Archive of SID

پژوهشی

مجله علمی- پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره پانزدهم، شماره ۴۸، مهر و آبان، ۱۳۸۴ (۱۰۴-۹۹)

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 ۱۳۸۲-۱۳۸۱

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 : هلیکو باکتر 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 به‌کار می رود.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 به‌دست 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 بیوتیک‌های منتخب می باشد.

مواد و روش‌ها : ٦٧ مورد هلیکوباکترپیلوری 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 هلیکوباکترپیلوری جدا شده، استفاده گردیده است. مرز بین حساسیت و مقاومت (Cut of point)عبارت است از MIC90که حداقل ۹۰درصد نمونه ها در آن MICیا کم‌تر، ایجاد هاله کرده باشند.

یافته‌ها : برای آموکسی سیلین MIC90=0.25 g/ml تعیین شده و تمام نمونه‌ها به آموکسی سیلین حساس بوده اند.برای کلاریترومایسین MIC90=0.25 g/mlتعیین 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 نسبتا پایینی از مقاومت نسبت به کلاریترومایسین و مترونیدازول دیده می شود. به‌علاوه 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 هلیکوباکترپیلوری استفاده نمود.

واژه های کلیدی : هلیکوباکتر پیلوری,انتشار دیسک ,مقاومت انتی بیوتیکی

این تحقیق طی شماره ۵۷-۷۹ 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 امیرمازندرانی، مرکز آموزشی درمانی امام خمینی(ره)
** فوق تخصص گوارش و کبد، عضو هیأت علمی(دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
*** دستیار پاتولوژی

تاریخ دریافت : ۸۳/٦/۱۰ تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۸/۲۰ تاریخ تصویب: ۸۳/۱۲/۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]
www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری، باسیل گرم منفی ساکن در مخاط معده بوده و با طیف وسیعی از بیماری‌های گوارشی همراه است(۱). این میکروارگانیسم عامل گاستریت مزمن فعال و همچنین زخم پپتیک بوده و نیز از عوامل خطرساز سرطان معده و B-cell maltoma می‌باشد(۲ تا ٦).چندین مطالعه دیگر همراهی آن‌را با بیماری‌های غیر گوارشی نیز نشان می‌دهد(۷).

از زمانی که هلیکوباکترپیلوری برای اولین بار توسط Warren,Marshall دراسترالیا کشت داده‌شد(۸) تا به امروزهزاران مقاله دررابطه با همه‌گیری‌شناسی ژنتیک‌مولکولی،میکروبیولوژی‌جنبه های بالینی و درمان این پاتوژن‌انسانی گزارش شده است.

این ارگانیسم در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران شیوع بالایی داشته(۹،۱۰) و داروهای مختلفی جهت درمان آن به‌کار می‌رود.در برخی از موارد این رژیم های درمانی با موفقیت همراه نبوده است(۱۱تا۱۳). یکی از علل عدم موفقیت ،بروز مقاومت در بین سویه های باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها می‌باشد(۱۲،۱۳).بنابراین برای به‌دست 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.(۱۱تا۱۳).

به‌واسطه مشکل بودن کشت هلیکوباکترپیلوری (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 اخیر جهت بررسی مقاومت Invitro هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران با علائم گوارشی فوقانی مراجعه کننده به درمانگاه گوارش بیمارستان امام خمینی(ره) ساری که تحت آندوسکوپی تشخیصی قرار گرفته‌اند، طرح‌ریزی شده است.

مواد و روش‌ها

تشخیص و جدا سازی هلیکوباکترپیلوری

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 هلیکوباکترپیلوری در نمونه بیوپسی از آزمون اوره آز سریع در اتاق آندوسکوپی استفاده شد و نمونه‌های اوره آز مثبت در محیط ترانسپورت (نرمال سالین استریل) در طی حداکثر ٤ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد.

در آزمایشگاه نمونه ها روی صفحه حاوی محیط انتخابی (Selective) بروسلا آگار (Brucella agar) کشت داده شده و به‌مدت ۵-۳ روز در داخل انکوباتور با Co2 ۵ تا ۱۰ درصد قرار داده می‌شود.از ۱۱۰ مورد بیوپسی که روی محیط فوق کشت داده شده، تنها ٦۷ مورد کشت موفق وجود داشت که در آن‌ها باکتری‌ها دارای فرم خمیده بوده و آلودگی وجود نداشت سپس سوسپانسیون باکتری در لوله های حاوی ۲ میلی لیترسرم استریل تهیه می‌شود. 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]
www.SID.ir

Archive of SID

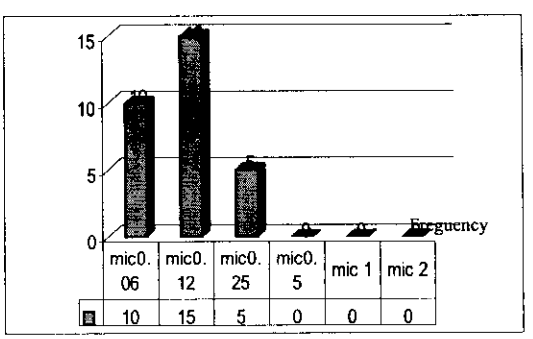
دیسک (disk diffusion) مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری برداشت شده و جهت انجام آزمون حساسیت روی محیط مولر هینتون آگار (Muller-Hinton agar) تلقیح شده و با میله‌ای شیشه ای خمیده و استریل پخش می‌گردد تا سوسپانسیون جذب محیط شود.

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 قبلا تهیه شده است میزان ۱۰ میکرو لیتر برداشته و به آهستگی روی دیسک بلانک تلقیح میگردد. سپس صفحه‌ها به‌صورت وارونه به‌مدت ۴۸ ساعت انکو به شده و بعد از این مدت، کم‌ترین غلظتی از آنتی بیوتیک که باعث ایجاد هاله به‌دور دیسک شده را به‌عنوان (MIC)[1] در نظر می‌گیریم.

مرز بین حساسیت و مقاومت (Cut of point) عبارت است از MIC90 که حداقل ۹۰درصد نمونه ها در آن MIC یا کم‌تر، ایجاد هاله کرده باشند.

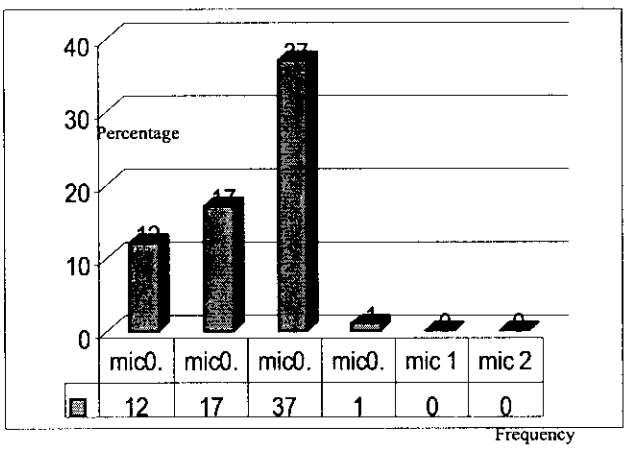
یافته‌ها

در مورد آموکسی سیلین از رقت های 0.06 – 0.12-0.25-0.5-1,2 g/ml استفاده شده است MIC تعیین شده در ٦٧ مورد نمونه کشت داده شده به‌صورت نمودار ۱ خلاصه شده است.



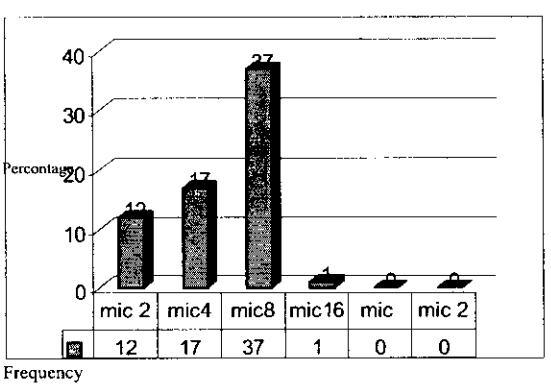
نمودار شماره ۱: رقت های مورد استفاده و MIC تعیین شدهٔ آنتی بیوتیک آموکسی سیلین در ٦٧ بیمار

با توجه به نمودار فوق Cut of point برای آموکسی سیلین MIC90=0.25 g/ml تعیین شده و تمام نمونه‌ها به آموکسی سیلین حساس بودند. در مورد کلاریترومایسین از رقت های 0.06-0.12-0.25-0.5-12 g/ml استفاده شده است MIC تعیین شده در ٦٧ مورد نمونه کشت داده شده بصورت نمودار ۲ خلاصه شده است.



نمودار شماره ۲: رقت های مورد استفاده و MIC تعیین شده آنتی بیوتیک کلاریترومایسین در ٦٧ بیمار

با توجه به نمودار فوق، Cut of point برای کلاریترومایسین MIC90=0.25g/ml تعیین شده و فقط یک مورد مقاوم(1.49 درصد) دیده شده است. در مورد مترونیدازول از رقت های 2-4-8-16-32 g/ml استفاده شده است.MIC تعیین شده در ٦٧ مورد به‌صورت نمودار ۳ خلاصه شده است.



نمودار شماره ۳: رقت های مورد استفاده MIC تعیین شده آنتی بیوتیک مترونیدازول در ٦٧ بیمار

1- Minimum Inhibitory concentration

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]
www.SID.ir

Archive of SID

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 هلیکوباکترپیلوری به مترونیدازول و کلارتیرومایسین به‌ترتیب ۵/۹۴ و ۱/۴۹ درصد بوده که بر خلاف تحقیقات انجام شده در کشورهای مختلف (جدول شماره ۱) سطح نسبتا پایینی از مقاومت نسبت به دو آنتی بیوتیک فوق دیده می شود. به‌علاوه در این تحقیق همانند اکثر مطالعات (جدول شماره ۱) مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک آموکسی سیلین وجود نداشته است.با وجود این‌که مترونیدازول از آنتی بیوتیک های شناخته شده در درمان هلیکوباکترپیلوری می باشد، به‌دلیل این‌که میزان بروز مقاومت نسبت به آن در ایران(تهران) (۳۷درصد) 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 می تواند ناشی از مصرف گسترده مترونیدازول جهت درمان عفونت‌های انگلی، تناسلی یا دندانی با شد.در این مطالعه به‌دلیل سطح پایین مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک (۵/۹۶ درصد) همچنان می توان از این دارو به‌عنوان یک رژیم مناسب در درمان ترکیبی جهت ریشه کنی هلیکوباکترپیلوری خصوصا در بیمارانی که نسبت به ترکیبات پنی سیلینی 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) (۵۰-۳/۳ درصد) می‌باشد(۲۷). در تحقیق حاضر، شیوع مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ۱/۴۹ درصد می باشد.علت شیوع پایین مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک را می‌توان چنین توجیه کرد که به‌علت قیمت بالای دارو، کم‌تر از آن برای درمان عفونت‌های رایج استفاده می شود. بالطبع سطح مقاومت ارگانیسم‌ها نسبت به آن پایین است. این مسأله در مورد هلیکوباکترپیلوری 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 ضدمیکروبی در بین H.pylori در کشورهای مختلف.

کشور	تعداد گونه‌های جدا شده	درصد مقاومت گونه‌ها نسبت به		
		مترونیدازول	کلاریترومایسین	آموکسی سیلین
ایران(۱۴)	۷۰	۳۷	۱/۴۳	۰
عربستان صعودی(۱۵)	۶۵	۷۸/۵	-	-
بحرین(۱۶)	۸۳	۵۷	۳۵/۵	۰
امارات متحده عربی(۱۷)	۱۶	۴۲	-	-
نیجریه(۱۸)	۵۵	۴۰	۱۲/۷	۰
هند(۱۹)	۷۸	۹۰	-	-
پرو(۲۰)	۱۸	۶۱	۵۰	-
آمریکا(۲۱)	۱۷۹	۳۷۴	۶/۱	-
ایتالیا(۲۲)	۳۶۹	۲۹/۷	۳۳/۱	۲۶
سوئد(۲۳)	۴۱۵	۳۰	۹	-
آلمان(۲۴)	۲۷۱	۳۲-۱	۳/۳	۰
اسپانیا(۲۵)	۲۸۳	۲۵/۴	۹/۵	۰

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 آنتی بیوتیک 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 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 هلیکوباکترپیلوری استفاده کرد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]
www.SID.ir

Archive of SID

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 , lsaacson 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 Helicobocter 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 susceptibity pattern in

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]
www.SID.ir

Archive of SID

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 lnfection – 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 , lndia.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. ***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 , R amitez 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-10-12]

www.SID.ir