

# بررسی مقاومت هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه گوارش بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ساری نسبت به آنتی بیوتیک های منتخب در سال ۱۳۸۲-۱۳۸۳

\* ریلا ترابی زاده (M.D.)  
 \*\* حافظ تیرگر فاخری (M.D.)  
 \*\*\* امین زارع (M.D.)  
 \*\*\*\* ایرج ملکی (M.D.)  
 \* فرشاد نقش وار (M.D.)  
 \*\* امید عمادیان (M.D.)

## چکیده

**سابقه و هدف :** هلیکو باکتر پیلوری، با سیل 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، رژیم‌های درمانی با موفقیت همراه نبوده است. یکی از علل عدم موفقیت بروز مقاومت در بین سویه‌های باکتری نسبت به آنتی بیوتیک است. بنابراین برای به دست آوردن فرمول درمانی مناسب باید میزان حساسیت و مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک‌ها سنجیده شود. هدف این مطالعه، بررسی مقاومت هلیکو باکتر پیلوری کشت داده شده از بیوبسی معده بیماران با علامت گوارشی فوکانی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) شهرستان ساری نسبت به آنتی بیوتیک‌های منتخب می‌باشد.

**مواد و روش‌ها :** ۶۷ مورد هلیکو باکتر 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 هلیکو باکتر پیلوری جدا شده، استفاده گردیده است. مرز بین حساسیت و مقاومت (Cut off point) عبارت است از MIC90 که حداقل ۹۰ درصد نمونه‌ها در آن MIC یا کمتر، ایجاد هاله کرده باشد.

**یافته‌ها :** برای آموکسی سیلین  $MIC90=0.25 \text{ g/ml}$  تعیین شده و تمام نمونه‌ها به آموکسی سیلین حساس بوده اند. برای کلاریترومایسین  $MIC90=0.25 \text{ g/ml}$  تعیین شده و فقط یک مورد مقاوم دیده شده است. برای مترونیدازول  $MIC90=16 \text{ g/ml}$  تعیین شده و چهار مورد مقاوم دیده شده است.

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

## واژه‌های کلیدی : هلیکو باکتر پیلوری، انتشار دیسک، مقاومت آنتی بیوتیکی

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

\* متخصص پاتولوژی عضو هیأت، علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

\*\* ساری: بلوار امیر مازندرانی، مرکز آموزش درمانی امام خمینی (ره)

\*\*\* دستیار پاتولوژی

تاریخ تصویب: ۱۵/۱۲/۸۳

تاریخ انجام اصلاحات: ۲۰/۰۸/۸۳

## مقدمه

اخير جهت بررسی مقاومت Invitro هلیکوباکترپیلوی 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 روش‌ها

### تشخیص و جدا سازی هلیکوباکترپیلوی

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 بی بردن به وجود هلیکوباکترپیلوی در نمونه بیوپسی از آزمون اوره آز سریع در اتفاق آندوسکوپی استفاده شد و نمونه های اوره آز مثبت در محیط ترانسپورت (ترمال سالین استریل) در طی حداقل ۴ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد.

در آزمایشگاه نمونه ها روی صفحه حاوی محیط انتخابی (Selective) بروسل‌آگار (Brucella agar) کشت داده شده و به مدت ۳-۵ روز در داخل انکوپاتور با  $\text{CO}_2$  ۱۰ 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 آلدگی وجود نداشت سپس سوسپانسیون باکتری در لوله های حاوی ۲ میلی لیتر سرم استریل تهیه می شود. کدورت سوسپانسیون باستی مطابق استاندارد شماره یک مک فارلند یعنی  $3 \times 10^5$  باکتری در میلی لیتر باشد.

مراحل آزمون آنتی بیوگرام: سه آنتی بیوپتیک مترونیدازول، کلاریتیروماسین و آموکسی سیلین با رقت های مختلف توسط مت انتشار

هلیکوباکترپیلوی، با سیل گرم منفی ساکن در مخاط معده بوده و با طیف وسیعی از بیماری های گوارشی همراه است<sup>(۱)</sup>. این میکرووارگانیسم عامل گاستریت مزمن فعال و همچنین زخم پیتیک بوده و نیز از عوامل خطرساز سرطان معده و B-cell maloma می باشد<sup>(۲ تا ۶)</sup>. چندین مطالعه دیگر همراهی آن را با بیماری های غیر گوارشی نیز نشان می دهد<sup>(۷)</sup>.

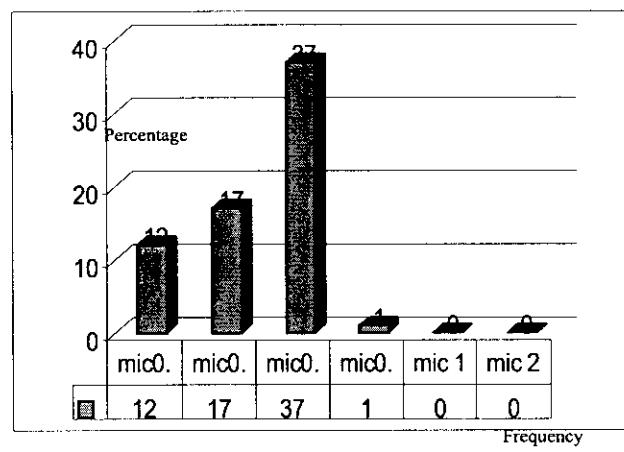
از زمانی که هلیکوباکترپیلوی برای اولین بار توسط Warren, Marshall در استرالیا کشت داده شد<sup>(۸)</sup> تا به امروز هزاران مقاله در رابطه با همه گیری شناسی ژنتیک مولکولی، میکروبیولوژی جنبه های بالینی و درمان این پاتوژن انسانی گزارش شده است.

این ارگانیسم در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران شیوع بالایی داشته<sup>(۹، ۱۰)</sup> و داروهای مختلفی جهت درمان آن به کار می رود. در برخی از موارد این رژیم های درمانی با موقیت همراه نبوده است<sup>(۱۱ تا ۱۳)</sup>. یکی از علل عدم موقیت بروز مقاومت در بین سویه های باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد<sup>(۱۲)</sup>. 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 پیتیک و بالطبع کاهش هزینه ها و خطرات بعدی امری ضروری است<sup>(۱۱ تا ۱۳)</sup>.

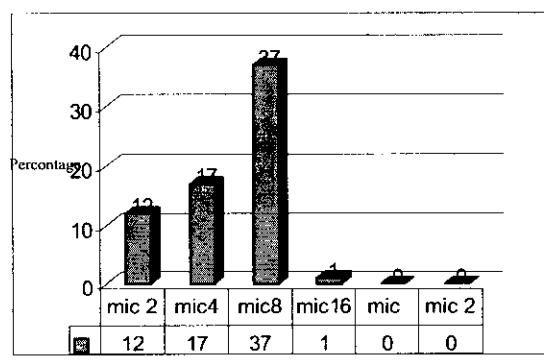
به واسطه مشکل بودن کشت هلیکوباکترپیلوی (و بالطبع بررسی الگوی حساسیتی آن) مطالعات محدودی در این زمینه در کشور ما انجام شده است. همچنین با توجه به تفاوت الگوی حساسیتی در مناطق مختلف، لزوم انجام این تحقیق بیشتر احساس می شود. مطالعه

با توجه به نمودار فوق Cut of point برای آموکسی سیلین  $\text{g/ml}$   $\text{MIC90}=0.25$  تعیین شده و تمام نمونه‌ها به آموکسی سیلین حساس بودند. در مورد کلاریترومایسین از رقت‌های  $\text{g/ml}$  ۰.۰۶-۰.۱۲-۰.۲۵-۰.۵-۱.۲ 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  $\text{MIC90}=0.25 \text{ g/ml}$  تعیین شده و فقط یک مورد مقاوم (۱.۴۹ درصد) دیده شده است. در مورد مترونیدازول از رقت های  $\text{g/ml}$  ۲-۴-۸-۱۶-۳۲ استفاده شده است. MIC تعیین شده در ۶۷ مورد بصورت نمودار ۳ خلاصه شده است.



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

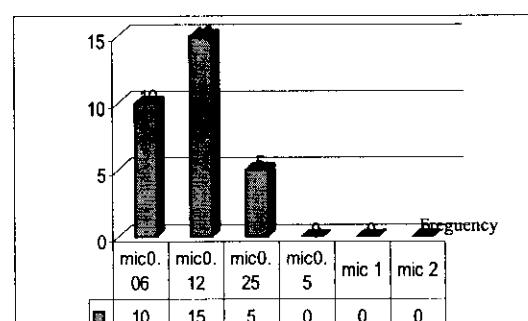
دیسک (disk diffusion) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برداشت شده و جهت انجام آزمون حساسیت روی محیط مولر هیتون آگار (Muller-Hinton agar) تلقیح شده و با میله‌ای شیشه‌ای خمیده و استریل پخش می‌گردد تا سوسپانسیون جذب محیط شود.

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 میکرو لیتر برداشته و به آهستگی روی دیسک بلانک تلقیح می‌گردد. سپس صفحه‌ها به صورت وارونه به مدت ۴۸ ساعت انکو به شده و بعد از این مدت، کمترین غلظتی از آنتی بیوتیک که باعث ایجاد هاله به دور دیسک شده را به عنوان<sup>۱</sup> (MIC) در نظر می‌گیریم.

مرز بین حساسیت و مقاومت (Cut of point) عبارت است از  $\text{MIC90}=0.25$  که حداقل ۹۰ درصد نمونه‌ها در آن MIC یا کمتر، ایجاد هاله کرده باشند.

## یافته‌ها

در مورد آموکسی سیلین از رقت‌های  $-0.06$  استفاده شده است MIC تعیین شده در ۶۷ مورد نمونه کشت داده شده بصورت نمودار ۱ خلاصه شده است.



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

1- Minimum Inhibitory concentration

آن برای درمان عفونت‌های رایج استفاده می‌شود. بالطبع سطح مقاومت ارگانیسم‌ها نسبت به آن پایین است. این مسئله در مورد هلیکوپاکترپیلوری هم صدق می‌کند. بنابراین با توجه به شیوع پایین مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک، می‌تواند در درمان ترکیبی به عنوان جایگزین مناسب برای مترونیدازول بکار رود، ولی در کشورهایی که از نظر اقتصادی در وضعیت خوبی 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.

آمریکا-سلین	کلاریتروموایسین	درصد مقاومت گونه‌های مثبت به آمریکا-سلین	مترونیدازول	مترونیدازول	تعداد گونه‌های مثبت	کثیر
					جدا شاهد	
		۱/۶۲	۷۷	۷۰	۱۴	ایران (۱۴)
-	-	-	۷۸/۰	۷۰	۱۵	مرستان صورت (۱۵)
-	۳۰/۰	۰۷	۸۳	۱۱	۱۱	پسرین (۱۱)
-	-	۴۲	۱۱	۱۱	۱۷	امارات متحده عربی (۱۷)
-	۱۲/۷	۱۰	۰۰	۰۰	۱۸	تیغزیده (۱۸)
-	-	۹۰	۷۸	۷۸	۱۹	نه (۱۹)
-	۰۰	۱۱	۱۸	۱۸	۰۰	بروز (۰۰)
-	۷۱	۳۷	۱۷۹	۱۷۹	۲۱	آمریکا (۲۱)
۲۲	۳۷/۱	۲۹/۷	۳۶۹	۳۶۹	۲۲	ایتالیا (۲۲)
-	۹	۳۰	۶۱۰	۶۱۰	۳۳	سوئیس (۳۳)
-	۷/۷	۳۲-۱	۷۷۱	۷۷۱	۱۴	ایران (۱۴)
-	۹/۰	۲۰/۵	۷۸۵	۷۸۵	۱۰	نپال (۱۰)

مقاومت نسبت به آموکسی سلین در این مطالعه، ایران (۲۷) و سایر کشورها (جدول شماره ۱) دیده نشده است و با وجود مصرف گسترده این آنتی‌بیوتیک در کشور ما توجیهی 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 سلین گزارش شده است (۲۲، ۲۸). بنابراین از آموکسی سلین به دلیل عدم بروز مقاومت، در دسترس بودن و قیمت پایین آن می‌توان به عنوان یکی از داروهای ترکیبی مناسب جهت ریشه کنی هلیکوپاکترپیلوری استفاده کرد.

با توجه به نمودار فوق، Cut of point تعیین شده و تعداد موارد مقاوم MIC90=16<sub>ug/ml</sub> (5.94%) بوده است.

## بحث

در این تحقیق شیوع مقاومت هلیکوپاکترپیلوری به مترونیدازول و کلاریتروموایسین 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. به علاوه در این تحقیق همانند اکثر مطالعات (جدول شماره ۱) مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسی سلین وجود نداشته است. با وجود این که مترونیدازول از آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده در درمان هلیکوپاکترپیلوری می‌باشد، به دلیل این که میزان بروز مقاومت نسبت به آن در ایران (تهران) (۳۷ درصد) و در سایر کشورها (جدول شماره ۱) (۴۰ 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، تناصلی یا دندانی باشد. در این مطالعه به دلیل سطح پایین مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک (۵/۹۶ درصد) همچنان می‌توان از این دارو به عنوان یک رژیم مناسب در درمان ترکیبی جهت ریشه کنی هلیکوپاکترپیلوری خصوصاً در بیمارانی که نسبت به ترکیبات پنی سلینی حساسیت دارند، استفاده کرد.

کلاریتروموایسین داروی دیگری است که شیوع مقاومت به آن در ایران (تهران) (۱/۴۳، ۱/۴۲ درصد) و در سایر کشورها (جدول شماره ۱) (۳۳-۵۰ 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 به علت 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. Helicopacter 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 , Francesvhi F.Extradigestives 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 , Andews 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 tretment 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 stains 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 metronidazol and tetracycline susceptibility pattern in

- Helicobacter pylori at a hospital in Saudi Arabia.*Lnt 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 – Homsi 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 lsolafed 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 , Valdez , 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. *Lnt 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 , Ramírez 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.