جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۸۸، صفحات ۱۹۳ تا ۱۹۶

Original Article

ارزیابی مقاومت دارویی در سوش‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران شهرکرد نسبت به داروی مترونیدازول

محمد کارگر[۱]، **مریم باقرنژاد**[۲]، **عباس دوستی**[۳]

[۱] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
[۲] کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم
[۳] استادیار، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: *مترونیدازول یکی از کلیدی‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های رژیم‌های درمانی عفونت هلیکوباکترپیلوری است. هدف از این پژوهش، تعیین مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران ساکن در شهرکرد می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه مقطعی- توصیفی، در تابستان ۱۳۸۶ از بین بیمارانی که به بخش اندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه نموده بودند، ۲۶۳ بیمار به طور تصادفی انتخاب بررسی گردیدند. نمونه‌های بیوپسی بر روی محیط انتخابی بروسلاآگار و تحت شرایط استاندارد ۷ روز گرم‌خانه گذاری شد. برای تعیین هویت هلیکوباکترپیلوری از روش رنگ آمیزی گرم، اوره‌آز، کاتالاز، اکسیداز و از روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) به منظور شناسایی ژن ureC استفاده گردید. مقاومت به مترونیدازول با روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *میزان آلودگی با روش‌های RUT (آزمون اوره‌آز سریع)، کشت و PCR به ترتیب ۵۴/۳۷ درصد، ۸۴ درصد و ۸۴/۷۹ درصد شناسایی گردید. از سویه‌های جدا شده، ۴۹ سویه مقاوم (۵۸/۳۳ درصد) و ۷ سویه نیمه‌حساس (۸/۳۳ درصد) به مترونیدازول شناسایی گردید. از ۴۹ بیمار مقاوم به مترونیدازول به ترتیب ۳۲/۶۵ درصد، ۲۰/۴۰ درصد، ۱۲/۲۴ درصد، ۶/۱۰ درصد، ۴/۸۰ درصد و ۲۴/۴۸ درصد از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده، زخم دوازدهه، التهاب مری، سرطان معده و بدون بیماری بودند. بین مقاومت به مترونیدازول و جنس زن ارتباط معنی‌داری وجود داشت.*

نتیجه‌گیری: *به دلیل مقاومت بالا به مترونیدازول در بیماران مورد پژوهش، ضرورت جایگزینی آن با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در رژیم درمانی وجود دارد.*

واژگان کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری ، مترونیدازول، مقاومت میکروبی، شهرکرد.*

مقدمه

بیش از نیمی از جمعیت دنیا آلوده به هلیکوباکترپیلوری هستند. شیوع هلیکوباکترپیلوری در مناطق مختلف جهان متفاوت است و تا حد زیادی به استانداردهای کلی زندگی در هر منطقه بستگی دارد (۱). شرایط اقتصادی و اجتماعی پایین ارتباط مستقیمی با این عفونت دارد. اپیدمیولوژی هلیکوباکترپیلوری بین کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه متفاوت است. در کشورهای توسعه یافته ابتلا به عفونت، به میزان نسبتا ثابت ۲-۰/۵درصد در سال است و در نهایت، شیوع این عفونت در بزرگسالان به۲۰ تا ۴۰ درصد

آدرس نویسنده مسئول: جهرم ،دانشگاه آزاد اسلامی ،دکتر محمد کارگر
(**email**: microkargar@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۸
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۶/۵

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

می‌رسد. در کشورهای در حال توسعه، ابتلا به این عفونت در اوایل کودکی و به میزان نسبتا بالا صورت گرفته و در ۲۰ سالگی ۷۰ تا ۹۰ درصد از افراد جامعه به آن آلوده‌اند (۳،۲). عفونت هلیکوباکترپیلوری با بیماری‌های گوارشی نظیر گاستریت، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده، لنفوم MALT و بیماری‌های غیرگوارشی گوناگونی از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های پوستی، بیماری‌های خودایمنی تیروئید، آنمی، پورپورای ترمبوسیتوپنیک، آنمی کمبود آهن، سندرم گلین باره، اسکلرودرما و میگرن در ارتباط است (۴). از شایع‌ترین علایم عفونت این باکتری می‌توان به مواردی نظیر درد، تهوع، احساس سیری زودرس، بی‌اشتهایی، برگشت اسید معده به مری (ریفلاکس) و کاهش وزن یا مجموعه‌ای از این علایم اشاره کرد (۴). چندین روش تهاجمی و غیرتهاجمی برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری وجود دارد. اساس روش‌های تهاجمی نمونه‌برداری معده می‌باشد، در حالی که روش‌های غیرتهاجمی مبتنی بر نمونه‌گیری از سرم، خون، ادرار یا نمونه بزاق است. روش‌های تهاجمی شامل آزمون اوره‌آز سریع (RUT)، کشت، هیستولوژی و PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) و روش‌های غیرتهاجمی شامل روش ایمونوبلات، RUT و آزمون بررسی آنتی‌ژن‌های مدفوعی می‌باشد (۵). رژیم‌هایی که به منظور درمان عفونت هلیکوباکترپیلوری به کار می‌روند، رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی هستند که ترکیبی از مهارکننده‌های پمپ پروتونی و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. مترونیدازول یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان این عفونت می‌باشد. مقاومت دارویی مهم‌ترین عامل شکست این رژیم‌هایی درمانی است. پژوهش‌های مختلف نشان داده که در صورت مقاومت به مترونیدازول، کفایت درمانی ۵۰ درصد کاهش می‌یابد (۶). هدف از این پژوهش تعیین میزان مقاومت به مترونیدازول در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز اندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد بود.

مواد و روشها

این پژوهش به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۲۶۳ بیمار مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان هاجرشهرکرد در تابستان ۱۳۸۶ انجام شد. پس از انجام اندوسکوپی، نمونه‌های بیوپسی در فسفات بافر سالین (PBS) جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شد. سپس نمونه‌ها بر روی محیط بروسلا آگار حاوی ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند واجد وانکومایسین (۶mg/L)، تری‌متوپریم (۵ mg/L) و آمفوتریسین B (۲ mg/L) کشت داده شدند و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در شرایط میکروآئروفیل گرمخانه گذاری گردیدند. تعیین هویت مقدماتی کلنی‌های رشد یافته با آزمون اوره‌آز، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز انجام گردید. سپس آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای F : 5 '- GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG-3' و R : 5'- GCT TAC TTT CTA ACA ACG CGC – 3' به منظور تکثیر ژن *ureC* استفاده گردید. روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra) با شرایط حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Hot start)، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (Annealing) و ۴۷ درجه به مدت ۱ دقیقه (Extension) انجام شد. برای این منظور ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱۶/۷میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. پس از شناسایی و تایید هویت کلنی‌های هلیکوباکتر پیلوری آنتی‌بیوگرام با روش استاندارد دیسک دیفیوژن CLSI انجام گردید. تعیین حساسیت کلنی‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله‌ها و با توجه به دستور شرکت سازنده دیسک Himedia بررسی گردید. استخراج DNA از باکتری‌های حساس، نیمه‌حساس و مقاوم به مترونیدازول با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام گردید.

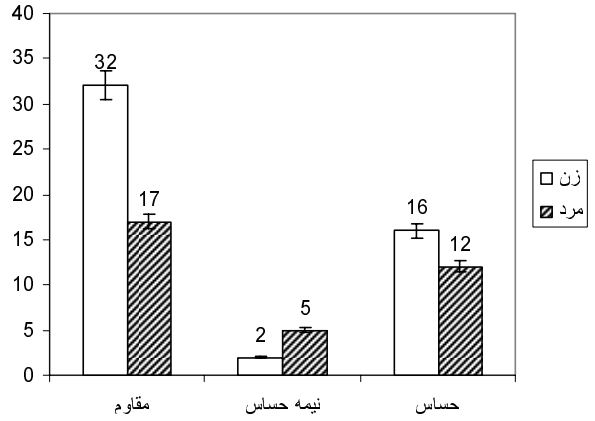
داده‌های عددی به صورت میانگین و داده‌های اسمی به صورت فراوانی (درصد) ارائه شدند. برای تحلیل داه‌ها از آزمون کای‌دو و در صورت نیاز از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این پژوهش، ۱۵۷ زن (۵۹/۷۰ درصد) با میانگین سنی ۴۶/۸۳ سال و ۱۰۶ مرد (۴۰/۳۰ درصد) با میانگین سنی ۴۷/۲۱ سال مورد بررسی قرار گرفتند. جوان‌ترین بیمار ۱۲ سال و مسن‌ترین آنها ۸۶ سال سن داشتند. بیشتر بیماران در گروه سنی ۴۰ تا ۵۰ سال (۲۴/۷۰ درصد) و کمترین آنها در گروه سنی ۸۰ تا ۹۰ سال (۱/۱۴ درصد) قرار داشتند. بین تعداد بیماران و گروه‌های سنی مختلف ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<۰۰۰۱$)، اما بین گروه‌های سنی و جنسیت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (NS). نتایج مثبت RUT با توجه به اخذ یک نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم و تغییر رنگ محیط از رنگ زرد به بنفش گزارش گردید. از نمونه های مورد بررسی ۱۴۳ مورد مثبت و ۱۲۰ مورد منفی گزارش شد. بین نتایج آزمون اوره‌آز سریع مثبت (۵۰/۹۵ درصد) و منفی (۴۹/۰۵ درصد) در زنان اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، اما اختلاف نتایج مثبت و منفی در مردان معنی‌دار بود. از کشت ۲۶۳ نمونه بیوپسی بر روی محیط انتخابی بروسلاآگار، ۱۰۰ سویه از طریق آزمون‌های اوره‌آز، کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم شناسایی شد. ۸۴ سویه (۸۴ درصد) هلیکوباکترپیلوری پس از انجام PCR مورد تایید قرار گرفتند. از سویه‌های شناسایی شده، ۴۹ سویه مقاوم (۵۸/۳۳ درصد) و ۷ سویه نیمه‌حساس (۸/۳۳ درصد) به مترونیدازول شناسایی گردیدند (نمودار ۱). از ۴۹ بیمار، ۳۲ زن و ۱۷ مرد مقاوم به مترونیدازول بودند. بین مقاومت به مترونیدازول و جنس زن ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<0.001$). از ۴۹ بیمار مقاوم به مترونیدازول به ترتیب ۳۲/۶۵ درصد، ۲۰/۴۰ درصد، ۱۲/۲۴ درصد، ۶/۱۰ درصد، ۴/۸۰ درصد و ۲۴/۴۸ درصد از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم معده، زخم دوازدهه، التهاب مری، سرطان معده و بدون بیماری بودند. هم‌چنین بین مقاومت به مترونیدازول و بیماری گاستریت و زخم دوازدهه ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=0.03$).



نمودار ۱- نتایج مقاومت به مترونیدازول با روش استاندارد CLSI در کشت‌های هلیکوباکتر پیلوری.

بحث

رژیم‌های گوناگون با اثربخشی و عوارض جانبی مختلفی برای حذف هلیکوباکترپیلوری به کار می‌روند. متداول‌ترین این رژیم‌ها، رژیم‌های سه دارویی و چهار دارویی است. رژیم‌های سه دارویی در اروپا و امریکا به عنوان اولین خط درمان در نظر گرفته می‌شوند. رژیم‌های چهار دارویی متشکل از بیسموت، مهار کننده‌های پمپ پروتونی و دو آنتی بیوتیک است (۸). در ایران کارآیی این رژیم به طور چشم‌گیری بالاتر از رژیم‌های سه دارویی است. مترونیدازول یکی از متداول‌ترین و مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها در رژیم‌های درمانی در ایران است (۹). با توجه به شیوع بالای بیماری‌های گوارشی به ویژه سرطان معده در ایران و ارتباط این بیماری‌ها با عفونت هلیکوباکترپیلوری به ویژه در مناطق پرخطر مانند اردبیل و چهارمحال و بختیاری به نظر می‌رسد که آگاهی ازالگوی مقاومت نسبت به داروهای متداول مثل مترونیدازول نقش مهمی در بهبود کارآیی رژیم‌های درمانی و ریشه‌کنی این باکتری پس از درمان دارد.

این پایش به دو طریق کشت، تعیین میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی و روش‌های مولکولی امکان‌پذیر است. شایان ذکر است که کشت و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی متداول‌ترین روش مورد بررسی در مناطق مختلف دنیا می‌باشد. به عنوان مثال میزان مقاومت در کشور کرواسی ۳۳ درصد، فرانسه ۳۱/۵ درصد، ایتالیا ۱۴/۹۰ درصد، پرتغال ۲۳/۵۰ درصد، انگلستان ۳۶ درصد، مکزیک ۷۶/۳۰ درصد، ایالت متحده امریکا ۲۱/۶۰ درصد، برزیل ۵۳ درصد، ژاپن ۲۹ درصد و کره ۴۰/۶۰ درصد گزارش شده است (۱۱،۱۰). در ایران مقاومت به مترونیدازول بسیار شایع است، به طوری که ۴۶ تا ۵۱ درصد از سوش‌های هلیکوباکترپیلوری به این دارو مقاومند (۱۲). یافته‌های مطالعه ما در مورد مقاومت به مترونیدازول (۵۸/۳۳ درصد) مطابق الگوی کشورهای در حال توسعه است. در بین روش‌های شناسایی هلیکوباکترپیلوری، کشت یک روش وقت‌گیر است که با مشکلاتی از جمله آلودگی حساسیت آن به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. علاوه بر این، مسأله دیگر تغییر سویه‌های هلیکوباکترپیلوری است. بدین ترتیب که این باکتری درست مانند ویروس‌ها مرتب در حال تغییر هستند که اصطلاحا به این پدیده سویه‌های بینابینی در حال تغییر (Quasi-species) می‌گویند. علی‌رغم این مسأله، یکی دیگر از از مشکلات مقاومت هلیکوباکترپیلوری به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها ، پدیده‌ای به نام مقاومت نا هم‌تیپ (Hetroresistance) است. معمولا برای انجام آزمایش مقاومت فقط یک کلنی از باکتری‌های جدا شده را برای حساسیت به انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار می‌دهند. اکنون، دانشمندان دریافته‌اند که اگر ده کلنی از سویه جدا شده از زخم بیمار را برای مشاهده مقاومت مورد بررسی قرار دهند، از نظر حساسیت با هم تفاوت دارند. این امر احتمالا از آن جا ناشی می‌شود که پیدایش مقاومت به دلیل انتخاب یک

جمعیت کوچک مقاوم از یک جمعیت بزرگتر که اغلب باکتری‌هایشان حساس هستند حاصل می‌شود. این پدیده تاکنون فقط در مورد مقاومت در برابر مترونیدازول مشاهده شده است (۱۳). اما این سوال مطرح می‌شود که چگونه سویه‌های هلیکوباکترپیلوری مختلف به آنتی‌بیوتیک‌ها به سرعت مقاوم می‌شوند؟

از طرفی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به مترونیدازول متفاوت و متعدد است. مهمترین روش‌های مولکولی شناخته شده مقاومت، کاهش تجمع درون سلولی مترونیدازول از طریق کاهش جذب به واسطه پمپ یونی، بیان بیش از حد RecA ، جهش در ژن NADPH غیرحساس به اکسیژن (*rdxA*)، فلاوین اکسیدوردوکتاز (*frxA*)، پروتئین‌های شبه فری‌دوکسین (*fdxA* و *fdxB*) و پیروات اکسیدوردوکتاز (*porB,porA*) می‌باشد (۱۴،۱۱). به همین دلیل ضرورت پایش گسترده و جداگانه موتاسیون‌هایی که باعث این چنین مکانیسم‌هایی می‌شوند، برای اطلاع از چگونگی مقاومت به مترونیدازول به ویژه در مناطق دارای آلودگی گسترده حائز اهمیت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل پشتیبانی علمی از این پژوهش اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Dunne B, Cohen H. *Helicobacter pylori.* Clin Microbiol Rev 1997; 19:449-90.
2. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. New Engl J Med 2002; 347:1175-86.
3. Fennerty M. *Helicobacter pylori*: why it still matter in 2005 .Clin J Med 2005; 72:1-7.
4. Peterson W, Fendrick M, Cave D, Peura D, Ruffalo S, Laine L. *Helicobacter pylori* – related disease. Arch Intern Med 2000; 160:1285-91.
5. Kusters J, Vilet A. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev 2006; 90:11-25.
6. Ozturk E. Diagnostic method of *Helicobacter pylori* infection. Gulhane Tip Dergisi 2008; 50:60-64.
7. Smith SI , Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo O, et al. Comparison of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. World J Gastroenterol 2004; 10:1958-60.
8. Malekzadeh R. Treatment of *Helicobacter pylori* infection in Iran: low efficacy of recommended western regimens. Arch Iranian Med 2004; 7:1-8.
9. Meurer LN, Bower DJ. Management of *Helicobacter pylori* infection. Am Fam Phys 2000; 7:1327-36.
10. Megraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advance in testing. Gut 2004; 53:1374-84.
11. Canton R, Argilia CM, Rafael F, Baquero F. Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori.* Rev Med Microbiol 2001; 12:47-61.
12. Mohajeri P, Navabi J, Salimi GH, Ghamari M, Abdoli GH. Rate of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* from biopsy gastric of referred patients to Emam hospital. Medical Journal of Lorestan 2002; 21:9-18. [In Persian]
13. Nowrouzi J, Kargar M, eds. Bacterial pathogenesis. 1st ed. Tehran: Jafari Publication; 2008. p.232-50. [In Persian]
14. Collins J, Ali-Ibrahim A, Smoot DT. Antibiotic therapy for *Helicobacter pylori.* Med Clin Am 2006; 90:11-25.