو برای درمان عفونت‌های ژنیکولوژیک در زنان است و جایگزینی آن با سایر آنتی بیوتیک ها در رژیم های درمانی امری ضروری است. همچنین مطالعه ما نشان می‌دهد یکی از مکانیسم‌های مقاومت هلیکوباکترپیلوری نسبت به مترونیدازول وقوع جهش در ژن frxA است. همچنین وقوع موتاسیون در ژن frxA تنها عامل مقاومت هلیکوباکترپیلوری نسبت به مترونیدازول نیست و عوامل دیگری نیز در مکانیسم مقاومت به مترونیدازول نقش دارند. اگر چه این بحث نیازمند تحقیق بیشتری است.

در این تحقیق، بر حسب نیاز غیرفعال شدن ژن frxA مد نظر بودکه روی آن بحث و تفسیر انجام شد. اما ارزیابی سایر مکانیسم های مقاومت مانند بیان بیش از حد پروتئین ترمیمی RecA و بررسی جهش در سایر ژن‌ها از جمله rdxA، fdxA، fdxB و .... در پژوهش‌های بعدی در سایر مناطق کشور و منطقه مورد پژوهش پیشنهاد می‌شود.

REFERENCES

1. Gerrits MM, Berning M, Van Vliet AH, Kuipers EJ, Kusters JG. Effects of 16S rRNA gene mutations on tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2984-6.

2.Peterson WL, Fendrick AM, Cave DR, Peura DA, Garabedian-Ruffalo SM, Laine L. *Helicobacter pylori*–related disease: guidelines for testing and treatment. Arch Intern Med 2000;160:1285-91.

3.Chan FK, To K, Wu JC, Yung M, Leung W, Kwok T, et al. Eradication of *Helicobacter pylori* and risk of peptic ulcers in patients starting long-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a randomized trial. Lancet 2002;359:9-13.

4.Das JC, Paul N. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. Indian JPediatr 2007;74:287-90.

5.Tomatari FH, Mobarez AM, Amini M, Hosseini D, Abadi ATB. *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in dyspeptic patients in Iran. Iran Red Crescent Med J 2010;12:409.

6.Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in Helicobacter pylori is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Mol Microbiol 1998;28:383-93.

7.Dadashzadeh K, Milani M, Rahmati M, Akbarzadeh A. Real-time PCR detection of 16S rRNA novel mutations associated with *Helicobacter pylori* tetracycline resistance in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2014;15:8883-6.

8.Binh TT, Suzuki R, Trang TTH, Kwon DH, Yamaoka Y. Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* using next-generation sequencing. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2343-8.

9.Kwon DH, Peña JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J. Frameshift mutations in rdxA and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000;46:793-6.

10.Jeong J-Y, Mukhopadhyay AK, Akada JK, Dailidiene D, Hoffman PS, Berg DE. Roles of FrxA and RdxA Nitroreductases of *Helicobacter pylori* in Susceptibility and Resistance to Metronidazole. J Bacteriol 2001;183:5155-62.

11.Fallahi G-H, Maleknejad S. *Helicobacter pylori* culture and antimicrobial resistance in Iran. Indian J Pediatr 2007;74:127.

12.Kim JJ, Reddy R, Lee M, Kim JG, El-Zaatari FA, Osato MS, et al. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2001;47:459-61.

13.Rafeey M, Ghotaslou R, Nikvash S, Hafez AA. Primary resistance in *Helicobacter pylori* isolated in children from Iran. J Infect Chemother 2007;13:291-5.

14.Siavashi F, Safari F, Doratotaj D, Khatami Gr, Falahi Gh, Mirnaseri S. Antimicrobial resistance of Helicobacter pylori isolates from Iranian adults and children. Arch Iran Med. 2006;9:308-14.

15.Abdollahi H, Savari M, Zahedi MJ, Darvish Moghadam S, Hayatbakhsh Abasi M. A study of rdxA gene in metronidazole resistant and sensitive Helicobacter pylori isolates in Kerman, Iran. Jundishapur J Microbiol. 2011; 4(2): 99-104.

16.Milani M, Ghotaslou R, Somi MH, Rafeey M, Akhi MT, Nahaei MR, et al. The status of antimicrobial resistance of Helicobacter pylori in Eastern Azerbaijan, Iran: comparative study according to demographics. J Infect Chemother. 2012;18:848-52.