Archive of SID

ممانعت از رشد هلیکوباکتر پیلوری توسط ماده تولیدی سودوموناس آئروژینوزا به صورت In vitro

دکتر علی فاضلی[1]، دکتر اکبر طبیبیان، جواد زعیمی

چکیده مقاله

مقدمه. مقاومت هلیکوباکتر پیلوری در برابر متروئیدازول که به طور فزاینده‌ای در گزارشهای پژوهشگران در زمینه عفونتهای دستگاه گوارشی به چشم می‌خورد جستجو برای دستیابی به داروهای مؤثر بر این باکتری را ایجاب می‌کند. در این مطالعه مهار شد هلیکوباکتر پیلوری بوسیله ماده تولیدی سردوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت.

روش مطالعه. اثر ضد هلیکوباکتر ۳۷ ایزوله سردوموناس آئروژینوزا بر روی ۳۱ ایزوله هلیکوباکتر با استفاده از دو روش کشت متقاطع و نفوذ در چاهک مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث. تنها دو سویه از ۳۷ ایزوله سردوموناس آئروژینوزا قادر به مهار رشد هلیکوباکتر بودند و فعالیت ضد باکتریائی یکی از ایزوله‌ها بر روی ۳۱ ایزوله هلیکوباکتر مشتمل بر ۲۷ ایزوله حساس و ۴ ایزوله مقاوم نسبت به متروئیدازول آزمایش گردید. ماده مهار کننده قادر به از بین بودن هر دو گروه ایزوله‌های حساس و مقاوم به متروئیدازول بود.

ماده بازدارنده همچنین قادر به مهار رشد اشریشیاکلی، سالمونلا، شیگلا، کلبسیلا، استافیلوکوکوس اورنوس، و یک باسیل گرم مثبت بود. در حالیکه اثر بازدارندگی ماده در حرارت ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ روز تغییر نمی‌کرد، فعالیت آن در حرارت ۶۰oc به مدت ۱۵ دقیقه نسبتاً کاهش می‌یافت. حرارت ۶۰oc (۳۰ دقیقه)، ۸۰oc و ۱۰۰oc (۱۵ و ۳۰ دقیقه) و همچنین منجمد کردن (۲۰- درجه) و ذوب کردن (۳۷ درجه) به طور کامل ماده باز دارنده را غیرفعال می‌کرد. همچنین تیمار کردن ماده بازدارنده با آنزیم تریپسین موجب غیرفعال شدن آن می‌گردید. بنابراین ماده بازدارنده تولیدی سردوموناس آئروژینوزا احتمالاً یک پروتئین می‌باشد و می‌تواند در گروه باکتریوسین‌ها طبقه‌بندی شود.

● *واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر - متروئیدازول - سودوموناس آئروژینوزا*

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری باسیل خمیده گرم منفی و میکروآئروفیل است که عامل عمده بیماریهای دستگاه گوارش مانند گاستریت مزمن فعال، زخم معده، زخم دوازدهه و سرطان معده می‌باشد (۱و۲).

یکی از داروهای اصلی برای درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری که در ایران نیز استفاده از آن مرسوم است متروئیدازول می‌باشد. گزارشهای زیادی مبنی بر مقاوم شدن این باکتری نسبت به متروئیدازول از سراسر جهان ارائه شده است (۱و۲) که کاربرد این دارو را زیر سؤال می‌برد. لذا اقدام عملی در جهت تولید داروی جدید ضد هلیکوباکتر ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین ما در این مطالعه ممانعت از رشد سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران محلی را توسط سودوموناس آئروژینوزا که توانائی خاصی در تولید مواد بازدارنده رشد سایر باکتریها را دارد بررسی کردیم.

روش مطالعه

جداسازی هلیکوباکترپیلوری: از ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان الزهرا از ناحیه آنتروم معده نمونه بیوپسی گرفته شد. نمونه‌های بیوپسی در سرم فیزیولوژی و یخ قرار داده شده و سریعاً به آزمایشگاه دانشکده پزشکی منتقل می‌گردید و در آنجا براساس روشهای مشروحه در رفرانسهای ۱و۳و۴ روی آنها آزمایش می‌شد که به طور خلاصه ذکر می‌گردد.

پس از له کردن نمونه مقداری از آن به محیط اوره تلقیح شده و در ۳۷ درجه انکوبه می‌شد. مقداری از نمونه در سطح محیط برین هارت اینفیوژن آگار حاوی ۵-۷ درصد سرم اسب و آنتی‌بیوتیکهای وانکومایسین، پلی‌میکسین، تری‌متوپریم و آمفوتریسین کشت داده می‌شد. پلیتهای کشت شده به مدت ۵-۷ روز در ۳۷ درجه و در شرایط میکروآئروفیلیک (۸۵٪ نیتروژن، ۱۰٪ گاز کربنیک و ۵٪ اکسیژن) انکوبه می‌گردید. باقیمانده نمونه بیوپسی هم با روش گرم اصلاح شده رنگ‌آمیزی می‌شد و از نظر وجود باسیلهای خمیده گرم منفی مورد بررسی قرار می‌گرفت. پس از جداسازی هلیکوباکتر پیلوری، حساسیت ایزوله‌ها نسبت به متروئیدازول، آموکسی‌سیلین، تتراسیکلین و سفتی‌زوکسیم با روش Kirby-Bauer سنجیده می‌شد.

بررسی اثر مهاری سودوموناس آنروژینوزا بر روی رشد هلیکوباکتر پیلوری: اثر مهاری ۳۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای گرفته شده از آزمایشگاه بیمارستان الزهرا و سوانح سوختگی اصفهان و یک سویه

۱- دانشیار گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

www.SID

Archive of SID

مشخص سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 15633) بر روی رشد هلیکوباکترپیلوری با دو روش کشت متقاطع و نفوذ در چاهک بررسی گردید(۵و۶).

۱- **روش کشت متقاطع** (Cross-streak): در این روش ابتدا با سواب استریل ازسوسپانسیون سودوموناس آئروژینوزا در سطح محیط کشت (برین هارت اینفیوژن آگار حاوی سرم اسب) به شکل خطی به عرض یک سانتیمتر کشت داده می‌شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌گرفت. پس از این مدت کلنی‌های رشد یافته در محل تلقیح توسط لامل استریل برداشته می‌شد و میکروکلنی‌های باقیمانده نیز توسط بخار کلروفرم کشته می‌شدند (۵و۶). سپس از سوسپانسیون هلیکوباکترپیلوری در جهت عمود بر خط تلقیح سودوموناس کشت داده شده و پلیتها به مدت ۵-۷ روز در ۳۷ درجه و در شرایط میکروآئروفیل انکوبه می‌گردید. پس از این مدت پلیتها از نظر مهار رشد هلیکوباکترپیلوری در محل برخورد خط تلقیح سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار می‌گرفتند.

۲- **روش نفوذ در چاهک** (Well-diffusion): در این روش در سطح محیط اختصاصی هلیکوباکترپیلوری چاهکی به قطر ۷ میلی‌متر ایجاد کرده و سطح پلیت با سوسپانسیون هلیکوباکترپیلوری نظیر روش آنتی بیوگرام کشت داده می‌شد. پس از خشک شدن سطح محیط، ۱۰۰ میکرولیتر از صاف شده محیط کشت مایع سودوموناس آئروژینوزا درون چاهک ریخته و پلیت‌ها به مدت ۳ روز در شرایط میکروآئروفیل انکوبه می‌شد. پس از این مدت ایجاد هاله عدم رشد هلیکوباکترپیلوری اطراف چاهک بیانگر اثر مهاری صاف شده کشت سودوموناس آئروژینوزا تلقی می‌گردید (۵و۶). برای تهیه صاف شده یا عصاره محیط کشت سودوموناس آئروژینوزا، باکتری در محیط TSB کشت داده شده و در ۳۷ درجه انکوبه می‌شد. پس از ۲۴ ساعت کشت مایع سانتریفیوژ می‌شد (۳۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه و محلول رونی (سوپرناتانت) توسط فیلترهای غشائی با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون در شرایط استریل صاف می‌شد و این محلول بدون سلول، حاوی ماده بازدارنده مورد آزمایش قرار می‌گرفت.

نحوه بررسی تاثیر شرایط مختلف بر ماده بازدارنده

حرارت: صاف شده محیط کشت سودوموناس آئروژینوزا در بن ماری در حرارت‌های معین (۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه) با زمانهای مشخص (۱۵ و ۳۰ دقیقه) قرار گرفته و سپس تأثیر بازدارندگی آن همراه با شاهد حرارت ندیده از همان نمونه مورد بررسی قرار می‌گرفت(۶). لازم به یادآوری است که تأثیر فریز (۲۰- درجه) و ذوب (۳۷ درجه) متوالی و همین طور نگهداری در یخچال بر روی عصاره نیز به همان نحو مورد بررسی قرار گرفت.

آنزیم: برای این منظور آنزیم تریپسین پس از حل شدن در بافر فسفات (Img/ml) توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل گردیده و به نسبت ۱:۱ با صاف شدن محیط کشت سودوموناس مخلوط گردید و سپس اثر بازدارندگی عصاره تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت(۶).

بررسی اثر عصاره بر روی چند باکتری دیگر: در این قسمت اثر عصاره مورد نظر بر روی استافیلوکوکوس اورنوس، کلبسیلا، اشریشیاکلی، شالمونلا، شیگلاو یک باسیل گرم مثبت نیز با روش کشت متقاطع مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

جداسازی هلیکوباکترپیلوری: بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بیوپسی معده ۱۰۰ نفر (لام مستقیم) نشان داد که ۷۲ نفر از نظر هلیکوباکتر مثبت بودند. با توجه به تشخیص آندوسکوپی، از ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه ۷۲ نفر مبتلا به گاستریت، ۷ نفر زخم دوازدهه، ۳ نفر دئودنسیت، ۴ نفر زخم دوازدهه و گاستریت توأم، ۵ نفر ازوفاژیت و ۹ نفر نرمال بودند. موارد مثبت از نظر هلیکوباکتر در هر گروه عبارت بودند از: گاستریت ۵۱ نفر (۷۰/۱۸٪)، زخم دوازدهه ۷ نفر (۱۰۰٪)، دئودنیست ۲ نفر (۶۶/۶٪)، زخم دوازدهه و گاستریت توأم ۴ نفر (۱۰۰٪)، ازوفاژیت ۲ نفر (۴۰٪)، و افراد نرمال ۶ نفر (۶۶/۶٪) (جدول شماره ۱).

نمودار شماره یک نشان دهنده فراوانی آلودگی با هلیکوباکتر در بیماریهای مختلف دستگاه گوارش در مقایسه با کل موارد مثبت و همچنین فراوانی موارد منفی از نظر هلیکوباکتر در بیماریهای مختلف در مقایسه با کل موارد منفی می‌باشد.

از ۷۲ نمونه مثبت از نظر هلیکوباکتر، موفق به کشت ۶۸ ایزوله شدیم (جدول شماره ۱). از این تعداد، ۶۰ ایزوله (۸۹/۷٪) نسبت به مترونیدازول حساس و ۷ ایزوله (۱۰/۳) مقاوم بودند (جدول شماره ۲). تمام ایزوله‌ها نسبت به آموکسی سیلین، سفتی زوکسیم و تتراسیکلین حساس بودند.

نتایج مربوط به جداسازی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا: از ۳۷ ایزوله سودوموناس تنها ۲ ایزوله قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری بودند و چون توانائی یکی از آنها در مهار رشد هلیکوباکتر بیشتر بود سایر آزمایشات بوسیله آن ایزوله انجام گرفت. چون یافتن سودوموناس مولد ماده بازدارنده به طول انجامید و در این مدت تعدادی از ایزوله‌های هلیکوباکتر زنده نماندند، لذا اثر ماده بازدارنده بر روی ۳۱ ایزوله هلیکوباکتر مشتمل بر ۲۷ ایزوله حساس و ۴ ایزوله مقاوم به مترونیدازول انجام گرفت.

قطر هاله عدم رشد هلیکوباکترپیلوری متأثر از ماده بازدارنده ۱۴ میلی‌متر بود و این ماده بدون هیچ تفاوتی ایزوله‌های حساس و مقاوم به مترونیدازول را از بین می‌برد. ماده بازدارنده در رقت‌های ۱/۲ و ۱/۴ نیز قادر به مهار رشد هلیکوباکتر بود. حرارت ۴oc به مدت ۳۰ روز تأثیری بر فعالیت ماده بازدارنده نداشت در حالیکه حرارت ۶۰oc به مدت ۳۰ دقیقه و ۸۰oc و ۱۰۰oc به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه موجب غیرفعال شدن ماده بازدارنده می‌شد. انجماد و ذوب متوالی و همین‌طور تیمار کردن ماده بازدارنده با آنزیم تریپسین موجب غیرفعالی شدن کامل آن می‌گردید.

ضمناً ماده بازدارنده قادر به مهار رشد سویه‌هائی از باکتریهای دیگر مانند اشریشیاکلی، کلبسیلا، شیگلا، سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس، و باسیل گرم مثبت نیز می‌شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: فراوانی نسبی موارد مثبت هلیکوباکترپیلوری تشخیص داده شده بوسیله بررسی میکروسکوپی، کشت و تست اوره‌آز و ارتباط آن با بیماریهای مختلف دستگاه گوارش فوقانی

شماره‌گروه	تشخیص آندوسکوپی	تعدادبیماران	لام مستقیم مثبت		تست اوره مثبت		کشت مثبت	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
گروه یک	انواع گاستریت	۷۲	۵۱	٪۷۰/۸	۴۷	٪۶۵/۲	۴۹	٪۶۸
گروه دو	زخم دوازدهه	۷	۷	٪۱۰۰	۷	٪۱۰۰	۷	٪۱۰۰
گروه سه	دئودنیت	۳	۲	٪۶۶/۶	۲	٪۶۶/۶	۱	٪۳۳/۳
گروه چهار	گاستریت‌وزخم‌دوازدهه	۴	۴	٪۱۰۰	۴	٪۱۰۰	۴	٪۱۰۰
گروه پنج	ازوفاژیت	۵	۲	٪۴۰	۲	٪۴۰	۲	٪۴۰
گروه شش	نرمال	۹	۶	٪۶۶/۶	۵	٪۵۵/۵	۵	٪۵۵/۵
	کل	۱۰۰	۷۲	٪۷۲	۶۷	٪۶۷	۶۸	٪۶۸

جدول ۲: فراوانی نسبی ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری حساس و مقاوم به مترونیدازول در دو جنس

جنس / حساسیت به مترونیدازول	مرد	زن	کل نمونه‌ها
حساس	۳۲	۲۹	۶۱
	٪۵۲/۵	٪۴۷/۵	٪۸۹/۷
مقاوم	۴	۳	۷
	٪۵۷/۱	٪۴۲/۹	٪۱۰/۳

نمودار ۱: مقایسه فراوانی آلودگی با هلیکوباکترپیلوری در بیماریهای مختلف دستگاه گوارش

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج مربوط به موارد مثبت هلیکوباکتر پیلوری در بیماریهای مختلف دستگاه گوارش که در این مطالعه بدست آمده با سایر مطالعات همخوانی دارد (۱و۲و۳). ۸۹/۷٪ ایزوله‌های هلیکوباکتر جدا شده در این مطالعه نسبت به مترونیدازول حساس و ۱۰/۳٪ مقاوم بودند (جدول شماره ۲). شیوع مقاومت به مترونیدازول در کشورهای مختلف و جمعیت‌های مختلف متفاوت می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه با مطالعه M-Lopez از اسپانیا(۷) و Glupezynski (۴) مطابقت دارد. در مطالعه اول ۲۵-۱۰٪ ایزوله‌ها نسبت به مترونیدازول مقاوم بودند. در مطالعه دوم ۷٪ سویه‌های هلیکوباکتر جدا شده از مادرید و ۴۹٪ ایزوله‌های جدا شده از آتن نسبت به مترونیدازول مقاوم بودند.

در رابطه با ممانعت از رشد هلیکوباکترپیلوری توسط باکتریهای دیگر دو مطالعه انجام شده است (۸و۵). در مطالعه اول رشد هلیکوباکتر توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت In vitro مهار شده است و محققین حدس می‌زنند که ماده بازدارنده اسیدلاکتیک باشد. در مطالعه دوم مهار رشد هلیکوباکتر توسط سودوموناس آئروژینوزا بررسی شده است. در این مطالعه از ۱۰ سویه سودوموناس ۵ سویه قادر به مهار رشد هلیکوباکتر بوده‌اند و با استفاده از روش HPLC نشان داده شده است که خاصیت مهاری ماده بازدارنده مربوط به ماده‌ای است به نام ۴-هیدروکسی -۲-الکیل کینولین. ترکیب مذکور همانند ماده مورد مطالعه ما قادر به مهار هر دو گروه ایزوله‌های حساس و مقاوم به مترونیدازول بوده است.

برای ارزیابی ماده بازدارنده تأثر برودت، حرارت و آنزیم تریپسین بر روی آن بررسی شد و همان گونه که ذکر گردید نگهداری در ۴oc به مدت ۳۰ روز تأثیری بر فعالیت ماده بازدارنده نداشت.

در تحقیقی مشابه نشان داده شده است که ماده بازدارنده رشد استافیلوکوکهای مقاوم به متی‌سیلین تولید شده توسط سودوموناس، در ۴oc درجه به مدت ۳۰ روز همچنان فعال فعال باقی می‌ماند (۶). کاهش فعالیت در ۶۰oc (۱۵ دقیقه) و غیرفعال شدن آن در ۶۰oc (۳۰ دقیقه)، ۸۰oc و ۱۰۰oc (۱۵و۳۰ دقیقه) نشان دهنده این مطلب است که ماده بدست آمده در مطالعه ما نمی‌تواند کینولین بدست آمده در مطالعه S.Lacey(۵) باشد چراکه کینولین‌ها نقطه جوشی معادل ۲۳۷/۷ درجه دارند و توسط حرارتهای مورد آزمایش ما غیرفعال نمی‌شوند. غیرفعال شدن ماده بازدارنده توسط آنزیم تریپسین نیز مؤید این مطلب است. با توجه به نتایج بدست آمده احتمالاً ماده بازدارنده در مطالعه حاضر یک پروتئین است و می‌تواند در گروه باکتریوسین‌ها طبقه‌بندی گردد.

براساس نتایج بدست آمده از این مطالعه، می‌توان انتظار داشت که با تخلیص و شناسائی دقیق ماده بازدارنده فوق و همچنین بررسی تأثیر آن بر روی عفونتهای ناشی از هلیکوباکترپیلوری در حیوانات آزمایشگاهی و اطمینان کامل از عدم ایجاد شرایط مخاطره‌آمیز، اطلاعات بیشتری در ارتباط باکاربرد آن در درمان عفونتهای ناشی از هلیکوباکتر در انسان بدست خواهد آمد.

سپاسگزاری: بدین وسیله از مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری اصفهان که در تصویب بودجه این طرح ما را یاری کرد تشکر و قدردانی می‌گردد.

مراجع

1- Blaser, MJ. Helicobacter pylori and related organisms, In: Mandell GL, Doncylas RG, and Benett JE. Priinciple and practice of infectious diseases: From Churohill Levingston Inc. New York, USA, 1995: 1956-63.

2- McColl Kel. Helicobacter pylori: Clinical aspects. J. of Infection, 1997;34:7-13.

۳- حاذقی کامبیز، فاضلی علی و علیمحمدی حسین. جداسازی و تشخیص هلیکوباکتر پیلوری از نمونه‌های بیوپسی در بیماران مبتلا به ضایعات دستگاه گوارش فوقانی در اصفهان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۱۳۷۵، ۴۴، ص ۳۲-۲۵.

4- Glupezynski Y. Infection with Helicobacter. In: Collier L, Balows A, and Sussman M.Microbiology and Microbial Infection, 4th ed. vol. 3: From Amold London, UK. 1998: 581-91.

5- Lacey SL, Mehmet S, and Tanlor GW. Inhibition of Helicobacter pylori growth by 4-hydroxy-2-alkyl auinolones produced by pseudomonas aeroginosa. J. of antimicrobial chemotherapy: 1995;36:827-31

۶- فاضلی علی و پورحسین معراج. بررسی تأثیر بازدارندگی سودوموناس آئروجینوزای ایزوله شده از حفره دهانی بر روی استافیلوکوکهای مقاوم به ملی سیلین، مجله دانشکده پزشکی اصفهان. ۱۳۷۵، ۴۴ ص ۲۹-۲۲.

7- Lopez-Brea M, Martinez MJ, Domingo D, and Sanchez J. Evaluation of the resistance to several antibiotics in H. pylori over a 4 year period. Gut, 1996;38:675-78.

8- Bhatia SJ, Kocher N, Abraham P, and Nair NG. Lactobacillus acidophilus inhibition growth of Campylobacter pylori In vitro. J. Clinical Microbiology, 1989;27(10):2328 2330.

www.SID.ir