

Disk diffüzyon yöntemi ile helicobacter pylori klinik izolatlarında amoksisiline ve klaritromisine karşı primer duyarlılığın araştırılması ve tedavi sonrası muhtemel duyarlılık değişikliğinin incelenmesi

Determination of primary resistance of Helicobacter pylori isolates to clarithromycin and amoxicillin by disc diffusion method and the comparison with resistance in recurrent cases

Dr. Murat PALABIYIKOĞLU¹, Dr. Fikret ŞAHİN², Dr. Ali ÖZDEN¹, Dr. Özden UZUNALIMOĞLU¹

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji¹ Bilim Dalı ve Mikrobiyoloji² Anabilim Dalı

ÖZET: Çalışmamızın amacı, gastrointestinal yakınmaları olan farklı iki hasta grubunda, *Helicobacter pylori* (*Hp*)'nin klaritromisin ve amoksisiline karşı primer (tedavi öncesi) ve tedavi sonrası nüks gösteren olgularda sekonder dirençliliğini araştırmaktı. Birinci grupta, 26 kadın 35 erkek toplam 61 hasta, klaritromisin içeren kombinasyonla (Omeprazol 2 x 20 mg + klaritromisin 3 x 500 mg) iki hafta süre ile tedavi edildi. Tedavi öncesi ve tedaviden sonraki izlemelerinde *H. pylori*'nin klaritromisine karşı dirençliliği araştırıldı. İkinci hasta grubundaki 32 kadın 19 erkek toplam 51 hastada amoksisilin içeren (omeprazol 2 x 20 mg. + amoksisilin 2 x 1 gr) kombinasyonla tedavi öncesi ve tedavi sonrası takiplerinde *H. pylori*'lerin amoksisilinle karşı dirençlilikleri araştırıldı. Her iki nüks grubunda muhtemel dirençliliği anlamak için disk diffüzyon yöntemi kullanıldı. Mide biopsi örneklerinden standart yöntemlerle üretilen mikroorganizmaların *H. pylori* tanısı konduktan sonra klaritromisin (clarithromycin, 31678 BBL, Becton Dickinson System Microbiology, USA) ve amoksisilin (amoxicillin 25 OXOID, Lot ch-B37101, Unipath Limited, England) diskleri kullanılarak duyarlılıklarları araştırıldı. Yapılan testlerde 15 mm ve üstündeki zon çapları duyarlı, 11 mm. ve altı dirençli olarak kabul edildi. Klaritromisin grubundaki 61 olgunun tedavi öncesi yapılan disk diffüzyon testinde dirençlilik (primer dirençlilik) gözükmezken, tedavi sonrası yapılan disk diffüzyon testinde 2 (%3.2) izolat dirençli olarak (sekonder dirençlilik) belirlendi. Amoksisilin grubundaki yapılan tedavi öncesi ve tedavi sonrası testlerde ise dirençlilik gözlenmedi. Araştırma sonuçlarımız, literatürle uyum içindedir. *H. pylori* tedavisinde önemli bir problem olan dirençliliğe karşı, her iki ilacı da içeren kombinasyonların kullanımının etkin ve güvenli bir tedavi sağlayacağını düşünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Klaritromisin, amoksisilin, *Helicobacter pylori*

SUMMARY: In this study, which was held in relation with the former one, the aim was to ascertain the primary resistance of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) isolates to clarithromycin and amoxicillin as well as to compare it with resistance in recurrent cases after combination therapies. Gastroduodenoscopy was performed in 61 patient (35 men; 26 women) with different dyspeptic complaints and antral biopsies were obtained and cultured for *H. pylori*. Primary resistance was evaluated by disc diffusion method and zone radius of 15 mm or greater was accepted as susceptible whereas 11 mm or lesser measures were accepted as resistant. This group was treated with omeprazole (2x20 mg/day) + clarithromycin (3x500 mg/day) for 2 weeks and then recurrent cases were re-evaluated for secondary resistance recording. Second group of 51 patients (32 men; 19 women) were investigated by the same method for omeprazole (2x20 mg/day) + amoxicillin (2x1 gr/day) recording the differences in susceptibility. As no primary resistance was seen in clarithromycin group, two isolates (3.2 %) were found resistant after treatment (secondary resistance). On the other hand, neither primary nor secondary resistance was recorded for amoxicillin. In conclusion, we think that administration of both drugs in combination will fulfill an effective and safe treatment of *H. pylori* of which resistance emerges as an important clinical problem

Key Words: Clarithromycin, amoxicillin, *Helicobacter pylori*

1980'li yıllarda Avustralya'da gastrik antrumdan üretilen *Campylobacter* benzeri organizma, aktif kronik gastrit etkeni olduğunun, peptik ülser ve gastrik kanser ile ilişkisi bulunduğu ortaya çıkışmasından sonra tüm dünyada mikrobiolog, gastroenterolog ve patologların ilgi alanı haline gelmiştir (1).

Katalaz, oksidaz ve yoğun üreaz pozitifliği ve karakteristik şekli ile basit olarak tanısı konulabilen organizmanın mikrobiyolojik yapısı ve patojenite kriterleri üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır (2).

Tablo 1. Klaritromisin için yapılan tedavi öncesi ve tedavi sonrası disk diffüzyon test sonuçları

	<i>Tedavi öncesi % (Primer dirençlilik)</i>	<i>Tedavi sonrası % (Sekonder Dirençlilik)</i>
Erkek	35	0
Kadın	26	2
Toplam	61	2(%3.2)

Bakteri, daha sonra yapılan taksonomi çalışmalarında *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) olarak adlandırılmıştır. Bakterinin transmisyonundaki soru işaretleri devam ederken, bakteri ile ilgili en önemli konulardan biri bakterinin eradikasyonunu olmuştur.

Özellikle çeşitli antibiotiklerle yapılan eradikasyon çalışmalarından sonra nükslerin ortaya çıkışısı, bu konuyu daha önemli hale getirmiştir. Bu amaçla klinik eradikasyon çalışmaları devam ederken, 1984 yılında Marshall ve arkadaşları tarafından ilk olarak mikroorganizmanın rutinde kullanılan antibiotiklere karşı duyarlılıklarını belirttilmiş, daha sonra 1986'da Goodwin ve arkadaşları çeşitli antibiotiklerin bakteriye karşı MIC ve MBC değerlerini belirlemiştir (1). İnvitro olarak bir çok antibiotığın bakteriye karşı etkili bulunmasına karşın, gastrik mukozaya penetrasyonun zor olması ve ortam pH'sının düşük olması, antimikrobiyal ilaçların klinik etkilerini sınırlamakta ve bakterinin yavaş üreyen bir mikroorganizma oluşu, tedavideki antibiotikleri daha da seçici kılmaktadır. Tek başına antibiotiklerin etkilerinin tam olmaması ve tek kullanıldığılarında direnç gelişiminin sıklığı, tedavide kombinasyonların gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır (3). Bu çalışmamızda amaç, daha önce amoksisinin ve klaritromisine karşı disk diffüzyon yöntemi ile yaptığımız duyarlılık çalışmasının sonucunu irdelerken, diğer taraftan tedavi sonrası yapılan duyarlılık çalışması ile sekonder direncin oluşup olmadığını incelemek idi.

GEREC VE YÖNTEM

22 kadın, 32 erkek toplam 61 değişik gastrointestinal yakınmalı hastanın mide antrum biopsileri sonrası histolojik preparatlarındaki mikroskopik görünüm, katalaz, oksidaz ve üreaz'ın pozitifliği ile *H.pylori* tanısı konulmuş, daha sonra invitro ortam olarak %5-10 at kanı ve vancomisin, trimethoprim ile amphotericin katkılı BHI besiyerleri mikroaerofilik ortamlarda tutularak 3,5 ve 7. günler içerisinde yapılan kontrollerde *H.pylorinin* ürettiği belirlenmiş, mikroskopik ve enzimatik reaksi-

Tablo 2. Amoksisin için yapılan tedavi öncesi ve tedavi sonrası disk diffüzyon test sonuçları

	<i>Tedavi öncesi % (Primer dirençlilik)</i>	<i>Tedavi sonrası % (Sekonder Dirençlilik)</i>
Erkek	32	0
Kadın	19	0
Toplam	51	0

yonlar ile doğrulanmıştır. İzole edilen bu *H. pylori*'ler nutrient broth içerisinde 109 CFU (coloni forming unit) şeklinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan, antibiotik ilavesi olmaksızın hazırlanan besiyerine 106 CFU bakteri ilave edilmiş, eküvyon ile plak üzerine yayılmış ve üzerlerinde klaritromisin diski (31678BBL, Becton Dickinson System Microbiology, USA) yerleştirilmiş ve mikroaerofilik ortamda tutularak *H. pylori*'nin üremesi ve oluşan disk diffüzyon çapları incelenmiştir (13). Bu hasta grubu 2 hafta süreyle klaritromisin içeren kombinasyon (omeprazol 2 x 20 mg + klaritromisin 3 x 500 mg) ile tedavi edilmiş ve tedavi sonrası izlemelerinde 4-8. haftalar arasında aynı yöntemlerle alınan biopsi sonrası elde edilen nüks *H. pylori*lerde klaritromisine karşı duyarlılık araştırılmış ve diffüzyon çapları belirtilmiştir.

32'si kadın 19'u erkek, gastrointestinal yakınmaları olan bir diğer grup hastada yukarıdaki yöntemle *H. pylori* belirlenmiş ve amoksisinle karşı duyarlılıklar disk diffüzyon (amoxicillin 25.00ID. Lot ch-B7101, Unipath Limited, England) yöntemi ile saptanmış, daha sonra amoksisin bulunan tedavi kombinasyonu (omeprazol 2 x 20 mg + amoksisin 2 x 1 gr-2 hafta) ile ortaya çıkan nüksler sonunda üreyen *H. pylori*lerde tedaviden sonraki 4-8. haftalar arasında amoksisin diskile tekrar duyarlılık araştırılmıştır.

SONUÇLAR

Klaritromisin diski ile yapılan disk diffüzyon çalışmasında 15 mm ve daha üzerindeki çaplar duyarlı olarak kabul edildiğinde toplam 61 hastada primer bir direnç görülmemesine karşın, tablo 1'de de görüldüğü gibi tedavi sonrası nükslerde yapılan diffüzyon testinde 2 vakada sekonder direnç ortaya çıkmıştır.

Amoksisin için yapılan duyarlılık çalışmasında ise, duyarlı diffüzyon çapı 15 mm ve üzeri kabul edildiğinde tablo 2'de görüldüğü gibi tedavi öncesi ve sonrası (primer ve sekonder) bir direnç ortaya çıkmamıştır.

TARTIŞMA

Günümüzde *H. pylori* enfeksiyonu kronik atrofik gastritin en önemli etkeni olarak kabul edilmektedir. Duodenal ülserde (DÜ) ise peptik aktivite, NSAİİ gibi bilinen önemli etyopatogenetik etkenler arasında ön sıradan sayılmaktadır. Bu enfeksiyonun ortadan kaldırılması ile kronik atrofik gastritte klinik ve histopatolojik iyileşme gözlenmekte, DÜ'lilerde ise iyileşme süresi kısalmaktadır ve nüks oranı azalmaktadır. *H. pylori* tedavisinden sonra bakteri gerçekten eradike edilmişse nüks riski senelerce çok az olmaktadır. Ancak, sadece bakterinin supresyonu sağlanmışsa, nüksler kaçınılmazdır. Bunun için *H. pylori* tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlar proton pompa inhibitörleri (asit inhibisyonu yaparak kombinasyonu yaparak ajanın anasit ortamda stabilitesini artırır) yanısıra bizmut tuzları ve antibiyotiklerdir.

H. pylori invitro ortamda birçok antibakteriyel ajana yüksek oranlarda duyarlı bulunurken, invivo yanıt beklentiği kadar iyi değildir. Ancak burada *H. pylori*'nın zor ve geç üremesi, gereksindiği özel atmosfer koşulları ve hala standardize edilmiş bir duyarlılık testinin bulunmaması gibi sorunlar nedeniyle, disk diffüzyon yönteminde ölçülen inhibisyon zon çaplarıyla *H. pylori*'nın duyarlı veya dirençli olduğunu net olarak söylemenin her zaman mümkün olmadığı vurgulanmalıdır. Nitekim, sonuçların önceki çalışmamızdaki oranlardan oldukça farklı çıkışının (klaritromisin için %14) bu problemle ilişkili olduğunu düşünmektedir (7). Invitro-invivo ortamlardaki farklı sonuçlar ayrıca; antibiyotiklerin mukozada yeterli yoğunlukta toplanmaları, mukusun lümen ve epitel tarafındanki pH farklılıklarını, bakterinin mukusun derin tabakalarına yerleşerek sessiz kalması ve supresyon kalkınca relapsa yol açması, oluşturduğu katalaz enzimi ile fagositozdan kurtulması, *H. pylori*'nın fizik ve kimyasal streslere morfoloji, metabolizma, üreme özelliklerini değiştirmek suretiyle kokkoid forma dönüşerek yanıt vermesi (böylece yaşamsal özelliklerinin sürdüğü, ama standart laboratuvar yöntemleriyle kültürde üretilemediği bir metabolik faz geçmesi) ve sekonder direnç gelişimi gibi konağa ve mikroorganizmaya ait faktörlerle açıklanmaya çalışılmaktadır (4,5). Nitekim metronidazol, yüksek oranda direnç gelişimi (*H. pylori* epi-

miyolojik dağılımı ile metronidazol direnci arasında paralellik mevcut) nedeniyle eski önemini kaybetmiştir (6,7).

Çalışmamızda *H. pylori* eradikasyonunda hala yerini koruyan amoksisilin ve klaritromisine primer ve sekonder direnci araştırdık. Amoksisiline primer ve sekonder direnç bulunmayı literatürle uyumludur (8,14). Ancak tek başına kullanıldığından %20'lerde kalan eradikasyon oranının kombinasyonlarla yükselmesi, yukarıda sayılan faktörlerle açıklanabilir. Ayrıca *H. pylori*'nın mukozal hücrelere yapıştıktan sonra glikoprotein yapısında bir salgıyla kaplandığı ve bu maddenin özellikle amoksisilinin bakteriye ulaşmasını engellediği gösterilmiştir. (5). Yine de primer ve sekonder direncin çok düşük olması, ekonomik oluşu ve önemli yan etkisinin bulunmaması, amoksisilinin kombinasyonlarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

Araştırmamızda yer alan ikinci antibiyotik olan klaritromisin için primer ve sekonder direnç çok düşük bildirilmiştir (sırasıyla %0-4, %6-13). Bizim sırasıyla %0 ve %3.2 olarak bulduğumuz primer ve sekonder direnç oranları bu sonuçlarla uyumludur. Klaritromisin; mide asidine dayanıklılığı, yarı ömrünün uzun oluşu, gastrik mukozada yüksek konsantrasyonda bulunması, metabolitlerinin de *H. pylori*'ye etkili olması, tek kullanıldığından bile %40-60 eradikasyon sağlama, ağızda tat bozukluğu dışında önemli bir yan etkisinin bulunmayı gibi özellikleriyle bugün *H. pylori* tedavisindeki temel taşlardan biri olarak kabul edilmektedir. Ancak gelişebilecek sekonder direnç nedeniyle, ikinci defa kullanılacaksa duyarlılık testi önerilmektedir (9, 10).

Başarılı bir *H. pylori* tedavisinden sonra bile ilk yılda nüks oranı %0-46.2 arasında bildirilmiştir. Yukarıda tartışılan bilgiler nüks reinfeksiyon dan ziyade rekurrensin yol açtığını düşündürmektedir. Ancak *H. pylori*'nın epidemiyolojisini ülkemizde batı memleketlerinden oldukça farklı olduğu ve az gelişmiş toplumlarda kadınlarla çocukların nüksün daha erken ve daha yüksek oranda gerçekleştiği dikkate alınırsa, ülkemizde reinfeksiyon (yeniden bulaşımın) en azından nükslerin bir kısmından sorumlu olması ihtimal dahilindedir.

KAYNAKLAR

1. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbial aspect of *H.pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; Jan.
2. James D Dici: *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. Annu Rev Microbiol, 1990.
3. Neri M, Susi D, Bovani I. Omeprazole, bismuth, clarithromycin: A new approach to the treatment of *H.pylori* related gastritis. Gastroenterology 1992; 102: A-134.
4. European Helicobacter pylori study group. Gut 1995;1 (Supp):37.
5. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol Infect 1993; 111:483-490.
6. Glupezynski Y (responsible article): Result of Multicentre European Survey in 1991 of metranidazole resistance in *Helicobacter pylori*; Eur J Clin Infect Dis September 1992.
7. Şahin F, Özden A, İner E, ve ark: Agar dilüsyon yöntemi ile *Helicobacter pylori* için metranidazol dirençlilik testi ve disk diffüzyon yöntemi ile amoksilin ve klaritromisinin *H.pylori*'ye etkisi. Gastroenteroloji. 1994; 5:203-206.
8. Megraud F, Trimoulet P, Lamouliatte H, Boyanova L. Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori*. Antimicrobiol AgentChemother 1991;
9. Malonoski GJ, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Moellering RC. Effect of pH variation on the susceptibility of *Helicobacter pylori* to three macrolide antimicrobial agents and tmafloxacin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993; 12:131-133.
10. Logan RPH: Eradication of Hp with clarithromycin and omeprazole. Gut 1994; 35:323-326.
11. Özden A, Dumlu Ş, Özkan H, et al. Transmission of *Helicobacter pylori*. Gastroenteroloji 1994; 5:411-413.
12. Coelho LG, Passos MC, Chausson Y, et al. Duodenal ulcer and eradication of *Helicobacter pylori* in a developing country. An 18-month-follow-up study. Scand J Gastroenterol 1992; 27:362-366.
13. Olson C, Craft JC, Siepmann N, Edmonds A. Clarithromycin resistance in US and European patients treated with clarithromycin and omeprazole for duodenal ulcer disease associated with *H.pylori* infection. 4th United European Gastroenterology Week. Berlin, Germany, September 1995.
14. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and related species. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R: (eds). Principles and practice of Infectious Diseases. 4th edition New York, Churchill Livingstone. 1995; p. 1956-1964.