

دارای رتبه علمی - پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

تعیین الگوی مقاومت و اثر هم افزایی تلفیق چند آنتی بیوتیک بر روی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از
نمونه های بیوپسی اولسر معده در شرایط آزمایشگاهی

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهمترین دلایل عود و شکست درمان عفونت های هلیکوباکتریایی، ایجاد مقاومت در هلیکوباکتر پیلوری به آنتی بیوتیک ها است. با مصرف همزمان چند دارو که با هم اثر هم افزایی دارند می توان تا اندازه ای این مقاومت را مهار نمود. هدف از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت و بررسی اثر هم افزایی تلفیق چند آنتی بیوتیک بر روی هلیکوباکتر پیلوری بود.

روش بررسی: از ۱۰۰ بیمار دارای اولسر معده مراجعه کننده به بیمارستان امام رضا (ع) شهرستان آمل نمونه بیوپسی تهیه شد. بعد از جداسازی و شناسائی هلیکوباکتر پیلوری تست آنتی بیوگرام با دیسک های متفاوت حاوی آنتی بیوتیک، ترکیب دو آنتی بیوتیک (مترونیدازول + کلاریترومایسین) و سه آنتی بیوتیک (مترونیدازول + کلاریترومایسین + سیپروفلوکسازین) انجام گرفت.

یافته ها: در این مطالعه از ۵۳ (۵۳٪) نمونه بیوپسی، هلیکوباکتر پیلوری جدا و شناسائی شد که ۴۹ مورد آن (۹۲/۵٪) مقاوم به مترونیدازول، ۱۴ مورد آن (۲۶٪) مقاوم به آموکسی سیلین، ۱۰ مورد آن (۱۹٪) مقاوم به کلاریترومایسین، ۷ مورد (۱۳٪) مقاوم به تتراسایکلین، ۱۳ مورد (۲۴/۵٪) مقاوم به فورازولیدون و ۷ مورد (۱۳٪) مقاوم به سیپروفلوکسازین بودند. در بررسی اثر هم افزایی جلوگیری از رشد دیسک های تلفیقی دو و سه تایی نسبت به موثرترین آنتی بیوتیک قطر هاله تا ۵ میلی متر افزایش دیده شد.

نتیجه گیری: قطر هاله دیسک های تلفیقی دو آنتی بیوتیک و سه آنتی بیوتیک نسبت به قطر هاله عدم رشد هر آنتی بیوتیک به تنهایی بیشتر بود.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، مقاومت آنتی بیوتیکی، اثر هم افزایی

فاطمه حبیبی نوا

کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی،
تنکابن، ایران

سید مسعود هاشمی کروئی

استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی دانشگاه
آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

شهریار شفایی

استادیار پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات
بهداشتی درمانی بابل، ایران

نویسنده مسئول: مسعود هاشمی کروئی

پست الکترونیک: mssepid4977@gmail.com

تلفن: ۰۹۱۱۲۱۵۹۶۳۴

آدرس: گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد
تنکابن

دریافت: ۹۲/۸/۲۱

ویرایش پایانی: ۹۲/۹/۱۲

پذیرش: ۹۲/۹/۱۷

آدرس مقاله:

حبیبی نواف، هاشمی کروئی س م، شفایی ش "تعیین الگوی مقاومت و اثر هم افزایی تلفیق چند آنتی بیوتیک بر روی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه های بیوپسی اولسر معده در شرایط آزمایشگاهی" مجله علوم آزمایشگاهی، ویژه نامه باکتری شناسی ۱۳۹۲، دوره هفتم (شماره ۵): ۶۵-۷۰

شده است. در حال حاضر اطلاعات محدودی از میزان مقاومت آنتی بیوتیکی هلیکوباکتریلوری در نواحی مختلف ایران به ویژه شمال موجود است، هدف این مطالعه تعیین میزان مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک های رایج در درمان و بررسی اثر هم افزایی تلفیق دو و سه آنتی بیوتیک بر روی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیوپسی تهیه شده از اولسر معده بیماران بود.

روش بررسی

۱۰۰ بیمار (بیمارستان امام رضا شهرستان آمل) دارای اولسر معده از ناحیه آنترال معده نمونه بیوپسی تهیه و در سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه های بیوپسی در محیط اسکیرو آگار (Skirrow medium Que lab) دارای ۷ درصد خون دفیبرینه گوسفندی، ونکومایسین، پلی میکسین و تری متوپریم (Sigma- Germany) تلقیح و در شرایط میکروآنروفلیک و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶-۵ روز انکوبه شد. کلنی های مشکوک به هلیکوباکتر پیلوری پس از جداسازی، با آزمون های بیوشیمیایی اکسیداز، کاتالاز و اوره آز و احیای نترات شناسائی و تأیید شدند.

آزمون آنتی بیوگرام

از محیط مولر هینتون آگار غنی شده با ۷ درصد خون دفیبرینه گوسفندی برای تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن (۹،۸،۴) استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هلیکوباکتر پیلوری معادل کدورت لوله ۳ مک فارلند برداشته و در محیط مولر هینتون آگاه غنی شده کشت داده شد. دیسک های آنتی بیوتیکی شامل آموکسی سیلین (25 mcg)، فورازولیدون (50 mcg)، سیپروفلوکسازین (5 mcg)، تتراسیکلین (30 mcg)، داکسی سیلین (30 mcg) پاتن طب، کلاریترومایسین (15 mcg) و مترونیدازول (5 mcg) کمپانی روسکو و دیسک های ترکیبی دو تائی (D) دارای ۵ میکروگرم مترونیدازول و ۱۵ میکروگرم کلاریترومایسین و دیسک های ترکیبی سه تائی (T) دارای ۵ میکروگرم مترونیدازول و ۱۵ میکروگرم

هلیکوباکتر پیلوری باسیل گرم منفی، فاقد اسپور، میکروآنروفیل، مارپیچی و ساکن مخاط معده در بیش از نیمی از مردم دنیا است. این باکتری در سال ۱۹۹۴ توسط سازمان بهداشت جهانی به عنوان عوامل کارسینوژن کلاس ۱ معرفی شد (۱). تولید و ترشح انواع فاکتورهای التهاب زا و محرک سیستم ایمنی مانع از جایگزینی باکتری در موکوس معده نمی شود، به طوری که علیرغم پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی، فرد مبتلا سال های زیادی حامل باکتری در معده خود خواهد بود. مطالعات حاکی از آنست که در بیشتر بیماران مبتلا به پپتیک اولسر، درمان آنتی بیوتیکی هلیکوباکتر پیلوری منجر به بهبود زخم های معده و اثنی عشر و گاهی پسرفت انواعی از تومورها می شود، در این راستا مطالعه Bayrdfr و همکاران روی بیماران مبتلا به MALT Lymphoma حاکی از پسرفت تومور در پی ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری بوده است (۲). شیوع این باکتری در کشورهای توسعه یافته حدود ۳۰ درصد و در کشورهای در حال توسعه تا ۸۰ درصد هم گزارش شده است (۳). از آنتی بیوتیک های مختلف علیه این پاتوژن گوارشی استفاده می شود (۴). در بیشتر مطالعات ایران مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک ها، در حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده (۵). میزان مقاومت در دنیا بین ۳ تا ۵۰ درصد متغیر است (۶،۷). با توجه به میزان مقاومت بالای این باکتری به انواع آنتی بیوتیک و نفوذ کم آنتی بیوتیک در بافت در بسیاری از مواقع مصرف چند آنتی بیوتیک برای درمان نیاز می باشد. معمولاً از انواع آنتی بیوتیک هایی استفاده می شود که با داشتن مکا نیزم ضد باکتریائی مختلف با هم اثر هم افزایی در حذف هلیکوباکتر دارند. ترکیب داروها برای هر سویه از میکروارگانیسم اختصاصی می باشد و هیچ ترکیبی همواره به طور یکسان هم افزا نیست. بنابراین نیاز است این اثر در بین آنتی بیوتیک های مختلف شناسائی شود. به همین دلیل مطالعات آزمایشگاهی دقیق بر روی ترکیب مترونیدازول با کلاریترومایسین (دو دارویی) و ترکیب مترونیدازول و کلاریترومایسین و سیپروفلوکسازین (سه دارویی) انجام

دیسک T نسبت به قطر هاله عدم رشد سیپروفلوکسازین انکوبه شد و هاله اطراف دیسک ها، طبق استانداردهای NCCLS با دستگاه آنتی بیوگراف قرائت و ثبت گردید (۱۰،۱۱).

کلاریترومایسین به همراه ۵ میکروگرم سیپروفلوکسازین تهیه شده توسط محقق بر سطح آگار قرار داده و به مدت ۵ روز در شرایط میکروآنروفلیک

جدول ۱- فراوانی نمونه های حساس و نیمه حساس و مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک های استفاده شده در کشت مثبت هلیکوباکتریلوری

آنتی بیوتیک		نیمه حساس		مقاوم	
تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۴	۷	-	-	۹۲	۴۹
۳۷	۷۰	۱۱	۶	۱۹	۱۰
۳۸	۷۲	۳	۲	۲۴	۱۳
۲۵	۴۷	۴۰	۲۱	۱۳	۷
۳۹	۷۴	-	-	۲۶	۱۴
۴۰	۷۰	۹	۵	۱۰	۸
۴۳	۸۱	۶	۳	۱۳	۷

جدول ۲- میزان افزایش قطر هاله ممانعت از رشد هلیکوباکتریلوری بر حسب میلی متر در اطراف دیسک های تلفیقی T,D در مقایسه با کلاریترومایسین و سیپروفلوکسازین

آنتی بیوتیکها	MET	CLA	دیسک D	CIP	دیسک T
۷ (۱۳٪)	R	R	۰	R	۰
۴ (۷/۵٪)	S	S	۴-۵	S	۴-۵
۲۱ (۴۰٪)	R	S	۱-۲	S	۲-۳
۶ (۱۱٪)	R	I	۱-۲	I	۱-۲
۱۲ (۲۳٪)	R	S	۱-۲	I	۲-۳
۳ (۵/۵٪)	R	R	۰	I	۱-۲

D(Claritromycin+ metronidazol)
T(Claritromycin+ metronidazole+Ciprofloxacin)
Met(metronidazol)
CLA: (Claritromycin)
CIP(Ciprofloxacin)

یافته ها

دیسک T نسبت به قطر هاله عدم رشد سیپروفلوکسازین افزایش یافته و در مواردی که نسبت به هر سه آنتی بیوتیک حساسیت وجود داشته است افزایش قطر هاله عدم رشد دیسک های دو تایی (D) و سه تایی (T)، ۴ تا ۵ میلی متر بوده است (جدول ۲).

بحث

نتایج این مطالعه حاکی از مقاومت بالای سویه های هلیکوباکتریلوری به بیشتر آنتی بیوتیک های رایج می باشد. میزان مقاومت به سیپروفلوکسازین در مطالعه حاضر در حدود ۱۳ درصد است، ولی ۲۱ مورد (۴۰٪) حالت نیمه حساس

از ۱۰۰ نمونه بیوسی بیماران مشکوک ۵۳ نمونه بیوسی (۵۳٪) هلیکوباکتریلوری جدا و شناسائی شد که ۴۹ مورد آن (۹۲/۵٪) مقاوم به مترونیدازول، ۱۴ مورد آن (۲۶٪) مقاوم به آموکسی سیلین، ۱۰ مورد آن (۱۹٪) مقاوم به کلاریترومایسین، ۷ مورد (۱۳٪) مقاوم به تتراسایکلین، ۱۳ مورد (۲۴/۵٪) مقاوم به فورازولیدون و ۷ مورد (۱۳٪) مقاوم به سیپروفلوکسازین بوده است (جدول ۱). به جز در ۷ مورد که نسبت به هر سه آنتی بیوتیک مقاومت وجود داشته در بقیه موارد قطر هاله عدم رشد دیسک های D نسبت به کلاریترومایسین افزایش یافته و همچنین قطر هاله عدم رشد

داشته اند. آمارهای حاضر حاکی از پایین بودن میزان مقاومت در اروپا است، میزان مقاومت به سیروفلوکسازین در کشورهای آلمان (۹٪)، پرتغال (۱۰٪)، فرانسه (۱۱٪) و اسپانیا (۱۲٪) کمتر از مقاومت تعیین شده در مطالعه حاضر است. درصد بالای مقاومت به سیروفلوکسازین با توجه به استفاده آن در درمان های ثانویه *هلیکوباکتری پیلوری*، تردید زیادی را در استعمال آن ایجاد می کند. میزان مقاومت به سیروفلوکسازین در مطالعه رافعی و همکاران ۲۱ درصد گزارش شده که میزان کمتری از درصد گزارش شده این مطالعه است، این در حالی است که در مطالعه فلسفی و صفر علی زاده و طالبی مقاومتی بالاتر از میزان این مطالعه تعیین شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴). تفاوت در میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در مطالعات نامبرده می تواند ناشی از اختلاف در روش های آزمایشگاهی به کار رفته در این مطالعات باشد. ولی در این مطالعه ۲۱ نمونه از ۵۳ نمونه کشت مثبت ۴۰ درصد حالت نیمه حساس داشته اند و ممکن است با مصرف بی رویه این دارو، مقاومت در این سویه ها ایجاد شود. استفاده از کلاریترومایسین در مناطقی با مقاومت بالاتر از ۲۰ درصد باید با دقت بیشتری صورت پذیرد (۱۵). در زمینه بررسی اثر هم افزایی آنتی بیوتیک ها، از آنجایی که دیسک های تلفیقی D و T همراه با دیسک های مترونیدازول و کلاریترومایسین و سیروفلوکسازین در داخل یک پلیت قرار گرفتند پس میزان تلفیح سوسپانسیون میکروبی و شرایط محیط کشت در شرایط یکسانی بوده و همچنین قطر هاله های عدم رشد با دستگاه آنتی بیوگراف و با دقت بالایی انجام شد پس نتایج حاصله هر چند در حد چند میلی متر بود قابل توجه می باشد. در مطالعات انجام شده بر روی *هلیکوباکتری پیلوری* جدا شده از بیمار اثر هم افزایی آنتی بیوتیک های مختلف بررسی شد و این اثر در تلفیق آمپرازول با کلاریترومایسین و آموکسی سیلین و سفتی بوتین در

تحقیق Alarcon و همکاران در اسپانیا به روش انتشار در آگار مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که در ۵۱/۵ درصد تلفیق داروها اثر هم افزایی داشتند که در ارتباط با ترکیب انواع آنتی بیوتیک ها متفاوت بوده است. اثر هم افزایی تلفیق کلیندامایسین با بیسموت ساب سیرات و تلفیق مترونیدازول با پاراموایسین و تلفیق کلاریترومایسین با آموکسی سیلین و بیسموت در تحقیق Meyer و همکاران مشخص شده است (۱۶-۱۹). Midolo و همکاران ثابت کردند که آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین و تتراسیکلین در ترکیب با مهار کننده پمپ پروتونی با MIC کمتر اثر هم افزایی در کشتن *هلیکوباکتر* دارند (۲۰).

نتیجه گیری

نتایج متفاوتی در تعیین حساسیت *هلیکوباکتر پیلوری* در تحقیقات مختلف مشاهده می شود که این امر می تواند مربوط به عوامل مختلفی همانند انتخاب نامناسب آنتی بیوتیک، مصرف بی رویه آنتی بیوتیک، عدم دقت در مدت زمان لازم برای درمان، عدم توانایی هر آزمایشگاه در کشت این باکتری و به دنبال آن انجام تست آنتی بیوگرام برای آن و از همه مهمتر عدم رعایت شرایط استاندارد بخصوص در مراحل مختلف تست آنتی بیوگرام می باشد. از طرف دیگر با توجه به خصوصیات بیماریزایی این باکتری مصرف چند دارو که با هم اثر هم افزایی دارند برای درمان بیماری ناشی از باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* موثر می باشد. بنابراین نیاز می باشد که در تحقیقات مختلف همانند تحقیق انجام گرفته دارو هائی که با هم اثر هم افزایی دارند شناسائی شوند.

تشکر و قدردانی

از زحمات کارکنان زحمتکش آزمایشگاه شفائی و پزشکان محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان امام رضا (ع) آمل به خصوص خانم عمران که کمال همکاری را داشتند قدردانی می نمایم.

References

1. World Health Organization: *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human*. World Health Organization, Geneva. 1994; 61: 177-240.
2. Harris A, Misiewicz J. *ABC of the upper gastrointestinal tract. Management of Helicobacter pylori infection*. Br Med J. 2001; 323(7320): 1047-1049.
3. Frenck RW Jr, Clemens J. *Helicobacter pylori in the developing World*. Microbes Infect. 2003; 5(8): 705-713.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, et al. *Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection the Maastricht 2000 Consensus Report*. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16(2): 167-180.
5. Saberi-Firoozi M, Nejabat M. *Experiences with Helicobacter Pylori Treatment in Iran*, IJMS. 2006; 31(4): 4-11.[Persian].
6. Eltahawy AT. *Prevalence of primary Helicobacter pylori resistance to several antimicrobials in a Saudi Teaching Hospital*. Med Princ Pract. 2002; 11(2): 65-8.
7. Heep M, Kista M, Strobel S, Beck D, Lehn N. *Secondary resistance among 554 isolates of Helicobacter pylori after failure of therapy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19(7): 538-542.
8. Fallahi Gh H, Malek nejad Sh. *Helicobacter pylori culture and antimicrobial resistance in Iran*. Indian J Pediat. 2007; 74: 127-130.
9. Siavoshi F, Heydarian E, Pourkhajeh AH, Merat SH, Asl- Soleimani H, Khatibian M, et al. *Susceptibility of various strains of Helicobacter pylori to selected agents*. Arch Iranian Med. 2000; 3(2): 60-63.
10. Talebi Bezmin Abadi A, Mobarez A, Taghvae T. *Antibiotic Resistance of Helicobacter pylori in Mazandaran, North of Iran*. Helicobacter. 2010; 15(6): 505-509.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. 4th ed. Approved Standard M11-A4. Wayne, Pa: NCCLS, 1997.
12. Rafeey M, Ghotaslou R, Nikvash S, hafez AA . *Primary resistance in Helicobacter pylori isolated in children from Iran*. J Infect Chemother. 2007; 13(5): 291-295.
13. Falsafi T, Mobasheri F, Nariman F, Najafi M. *Susceptibilities to Different Antibiotics of Helicobacter pylori Strains Isolated from Patients at the Pediatric Medical Center of Tehran, Iran*. JCM. 2004; 42(1): 387-389
14. Safaralizadeh R, Siavoshi F, Malekzadeh R, Akbari MR, Derakhshan MH, Sohrabi MR, et al. *Antimicrobial effectiveness of furazolidone against metronidazole resistant strains of Helicobacter pylori*. East Mediterr Health J. 2006; 12(3-4): 286-293.
15. Mendoca S, Ecclissato C, Sortori MS, Godoy AP, Guerzoni RA, Degger M, et al. *Prevalence of Helicobacter pylori resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and furazolidone in Brazil*. Helicobacter. 2000; 5(2): 79-84
16. Megraud F. *Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics*. Aliment Pharmacol Ther. 1997; 11(S1): 43-53.
17. Alarcón T, Domingo D, Sánchez I, Díaz de Rojas F, López-Brea M. *In vitro activity of omperazol in combination with several antimicrobial agents against clinical isolates of Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996; 15(12): 937-40.
18. Meyer JM, Ryu S, Pendland SL, Danziger LH. *In vitro synergy testing of clarithromycin and 14-hydroxyclearithromycin with amoxicillin or bismuth subsalicylate against Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents chemother. 1997; 41(7): 1607-80.
19. Meyer JM, Ryu S, Pendland SL, Danzigr LH. *In vitro synergy of paromomycin with metronidazol alone or metronidazol pluseur hydroxymetronidazole againt Helicobacter pylori*. Journal of Antimicrobial chemothrapy. (1999); 43(3): 403-406.
- 20- Midolo PD, Lambert JR, Kerr TG, Tee W. *In vitro synergy between ranitidine ismuth citrate and tetracycline or claritromycine against resistance strains of H.pylori*. Eur J Clin Microb Infect Dis. 1999; 18(11): 832-834.

Determination of Antibiotic Resistance and Synergistic Effect of Multiple Antibiotics on *Helicobacter Pylori* Isolated from the Stomach Ulcer Biopsy Specimens

Habibi Nava, F. (MSc)

MSC of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran

Hashemi Karouei, SM. (PhD)

Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran

Shafahi, SH. (PhD)

Assistant Professor of Pathobiology, Department of Pathobiology, Babol University of Medical Sciences, Iran

Corresponding Author: Hashemi Karouei, SM.

Email: mssepid4977@gmail.com

Received: 12 Nov 2013

Revised: 3 Dec 2013

Accepted: 8 Dec 2013

Abstract

Background and Objective: Resistance of *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*) to antibiotics is the main cause of relapse into Helcobacterial infections. With the use of several antibiotics that have synergistic effect, we can inhibit this antibiotic resistance. Thus, we aimed at determining resistance patterns and assessing the synergy of combining multiple antibiotics on *H. pylori*.

Material and Methods: Biopsy specimens were taken from 100 patients with gastric ulcer referred to Imam Reza hospital in Amol, north of Iran. After isolation and identification of *H. Pylori*, antibiogram was performed with different antibiotic disks containing one antibiotic, a combination of two antibiotics (metronidazole + clarithromycin) and three antibiotics (metronidazole + Claritromycin + Ciprofloxacin).

Results: In this study, *H. pylori* were isolated from 53 (53%) biopsy specimens. Of these, 49 (5.92%) were resistant to metronidazole, 14 (26%) to amoxicillin, 10 (19%) to clarithromycin, 7 (13%) to tetracycline, 13 (5/24%) to furazolidone and 7 (13%) to ciprofloxacin. In survey of synergistic effect, an increase in inhibition zone diameter around of combined disks was seen up to 5mm compared to the most effective antibiotic.

Conclusion: The inhibition zone diameter of discs containing two and three antibiotics was large, in comparison with one antibiotic.

Key words: *H. Pylori*; Antibiotic Resistance; Synergy Effect