

Klaritromisin dirençli *Helicobacter pylori*'nin saptanmasında, E-Test ve Agar Dilüsyon metodlarının karşılaştırılması

Comparison of the E-Test and the Agar Dilution Method to detect clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*

Peren H. BAĞLAN¹, Güleendam BOZDAYI², Muhip ÖZKAN³, Ali ÖZDEN⁴

Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü¹, Ziraat Fakültesi Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı², Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı⁴, Ankara Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı², Ankara

Giriş ve amaç: *H. pylori*, dünyada en sık rastlanan kronik bakteriyel enfeksiyondur. *H. pylori*'nin antimikrobiyal ajanlara direnç kazanmasından dolayı tedavide başarısızlıklar meydana gelmektedir. Çalışmamızın amacı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na, dispeptik yakınmalarla gelen *H. pylori* pozitif hastalarda, klaritromisine direnç sıklığını, agar dilüsyon ve E-Test yöntemleri gibi 2 ayrı yöntemle belirlemek ve 2 yöntemi karşılaştırmaktır. **Gereç ve yöntem:** Çalışmaya dispeptik yakınmalar nedeniyle endoskopik incelemeleri yapılan, 22-76 yaşları arasında (yaş ortalaması: 51±13), 43'ü kadın, 34'ü erkek toplam 77 hasta dahil edilmiştir. Endoskopik incelemesi yapılan 77 hastanın, 41'i gastrit, 13'ü gastrik ya da duodenal ülser, 3'ü normal, 20'si ise gastroduodenit, hiatus hernisi, alt özofagus sfinkter gevşekliliği, özofajit veya bulbitis tanılarından birini almıştır. *H. pylori*, at kanı içeren BHI agarda 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Klaritromisin direncinin belirlenmesi için ise, NCCLS standartlarına uygun agar dilüsyon ve E-test yöntemleri yapılmıştır. MIC değeri ≥1 µg/ml olan suşlar klaritromisine dirençli kabul edilmiştir. **Bulgular:** Çalışmaya alınan 77 hastanın, agar dilüsyon yöntemi ile 43'ünde (%55.8), E-Test yöntemi ile de 42'sinde (%54.5) klaritromisine direnç saptanmıştır. E-Test yöntemi ile yapılan MIC değerleri ile agar dilüsyon yöntemi ile yapılan MIC değerleri arasındaki uyumluluk istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (r=0.864, p<0.01). **Sonuç:** Çalışmamızda saptanan %54.5 ve %55.8 direnç oranları ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, bazı çalışmalarla benzerlik gösterirken bazılarına göre oldukça yüksek oranlar bulunmuştur. Sonuçlar, ülkemizde *H. pylori*'nin klaritromisine direncinin arttığını göstermiştir. Ayrıca aynı *H. pylori* suşlarına uygulanan 2 farklı yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı uyumluluk görülmüştür. Bu sonuç ise bize her iki yöntemde klaritromisin direncini belirlemede kullanılabileceğini göstermiştir. *H. pylori*'nin klaritromisin direncini tedavi öncesi belirlenmesi, direnç oranının yükselmesinin engellenmesi açısından önemlidir.

Anahtar sözcükler: *H. pylori*, klaritromisin, direnç, agar dilüsyon, E-test

Background/aim: *H. pylori* is the most common chronic bacterial infection in the world. Because of *H. pylori*'s acquired resistance to antimicrobial agents, treatment failure occurs. The aim of our study was to determine the prevalence of clarithromycin resistance in dyspeptic *H. pylori*-positive patients who applied to Ankara University School of Medicine, Department of Gastroenterology, by two methods - agar dilution and E-test - and to compare these two methods. **Materials and methods:** Seventy-seven *H. pylori*-positive patients (43 female, 34 male) were included in the study, aged between 22-76 (mean age: 51±13). Forty-one of the patients were diagnosed with gastritis, 13 were peptic or duodenal ulcer, 3 were normal gastrointestinal system, and 20 were diagnosed with one of the following diseases: gastroduodenitis, hiatal hernia, bulbitis or esophageal reflux. *H. pylori* culture was made with BHI agar and horse blood medium and incubated at 37°C for 72 hours. To determine the clarithromycin resistance, agar dilution and E-test methods were applied in accordance with NCCLS standards. Strains with MIC ≥1 µg/ml were accepted as resistant. **Results:** In 77 patients, 43 (55.8%) patients were resistant with agar dilution method and 42 (54.5%) were determined as resistant using the E-test method. There was a significant correlation between the MICs using the E-test and agar dilution (r=0.864, p>0.01). **Conclusion:** A comparison of our results with other studies shows similarities with some and discrepancies with others, demonstrating an increase in clarithromycin resistance over time. Two different methods, agar dilution and E-test, were applied to the same strains to determine the resistance. Our results showed statistical significance with the two methods, thus either can be used to determine resistance. It is important to know the clarithromycin resistance of the patient, to prevent its increase.

Key words: *H. pylori*, clarithromycin, resistance, agar dilution, E-test

GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya nüfusunun %60'ını enfekte eden *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), dünyada en sık rastlanan kronik bakteriyel enfeksiyondur (1, 2). Batı'da gelişmiş ülkelerde enfeksiyon oranı biraz daha düşmekte, fakat yine prevalans %25-50 civarında gö-

rülmektedir (3). Yüksek görülme sıklığına karşın, *H. pylori* ile enfekte olan hastaların çoğu asemptomatiktir (4). Ülkemiz, gelişmekte olan bir ülke olup, *H. pylori* toplumun büyük kısmını enfekte etme potansiyeline sahiptir.

H. pylori enfeksiyonunun mide ülseri, duodenal ülser, kronik atrofik gastrit, mide lenfoması ve mide kanseri ile ilişkisi bilinmektedir (5, 6). Duodenal ülserli ve mide lenfomalı hastaların %95'inde *H. pylori* pozitif iken, gastrik ülserde bu oran %65-75, mide kanserinde ise %60-80'dir (7, 8). *H. pylori* eradikasyonunun yapılmasından sonra komplikasyonların azalması *H. pylori*'nin hastalıklardaki etyolojik rolünü destekleyen en belirgin kanıttır (7). Bu nedenlerden dolayı bakterinin eradikasyonu önerilmektedir (9). Ancak *H. pylori*'nin antimikrobiyal ajanlara direnç kazanmasından dolayı tedavide başarısızlıklar meydana gelmektedir. Son yıllarda ise bu direnç oranının artması *H. pylori*'de antimikrobiyal ajanlara direncin önemini artırmıştır. Günümüzde tüm dünyada geçerliliği olan en uygun tedavi amoksisilin, klaritromisin ve ranitidin bizmut sitrat veya proton pompa inhibitörlerinden oluşan üçlü tedavidir (10).

Klaritromisin direncinin belirlenmesinde fenotipik ve genotipik olarak birçok yöntem vardır. Moleküler olarak A2143G, A2144G gibi mutasyonlara direnç tespiti yapılmasına karşın, fenotipik olarak da klaritromisin direncinin belirlenmesi önemlidir (11). Fenotipik yöntemlerden agar dilüsyon ile MIC ('Minimal Inhibitory Concentration') değerinin belirlenmesi diğer yöntemler arasında altın standarttır (12). Ayrıca daha pratik ve ticari olarak da bulunan E-Test (Epsilometer Agar Diffüzyon Testi) ve disk diffüzyon yöntemleri de bulunmaktadır (13).

Çalışmamızın amacı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na, dispeptik yakınmalarla gelen *H. pylori* pozitif hastalarda, klaritromisine direnç sıklığını, agar dilüsyon ve E-Test yöntemleri gibi 2 ayrı yöntemle belirlemek ve 2 yöntemi karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalar:

Çalışmaya dispeptik yakınmalar nedeniyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na, Ocak 2003 - Mayıs 2004 tarihleri arasında endoskopik incelemeleri yapılan ve yaşları 22-76 arasındaki (yaş ortalaması: 51±13), 43'ü kadın, 34'ü erkek toplam 77 hasta dahil edilmiştir. Çalışmada hastaların mide biyopsi örnekleri kullanılmıştır. Endoskopik inceleme yapılan 77 hastanın, 41'i gastrit, 13'ü gastrik ya da duodenal ülser, 3'ü normal, 20'si ise gastroduodenit, hiatus hernisi, alt özofagus sfink-

teri gevşekliği, özofajit veya bulbitis tanılarında birini almıştır.

Bakteri Kültürü:

Endoskopi ünitesinde alınan mide biyopsi örnekleri, steril serum fizyolojik içinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra, %7'lik taze, defibrine at kanı içeren Brain-Heart-Infusion Agar'a (Oxoid, İngiltere) ekim yapılmıştır. *H. pylori*'nin üreyebileceği mikroaerofilik atmosfer (Gas Generating Kit, Oxoid, İngiltere) sağlanıp, 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilere üreaz, katalaz ve oksidaz testleri uygulanmıştır. Pozitif olarak belirlenen suşlar %15'lik gliserol içeren Brucella-broth (Sigma, USA) sıvı besiyerine hızla aktarılıp -86°C'de daha sonra kullanılmak üzere saklanmıştır.

Direncin Belirlenmesi:

Agar Dilüsyon: İnokulum yapmak için 2.0 Mc Farland hazırlanmıştır. Klaritromisin, aseton ve distile su ile çözülmüştür. Bir suş için, %5 oranında koyun kanı içeren Mueller-Hinton agarı, (Lab M, UK) klaritromisin konsantrasyonları 0,032 µg/ml ile 16 µg/ml arasında değişen oranlarda antibiyotik konarak 10 ayrı plak hazırlanmıştır (14). Plaklar 72 saat süre ile 37°C'de mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiştir.

E-Test: Yüzde 5 oranında koyun kanı içeren Mueller-Hinton Agar hazırlanıp 2.0 Mc Farland'a göre ekim yapılmıştır. Klaritromisin E-Test şeritleri (AB Biodisk, İsveç) plaklara yerleştirilip plaklar 72 saat süre ile 37°C'de mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiştir.

Agar dilüsyon ve E-test, firma önerileri doğrultusunda, plaklarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MIC değerleri 'National Committee for Laboratory Standards (NCCLS)'a göre belirlenmiştir. MIC değeri ≥1 µg/ml olan suşlar klaritromisine dirençli olarak kabul edilmiştir.

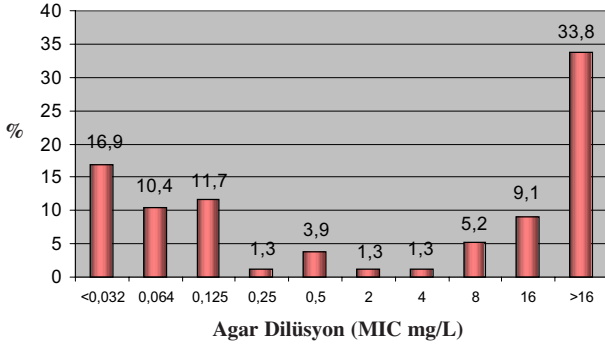
İstatistiksel Analiz:

Agar dilüsyon ve E-Test değişkenleri arasındaki ilişkinin incelenmesinde regresyon analizi kullanılmıştır.

BULGULAR

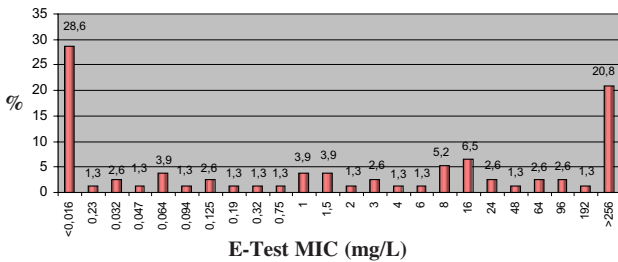
Çalışmaya alınan 77 hastanın, agar dilüsyon yöntemi ile 43'ünde (%55.8), E-Test yöntemi ile de 42'sinde (%54.5) klaritromisine direnç saptanmıştır. Yetmiş yedi *H. pylori* pozitif hastanın, agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MIC değerlerinin

yüzdeleri Şekil 1'de, E-Test yöntemi ile elde edilen MIC değerlerinin yüzdeleri Şekil 2'de, agar dilüsyon ve E-test sonuçlarının dağılımı ise Şekil 3'de gösterilmiştir.



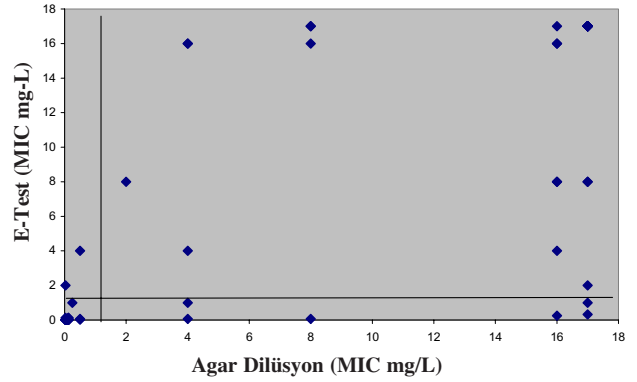
Şekil 1. Yetmiş yedi *H. pylori* pozitif hastanın, agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MIC değerlerinin yüzdelerinin gösterilmesi

Yetmiş yedi suşun, MIC₉₀ değeri agar dilüsyon yönteminde >16 µg/ml, E-test yönteminde >256 µg/ml olarak hesaplanırken, MIC₅₀ değeri ise agar dilüsyon yönteminde 4 µg/ml, E-test yönteminde 1.5 µg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. Yetmiş yedi *H. pylori* pozitif hastanın, E-Test yöntemi ile elde edilen MIC değerlerinin yüzdelerinin gösterilmesi

E-Test ile agar dilüsyon değişkenleri arasındaki ilişkiyi doğrusallaştırmak için iki değişkene logaritmik transformasyon uygulanmış ve değişkenler arasındaki korelasyon katsayısı 0.864, modelden yapılacak olan tahminlerin isabet derecesi de $r^2=0.7472$ bulunmuştur. Her iki katsayıda $p<0.01$ düzeyinde istatistik olarak önemlidir. E-Test yöntemi ile yapılan MIC değerleri ile agar dilüsyon yöntemi ile yapılan MIC değerleri arasındaki uyumluluk istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 3. Agar dilüsyon ve E-test sonuçlarının dağılımı. Bir nokta, bir ya da bazen birden fazla hastanın agar dilüsyon ve E-test sonuçlarına karşılık gelen değerlerin birleştirilmesi sonucu elde edilen noktadır. Agar dilüsyon ve E-test eksenlerindeki çizgi, MIC≥1 mg/L yani klaritromisin için dirençli kabul edilen değerden itibaren çizilmiştir

TARTIŞMA

Çalışmamızda klaritromisine direnç oranı E-test yöntemi ile %54.5 (42/77), agar dilüsyon yöntemi ile %55.8 (43/77) olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, agar dilüsyon yöntemi ile klaritromisin direnci %24 oranında saptanmıştır (15). Ülkemizde moleküler yöntemlerle yapılan klaritromisine direnç araştırmalarında ise %21, %48.2, %16.8 gibi oranlar bulunmuştur (16-18). Osato ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, klaritromisine direnç, E-Test yöntemi ile %12.5 oranında, agar dilüsyon yöntemi ile de %10.6 oranında saptanmıştır. E-test sonucu, agar dilüsyon sonucuna göre daha yüksek çıkmış ancak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,5$) ve böylece, klaritromisin direnci saptanmasında her iki yöntemde kullanılabilceği sonucuna varılmıştır (19). *H. pylori*'nin farklı yöntemlerle klaritromisine direnci ile ilgili çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar Tablo 1'de verilmiştir. Oranların farklılığı kullanılan yöntemlerin ve çalışma yıllarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında direnç sıklığının artmakta olduğunu görmekteyiz. Bunun nedeni de, klaritromisinin *H. pylori* tedavisi dışında diğer enfeksiyon hastalıklarında da sık kullanılmasıdır. Ayrıca ülkenin sosyoekonomik durumu *H. pylori* enfeksiyonunun görülme sıklığı açısından oldukça büyük önem taşır. Gelişmiş ülkelerde sosyoekonomik düzeyin yüksek olması enfeksiyonun yeni kuşaklarda azalmasına yol açmıştır. Birçok gelişmiş ülkede, *H. pylori* enfeksiyonu, son yıllarda belirgin bir şekilde düşmektedir.

Tablo 1. *H. pylori*'nin klaritromisin direnci ile ilgili yapılan çalışmalar

Kaynak	Ülke	%	Yöntem
10	Meksika	24	MIC
11	Japonya	12.9	MIC
12	Japonya	18	PCR-RFLP
13	Avrupa merkezleri	43.5	MIC
14	Fransa	10	MIC
15	Türkiye	14	MIC
16	Türkiye	21	MIC
17	Türkiye	24	MIC (Agar Dilüsyon)
18	Türkiye	48.2	PCR
19	Türkiye	16.8	PCR
20	Türkiye	21	PCR

%%: Klaritromisin direnci yüzdesi

Rehnberg ve ark.'nın Finlandiya'da yaptığı bir çalışmada, 1963-1973, 1983-1995 yılları arasında ki dönemde *H. pylori* enfeksiyonunda, %38'den %12'ye bir düşüş gözlenmiştir (20, 21).

Ayrıca çalışmamızda, klaritromisin direncinin belirlenmesinde E-Test yöntemi ile yapılan MIC değerleri ile agar dilüsyon yöntemi ile yapılan MIC değerleri arasındaki uyumluluk istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu yöntemler arasındaki uyumluluk, direncin belirlenmesinde, koşullara göre her iki yöntemde kullanılabilirliğini göstermektedir. Uygun laboratuvar şartları sağlandıktan ve NCCLS standartları uygulandıktan sonra agar dilüsyon yöntemi daha ucuz olması bakımından, E-test yöntemi ise daha pratik ve kolay uygulanabilir olması nedeni ile kullanılabilir. Her laboratuvar kendi şartlarına uygun olanı tercih edebilir. Ancak *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılığını belirlemede standardizasyonla ilgili bazı sorunlar vardır. Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılacak besiyeri, inkübasyon süresi ve anti-

biyotiklerin dirençlilik sınırının ne olması gerektiği kesinleşmemiştir (13). Ancak Amerika Birleşik Devletleri'nin belirlediği "National Commitee for Laboratory Standards" (NCCLS) ve Avrupa'nın belirlediği "European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases" (ESCMID) standartları vardır. Kullanacak besiyeri bakterinin iyi üremesini sağlamalıdır. Böylece üreme olmaması durumunda, üremeyi engelleyen faktörün besiyerinin olumsuz koşulları değil ortamdaki test edilen antibiyotik konsantrasyonu olduğu bilinmelidir (22). Yine inkübasyon süresinin ve inokulum miktarının ideal olamaması durumunda yanlış MIC değerleri bulunabilmektedir (22, 23). E-test yöntemi kolay uygulanabilir olması, disk difüzyon yöntemine benzer olması nedeni ile laboratuvar çalışmalarına kolay adapte edilebilmesi, kantitatif sonuçlar alınabilmesi ve inkübasyon süresinden etkilenmemesi gibi nedenlerle, pek çok araştırmacı tarafından zor üreyen bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde ideal yöntem olarak kabul edilmektedir (22, 24, 25).

Sonuç olarak, klaritromisin dirençli *H. pylori*'nin varlığı, eradikasyonu olumsuz etkileyebilmektedir. Bu yüzden bakteri direncinin önceden bilinmesi ve en uygun duyarlılık yönteminin saptanması büyük önem taşır. Etkin tedavi rejimini belirlemek, antibiyotik direncinin önüne geçmek, gereksiz ve fazla antibiyotik kullanımının getireceği ekonomik yükü azaltmak, bölgesel ve ulusal düzeyde direnç durumunu takip etmek ve böylece uygun ampirik tedavi rejimini belirleyebilmek için, *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılığın belirlenmesi önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Farthing MJ. *Helicobacter pylori* infection: an overview. *Br Med Bull* 1998; 54: 1-6.
2. Buck GE. *Campylobacter pylori* and gastrointestinal disease. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 1-12.
3. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 1997; 10: 720-41.
4. Blaser MJ. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: Should all be eliminated? *Lancet* 1997; 349: 1020-22.
5. Sipponen P. *Helicobacter pylori* and chronic gastritis: an increased risk of peptic ulcer? *Scand J Gastroenterol*, 1991; 26: 6-10.
6. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 116-8.
7. Nomura A, Stemmarman GN, Chyou PH. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994; 120: 977-81.
8. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ* 1998; 316: 1507-10.
9. NIH. Consensus Development Panel on *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease. *J Am Med Assn* 1994; 272: 65-9.
10. Pounder RE. New developments in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Scand J Gastroenterol Suppl*: 1997; 223: 43-5.
11. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002; 50: 285-9.
12. Megraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther*, 117(Suppl: 1): 1997; 45-53.
13. Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M. Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12: 19-26.
14. National Commitee for Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial testing. VI th Internatioanl supplement. M100S9. National Commitee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA. 1999.

Hp'de klaritromisin direncinin saptanması

15. Işıksal F, Çolakoğlu S, Köksal F, ve ark. *Helicobacter pylori*-Antibiyotik Direnci. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 20th National Gastroenterology Week Abstracts 2003; 14 (Suppl 1): 40.
16. Önder GF, Aydın A, Akarca SU, ve ark. Ülkemizde *Helicobacter pylori*'nin klaritromisine direncinin real-time PCR yöntemi ile araştırılması. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 21th National Gastroenterology Week Abstracts 2004; 15 (Suppl 1): 40.
17. Çırak YM, Ünal S, Türet S, ve ark. Klaritromisine dirençli ve duyarlı *Helicobacter pylori* suşlarının midedeki dağılımı. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 21th National Gastroenterology Week Abstracts 2004; 15 (Suppl 1): 41.
18. Çolakoğlu S, Yetkin M, Koyar B, ve ark. *Helicobacter pylori* tedavisinde klaritromisine karşı gelişen antibiyotik direncinin genomik düzeyde incelenmesi. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 21th National Gastroenterology Week Abstracts 2004; 15 (Suppl 1): 236.
19. Osato MS, Reddy R, Reddy SG, et al. Comparison of the E-Test and NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 39-44.
20. Rehnberg-Laiho L, Rautelin H, Koskela P. Decreasing prevalence of *Helicobacter* antibodies in Finland, with reference to the decreasing incidence of gastric cancer. *Epidemiol Infect* 2001; 126: 37-42.
21. Mitchell H, Megraud F. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002; 7(Suppl: 1) 8-16.
22. Hartzen SH, Andersen LP, Bremmelgaard A, et al. Antimicrobial susceptibility testing of 230 *Helicobacter pylori* strains: Importance of medium, inoculum and incubation time. *Antimicrobial Agents and Chemother* 1997; 41: 2634-39.
23. Henriksen TH, Brorson O, Schoyen R. et al. A simple method for determining metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1424-6.
24. Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, et al. Comparative evaluation of the E-test, agar dilution and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 Antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1842-46.
25. Glupczynski Y, Labbe M, Hasen W, et al. Evaluation of the E-test for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 29: 2072-75.
26. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2677-80.
27. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, et al. Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2214-16.
28. Yang YJ, Yang JC, Jeng YM, et al. Prevalence and rapid identification of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolates in children. *Pediatr Infect Dis* 2001; 20: 662-6.
29. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1998; 115: 58-66.
30. Megraud F, Camou-Juncas C, Occhialini, A, et al. *Helicobacter pylori* resistance levels to clarithromycin remain stable. *Gastroenterology* 1996; 100: A192.
31. Palabıyıkoglu M, Şahin F, Özden A, ve ark. Disk diffüzyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* klinik izolatlarında amoksisiline ve klaritromisine karşı primer duyarlılığın araştırılması ve tedavi sonrası muhtemel duyarlılık değişikliğinin incelenmesi. *Turk J Gastroenterol*, 1997; 8: 309-12.
32. Şahin F, Özden A, Ünver E, ve ark. Agar dilüsyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* için metronidazol dirençlilik testi ve disk diffüzyon yöntemi ile amoksiline ve klaritromisinin *H. pylori*'ye etkisi. *Gastroenteroloji* 1994; 5: 203-6.