مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۶ شماره ۱۰، زمستان۱۳۹۱، صفحات ۳۳ - ۲۷

بررسی مقایسه ای روش های کشت ، اوره آز سریع(RUT)و هیستوپاتولوژی در تشخیص سویه های هلیکوباکتر پیلوری ایزوله شده از نمونه های بیوپسی معده بیماران

مسعود سیدین خراسانی[۱]، رسول یوسفی مشعوف[۱]، امیر مجلسی[۲]، محمد جعفری[۳]، محمدیوسف علیخانی*[۱]

۱.دانشگاه علوم پزشکی همدان دانشکده پزشکی گروه میکروبشناسی
۲.دانشکده پزشکی گروه داخلی
۳. دانشکده پزشکی گروه پاتولوژی

رسول یوسفی مشعوف استاد گروه میکروبشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
امیر مجلسی استادیار گروه داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
محمد جعفری استادیار گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
مسعود سیدین خراسانی، فوق لیسانس گروه میکروبشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*نویسنده مسئول: محمد یوسف علیخانی،دانشیار گروه میکروبشناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*آدرس نویسنده مسئول: همدان، خیابان شهید فهمیده مجتمع دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی گروه میکروبشناسی.
شماره تلفن: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹٤
دور نگار: ۰۸۱۱-۸۲۷۶۲۹۹
پست الکترونیک alikhani43@yahoo.com
alikhani@umsha.ac.ir

چکیده :

زمینه و اهداف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری با بیماری های گاستریت مزمن ، زخم معده، زخم دوازدهه و سرطان معده در ارتباط است . از این رو شناساسی و درمان این عفونت دارای اهمیت بسیار زیادی است . هدف از این مطالعه بررسی مقایسه ای سه روش هیستوپاتولوژی ، کشت و تست اوره آز سریع (RUT) در شناسایی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی معده است .

روش بررسی: تعداد ۱۵۳ نمونه (٦٤ زن و ۸۹ مرد) که از ناراحتی های گوارشی رنج می بردند و به مرکز آندوسکوپی شهید بهشتی همدان مراجعه کرده بودند در این مطالعه وارد شدند . سه نمونه بیوپسی از هر کدام از بیماران تهیه شد. نمونه ها با تست های اوره آز سریع (RUT) ، کشت و هیستوپاتولوژی تشخیص داده شدند . تست هیستوپاتولوژی به عنوان استاندارد طلایی جهت شناسایی به کار رفت .

Archive of SID
www.SID.ir

یافته ها: از ۱۵۳ نمونه گرفته شده از بیماران ، ٦٩/٩٪ ، ٢٧/٤٪ و ٢/٦٪ به ترتیب مبتلا به گاستریت ، زخم معده ، و سرطان معده بودند . حساسیت و ویژگی تست RUT در یک ساعت اول و پس از یک ساعت به ترتیب ٥٥/٤٪ ، ٨٠٪ و ٥٥/٤٪ و ٦٦/٧٪ بود و حساسیت و ویژگی روش کشت به ترتیب ٦٠/٦٪ و ١٠٠٪ بود.

نتیجه گیری : نتایج این تحقیق نشان داد که روش کشت دارای حساسیت بیشتری برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری، نسبت به تست اوره آز سریع می باشد .همچنین زمانیکه تست RUT پس از یک ساعت اول خوانده شود نسبت به زمانیکه پس از یک ساعت یا بیشتر خوانده شود اختصاصی تر است.

کلید واژه : هلیکوباکتر پیلوری ، اوره آز سریع ،RUT ، هیستوپاتولوژی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

هلیکوباکتر پیلوری (Helicobacter pylori) باکتری مارپیچ ، گرم منفی و میکروآئروفیلکی است که به صورت کلونیزه در نیمی از مردم دنیا وجود دارد و به عنوان عامل گاستریت مزمن (chronic gastritis) ، زخم معده (peptic ulcer) و همچنین یکی از اصلی ترین ریسک فاکتور های ایجاد سرطان معده مطرح می باشد[۱-٤] . بین ۲۰٪ تا ۵۰٪ از افراد جامعه در کشور های توسعه یافته و ۸۰٪ تا ۹۰٪ از افراد جامعه در کشور های در حال توسعه به باکتری هلیکوباکتر پیلوری آلوده هستند. در کشور های در حال توسعه میزان آلودگی تا سن ۱۰ سالگی ۵۰-۶۰٪ و در بزرگسالان بیشتر از ۹۰٪ است [۵-۷]. این باکتری در معده انسان جای گیر شده و در زیر لایه ی مخاطی بر روی سطح سلول های اپیتلیالی مستقر می شود[۸]. روش های تشخیصی این باکتری به دو شکل روش های تهاجمی (invasive) و روش های غیر تهاجمی (non-invasive) می باشد که روش های تهاجمی بر پایه تهیه بیوپسی از معده بوده و شامل تست اوره آز سریع ، رنگ آمیزی پاتولوژی به روش گیمسا ،کشت و PCR مستقیم از نمونه های بیوپسی است [۹-۱۳] . روش های غیر تهاجمی نیز شامل روش های سرولوژیکی ، آنالیز آنتی ژن مدفوعی و تست تنفسی اوره (Urea Breath Test (UBT می باشد[١٤]. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان حساسیت و ویژگی سه روش تشخیصی کشت ، پاتولوژی و اوره آز سریع در تشخیص وجود هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بیوپسی جدا شده از بیماران انجام شده است.

روش کار:

بیمارانی که وارد این مطالعه شدند شامل بیمارانی بودند که طی ۹ ماه ، از ابتدای خرداد ماه تا انتهای بهمن سال ۱۳۸۹ به مرکز آندوسکوپی بیمارستان شهید بهشتی همدان مراجعه کردند . بیماران افرادی بودند که طی یک ماه گذشته آنتی بیوتیک و دارو های مهار کننده ی پمپ پروتونی مصرف نکرده بودند ، بالای ۱۵ سال سن داشتند و بر اساس ناراحتی گوارشی بدون زخم معده (Non-Ulcer Dyspepsia) ، زخم معده (Peptic Ulcer) و سرطان معده (gastric cancer) توسط پزشک متخصص ، کاندید تهیه بیوپسی از معده می شدند. تمامی بیماران انتخاب شده در جریان مراحل تحقیق قرار گرفته و فرم رضایت نامه از همگی آنها تهیه شده است. از هر بیمار سه نمونه ی بیوپسی تهیه شد که به ترتیب جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری به روش اوره آز سریع (Rapid Urease Test: RUT) ، رنگ آمیزی پاتولوژی به روش گیمسا و کشت از نمونه بیوپسی مورد استفاده قرار گرفتند . کشت نمونه ها ی بیوپسی توسط محیط ترانسپورت تایوگلیکولات حاوی آگار (1.3 gr/L) و عصاره ی مخمر (۳٪) به آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده پزشکی انتقال داده شدند [۱۵] . کشت با استفاده از محیط کشت بروسلا آگار حاوی۷٪ سرم گاوی، ۱۰٪ خون گوسفندی و آنتی بیوتیک های آمفوترسین B(5µg/L)، تریمتوپریم (5µg/L) و ونکومایسین (10µg/L)در شرایط میکرو آئروفیلیک (5%O,5%CO_2,90%N_2) صورت گرفت[١٦]. شرایط میکروآئروفیلک با استفاده از گاز پک Cدرون جار ایجاد شد. پس از آن نمونه ها به مدت ۲ تا ٤ روز در دمای ۳۷ درجه انکوباتور قرار گرفت . کلنی های با مورفولوژی خاص هلیکوباکتر پیلوری، با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست های مثبت

Archive of SID

www.SID.ir

اکسیداز ، کاتالاز و اوره آز سریع به عنوان هلیکوباکتر پیلوری شناسایی و جداسازی شدند.

پاتولوژی : نمونه ها ی بیوپسی پس از رنگ آمیزی به روش گیمسا ، توسط پزشک متخصص پاتولوژی از لحاظ آلودگی با باکتری هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفتند. تست تشخیصی پاتولوژی به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شده است [۱۷].

اوره آز : نتایج اوره آز سریع ، پس از قرار دادن بیوپسی در محیط اوره آز سریع (RUT) و تغییر رنگ این محیط از رنگ زرد کهربایی به رنگ صورتی پس از یک ساعت بررسی شد.

آنالیزآماری : از برنامه SPSS شماره19 جهت انجام آنالیز آماری داده های به دست آمده استفاده شد. برای بررسی ارتباط بین آلودگی به هلیکوباکتر و متغیرهای مورد مطالعه از آزمون کای اسکوار، استفاده شد. سطح معنی داری آماری $p<0.05$ درنظر گرفته شد.

یافته ها :

نمونه گیری از ۱۵۳ بیمار صورت گرفت که از این تعداد ۸۹ نمونه (۵۸/۲٪) از مردان و ٦٤ نمونه (٤١/٨٪) از زنان جدا شده بود. جوان ترین و پیر ترین بیماران به ترتیب دارای ١٦ و ۸۸ سال سن بودند و میانگین سن افراد ۵۳ سال بود. از ۱۵۳ نمونه ی گرفته شده تعداد ۱۰۷ نفر (٦٩/٩٪) از کل نمونه ها دارای ناراحتی گوارشی بدون زخم معده (Non-Ulcer Dyspepsia) یا به اختصار NUD بودند و تعداد ٤٢ (٢٧/٤٪) نمونه دارای زخم معده (Peptic Ulcer Dyspepsia) یا به اختصار PUD بودند . همچنین از این بین ٤ (٢/٦٪) دارای سرطان معده (Cancer) بودند(جدول ۱).

جدول۱ – طبقه بندی بیماران بر اساس نتایج پاتولوژی به تفکیک جنسیت و گروه سنی

PUD: Peptic Ulcer Diseases; NUD: Non-Ulcer Dyspepsia

سن	NUD		PUD		Cancer		جمع
	مرد	زن	مرد	زن	مرد	زن	
۱۵-۳۰	۱۱	٤	۱	۳	–	–	۱۹
۳۰-٤۵	۱۵	۱۰	٤	۳	–	–	٤٢
٤۵-٦۰	۱۳	۷	۷	۲	۲	–	۳۱
> ٦۰	۲۲	۱۵	۸	۸	۱	۱	۵۵
جمع	٦۱	۳٦	۲۰	۱٦	۳	۱	۱۳۷

نتایج پاتولوژی برای ۱۳۷ بیمار (۸۹/۵٪) از لحاظ وجود هلیکوباکتر در نمونه های بیوپسی رنگ شده به روش گیمسا مثبت اعلام شد که از این میان ۸٤ نمونه از مردان (٦١/٣٪) و ۵۳ نمونه از زنان (٣٨/٦٪) بود(جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲ – نتایج کشت، اوره آز سریع و پاتولوژی به تفکیک جنسیت

	پاتولوژی		اوره آز سریع		کشت	
	٪	تعداد	٪	تعداد	٪	تعداد
مرد	٦١/٣	٨٤	٥٧/٩	٤٤	٥٦/٦	٤٧
زن	٣٨/٦	٥٣	٤٢/١	٣٢	٤٣/٤	٣٦
جمع	٨٩/٥	١٣٧	٤٩/٧	٧٦	٥٤/٢	٨٣

نتایج کشت برای ۸۳ نمونه بیوپسی مثبت شد (٥٤/٢٪) ، از این بین ٤٧ نفر مرد (٥٦/٦٪) و ٣٦ نفر زن (٤٣/٤٪) بودند که همگی از نمونه هایی بودند که نتایج پاتولوژی آنها نیز مثبت اعلام شده بود(جدول ۲). هیچ نمونه ای که دارای نتیجه ی پاتولوژی منفی و کشت مثبت باشد یافت نشد .

از ۸۳ نمونه که کشت آنها مثبت شده بودند تعداد ۵۳ (٦٣/٨٪) بیمار مبتلا به NUD ، ۲۷ بیمار (٣٢/٥٪) مبتلا به PUD و نهایتاً ۳ (٣/٦٪) بیمار مبتلا به سرطان معده (Cancer) بودند .

نتایج اوره آز سریع (RapidUreaseTest) یا به اختصار RUT برای ٨٤ نمونه بیوپسی مثبت شد (٥٤/٩٪ کل نمونه ها)، از این بین ٤٦ نفر مرد (٥٤/٧٪) و ۳۸ نفر زن (٤٥/٢٪) (جدول ۲). حساسیت و ویژگی برای دو روش کشت و اوره آز سریع RUT در مقایسه با روش پاتولوژی در جدول ۳ آورده شده است.

جدول۳ – حساسیت و ویژگی تست اوره آز سریع و کشت در مقایسه با هیستوپاتولوژی

تست تشخیصی	اوره آز سریع		کشت
	تا یک ساعت	پس از یک ساعت	
حساسیت (درصد)	٥٥/٤٪	٥٥/٤٪	٦٠/٦٪
ویژگی (درصد)	٨٠٪	٦٦/٧٪	١٠٠٪

بحث:

شیوع هلیکوباکتر پیلوری در جوامع و نژاد های مختلف و حتی در مناطق یک کشور ، بسیار متفاوت است ، این میزان شیوع همچنین بسته به وضعیت اجتماعی ، اقتصادی در دوران کودکی و شرایط جغرافیایی متفاوت است [۱۸]. میزان شیوع در کشور های در حال توسعه به میزان ۷۰٪-۹۰٪ گزارش شده است[۱۹]. در این مطالعه شیوع هلیکوباکتر پیلوری در بین بیماران مورد بررسی در منطقه ی همدان ۸۹/۵٪ بود که از این بین بیشترین شیوع عفونت در افراد بیش از ٦٠ سال مشاهده شد. پایین ترین و بالاترین سن آلودگی به ترتیب ١٦ و ٨٨ سال بود که بین آلودگی و جنس اختلاف معنا داری وجود نداشت. در سال ١٣٨٤ دکتر نخعی مقدم و همکاران شیوع هلیکوباکتر پیلوری را در بیماران در مشهد ٦٢/٥٪ گزارش کرده اند که بیشترین شیوع نیز در سنین ۳۲ تا ٤٢ سال گزارش کرده اند[۲۰].در حالیکه همانطور که ذکر شد شیوع این باکتری در بیماران مورد مطالعه ۸۹/۵٪ بدست آمد. همچنین دکتر کارگر و همکاران در تحقیقی که در سال ۱۳۸۹ در شهرکرد انجام داده اند شیوع این باکتری را دربیماران ٨٤/٧٪ و

Archive of SID

www.SID.ir

حساسیت تست های اوره آز سریع و کشت را به ترتیب ۵٤/۳٪ و ۳۱/۹٪ اعلام کرده اند[۲۱] که حساسیت روش کشت در مقایسه با حساسیت بدست آمده از این تحقیق بسیار کمتر بوده است که احتمالا بدلیل خطاهای تکنیکی و محیط های کشت و ترکیبات مورد استفاده بوده است. در تحقیق مذکور بر خلاف روش کشتی که در این تحقیق انجام شد، از روش خرد کردن بیوپسی برای کشت استفاده شده است و در محیط کشت نیز سرم گاوی استفاده نشده است. به نظر می رسد که با توجه به حساسیتی که هلیکوباکتر در مواجهه با هوای آزاد دارد و طولانی بودن فرآیند خرد کردن که باکتری را زمان بیشتری در معرض هوای آزاد قرار می دهد ، نتایج کشت دکتر کارگر از نتایج تست اوره آز سریع، حساسیت کمتری داشته باشد. در سال ۱۳۸٤ دکتر نخعی مقدم و همکاران حساسیت و ویژگی روش کشت را به ترتیب ۸۸/۲٪ و ۱۰۰٪ و روش اوره آز سریع RUT را به ترتیب ۸۷/۸٪ و ۷٦/٦٪ اعلام کرده است که در این تحقیق نیز حساسیت و ویژگی بالاتری برای روش کشت نسبت به روش اوره آز سریع گزارش شده است [۲۰].

نتیجه گیری :

به نظر می رسد که روش کشت با انجام اصلاحاتی مانند اضافه کردن سرم گاوی و سریع تر کشت دادن نمونه بیوپسی توسط سوآپ استریل بجای خرد کردن آن ، حساسیت این روش را از روش اوره آز سریع بیشتر می کند اما محدودیت روش کشت جهت تشخیص ، مدت زمان ۳ تا ۵ روزی است که برای کشت باکتری به کار می رود . اما روش تشخیصی RUT را نیز با اختصاصیت قابل قبول می توان با توجه به مزیت سریع بودن این تست نسبت به کشت به کار برد بخصوص زمانیکه مدت زمان خواندن تست در یک ساعت اول باشد. که در این صورت اختصاصیت تست بیشتر می شود . از آنجا که معمولا تست های اوره آز سریع در مراکز آندوسکوپی در اغلب موارد بین ۱ تا ۲٤ ساعت خوانده می شود این موضوع بایستی مورد توجه باشد که میزان ویژگی تست اوره آز سریع پس از یک ساعت کمتر شده و تعداد موارد مثبت کاذب افزایش می یابد . اما زمانیکه برای اهداف خاص زنده بودن باکتری مطلوب باشد کشت باکتری با شرایط گفته شده دارای اختصاصیت، و حساسیت قابل قبولی است.

سپاسگذاری: از معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به جهت تامین هزینه تحقیق، همکاران آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده پزشکی، و بخش آندوسکوپی بیمارستان شهید بهشتی همدان خصوصا جناب آقای دکتر خلیلیان، و سرکار خانم دکتر شهره فرشاد از مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی استاد البرزی که در انجام این تحقیق ما را یاری رسانده اند کمال تشکر و امتنان را داریم.

فهرست منابع

1.Agarwal, K. and S. Agarwal, *Helicobacter pylori vaccine: from past to future.* Mayo ClinProc, 2008. **83**(2): p. 169-75.

2.Adler, I., et al., *Helicobacter pylori associated with glossitis and halitosis.*Helicobacter, 2005.**10**(4): p. 312-7.

3.Moran, A.P., *The role of endotoxin in infection: Helicobacter pylori and Campylobacter jejuni.*SubcellBiochem. **53**: p. 209-40.

4.Ables, A.Z., I. Simon, and E.R. Melton, *Update on Helicobacter pylori treatment.*AmFam Physician, 2007. **75**(3): p. 351-8.

5.Frenck, R.W., Jr., and J. Clemens,*Helicobacter in the developing world.* Microbes Infect, 2003. **5**: p. 705-13.

6.Pounder, R.E., and D. Ng, *The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries.*Aliment.Pharmacol, 1995.**ther.9**: p. Suppl 2:33-9.

7.Rothenbacher, D., and H. Brenner, *Burden of Helicobacter pylori and H.*

Archive of SID

www.SID.ir

pylori-related diseases in developed countries: recent developments and future implications. Microbes Infect, 2003. **5**: p. 693-703.
8.Kilmartin, C.M., *Dental implications of Helicobacter pylori.* J Can Dent Assoc, 2002. **68**(8): p. 489-93.
9.Genta, R.M., and D. Y. Graham, *Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of Helicobacter pylori: a topographic study of H. pylori density and distribution.*Gastrointest.Endosc, 1994.**40**: p. 342-5.
10.Al-Ali, J., et al., *Diagnostic performance of gastric imprint smear for determination of Helicobacter pylori infection.* Can J Gastroenterol. **24**(10): p. 603-6.
11.Shin, C.M., et al., *Validation of diagnostic tests for Helicobacter pylori with regard to grade of atrophic gastritis and/or intestinal metaplasia.*Helicobacter, 2009.**14**(6): p. 512-9.
12.Cutler, A.F., S. Havstad, C. K. Ma, M. J. Blaser, G. I. Perez-Perez, and T. T. Schubert, *Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose Helicobacter pylori infection.*Gastroenterology, 1995.**109**: p. 136-41.
13.Hachem, C.Y., J. E. Clarridge, D. G. Evans, and D. Y. Graham, *Comparison of agar based media for primary isolation of Helicobacter pylori.*Clin.Pathol, 1995.**48**: p. 714-6.
14.Peng, N.J., et al., *Comparison of noninvasive diagnostic tests for Helicobacter pylori infection.* Med PrincPract, 2009. **18**(1): p. 57-61.
15.Baghaei, K., et al., *Determination of Helicobacter pylori virulence by analysis of the cag pathogenicity island isolated from Iranian patients.*Dig Liver Dis, 2009.**41**(9): p. 634-8.
16.Farshad, S., et al., *Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori strains isolated from patients in Shiraz, Southern Iran.*World J Gastroenterol, 2010.**16**(45): p. 5746-51.
17.Adamopoulos, A.B., et al., *Diagnostic value of rapid urease test and urea breath test for Helicobacter pylori detection in patients with Billroth II gastrectomy: a prospective controlled trial.*Dig Liver Dis, 2009.**41**(1): p. 4-8.
18.Zhang, D.H., et al., *[Epidemiology of Helicobacter pylori infection in Shandong and Beijing areas.].*ZhonghuaNeiKeZaZhi, 2009. **48**(12): p. 1004-7.
19.Pounder, R.E. and D. Ng, *The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries.* Aliment PharmacolTher, 1995. **9 Suppl 2**: p. 33-9.
۲۰. محبوبه نخعی مقدم ، مهرانگیز خواجه کرم الدینی ، فریدون ملک زاده ، شیوع هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بیوپسی معده و تعیین حساسیت و ویژگی روش های تشخیصی آن مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ، درمانی گناباد (2)**11** .1384 .
۲۱. محمد کارگر ، مریم باقر نژاد ، عباس دوستی ,مقایسه سه روش واکنش زنجیره ای پلیمراز ، کشت و تست اوره آز سریع در شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه بیوپسی معده , مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان .1389 **11**(3)

Archive of SID

www.SID.ir