مقاله پژوهشی

بررسی شیوع مقاومت به آنتی بیوتیک کلاریترومایسین در بین سویه‌های *هلیکو باکتر پیلوری* جدا شده از بیماران با مشکلات گوارشی

نویسندگان:

علیرضا احمدزاده*[۱]،زهره افتخاری[۲]،ژاله محسنی فر[۳]،مصطفی رضایی طاویرانی[۴]

۱–استادیار گروه علوم آزمایشگاهی ،دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲– دانشیار گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ،تهران، ایران

۳– دانشیار گروه پاتولوژی، بیمارستان آیت الله طالقانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴– استاد مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.4, Winter 2024

چکیده:

مقدمه: امروزه مقاومت به کلاریترومایسین که به عنوان یک داروی کلیدی در درمان *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد به یک نگرانی بهداشتی جهانی تبدیل شده است. جهش‌های نقطه‌ای در ژن 23srRNA به عنوان یکی از مهمترین دلایل مقاومت به کلاریترومایسین می‌باشد. هدف این تحقیق بررسی فراوانی مقاومت به کلاریترومایسین و ارتباط این مقاومت با جهش‌های نقطه‌ای در ژن 23srRNA می‌باشد.

روش کار: این مطالعه در بهمن ۱۴۰۰ و در کلنیک ولیعصر(عج) شهر تهران بر روی ۱۰۰بیمار که به خاطر ناراحتی معده مورد آندوسکوپی قرار گرفتند انجام شد. از هر بیمار دو نمونه بیوپسی گرفته شد که یکی از آنها برای مطالعات پاتولوژیک و دیگری برای مطالعات میکروبیولوژیک استفاده شد. آزمایش‌های حساسیت آنتی بیوتیکی با روش رقت‌سازی آگار و PCR انجام شد.

یافته‌ها: در بین بیماران، ۵۳ درصد (۵۳/۱۰۰) با ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* تشخیص داده شدند .نتایج پاتولوژیک نشان داد که ۵۴/۷ درصد (۲۹/۵۳) بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، ۳۷/۷ درصد (۲۰/۵۳) گاستریت شدید فعال و ۷/۵درصد (۴/۵۳) از متاپلازی رنج می‌بردند. در میان ۵۳ بیماری که *هلیکوباکتر پیلوری* آنها مثبت بود۱۳/۲درصد آنها (۷/۵۳) مقاوم به کلاریترومایسین تشخیص داده شدند. مقادیر۰/۱۲۵ میلی گرم در لیتر و۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب به عنوان مقادیر MIC_{50} و MIC_{90} تعیین شدند. بر اساس نتایجPCR ، تمامی سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین دارای جهش نقطه‌ای A2142Gدر ژن 23srRNA بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که وجود جهش‌های نقطه‌ای در ژن 23srRNA ممکن است با مقاومت به کلاریترومایسین در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* ارتباط داشته باشد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، مقاومت به کلاریترومایسین، تغییرات هیستوپاتولوژیک، حداقل غلظت مهاری، جهش نقطه‌ای

Pars J Med Sci 2024;21(4):62-70

مقدمه:

آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان سازمان بهداشت جهانی (WHO-IARC) *هلیکوباکتر پیلوری* را به عنوان عامل سرطان‌زا تیپ I دسته‌بندی کرده است . عفونت با این باکتری به عنوان یک ریسک فاکتور اصلی برای سرطان معده می‌باشد. این سرطان به عنوان سومین عامل مرگ ناشی از سرطان در جهان مطرح است [۱،۲].همچنین، این باکتری می تواند منجر به ایجاد زخم معده، گاستریت و سایر اختلالات گوارشی شود [۳،۴]. میزان عفونت با *هلیکوباکتر پیلوری* در سراسر جهان زیاد است به طوری که در سال ۲۰۱۵، تخمین زده شد که بیش از نیمی از جمعیت جهان به این باکتری مبتلاند[۵]. شیوع این عفونت در کشورهای

* نویسنده مسئول، نشانی: استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تلفن تماس: ۰۲۱–۲۲۷۱۸۵۲۸ و کدپستی: ۱۹۷۱۶۵۳۳۱۳ پست الکترونیک:a.ahmadzadeh@sbmu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴ اصلاح: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴

در حال توسعه به مراتب بیشتر است [۶]. ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* در بین جمعیت ایران زیاد بوده و همچنین سن ابتلا پایین می‌باشد [۷]. به دلیل عوارض مختلف مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری، ریشه کنی این باکتری به عنوان اولین انتخاب برای درمان می‌باشد. چندین رژیم دارویی برای درمان و حذف این باکتری وجود دارد که کلاریترومایسین به عنوان جزء کلیدی برخی از این رژیم‌ها است [۸،۹]. کلاریترومایسین به عنوان یک آنتی بیوتیک ماکرولیدی موثر در برابر *هلیکوباکتر پیلوری* از طریق اتصال به زیر واحد ۵۰s ریبوزومی باکتری سنتز پروتئین را متوقف می‌کند [۱۰]. متأسفانه امروزه مقاومت به کلاریترومایسین در حال گسترش است. این مقاومت بیشتر از طریق جهش در جایگاهای A2143G، A2142G و A2142C ژن ۲۳srRNA رخ می‌دهد [۱۱،۱۲]. با توجه به گستره وسیع عفونت با این باکتری، پایش دائمی شیوع *هلیکوباکتر پیلوری* و بررسی مقاومت به آن در برابر عوامل ضد میکروبی ضروری است [۱۳]. هدف اصلی این مطالعه بررسی شیوع *هلیکوباکتر پیلوری* و همچنین تعیین میزان شیوع مقاومت به کلاریترومایسیندر بین بیماران ایرانی مبتلا به اختلالات گوارشی با کمک تست حساسیت آنتی بیوتیکی و همچنین تعیین نوع جهش مرتبط با مقاومت با روش PCR می‌باشد.

روش کار:

نمونه‌های بیمار

این مطالعه به صورت مقطعی در بهمن سال ۱۴۰۰ انجام شده و شامل ۱۰۰ بیمار بااختلالات گوارشی بوده که در درمانگاه ولیعصر شهر تهران تحت آندوسکوپی قرار گرفتند.برای این پژوهش کد تاییداخلاقی IR.SBMU.RETECH.REC.1400.1189 از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صادر گردید. بیمارگیری به صورت تصادفی ساده انجام شد و فرم‌های رضایت آگاهانه طبق پروتکل‌های تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی از بیماران گرفته شد. همچنین بیماران که اخیراً دارو و آنتی بیوتیک جهت مشکلات گوارشی مصرف نموده بودند از مطالعه حذف شدند. از هر بیمار دو بیوپسی از ناحیه آنتروم معده تهیه گردید. یکی بیوپسی‌ها به منظور جداسازی*هلیکوباکتر پیلوری* و بیوپسی دیگر برای بررسی تغییرات بافت‌شناسی استفاده شد. همچنین اطلاعات دموگرافیک بیماران در فرم پرسشنامه استاندارد ثبت شد.

کشت هلیکوباکتر پیلوری

کشت نمونه‌ها بر روی محیط بروسلا آگار حاوی خون اسب لیز شده، مکمل اسکیرو، آنتی‌بیوتیک‌ها وانکومایسین، تری متوپریم و پلی‌میکسین B انجام شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت شرایط میکروآئروفیلیک (۸۵ درصد نیتروژن،۱۰٪CO_2 ، ۵درصدO_2) به مدت ۴ تا ۷ روز انکوبه شدند. در ادامه، کلنی‌های رشد یافته از نظر مورفولوژی سلولی بررسی شدند و همچنین برای تایید نهایی PCRبرای ژن glmM و ژن 16srRNA *هلیکوباکتر پیلوری* انجام گردید [۱۴].

تعیین حساسیت میکروبی

حساسیت پذیری سویه‌ها به کلاریترومایسین (Merck, CAS-Number 81103-11-9)با روش رقیق سازی آگار وطبق آخرین دستورالعمل کمیته اروپایی در خصوص تعیین حساسیت ضد میکروبی European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) انجام شد [۱۵]. مقادیر مختلف کلاریترومایسین، طبق دستورالعمل EUCAST در غلظت نهایی ۰/۰۶ تا ۱۶ میلی گرم در لیتر، به محیط کشت مولر-هینتون آگار (Sigma,CAS-Number 70191)حاوی ۱۰ درصد خون اسب دفیبرینه شده اضافه شد. سوسپانسیون *هلیکوباکتر پیلوری* در نرمال سالین استریل با تراکم ۳ مقیاس مک فارلندتهیه گردیدو از ۱۰۸ سلول (CFU)/1ml برای تعیین حساسیت استفاده شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به عنوان کمترین غلظت آنتی بیوتیکی که از رشد باکتری پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت شرایط میکروآئروفیل جلوگیری می‌کرد تعیین شد [۱۶]. سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* در صورت MIC ≤۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان سویه حساس، سویه‌های با حساسیت متوسط در صورت که MIC برابر۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و سویه مقاوم با MIC > ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در نظر گرفته شدند.

شناسایی مولکولی جهش از طریقPCR

DNA سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* با استفاده از کیت YTA Genomic DNA Extraction Mini Kit for Tissue شرکت یکتا تجهیز استخراج و برای تجزیه و تحلیل بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد. تایید گونه با انجام PCR برای ژن 16srRNA و ژن glmM انجام شد و به منظور شناسایی جهش‌های 23rRNA در موقعیت‌های A2143G ، A2142G ، واکنش PCRبا دستگاه ترمال سیکلر اپندورف مدل AG 22331 در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر که حاوی: PCR بافر۱ مولار ، ۰/۳میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرومولار DNA ژنومی، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط نوکلئوتید ها،۰/۶۳ میلی‌مول MgCl2 و۰/۲ در میکرولیتر Taq پلیمراز استفاده شد. واکنشPCR تحت شرایط زیر انجام شد: ۱ چرخه دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴

درجه سانتی‌گراد، annealing (براساس Tm پرایمرها محاسبه شد) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۳ درجه سانتیگراد، extension به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به دنبال آن ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، annealing به مدت ۱ دقیقه در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲ دقیقهextension در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت گرفت الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲درصد اجرا و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد.مجموعه پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و اندازه محصولات PCR در جدول۱ نشان داده شده است.DNA دو سویه مرجع کد کننده A2142G، A2143G با کدهایJQ765438 ، JQ765441، به عنوان سویه‌های کنترل استفاده شدند.

بررسی بافت شناسی

به منظور بررسی های بافت شناسی نمونه بیوپسی با فرمالین تثبیت و در پارافین قالب گیری انجام شد و در ادامه با میکروتوم برش بافتی تهیه و سپس مقاطع بافتی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

تحلیل آماری

داده‌ها و نتایج با نرم افزارهای SPSS 22 و Graph-Pad Prism 6 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون کای دو و Fisher's exact test انجام شد.$p< ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری نتایج در نظر گرفته شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده و اندازه محصولات آنها

اسم پرایمر	توالی پرایمر′3→′5	اندازه محصول	مرجع
16SrRNA	F:GGCTATGACGGGTATCCGGC R:GCCGTGCAGCACCTGTTTTC	۷۶۴	[۱۷]
glmM	F:GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG R:GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC	۲۹۶	[۱۸]
A2142G	F: ACGGCGGCCGTAACTATA R: AGGTCCACGGGGTCTTC	۱۷۵	[۱۹]
A2143G	F: TCGAAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC R: CCGCGGCAAGACAGAGA	۱۱۸	[۲۰]

یافته‌ها:

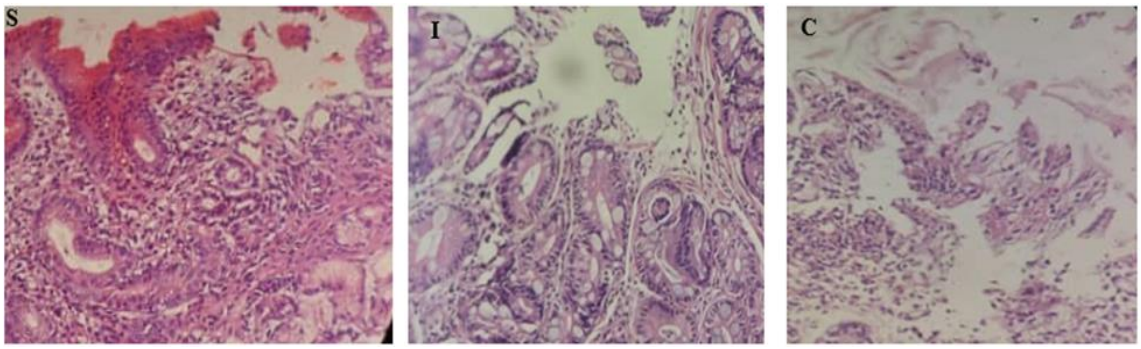
از ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده،*هلیکوباکتر پیلوری* در ۵۳ نفر مثبت تشخیص داده شد .محدوده سنی بیماران مبتلا بین ۱۸ تا ۶۰ سال بود. از این تعداد ۳۲ نفر (۶۰/۴ درصد) مرد و ۲۱ نفر زن (۳۹/۶ درصد) بودند. بیماران بر اساس یافته های پاتولوژیک به سه گروه تقسیم شدند. ۲۹ (۵۴/۷ درصد) از بیماران مبتلا به گاستریت مزمن(CG) ، ۲۰(۳۷/۷ درصد) گاستریت شدید فعال (SAG) و ۴ (۷/۵ درصد) با متاپلازیا (IM)، تشخیص داده شدند(شکل۱).در بیماران با گاستریت مزمن تجمع سلول‌های لنفوسیت به ویژه پلاسماسل‌ها در مقاطع بافتی زیاد می‌شود .در افرادی که وضعیت پاتولوژیک آنها گاستریت شدید فعال تشخیص داده شد میزان سلولهای نوتروفیل در بافت معده افزایش دارد و همچنین چنانچه سلولهای گابلت در بافت معده زیاد شود نوع عارضه متاپلازیا در نظر گرفته می‌شود.

بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌های دموگرافیک(جدول ۲) مربوط به مصرف الکل، بین گروه CG و IM تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۴$) و همچنین برای مصرف الکل تفاوت چشم‌گیری ($p< ۰/۰۲$) بین IM وSAG یافت گردید. علاوه بر این تفاوت معنی‌داری از لحاظ استعمال سیگار ($p< ۰/۰۳$) بین گروه‌های پاتولوژیکIM و SAG مشاهده شد.

مقاومت به کلاریترومایسین در ۵۳ سویه *هلیکوباکتر پیلوری* بررسی شد و مقادیر MIC آنها با استفاده از روش رقت آگار بررسی گردید (جدول ۳) . با بررسی مقادیر MIC مشاهده شد که ۷ (۱۳/۲درصد)سویه *هلیکوباکتر پیلوری* به کلاریترومایسین مقاوم بودند، درحالی که ۳۹ سویه (۷۳/۵ درصد) نسبت به این آنتی‌بیوتیک از خود حساسیت نشان دادند. همچنین یک سویه (۱/۸درصد) به عنوان سویه با حساسیت متوسط شناسایی شد. ۴ میلی‌گرم در لیتر به عنوان فراوان ترین مقدار MIC در بین سویه‌های مقاوم کشف شد. مقادیر ۰/۱۲۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب به عنوان مقادیر MIC50 و MIC90 در نظر گرفته شدند. سویه‌های مقاوم به *هلیکوباکتر پیلوری* به ترتیب به میزان۵۷/۱ درصد در گروه IM ، ۲۸/۵درصد در گروه SAG و ۱۴/۲ درصد در گروه CG قرار گرفتند. ۱۰۰درصد سویه‌های با حساسیت متوسط در گروه CG واقع شدند.

به منظور روشن شدن مکانیسم مقاومت به کلاریترومایسین در ایزوله *هلیکوباکتر پیلوری* ،PCR با مجموعه پرایمرهای اختصاصی

برای تشخیص جهش های نقطه‌ای در 23srRNA انجام شد. در همه سویه‌های مقاوم و حساسیت متوسط جهش نقطه‌ای A2142G در ۸/۵۳ نمونه (~۱۵درصد) شناسایی شد (شکل۲)، در حالی که جهش A2143G در نمونه ها شناسایی نشد. با توجه به نتایج پاتولوژیک،و همچنین براساس مقاومت به کلاریترومایسین، سویه‌های مقاوم HC34، HC30، HC27، HC42 در گروه متاپلازیا(IM)، و سویه‌های HC23 ، HC18 در گروه گاستریت شدید فعال (SAG) و HC14 در گروه گاستریت مزمن (CG) قرار گرفتند. همچنین سویه HC5 که دارای حساسیت متوسط نسبت به کلاریترومایسین بود در گروه CG قرار گرفت. با توجه به میزان مقاومت به کلاریترومایسین و یافته‌های پاتولوژیک، تفاوت قابل‌توجهی بین گروه‌هایCG و IM (P< ./۰۰۴) و بین گروه‌هایIM وSAG (p<۰/۰۰۲) مشاهده شد.



شکل ۱: تصاویر بافت معده بیماران آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری*. Sگاستریت شدیدفعال ، Iمتاپلازی ، C گاستریت مزمن. (رنگ امیزی هماتوکسیلین–ائوزین)

جدول ۲: داده های دموگرافیک مربوط به بیماران مبتلا به عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در مقابل داده های پاتولوژیک

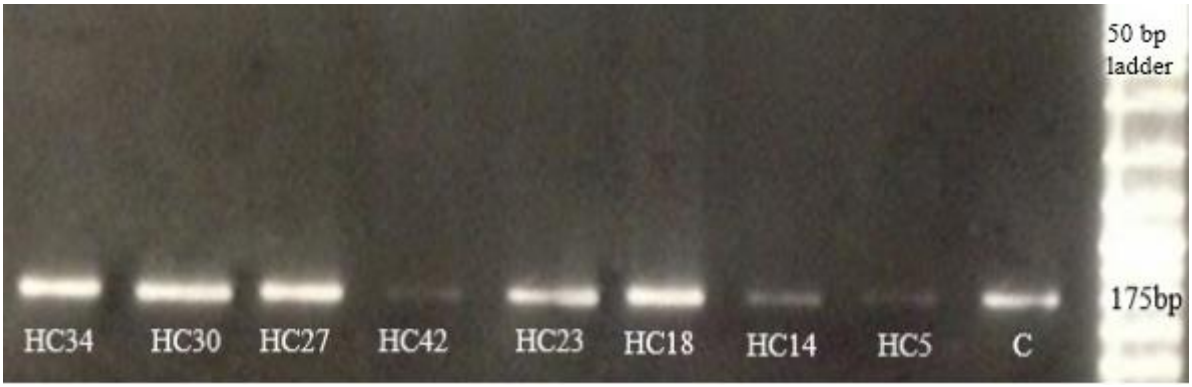
ویژگی	n=۵۳ یافته های پاتولوژیک			
	n	CG n=۲۹	SAG n=۲۰	IM n=۴
مرد	n=۳۲	۱۸(۵۶/۲%)	۱۱(۳۴/۳%)	۳(۹/۳%)
زن	n=۲۱	۱۱(۵۲/۳%)	۹(۴۲/۸%)	۱(۴/۷%)
سن	M	۴۵–۱۸	۵۹–۳۵	۶۰–۵۵
	F	۴۸–۲۲	۵۷–۳۰	۵۲
سیگار	M(n=۷)	۴(۵۷/۱%)	۱(۱۴/۲%)	۲(۲۸/۵%)
	F(n=۲)	۱(۵۰%)	۰(۰%)	۱(۵۰%)
الکل	M(n=۶)	۱(۱۶/۶%)	۲(۳۳/۳%)	۳(۵۰%)
	F(n=۱)	۰(۰%)	۰(۰%)	۱(۱۰۰%)
گروه خونی	M(n=۳۲)	A (n=۷, (۳۸/۸%))	A (n=۷, (۶۳/۳%))	A (n=۲, (۶۶/۶%))
		B (n=۵, (۲۷/۷%))	AB (n=۳, (۲۷/۲%))	B (n=۱, (۳۳/۳%))
		O (n=۴, (۲۲/۲%))	O (n=۱, (۹%))	
		Not detected (n=۲, (۱۱/۱%))		
	F(n=۲۱)	A (n=۵, (۴۵/۴%))	B (n=۳, (۳۳/۳%))	A (n=۱, (۱۰۰%))
		0(n=۶, (۵۴/۵%))	O (n=۵, (۵۵/۵%))	
			Not detected (n=۱, (۱۱/۱%))	

SAG: گاستریت شدید فعال،CG گاستریت مزمن،IM متاپلازیا،M:مرد،F:زن،n: تعداد

جدول ۳: مقدار MIC در سویه‌های مختلف *هلیکوباکتر پیلوری* و در گروه های مختلف پاتولوژیک

MIC (mg/L)	جنس	یافته های پاتولوژیک		
	n=۵۳	CG n=۲۹	SAG n=۲۰	IM n=۴
۰/۰۶	M(n=۱۱)	۳(۲۷/۲%)	۸(۷۲/۷%)	۰
	F(n=۱۰)	۶(۶۰%)	۴(۴۰%)	۰
۰/۱۲۵	M(n=۸)	۷(۸۷/۵%)	۱(۱۲/۵%)	۰
	F(n=۵)	۲(۴۰%)	۳(۶۰%)	۰
۰/۲۵	M(n=۸)	۷(۸۷/۵%)	۱(۱۲/۵%)	۰
	F(n=۳)	۲(۶۶/۶%)	۱(۳۳/۳%)	۰
۰/۵	M(n=۰)	۰	۰	۰
	F(n=۱)	۱(۱۰۰%)	۰	۰
۱	M(n=۱)	۰	۱(۱۰۰%)	۰
	F(n=۰)	۰	۰	۰
۲	M(n=۰)	۰	۰	۰
	F(n=۱)	۰	۱(۱۰۰%)	۰
۴	M(n=۳)	۱(۳۳/۳%)	۰	۲(۶۶/۶%)
	F(n=۰)	۰	۰	۰
۸	M(n=۰)	۰	۰	۰
	F(n=۰)	۰	۰	۱(۱۰۰%)
۱۶	M(n=۰)	۰	۰	۱(۱۰۰%)
	F(n=۰)	۰	۰	۰

SAG: گاستریت شدید فعال،CG گاستریت مزمن،IM متاپلازیا،M:مرد،F:زن،n: تعداد



شکل۲: ژل الکتروفورز برای جهش نقطه‌ای A2142G در ژن HC. 23srRNA:*هلیکوباکتر پیلوری*،C:کنترل

بحث:

عفونت با *هلیکوباکتر پیلوری* به عنوان یکی از شایع ترین بیماری‌های مزمن باکتریایی بوده که تقریباً ۵۰ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر خود قرار داده است. در کشورهای در حال توسعه میزان ابتلای بیش از ۸۰ درصد نیز گزارش شده است [۲۱،۲۲]. این تحقیق میزان ابتلای ۵۳ درصدی را گزارش نموده است که در تطابق با مطالعات قبلی در ایران بوده که میزان آلودگی را بین ۳۶ تا ۹۰ درصد گزارش نموده است [۲۳،۲۴]. تجویز یک رژیم دارویی مناسب و موثر به عنوان فاکتور مهمی

در درمان *هلیکوباکتر پیلوری* است.رژیم دارویی برای درمان عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* شامل یک مهارکننده پمپ پروتون، کلاریترومایسین و آموکسی سیلین یا مترونیدازول می‌باشد که به عنوان درمان استاندارد در نظر گرفته می‌شود .بنابراین کلاریترومایسین به عنوان یک آنتی بیوتیک کلیدی در درمان *هلیکوباکتر پیلوری* مطرح است و مقاومت یا حساسیت به کلاریترومایسین یکی از مهمترین عوامل تعیین کننده موفقیت یا شکست درمان می‌باشد [۲۵]. میزان مقاومت به کلاریترومایسین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* در مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت است. اگرچه میزان مقاومت در کشورهای توسعه یافته کمتر است، اما این میزان در کشورهای در حال توسعه بین ۲۵ تا ۵۰ درصد گزارش شده است [۲۶]. از مجموع ۲۱ مطالعه در خصوص مقاومت به کلاریترومایسین *هلیکوباکتر پیلوری* در مناطق مختلف ایران مقاومت بین محدوده بیشترین (۷۵درصد) و کمترین (۰درصد)گزارش شده است [۲۷]. میزان مقاومت گزارش شده در این مطالعه ۱۳/۲ درصد بوده که در محدوده مطالعه قبلی در ایران می‌باشد .در مطالعه دیگری در ایران مقادیر ۰/۲۵ و ۱۶ میلی‌گرم در لیتر را به ترتیب به عنوان MIC_{50}- MIC_{90} گزارش نموده است[۲۸] . طبق این مطالعه مقادیر ۰/۱۲۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر به عنوان مقادیر MIC_{50} و MIC_{90} تعیین شدند که این مقادیر برای مطالعه ما نسبت به مطالعه قبلی در ایران، کمتری می‌باشد که نشان می‌دهد میزان حساسیت به کلاریترومایسین در مطالعه دیگر نسبت به مطالعه ما کمتر است. در تحقیقی در چین۰/۰۳۱۲ میلی گرم در لیتر به عنوان MIC_{50} و ۶۴ میلی‌گرم در لیتر به عنوان MIC_{90} گزارش شده است که با مقادیر مطالعه ما متفاوت بود که می‌تواند ناشی از متفاوت بودن سویه‌های در ایران با کشور چین باشد[۲۹]. در یک بررسی در ۱۸ کشور اروپایی محدوده مقاومت به کلاریترومایسین۳۶/۹– ۸/۴ درصدگزارش شده است که این میزان مقاومت با گزارش ما همخوانی داشت [۳۰]. همچنین در تحقیقی دقیقا مشابه در ایتالیا، مقاومت ۱۳/۵درصدی به کلاریترومایسین در میان سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* یافت شده است[۳۱].کلاریترومایسین از طریق تعامل با دمین V پپتیدیل ترانسفراز 23srRNA عمل می کند. از این‌رو جهش‌های نقطه‌ای در 23srRNA باعث کاهش میل ترکیبی نسبت به کلاریترومایسین و در نتیجه مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک می‌شوند. A2142G ، A2143G، شایع ترین جهش‌های نقطه‌ای در23 srRNA هستند [۳۲،۳۳]. در تحقیق کنونی ۱۰۰ درصد سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین حامل جهش نقطه‌ای A2142G بودند.در صورتی که در مطالعه‌ای فرضی و همکاران از ایران، از بین ۲۳ سویه مقاوم به کلاریترومایسین، ۸۲/۷ درصد از سویه‌های مقاوم حامل جهش A2142G بودند و تنها ۱۷/۳ درصد با جهش نقطه‌ای A2143G شناسایی شدند. در مقابل، خاشعی و همکاران. گزارش داد که A2142Gبیشترین (۹۰درصد) جهش نقطه‌ای شایع در میان سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین بوده است [۳۴،۳۵]. در مطالعه‌ای در کره، A2143G به عنوان فراوان ترین جهش نقطه‌ای و جهش A2142G تنها به میزان ۰/۹درصدگزارش شد [۳۶]. این تفاوت در مطالعات مربوط به ایران و کره با مطالعه مذکور می تواند ناشی از حجم نمونه و همچنین تفاوت در منطقه مورد مطالعه باشد.در این مطالعه عفونت در میان افراد با گروههای خونA و B به مراتب بیشتر از افراد با گروه خونی O بود این درصورتی است که معمولا عفونت در بین افراد با گروه خونی O بایستی بیشتر باشد [۳۷] این تفاوت می‌تواند ناشی از کم بودن حجم نمونه این مطالعه باشد.بین ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* و ویژگی‌های سویه باکتریایی و ایجاد تغییرات بافتی ارتباط مستقیمی وجود دارد و از نظر وضعیت بافت‌شناسی به ترتیب از راست به چپ افراد دارای گاستریت مزمن، گاستریت شدید فعال و متاپلازیا دارای شانس احتمال بیشتری برای وخیم شدن بیماریشان دارند [۳۸،۳۹]. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت انتی بیوتیکی در بین افراد دارای متاپلازیا یافت گردید که خود دلیلی بر این موضوع است که سویه‌های دارای مقاومت باعث تغییرات بافتی شدیدتری خواهند شد. دراین مطالعه بعضاً تفاوت‌هایی با مطالعات داخلی و یا خارجی مشاهده گردید که پیشنهاد می‌گردد مطالعات بعدی با حجم نمونه بیشتر و همچنین با همکاری بین مراکز مختلف از چندین شهر مطالعات مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی انجام پذیرد.

نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که بروز مقاومت به کلاریترومایسین در باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* در ایران در حال افزایش است. یافته‌های این مطالعه نشان داد که سویه‌های مقاوم دارای جهش از نوع A2142G در ژن 23srRNA خود می باشند. همچنین این مطالعه شواهدی مبنی بر اهمیت غربالگری ژنوتیپ‌های مقاوم سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* برای راهنمایی پزشکان جهت انتخاب ترکیبی دارویی مناسب را ارائه داد.

تعارض منافع:

هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

References:

1.Guo Y, Cao XS, Guo GY, Zhou MG, Yu B. Effect of Helicobacter Pylori Eradication on Human Gastric Microbiota: A Systematic Review and Meta-Analysis. FRONT CELL INFECT MI. 2022;12:899248.

2. Che H, Xiong Q, Ma J, Chen S, Wu H, Xu H, et al. Association of Helicobacter pylori infection with survival outcomes in advanced gastric cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. BMC Cancer. 2022;22(1):904.

3. Cho JH, Jin SY. Current guidelines for Helicobacter pylori treatment in East Asia 2022: Differences among China, Japan, and South Korea. WJCC 2022; 10(19): 6349-6359 [PMID: 35979311 DOI: 10.12998/wjcc.v10.i19.6349]

4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/florence consensus report. Gut. 2017;66(1):6-30. doi:10.1136/gutjnl-2016-312288

5. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. J. Gastroenterol."‥ 2017;153(2):420-9.

6. Tran V, Saad T, Tesfaye M, Walelign S, Wordofa M, Abera D, et al. Helicobacter pylori (H. pylori) risk factor analysis and prevalence prediction: a machine learning-based approach. BMC Infect Dis.. 2022;22(1):655.

7. Massarrat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A, et al. Peptic ulcer disease, irritable bowel syndrome and constipation in two populations in Iran. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1995;7:427–33.

8.Goldberg L, Amrick TJ. Successful Eradication of Helicobacter pylori with 5-Day Concomitant Treatment. GastroHep. 2022;2022:1211329.

9. Leung WK, Graham DY. Clarithromycin for Helicobacter pylori infection. Expert Opin Pharmacother. 2000;1(3):507-14.

10. Kocsmár É, Buzás GM, Szirtes I, Kocsmár I, Kramer Z, Szijártó A, et al. Primary and secondary clarithromycin resistance in Helicobacter pylori and mathematical modeling of the role of macrolides. Nat Commun.. 2021;12(1):2255.

11. Hosseini RS, Rahimian G, Shafigh MH, Validi M, Khaledi M, Gholipour A. Correlation between clarithromycin resistance, virulence factors and clinical characteristics of the disease in Helicobacter pylori infected patients in Shahrekord, Southwest Iran. AMB Express. 2021;11(1):147.

12. Albasha AM, Elnosh MM, Osman EH, Zeinalabdin DM, Fadl AAM, Ali MA, et al. Helicobacter pylori 23S rRNA gene A2142G, A2143G, T2182C, and C2195T mutations associated with clarithromycin resistance detected in Sudanese patients. BMC Microbiology. 2021 2021/02/03;21(1):38.

13.Bordin D, Morozov S, Plavnik R, Bakulina N, Voynovan I, Skibo I, et al. Helicobacter pylori infection prevalence in ambulatory settings in 2017-2019 in RUSSIA: The data of real-world national multicenter trial. Helicobacter. 2022:e12924.

14. Gharibi S, Falsafi T, Alebouyeh M, Farzi N, Vaziri F, Zali MR. Relationship between histopathological status of the Helicobacter pylori infected patients and proteases of H. pylori in isolates carrying diverse virulence genotypes. Microbial Pathogenesis. 2017;110:100-6.

15. Kahlmeter G, Brown DF, Goldstein FW, et al. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect. 2006;12(6):501-503.

16. Bińkowska A, Biernat MM, Łaczmański Ł, Gościniak G. Molecular Patterns of Resistance Among Helicobacter pylori Strains in South-Western Poland. Front Microbiol. 2018;9:3154. Published 2018 Dec 18.

17. Bohr UR, Primus A, Zagoura A, Glasbrenner B, Wex T, Malfertheiner P. A group-specific PCR assay for the detection of Helicobacteraceae in human gut. Helicobacter. 2002;7(6):378-383.

18. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, et al. Comparative genomics of Helicobacter pylori isolates recovered from ulcer disease patients in England. BMC Microbiol. 2005;5:32.

19. Pan ZJ, Su WW, Tytgat GN, Dankert J, van der Ende A. Assessment of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori among patients in Shanghai and Guangzhou, China, by primer-mismatch PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(1):259-261.

20. Furuta T, Soya Y, Sugimoto M, et al. Modified allele-specific primer-polymerase chain reaction method for analysis of susceptibility of Helicobacter pylori strains to clarithromycin. J Gastroenterol Hepatol. 2007;22(11):1810-1815.

21. Alexander SM, Retnakumar RJ, Chouhan D, Devi TNB, Dharmaseelan S, Devadas K, et al. Helicobacter pylori in Human Stomach: The Inconsistencies in Clinical Outcomes and the Probable Causes. Front Microbiol. [Review]. 2021 2021-August-17;12.

22. Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Dabiri H, Yamaoka Y, Bolfion M, et al. Determination of Helicobacter pylori virulence by analysis of the cag pathogenicity island isolated from Iranian patients. Dig Liver Dis 2009;41:634-38.

23. Fakheri H, Saberi Firoozi M, Bari Z. Eradication of Helicobacter Pylori in Iran: A Review. Middle East J Dig Dis. 2018;10(1):5-17.

24. Ahmadzadeh A, Ghalehnoei H, Farzi N, et al. Association of CagPAI integrity with severeness of Helicobacter pylori infection in patients with gastritis. Pathol Biol (Paris). 2015;63(6):252-257.

25. Kim SY, Chung JW. Best Helicobacter pylori Eradication Strategy in the Era of Antibiotic Resistance. Antibiotics (Basel). 2020;9(8):436.

26. Yilmaz O, Demiray E. Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of Helicobacter pylori infection and determination of clarithromycin resistance in H. pylori eradication therapy. WJG 2007: 13:671-75

27. Khademi F, Poursina F, Hosseini E, Akbari M, Safaei HG. Helicobacter pylori in Iran: A systematic review on the antibiotic resistance. Iran. J. Basic Med. Sci. 2015;18(1):2-7.

28. Alavifard H, Mirzaei N, Yadegar A, et al. Investigation of Clarithromycin Resistance-Associated Mutations and Virulence Genotypes of Helicobacter pylori Isolated from Iranian Population:

A Cross-Sectional Study. Curr Microbiol. 2021;78(1):244-254.
29. Huang X, Liu Y, Lin Z, et al. Minimum inhibitory concentrations of commonly used antibiotics against Helicobacter Pylori: A multicenter study in South China. PLoS One. 2021;16(9):e0256225.
30. Megraud F, Bruyndonckx R, Coenen S, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europein 2018 and its relationship to antibiotic consumption in the community. Gut 2021;70:1815–1822.
31. De Francesco V, Zullo A, Fiorini G, Saracino IM, Pavoni M, Vaira D. Role of MIC levels of resistance to clarithromycin and metronidazole in Helicobacter pylori eradication. J Antimicrob Chemother. 2018;74(3):772-4.
32. Klesiewicz K., Savari M., Zahedi M.J., Zahedi M.J., Moghadam S.D., Abasi M.H. PCR-RFLP detection of point mutations A2143G and A2142G in 23S rRNA gene conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori strains' Acta Biochim. Pol. 2014;61(2):311–315.
33. Hussein RA, Al-Ouqaili MTS, Majeed YH. Detection of clarithromycin resistance and 23SrRNA point mutations in clinical isolates of Helicobacter pylori isolates: Phenotypic and molecular methods. Saudi J Biol Sci. 2022;29(1):513-520.
34.Farzi N, Yadegar A, Sadeghi A, Asadzadeh Aghdaei H, Marian Smith S, Raymond J, Suzuki H, Zali MR. High Prevalence of Antibiotic Resistance in Iranian Helicobacter pylori Isolates: Importance of Functional and Mutational Analysis of Resistance Genes and Virulence Genotyping. J. Clin. Med. 2019; 8(11):2004.
35.Khashei, R.; Dara, M.; Bazargani, A.; Bagheri Lankarani, K.; Taghavi, A.; Moeini, M.; Dehghani, B.; Sohrabi, M. High rate of A2142G point mutation associated with clarithromycin resistance among Iranian Helicobacter pylori clinical isolates. APMIS APMIS Scand. 2016, 124, 787–793.
36. Seo SI, Do BJ, Kang JG, Kim HS, Jang MK, Kim HY, Shin WG. Helicobacter pylori Eradication According to Sequencing-Based 23S Ribosomal RNA Point Mutation Associated with Clarithromycin Resistance. J. Clin. Med. 2020; 9(1):54.
37. Jaff MS. Relation between ABO blood groups and Helicobacter pylori infection in symptomatic patients. Clin Exp Gastroenterol. 2011;4:221-226. doi:10.2147/CEG.S23019.
38. Ghasemi Basir, Hamid Reza, Mehdi Ghobakhlou, Parvin Akbari, Arash Dehghan, and Mohamad Ali Seif Rabiei. "Correlation between the Intensity of <I>Helicobacter Pylori</I> Colonization and Severity of Gastritis." Gastroenterol Res Pract 2017 (2017/11/28 2017): 8320496.
39. Hojati SA, Kokabpeyk S, Yaghoubi S, Joukar F, Asgharnezhad M, Mansour-Ghanaei F. Helicobacter pylori infection in Iran: demographic, endoscopic and pathological factors. BMC Gastroenterol. 2021;21(1):355.

Original Article

Investigating the prevalence of clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with digestive problems

Alireza Ahmadzadeh[*1], Zohre Eftekhari[2], Zhaleh Mohsenifar[3]
Mostafa Rezaei-Tavirani[4]

Received:2023.12.25 Revised:2024.01.29 Accepted: 2024.02.03

1. Department of lablatory Sciences, Paramedical Sciences Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Department of Pathology, School of Medicine, Ayatollah Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Proteomics Research Center, Paramedical Sciences Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.21, No.4, Winter 2024

Pars J Med Sci 2024;21(4):62-70

Abstract:

Introduction:
Nowadays occurrence of resistant to clarithromycin which is a key component of eradication therapy for *Helicobacter pylori* strains is a worldwide health concern. Point mutations in 23srRNA gene is one of the main causes of clarithromycin resistance. This study aimed to examine rate of clarithromycin resistance and its link with 23srRNA gene point mutation.

Materials and Methods:
This study was conducted on 100 patients suffering from gastric complications had referred to Tehran valiasr clinic during january of 2022. Two separate biopsy samples were collected from each patient and used for pathological and microbiological examinations. Antimicrobial susceptibility tests were performed by agar dilution and PCR.

Results:
53% (53/100) of the study patients were diagnosed as *H. pylori*+. Pathological findings indicated that 54.7% (29/53) of the *H.pylori*+ patients suffered from Chronic Gastritis, 37.7% (20/53) from Sever Active Gastritis and 7.5% (4/53) with Intestinal Metaplasia. Clarithromycin resistant were found among 13.2% (7/53) of patients. The MIC values of 0.125 mg/L and 2 mg/L were determined as the MIC50 and MIC90 values, respectively. Based on PCR results, all clarithromycin resistant strains had point mutations A2142G in 23SrRNA gene.

Conclusions:
The findings revealed the existence of point mutations in 23srRNA gene which may be related with resistance to clarithromycin in *H. pylori* strains.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Clarithromycin Resistance, Histopathological Changes, Minimum Inhibitory Concentration, Point mutation

* Corresponding author Email: a.ahmadzadeh@sbmu.ac.ir