

بررسی مقاومت هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه گوارش بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ساری نسبت به آنتی بیوتیک های منتخب در سال ۱۳۸۲-۱۳۸۱

فرشاد نقش‌وار (M.D.)* حافظ تیرگر فاخری (M.D.)*^{**} ژیلا ترابی زاده (M.D.)*
امید عمادیان (M.D.)* ایرج ملکی (M.D.)*^{**} امین زارع (M.D.)*^{***}

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری، باسیل گرم منفی ساکن در مخاط معده بوده و با طیف وسیعی از بیماری‌های گوارشی همراه است. این ارگانیسم در کشورهای در حال توسعه شیوع بالایی داشته و داروهای مختلفی جهت درمان آن به کار می‌رود. در برخی از موارد، رژیم های درمانی با موفقیت همراه نبوده است. یکی از علل عدم موفقیت، بروز مقاومت در بین سویه های باکتری نسبت به آنتی بیوتیک است. بنابراین برای به دست آوردن فرمول درمانی مناسب باید میزان حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها سنجیده شود. هدف این مطالعه، بررسی مقاومت هلیکوباکتر پیلوری کشت داده شده از بیوپسی معده بیماران با علائم گوارشی فوقانی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ساری نسبت به آنتی بیوتیک های منتخب می باشد.

مواد و روش ها: ۶۷ مورد هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از کشت بر علیه سه آنتی بیوتیک مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی سیلین مورد بررسی قرار گرفته است و از روش انتشار دیسک (Disk diffusion) برای تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و همچنین برای شناسایی الگوی مقاومت آنتی بیوتیک هلیکوباکتر پیلوری جدا شده، استفاده گردیده است. مرز بین حساسیت و مقاومت (Cut of point) عبارت است از MIC90 که حداقل ۹۰ درصد نمونه ها در آن MIC یا کم تر، ایجاد هاله کرده باشند.

یافته ها: برای آموکسی سیلین MIC90=0.25 g/ml تعیین شده و تمام نمونه ها به آموکسی سیلین حساس بوده اند. برای کلاریترومایسین MIC90=0.25 g/ml تعیین شده و فقط یک مورد مقاوم دیده شده است. برای مترونیدازول MIC90=16 g/ml تعیین شده و چهار مورد مقاوم دیده شده است.

استنتاج: این پژوهش نشان داد که بر خلاف تحقیقات انجام شده در کشورهای مختلف، سطح نسبتاً پایینی از مقاومت نسبت به کلاریترومایسین و مترونیدازول دیده می شود. به علاوه همانند اکثر مقالات، هیچ مورد مقاومی به آموکسی سیلین مشاهده نشده است. بنابراین با استفاده از الگوی مقاومت دارویی می توان از داروهای بررسی شده در درمان هلیکوباکتر پیلوری استفاده نمود.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، انتشار دیسک، مقاومت آنتی بیوتیکی

این تحقیق طی شماره ۵۷-۷۹ در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه مازندران انجام شده است.

* متخصص بائولوژی عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران ✉ ساری: بلوار امیرمازندرانی، مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره)

** فوق تخصص گوارش و کبد، عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

*** دستیار بائولوژی

تاریخ تصویب: ۸۳/۱۲/۵

تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۸/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۳/۶/۱۰

مقدمه

اخیر جهت بررسی مقاومت Invitro هلیکوباکتریلوری جدا شده از بیماران با علائم گوارشی فوقانی مراجعه کننده به درمانگاه گوارش بیمارستان امام خمینی (ره) ساری که تحت آندوسکوپی تشخیصی قرار گرفته اند، طرح ریزی شده است.

مواد و روش ها

تشخیص و جدا سازی هلیکوباکتریلوری

برای شروع کار باید نمونه های بیوپسی از بیماران تهیه شود. لذا از بیماران با علائم گوارشی فوقانی مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی (ره) ساری نمونه بیوپسی از آنتر معده گرفته شده و برای پی بردن به وجود هلیکوباکتریلوری در نمونه بیوپسی از آزمون اوره آز سریع در اتاق آندوسکوپی استفاده شد و نمونه های اوره آز مثبت در محیط ترانسپورت (نرمال سالین استریل) در طی حداکثر ۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد.

در آزمایشگاه نمونه ها روی صفحه حاوی محیط انتخابی (Selective) بروسلا آگار (Brucella agar) کشت داده شده و به مدت ۵-۳ روز در داخل انکوباتور با CO_2 ۵ تا ۱۰ درصد قرار داده می شود. از ۱۱۰ مورد بیوپسی که روی محیط فوق کشت داده شده، تنها ۶۷ مورد کشت موفق وجود داشت که در آن ها باکتری ها دارای فرم خمیده بوده و آلودگی وجود نداشت سپس سوسپانسیون باکتری در لوله های حاوی ۲ میلی لیتر سرم استریل تهیه می شود. کدورت سوسپانسیون بایستی مطابق استاندارد شماره یک مک فارلند یعنی 3×10^8 باکتری در میلی لیتر باشد.

مراحل آزمون آنتی بیوگرام:

سه آنتی بیوتیک مترونیدازول، کلاریترومایسین و آموکسی سیلین با رقت های مختلف توسط متد انتشار

هلیکوباکتریلوری، باسیل گرم منفی ساکن در مخاط معده بوده و با طیف وسیعی از بیماری های گوارشی همراه است (۱). این میکروارگانیسم عامل کاستریت مزمن فعال و همچنین زخم پپتیک بوده و نیز از عوامل خطر ساز سرطان معده و B-cell maltoma می باشد (۲ تا ۶). چندین مطالعه دیگر همراهی آن را با بیماری های غیر گوارشی نیز نشان می دهد (۷).

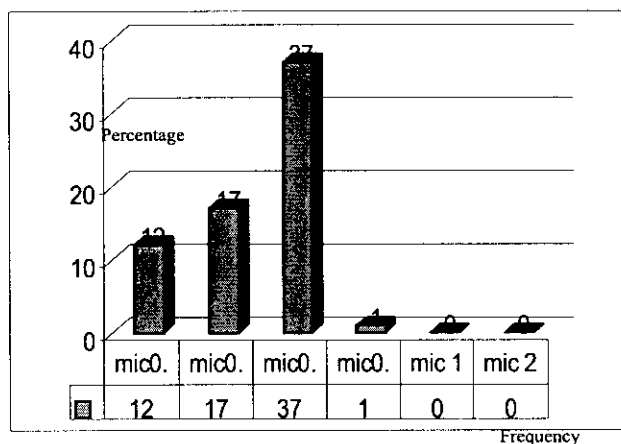
از زمانی که هلیکوباکتریلوری برای اولین بار توسط Warren, Marshall در استرالیا کشت داده شد (۸) تا به امروز هزاران مقاله در رابطه با همه گیری شناسی ژنتیک مولکولی، میکروبیولوژی جنبه های بالینی و درمان این پاتوژن انسانی گزارش شده است.

این ارگانیسم در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران شیوع بالایی داشته (۹، ۱۰) و داروهای مختلفی جهت درمان آن به کار می رود. در برخی از موارد این رژیم های درمانی با موفقیت همراه نبوده است (۱۱ تا ۱۳). یکی از علل عدم موفقیت، بروز مقاومت در بین سویه های باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد (۱۲، ۱۳). بنابراین برای به دست آوردن فرمول درمانی مناسب باید میزان حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها سنجیده شود.

بنابراین تعیین الگوی حساسیتی (Susceptibility) در انتخاب رژیم درمانی مناسب جهت ریشه کنی ارگانیسم و در نهایت کاهش عود زخم پپتیک و بالطبع کاهش هزینه ها و خطرات بعدی امری ضروری است (۱۱ تا ۱۳).

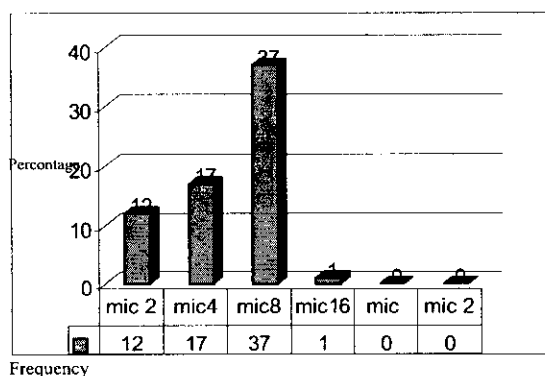
به واسطه مشکل بودن کشت هلیکوباکتریلوری (و بالطبع بررسی الگوی حساسیتی آن) مطالعات محدودی در این زمینه در کشور ما انجام شده است. هم چنین با توجه به تفاوت الگوی حساسیتی در مناطق مختلف، لزوم انجام این تحقیق بیش تر احساس می شود. مطالعه

با توجه به نمودار فوق Cut of point برای آموکسی سیلین $MIC_{90}=0.25 \text{ g/ml}$ تعیین شده و تمام نمونه‌ها به آموکسی سیلین حساس بودند. در مورد کلاریترومایسین از رقت‌های $0.06-0.12-0.25-0.5-12 \text{ g/ml}$ استفاده شده است MIC تعیین شده در ۶۷ مورد نمونه کشت داده شده بصورت نمودار ۲ خلاصه شده است.



نمودار شماره ۲: رقت‌های مورد استفاده و MIC تعیین شده آنتی بیوتیک کلاریترومایسین در ۶۷ بیمار

با توجه به نمودار فوق، Cut of point برای کلاریترومایسین $MIC_{90}=0.25 \text{ g/ml}$ تعیین شده و فقط یک مورد مقاوم (۱.۴۹ درصد) دیده شده است. در مورد مترونیدازول از رقت‌های $2-4-8-16-32 \text{ g/ml}$ استفاده شده است MIC تعیین شده در ۶۷ مورد به صورت نمودار ۳ خلاصه شده است.



نمودار شماره ۳: رقت‌های مورد استفاده MIC تعیین شده آنتی بیوتیک مترونیدازول در ۶۷ بیمار

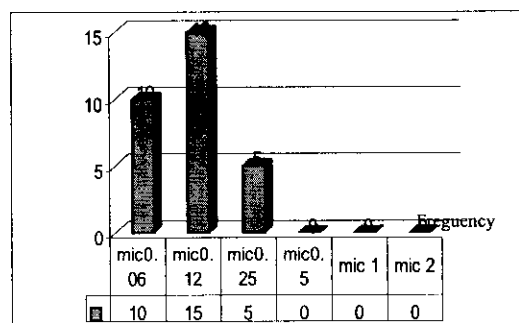
دیسک (disk diffusion) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برداشت شده و جهت انجام آزمون حساسیت روی محیط مولر هیتون آگار (Muller-Hinton agar) تلقیح شده و با میله‌ای شیشه‌ای خمیده و استریل پخش می‌گردد تا سوسپانسیون جذب محیط شود.

بعد از خشک شدن سطح محیط، دیسک‌های بلانک استریل شده در وسط صفحه گذاشته می‌شود. سپس از محلول‌های حاوی رقت‌های مختلف، آنتی بیوتیک مورد نظر که قبلاً تهیه شده است میزان ۱۰ میکرولیتر برداشته و به آهستگی روی دیسک بلانک تلقیح می‌گردد. سپس صفحه‌ها به صورت وارونه به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و بعد از این مدت، کم‌ترین غلظتی از آنتی بیوتیک که باعث ایجاد هاله به دور دیسک شده را به عنوان MIC^1 در نظر می‌گیریم.

مرز بین حساسیت و مقاومت (Cut of point) عبارت است از MIC_{90} که حداقل ۹۰ درصد نمونه‌ها در آن MIC یا کم‌تر، ایجاد هاله کرده باشند.

یافته‌ها

در مورد آموکسی سیلین از رقت‌های $0.06-0.12-0.25-0.5-12 \text{ g/ml}$ استفاده شده است MIC تعیین شده در ۶۷ مورد نمونه کشت داده شده به صورت نمودار ۱ خلاصه شده است.



نمودار شماره ۱: رقت‌های مورد استفاده و MIC تعیین شده آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در ۶۷ بیمار

آن برای درمان عفونت‌های رایج استفاده می‌شود. بالطبع سطح مقاومت ارگانیسم‌ها نسبت به آن پایین است. این مسأله در مورد هلیکوباکتریلوری هم صدق می‌کند. بنابراین با توجه به شیوع پایین مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک، می‌تواند در درمان ترکیبی به‌عنوان جایگزین مناسب برای مترونیدازول بکار رود، ولی در کشورهایی که از نظر اقتصادی در وضعیت خوبی قرار ندارند، بالا بودن قیمت دارو امکان استفاده از آن را محدود کرده است.

جدول شماره ۱: میزان بروز مقاومت ضد میکروبی در بین H.pylori در کشورهای مختلف.

کشور	تعداد گونه‌های جدا شده	مترونیدازول	کلاریترومایسین	درصد مقاومت گونه‌ها نسبت به
ایران (۱۴)	۷۰	۳۷	۱/۴۳	آموکسی سیلین
هرستان صمدی (۱۵)	۶۵	۷۸/۵	-	-
بهرین (۱۶)	۸۳	۵۷	۳۵/۵	-
امارات متحده عربی (۱۷)	۱۶	۴۲	-	-
نیجریه (۱۸)	۵۵	۴۰	۱۲/۷	-
هند (۱۹)	۷۸	۹۰	-	-
پرو (۲۰)	۱۸	۶۱	۵۰	-
آمریکا (۲۱)	۱۷۹	۳۷/۴	۶/۱	-
ایتالیا (۲۲)	۳۶۹	۲۹/۷	۳۲/۱	۲۶
سوئد (۲۳)	۴۱۵	۳۰	۹	-
آلمان (۲۴)	۲۷۱	۳۲-۱	۳/۳	-
اسپانیا (۲۵)	۲۸۳	۲۵/۴	۹/۵	-

مقاومت نسبت به آموکسی سیلین در این مطالعه، ایران (۲۷) و سایر کشورها (جدول شماره ۱) دیده نشده است و با وجود مصرف گسترده این آنتی‌بیوتیک در کشور ما توجهی برای حساسیت بالا به آن وجود ندارد. در یک مطالعه در ایتالیا، ۲۶ درصد و مطالعه دیگری در چین ۴۲ درصد مقاومت نسبت به آموکسی سیلین گزارش شده است (۲۲، ۲۸). بنابراین از آموکسی سیلین به‌دلیل عدم بروز مقاومت، در دسترس بودن و قیمت پایین آن می‌توان به‌عنوان یکی از داروهای ترکیبی مناسب جهت ریشه‌کنی هلیکوباکتریلوری استفاده کرد.

با توجه به نمودار فوق، Cut of point برای مترونیدازول MIC₉₀=16g/ml تعیین شده و تعداد موارد مقاوم 4 (5.94%) بوده است.

بحث

در این تحقیق شیوع مقاومت هلیکوباکتریلوری به مترونیدازول و کلاریترومایسین به ترتیب ۵/۹۴ و ۱/۴۹ درصد بوده که بر خلاف تحقیقات انجام شده در کشورهای مختلف (جدول شماره ۱) سطح نسبتاً پایینی از مقاومت نسبت به دو آنتی‌بیوتیک فوق دیده می‌شود. به‌علاوه در این تحقیق همانند اکثر مطالعات (جدول شماره ۱) مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسی سیلین وجود نداشته است. با وجود این که مترونیدازول از آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده در درمان هلیکوباکتریلوری می‌باشد، به‌دلیل این که میزان بروز مقاومت نسبت به آن در ایران (تهران) (۳۷ درصد) و در سایر کشورها (جدول شماره ۱) (۹۰-۲۵/۴ درصد) رو به افزایش است، دامنه استفاده از آن محدودتر گشته است (۱۴). این اختلاف می‌تواند ناشی از مصرف گسترده مترونیدازول جهت درمان عفونت‌های انگلی، تناسلی یا دندانی باشد. در این مطالعه به‌دلیل سطح پایین مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک (۵/۹۶ درصد) همچنان می‌توان از این دارو به‌عنوان یک رژیم مناسب در درمان ترکیبی جهت ریشه‌کنی هلیکوباکتریلوری خصوصاً در بیمارانی که نسبت به ترکیبات پنی‌سیلینی حساسیت دارند، استفاده کرد.

کلاریترومایسین داروی دیگری است که شیوع مقاومت به آن در ایران (تهران، ۱/۴۳ درصد) و در سایر کشورها (جدول شماره ۱) (۳/۳-۵۰ درصد) می‌باشد (۲۷). در تحقیق حاضر، شیوع مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک ۱/۴۹ درصد می‌باشد. علت شیوع پایین مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک را می‌توان چنین توجیه کرد که به‌علت قیمت بالای دارو، کم‌تر از

فهرست منابع

1. Dunn BE , Cohen H , Blaser MJ. Helicobacter pylori. *Clin Microbiol Rev* 1997 ; 10:720-41.
2. NIH Consensus conference. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. *Jam Med Assoc* 1994 ; 272:65-9
3. Parsonnet J , friedman GD , Vandersteen DP , Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *New Engl J Med* 1991;325:1127-31.
4. Wotherspoon AC , Ortiz – Hidalgo C , Falzon MR , Isaacson PG. Helicobacter pylori – associated gastritis and primary B – cell gastric lymphoma *lancet* 1991 ; 338:1175 – 6.
5. Blaser MJ. Helicobacter pylori and the Pathogenesis of gastrointestinal inflammation. *J infect Dis* 1990 ; 161:626 –33.
6. Lee A , Foz J , Hazells. Pathogenicity of Helicobacter pylori: a perspective. *Infect Immun* 1993 ; 61:1601 –10
7. Patel P , Gasbarrini G , Pretolani S , Gasbarrini A , Franceschi F. Extradigestive diseases and Helicobacter Pylori infection. *Curr opin Gastroenterol* 1997 ; 13:52 – 5
8. Marshall BJ , Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984 ; 1:1311 –5.
9. Massarrat S , Saberi – Firoozi M , Solemani A , Himmelmann GW , Hitzes M , Keshavarz H. “Peptic ulcer disease , irritable bowel. Syndrome and constipation in two population in Iran.” *Eur J Gastroenterol and Hepatol* 1995 ; 7:427 – 433.
10. Mikaeli J , Malekzadeh R , Ziad Alizadeh B, Prevalence of Helicobacter Pylori in two Iranian Provinces with high and low incidence of gastric carcinoma” *Arch Iranian med* 2000 ; 3:6-9.
11. Georgell , Borody TJ , Andrews P Cure of duodenal ulcer after eradication of Helicobacter pylori. *Med J Aust* 1990 ; 153:145 – 49.
12. Graham DY , Lew GM , Klein PD Effect of treatment of Helicobacter Pylori infection on the long – term recurrence of gastric and duodenal ulcer. *Ann Intern Med* 1992 ; 116:705 – 08.
13. Rauws EAJ , Tytgat GNJ. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of Helicobacter pylori. *Lancet* 1990 ; 1:1233 – 35.
14. Siavoshi F , Pourkhajeh AH , Merat S , Susceptibility of Various strains of Helicobacter pylori to selected agents” *Arch Iranian Med* 2000 ; 3:60 – 3.
15. Megraud F. Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics. *Aliment pharmacol there* 1997 ; 11 (suppl.1):43 –53.
16. Al – Qurashi AR , EL – Morsy F , AL – Quorain AA. Evolution of metronidazole and tetracycline susceptibility pattern in

- Helicobacter pylori at a hospital in Saudi Arabia. *Int J Antimicrob Agents* 2001 ; 17 (3):233 – 6
17. Binndayna KM. Antibiotic susceptibilities of Helicobacter pylori. *Saudi Med J* 2001 ; 22 (1):53 – 7.
18. Adeyemi EO , Fadlalla H , al – Homs M, Clinicopathological assessment of gastric biopsy samples of patients with Helicobacter pylori Infection – Metronidazole resistance and compliance problems in the united Arab Emirates. et al *Gastroenterol* 1992 ; 24 80:436 – 9.
19. Ani AE, Malu Ao, onan JA, Antimicrobial susceptibility test of Helicobacter pylori Isolafed from Jos , Nigeria. *Trans R soc Yrop Med Hyg* 1999 ; 93 (6):659 – 61.
20. Mukhopadhyay Ak , kersulyte D , Jeongjy, Distinctiveness of genotypes of Helicobacter pylori in Calcutta , India. *J Bacteriol* 2000 ; 182 (11):219 – 4.
21. Vasquez A , Valdezy , Gilman RH, Metronidazol and clarithromycin resistance in Helicobacter pylori determined by measuring MIC of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. *J clin Microbiol* 1996 ; 34:232 – 4.
22. Osato MS , Reddy R , Graham DY. Metronidazole and clarithromycin resistance amongst Helicobacter pylori isolates from a large metropolitan hospital in the united ststes. *Int J Antimicrob Agents* 1999 ; 12 (40):341 – 7.
23. Realdi G, Dore MP, Piana A, Pretreatment antibiotic resistance in Helicobacter pylori infection: results of three randomized controlled studies. *Helicobacter* 1999 ; 4 (2):106 – 12.
24. Wreiber K , olsson – liljequist B , Engstrand L. Development of resist ant Helicobacter pylori in Sweden. Tendency toward increasing resistance to clarithromycin. *Lakartidningen* 1999 ; 96 (6):582 – 4.
25. Wolle K , Nilius M , leodolter A, Prevalence of Helicobacter pylori resistance to several antimicrobial agents in a region of Germany. *Eur J clin Microbiol Infect Dis* 1998 ; 17 (7):519– 21.
26. Lopez Bartolome O , Moran Vasallo A , Ramitez Armengol JA, Microbiologic , diagnosis of Helicobacter pylori and its resistance to antibiotics. *Rev clin ESP* 1998 ; 198 (7):420 – 3.
27. Malekzadeh R , Merat S , Derakhshan MH, “Helicobacter pylori and the Gut. Low Helicobacter pylori eradication rates with 4 –and 7-day regimens in an Iranian population” *J Gastroenterol and Hepatol* 2003 ; 1:13 – 17.
28. Wu H , shi XD , Wang HT , Liu JX. “Resistance of Helicobacter pylori to metronidazole , tetracycline and amoxicillin”. *J Antimicrob chemother* 2000 ; 46:121 – 123.