تحقیقی

دارای رتبه علمی - پژوهشی از کمیسیون
نشریات علوم پزشکی کشور

بررسی توافق 3 روش میکروسکوپی ، تست اوره و کشت در تشخیص هلیکوباکترپیلوری در اولسر های پپتیک

محمد مهدی سلطان دلال
استادگروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

عباس رحیمی فروشانی
دانشیارگروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

روناک بختیاری
کارشناس ارشد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: محمد مهدی سلطان دلال

تلفن : 021-88992971

پست الکترونیک:
soltanirad34@yahoo.com

آدرس : تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب شناسی

وصول مقاله: 90/10/2
اصلاح نهایی: 91/1/23
پذیرش مقاله:91/2/4

چکیده

زمینه و هدف *: هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی، مارپیچ با فلاژل های قطبی که اولین بار توسط Warren and Marshall در 1983 کشف گردید. هلیکوباکترپیلوری در مخاط معده کمتر از 20 % افراد کمتر از 30 سال وجود دارد اما میزان شیوع این ارگانیسم در افراد 60 ساله به 40 تا 60 % افزایش می‌یابد. هدف از این تحقیق مقایسه 3 روش کشت، رنگ آمیزی لام مستقیم و تست اوره جهت تسریع در شناسایی باکتری به هنگام زخم معده و یا اثنی عشر می باشد.*

روش بررسی: *این یک مطالعه توصیفی است که از تعداد 82 نفر مراجعه کننده به چهار بیمارستان از هر بیمار دو نمونه بیوپسی تهیه شد. در اتاق آندوسکوپی با انجام تست سریع اوره آز بر روی یکی از دو نمونه به وجود یا عدم وجود هلیکوباکترپیلوری پی برده، نمونه دوم پس از تهیه سه گسترش با رنگ آمیزی فوشین، گیمسا و گرم به مشاهده هلیکوباکترپیلوری در نسج پرداخته و سپس روی محیط‌های کشت اختصاصی تلقیح و در شرایط میکروآئروفیلیک به مدت (6-4) روز نگهداری شد.*

یافته‌ها*: از مجموع 82 نمونه بیوپسی مورد مطالعه، 70 نمونه (85/4%) اوره آز مثبت ، 66 نمونه (80/5%) کشت هلیکوباکترپیلوری مثبت بود. فراوانی موارد اسمیر مثبت در رنگ آمیزی های فوشین ، گیمسا و گرم به ترتیب 67 (81/7%)، 66 (80/5%) و 61 نمونه (74/4%) برآورد گردید، براین اساس رنگ آمیزی فوشین با حساسیت 100 درصد بهترین روش می باشد.*

نتیجه گیری*: باتوجه به آزمون اختلاف نسبت در رنگ آمیزی فوشین، گیمسا ، گرم ، اوره با کشت میکروبی اختلاف معنی داری وجود ندارد و تمامی این روش ها می توانند برای تشخیص به کار روند ولی روش رنگ آمیزی فوشین به علت حساسیت بالا و ارزان بودن پیشنهاد می گردد*

واژه های کلیدی *: هلیکوباکتر پیلوری، روش میکروسکوپی، تست اوره آز،کشت*

آدرس مقاله:
سلطان دلال م م، رحیمی فروشانی ع، بختیاری ر" بررسی توافق 3 روش میکروسکوپی ، تست اوره و کشت در تشخیص هلیکوباکترپیلوری در اولسر های پپتیک ". مجله علوم آزمایشگاهی بهار و تابستان ، 1391دوره ششم(شماره1) :18-13

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی S مانند (مارپیچ) است که جدار خارجی صاف و نازک قطبی چند لایه دارد. این میکروب تحت شرایط میکروآئروفیلیک در 37 درجه سانتی-گراد در آگار شکلاتی مرطوب رشد می‌کند و طی 4-3 روز کلونی‌های کوچک (یک میلی‌متری) شفاف تولید می‌کند(1). هلیکوباکترپیلوری مقدار قابل توجهی اورآز تولید می‌کند، که در توسعه زخم‌های پپتیک نقش دارد(2). بسیاری از محققین اعتقاد دارند که عفونت ناشی از هلیکوباکترپیلوری بعنوان یک فاکتور اتیولوژیک مهم در گسترش التهاب دستگاه گوارش می-باشد(3،4). هلیکوباکترپیلوری یک باکتری حساس به اسید بوده و در pH بین 8-6/9 قادر به تکثیر می‌باشد اما چطور خود را با شرایط اسیدی معده سازش می‌دهد کاملاً مشخص نیست، شاید در مخاط معده بتواند خود را از دسترس اسید محفوظ نگه دارد. این باکتری دارای فعالیت اوره آزی شدیدی بوده و به نظر می-رسد این توانایی یکی از مهم ترین فاکتورهای بقاء باکتری بوده و با تولید هاله‌ای از آمونیاک در اطراف باکتری آن را از اثر اسید معده محافظت می‌نماید (6،5). آدنوکارسینومای معدی جزء شایع ترین بدخیمی‌ها در سراسر جهان است. رژیم غذایی، آلودگی با هلیکوباکترپیلوری و فاکتورهای ژنتیکی را درگیر می‌دانند. هلیکوباکترپیلوری در مخاط معده کمتر از 20 % افراد کمتر از 30 سال وجود دارد اما میزان شیوع این ارگانیسم در افراد 60 ساله (از جمله افراد فاقد علامت) به 40 تا 60 % افزایش می‌یابد. در کشورهای در حال توسعه، میزان شیوع این عفونت در بزرگسالان ممکن است 80 % یا بیشتر باشد(10- 7) .

در جامعه‌ای که ما در آن زندگی می‌کنیم، همانند سایر کشورهای دنیا بیماران مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی ناشی از عفونت با هلیکوباکترپیلوری رنج می‌برند، این بیماران اغلب به پزشک مراجعه نموده و در اتاق آندوسکوپی به علت زمان طولانی انکوباسیون هلیکوباکترپیلوری از کشت میکروبی استفاده نکرده و اغلب از تست اوره آز سریع استفاده می‌شود. این تست در مدت یک دقیقه تا یک ساعت می‌تواند در تشخیص سریع باکتری کمک موثری نماید. تشخیص باکتری با روش های مختلفی از جمله رادیوگرافی با باریم و آندوسکوپی و روش های مولکولی... وجود دارد(13-11) .هدف ما در این تحقیق مقایسه 3 روش کشت، رنگ آمیزی لام مستقیم و تست اوره جهت تسریع در شناسایی باکتری به هنگام زخم معده و یا اثنی عشر می باشد.

روش بررسی

82 نمونه از بیماران مشکوک به زخم معده و یا اثنی عشر مراجعه کننده به بیمارستان‌های امام خمینی، مهر، آبان، سینا و از هر بیمار دو نمونه بیوپسی تهیه می شود. نمونه اول برای تست سریع اوره و نمونه دوم را پس از انتقال به محیط ترانسپورت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت انتقال داده و پس از طی مراحل آماده سازی و به منظور جستجوی باکتری در نسج سه گسترش از هر نمونه تهیه کرده و با رنگ آمیزی فوشین، گیمسا و گرم به مشاهده هلیکوباکترپیلوری در نسج می پردازیم. از نمونه دوم هلیکوباکترپیلوری را روی محیط‌های کشت اختصاصی در شرایط میکروآئروفیلیک به مدت (6-4) روز در اتو 37 درجه سانتی گراد قرار داده می شود.

کشت نمونه و تهیه گریندراستریل: با فرو بردن دسته گریندر به قسمت پایه و چرخانیدن دسته گریندر نسج‌ها را خرد نموده، سپس نسج‌ها را با لوپ استریل از قسمت پایه گریندر درآورده و بر روی محیط انتخابی کمپیلوبلاد آگار خون‌دار قرار داده می‌شود، سپس با پیپت پاستور استریل یا توسط سرنگ استریل 0/5 میلی لیتر از محیط ترانسپورت یا آب مقطر استریل را برداشته و در قسمت پایه گریندر ریخته تا یک سوسپانسیون میکروبی تهیه شود و از سوسپانسیون میکروبی سه گسترش تهیه نموده و پس از خنک شدن و فیکس کردن سه لام با سه روش فوشین، گیمسا و گرم، رنگ آمیزی کرده و زیر میکروسکوپ مشاهده می‌گردد و نتایج بدست آمده ثبت میشود. در محیط کشت لوپ استریل از قسمت پایه گریندر درآورده و بر روی محیط کشت انتخابی کمپیلوباکتر آگار قرارداده ، چندین بار لوپ استریل را در چند قسمت از محیط کشت فشار داده و سپس با لوپ استریل نمونه‌های بیوپسی را به تمام سطح پلیت خوندار تماس داده تا کاملاً آغشته شوند، آنگاه پلیت‌ها را در جار قرار داده و شرائط میکرو آئروفیلیک تامین می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط میکروآئروفیلی و قرار دادن پلیت‌ها در جار:
درجه حرارت مناسب 37-36 درجه سانتی گراد بهترین درجه حرارت است، برای ایجاد شرایط میکروآئروفیلی از جار، گازپک و شمع استفاده می‌شود، پس از گذاشتن اولین پلیت در جار شمع را به سرعت روشن کرده و درون جار قرار داده و در جار را بسته، این کار باید با سرعت انجام گیرد، و هر بار که در جار باز می شود (برای گذاشتن دومین و سومین.... پلیت) شمع را روشن کرده و در جار بسته، تا هنگامی که به آخرین پلیت برسیم شمع را مجدداً روشن کرده و گاز پک (Gas Pack) را درون جار به صورت عمودی قرار داده و به آرامی 6 میلی لیتر آب مقطر استریل روی آن ریخته و به سرعت در جار بسته شود. تمامی پلیت‌ها درون جار به صورت وارونه قرار گرفته و با سوختن شمع قسمتی از اکسیژن موجود در جار مصرف می‌شود و Co_2 لازم به همراه گاز پک فراهم می‌شود.

شرایط و مدت آنکوباسیون:کلنی‌های هلیکوباکترپیلوری در طی مدت 6-4 روز پس از کشت نمونه بیوپسی ظاهر می‌شوند. کلنی‌های مشکوک از نظر شکل میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. چون هلیکوباکترپیلوری میکروآئروفیل است در نتیجه به فشار و اکسیژن موجود در اتاق حساس است، بدین ترتیب پلیت‌های واجد کلنی هلیکوباکترپیلوری را فقط در هنگامی که برای انجام تست احتیاج است از جار درآورده و پس از استفاده سریعاً به جار منتقل می گردند.

پس از ظاهر شدن کلنی‌های هلیکوباکترپیلوری در سطح محیط انتخابی کمپیلوباکتر بلادآگار، جهت رنگ آمیزی با 3 روش فوشین،گیمسا، گرم و تست های کاتالاز، اکسیداز و اوره استفاده گردید.

یافته ها

تعداد 82 نمونه بیوپسی معده وزخم اثنی عشر از چهار بیمارستان امام خمینی، مهر، آبان، سینا تهیه و کشت داده شد که تعداد 70 نمونه اوره آز مثبت و تعداد 12 نمونه اوره آز منفی بدست آمد، 85% نمونه های معده و 86% نمونه های اثنی عشر اوره از مثبت بودند. نتایج بدست آمده در جدول 1 و2منعکس گردیده است.

جدول 1- توزیع فراوانی مطلق و نسبی اوره آز نمونه‌های جمع آوری شده از 4 بیمارستان

محل جمع آوری نمونه	اوره آز مثبت	درصد	اوره آز منفی	درصد	تعداد کلی نمونه‌ها
بیمارستان امام خمینی	11	84	2	16	13
بیمارستان مهر	39	79	10	21	49
بیمارستان آبان	16	100	0	0	16
بیمارستان سینا	4	100	0	0	4
جمع	70	85/4	12	14/6	82

جدول 2- توزیع فراوانی مطلق و نسبی زخم معده و اثنی عشر نسبت به تست اوره آز

جایگاه زخم	اوره آز مثبت		اوره آز منفی		تعداد کل
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
معده	45	85	8	15/1	53
اثنی عشر	25	86	4	13/8	29
جمع	70	85/4	12	14/6	82

Archive of SID

www.SID.ir

برای مقایسه بین سه رنگ آمیزی فوشین، گرم، گیمسا و تست اوره از با روش کشت از تعیین حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) استفاده نمودیم، نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که رنگ آمیزی فوشین بالاترین حساسیت را داشته (100 %) و در مراحل بعدی تشخیص به ترتیب تست اوره، رنگ آمیزی گیمسا و رنگ آمیزی گرم قرار گرفته-اند(جدول3).

جدول 3- بررسی مقایسه‌ای کشت با رنگ آمیزی های فوشین، گیمسا و گرم و تست اوره از

رنگ آمیزی و تست اوره آز کشت	فوشین		گیمسا		گرم		تست اوره آز		جمع
	+	-	+	-	+	-	+	-	
+	66	0	62	4	59	7	64	2	66
-	1	15	4	12	2	14	6	10	16
جمع	67	15	66	16	61	21	70	12	82

حساسیت، اختصاصیت ، ارزش پیشگوئی مثبت و منفی روش رنگ آمیزی فوشین نسبت به کشت به ترتیب 100%،94%، 98,5% و 100% بود. این مقادیر برای رنگ آمیزی گیمسا به ترتیب 94% ، 75%، 94% و 67% اما برای رنگ آمیزی گرم 89%، 87%، 97% و 67% برآورد گردید. حساسیت روش اوره آز به نسبت کشت 97% تعیین گردید(جدول4). باتوجه به آزمون اختلاف نسبت در رنگ¬آمیزی فوشین، گیمسا، گرم و اوره با کشت میکروبی اختلاف معنی¬داری وجود ندارد.

جدول 4- بررسی آنالیز آماری روش‌های تشخیصی در مقایسه با کشت میکروبی

تست آماری	حساسیت(%)	اختصاصیت(%)	ارزش پیشگوئی(%)	
تست تشخیصی			**منفی**	**مثبت**
رنگ آمیزی فوشین	100	94	100	99
رنگ آمیزی گیمسا	94	75	75	94
رنگ آمیزی گرم	89	87	67	97
تست اوره	97	62	83	91

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در جامعه‌ای که ما در آن زندگی می‌کنیم، همانند سایر کشورهای دنیا بیماران مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی ناشی از عفونت با هلیکوباکترپیلوری رنج می‌برند، این بیماران اغلب به پزشک مراجعه نموده و در اتاق آندوسکوپی به علت زمان طولانی انکوباسیون هلیکوباکترپیلوری از کشت میکروبی استفاده نکرده و اغلب از تست اوره آز سریع استفاده می‌شود(5،11،12). مجموعه ای از روش های تهاجمی و غیرتهاجمی برای بررسی وجود هلیکوباکترپیلوری وجود دارد .از بین این روش ها، تست تنفسی اوره روشی است که از حساسیت و ویژگی قابل قبولی برخوردار است .مولفین اسپانیایی در مطالعه خود برای مقایسه روش های متفاوت تشخیصی برای هلیکوباکتر پیلوری به این نتیجه رسیدند که تست تنفسی اوره حساسیت 75 درصد وویژگی 60 درصد دارد، اما با تغییر در حد آ ستانه تشخیصی حساسیت و ویژگی به 90 درصد میرسد (14).

Salah و همکاران در سال 1989، 49 نمونه بیوپسی را مورد مطالعه قرار دادند که حساسیت اوره آز برابر با 62 درصد و ویژگی 93 درصد بود (15). Wang و همکاران نیز در سال 1990 به تعداد 121 نمونه بیوپسی را مورد آزمایش قرار دادند که حساسیت اوره آز برابر با 95 درصد و ویژگی 96 درصد بود (16).

یافته های ما طی 82 نمونه بیوپسی حساسیت و ویژگی اوره آز به ترتیب برابر با 97 و 62 درصد بود. این نتایج با Wang و Salah نزدیک است و تست اوره آز را می‌توان به عنوان یک تست خوب در اتاق آندوسکوپی و تشخیص سریع باکتری موثر باشد. چرا که تست اوره آز با تعداد کمی از باکتری در نمونه بیوپسی می‌تواند مثبت شود (15،16). Wang ، 121 نمونه بیوپسی را با رنگ آمیزی گرم و مشاهده زیر میکروسکوپ پرداخت که حساسیت 95 درصد و ویژگی 100 درصد را بدست آورد که از نتایج ما بالاتر و بیشتر است ولی از آنجائیکه تفاوت آماری معنی داری بین نتایج روش ها وجود ندارد، می‌توان از رنگ‌آمیزی گرم نیز به عنوان یک تست تشخیص موثر استفاده کرد.

Pinkard و همکاران در سال 1985، 70 نمونه بیوپسی را توسط دو نوع آزمایش، رنگ آمیزی گرم و کشت میکروبی مورد بررسی قرار داد از این تعداد 62 درصد با رنگ آمیزی گرم و کشت میکروبی مثبت بود و هلیکوباکترپیلوری را مشاهده کردند (17)، در مطالعه ما نیز طی بررسی 82 نمونه بیوپسی 74/4 درصد نمونه‌ها به هنگام دید مستقیم با رنگ آمیزی گرم مثبت و 80/5 درصد در محیط کشت هلیکوباکتر شناسائی شد.

رنگ آمیزی فوشین با حساسیت 100 درصد و ویژگی 94 درصد بهترین رنگ آمیزی مشاهده شده در مقابل دو رنگ آمیزی گرم و گیمسا است و رنگ آمیزی گیمسا با حساسیت 94 درصد و ویژگی75 درصد در مقابل رنگ آمیزی گرم با حساسیت 89 درصد و ویژگی 87 درصد بهتر بود، بنابراین در تشخیص هلیکوباکترپیلوری بر مبنای رنگ آمیزی ، رنگ آمیزی فوشین و گیمسا مناسب تر هستند.

نتیجه گیری

باتوجه به آزمون اختلاف نسبت در رنگ آمیزی فوشین، گیمسا و گرم و اوره با کشت میکروبی اختلاف معنی داری وجود ندارد و تمامی این روش ها می توانند برای تشخیص به کار روند ولی روش رنگ آمیزی فوشین به علت حساسیت بالا و ارزان بودن پیشنهاد می گردد

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد 11731مورخ 89/12/9 می باشد .

Archive of SID

www.SID.ir

References

1-Warren JR, Marshal BJ. *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. Lancet. 1983; 1, 1272-1275.

2-Goodwin CS, Armstrong JA, Mansha BJ. *Campylobacter pylori in gastritis and peptic ulceration*. J Chin Pathol. 1986; 39: 353-365.

3- Go MF. Review article: *Natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection*. Aliment Pharmacol Ther. 2002;16, Suppl 1:3-15.

4- Leclerc H. *Epidemiological aspects of Helicobacter pylori infection*. Bull Acad Natl Med. 2006; 190(4-5):949-962.

5- Said RM, Cheah PL, Chin SC, Goh KL. *Evaluation of a new biopsy urease test: Pronto Dry, for the diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2004;16(2):195-199.

6- Mandell, Douglas and Bennett's. *Principles and practice of Infectious Diseases.* 2010;volume 10, issue 5: 303-304.

7- Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, Möricke A, Vogt K,Triantafilou M, Hahn P, Schneider EM, Lepper PM. Serum antibody positivity for distinct *Helicobacter pylori* antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. Int J Med Microbiol. 2006;296:223–228.

8- McCune A, Lane A, Murray L, Harvey I, Nair P, Donovan J, Harvey R. Reduced risk of atopic disorders in adults with Helicobacter pylori infection. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003 Jun; 15(6):637-640.

9- Bures J, Kopácová M, Skodová Fendrichová M, Rejchrt S. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Vnitr Lek. 2011 Dec;57(12):993-999.

10- Matsukura N, Yokomuro S, Yamada S, Tajiri T, Sundo T, Hadama T, Kamiya S, Naito Z, Fox JG. Association between Helicobacter bilis in bile and biliary tract malignancies: H. bilis in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. Jpn J Cancer Res. 2002;93(7):842-847.

11- Tummala S, Sheth SG, Goldsmith JD, Goldar-Najafi A,Murphy CK, Osburne MS, Mullin S, Buxton D, Wagner DA,Kelly CP. Quantifying gastric *Helicobacter pylori* infection:a comparison of quantitative culture, urease breath testing,and histology. Dig Dis Sci. 2007;52:396–401.

12- Quesada M, Calvet X, Dosal A, Calvet V, Sanfeliu I, Ribera L,Choat T, Fallowfield B, Montserrat A, Puig V, Segura F. Evaluation of four different fecal tests for determination of cure after *Helicobacter pylori* treatment. J Clin Gastroenterol.2006;40:790–794.

13- Kolho KL, Klemola T, Koivusalo A, Rautelin H. Stool antigen tests for the detection *Helicobacter pylori* in children. Diagn Microbiol InfectDis. 2006;55:269–273.

14-Calvet X, Sanchez-Delgado J, Montserrat A, Lario S, Ramirez-Lazaro MJ, Quesada M, et al. Accuracy of diagnostic tests for Helicobacter pylori: an appraisal. Clin Infect Dis 2009; 48: 1385-1391.

15- Salah AB, Marco F, Perez R, Pique JM, Bordas JM. Rapid Detecion of Gastric Campylob-acter pylori colonization by a simple Biochemical test. J of clinical Microbioloy 1989; 2604-2605.

16- Wang WM. Evaluation of urease test, gram test, culture, and histology in the detection of Helicobacter pylori. Taiwan-I-Hsueh- Hui- Tse- Chih. 1990 Aug; 89 (8): 638-646.

17- Pinkard, K. J., B. Harrison, J. A. Capstick, G. Medley, and J. R. Lambert. Detection of *Campylobacter pyloridis* in gastric mucosa by phase contrast microscopy. J. Clin. Pathol. 1986;39:112-113.

Archive of SID

www.SID.ir