شیوع هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی معده و تعیین حساسیت و ویژگی روشهای تشخیصی آن

محبوبه نخعی مقدم[1]- دکتر مهرانگیز خواجه‌کرم‌الدینی[2]- دکتر فریدون ملک‌زاده[3]- دکتر عباس خوشنوای فومنی[4]

چکیده

زمینه و هدف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری (HP) با گاستریت مزمن، زخم معده، زخم اثنی‌عشر و بدخیمی معده ارتباط دارد و شیوع آن در میان جمعیتهای مختلف، متفاوت است. از آن جا که این باکتری با بیماریهای مهم و خطرناکی ارتباط دارد، مطالعه حاضر به منظور تعیین میزان آلودگی در میان ۱۹۵ نمونه آندوسکوپی و نیز تعیین حساسیت و ویژگی روشهای تشخیصی آن، انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، نمونه‌های بیوپسی معده ۱۹۵ بیمار ۱۲-۷۵ ساله مراجعه‌کننده به بیمارستان ۱۷ شهریور وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد، از شهریور تا اسفند ۱۳۸۳ مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌ها در محیط استوارت (Merck) به آزمایشگاه انتقال یافتند و پس از هموژنیزاسیون، تشخیص با استفاده از رنگ‌آمیزی مستقیم نمونه، کشت در محیط بروسلا آگار (Merck) حاوی افزودنیها و آزمون اوره آز انجام گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۹۵ نمونه بیوپسی آزمایش شده، ۱۲۲ مورد (۶۲/۵۶٪) از نظر هلیکوباکترپیلوری مثبت بودند. حساسیت و ویژگی به ترتیب برای روش کشت ۸۸/۲۴٪ و ۱۰۰٪، برای آزمون اوره آز سریع ۸۷/۸۰٪ و ۷۶/۶۰٪ و برای رنگ‌آمیزی گرم ۸۷/۸۰٪ و ۹۰/۹٪ بود. ۶۰/۴٪ از زنان و ۶۴/۸۹٪ از مردان از نظر HP مثبت بودند که با توجه به آزمون برابری نسبت، اختلاف معنی‌داری بین شیوع عفونت و جنس وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بالای عفونت HP، تشخیص آلودگی بویژه برای پیشگیری و درمان بیماری اهمیت دارد. در این پژوهش حساسیت و ویژگی بالای روش کشت تأیید شد. علاوه بر این، با انجام کشت، امکان جداسازی باکتری و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی نیز وجود دارد. با استفاده همزمان از هر سه روش تشخیصی فوق، احتمال شناسایی موارد مثبت عفونت هلیکوباکتر پیلوری بیشتر می‌شود.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، شیوع، کشت، حساسیت و ویژگی

افق دانش؛ مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی گناباد (دوره ۱۱؛ شماره ۲؛ سال ۱۳۸۴)

[1] نویسنده مسؤول: دانش آموخته دکترای میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم - تحقیقات
آدرس: مشهد- خیابان احمدآباد- ابوذر غفاری ۳۸- پلاک ۵۷
تلفن: ۸۴۱۲۶۱۴- ۰۵۱۱ نمابر: ۸۴۱۹۲۱۵-۰۵۱۱ پست الکترونیکی: mahboobe_nak@yahoo.com
[2] متخصص میکروب شناسی؛ استاد گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
[3] استاد گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد واحد تهران (واحد علوم- تحقیقات)
[4] متخصص بیماریهای داخلی؛ استادیار گروه آموزشی بیماریهای داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

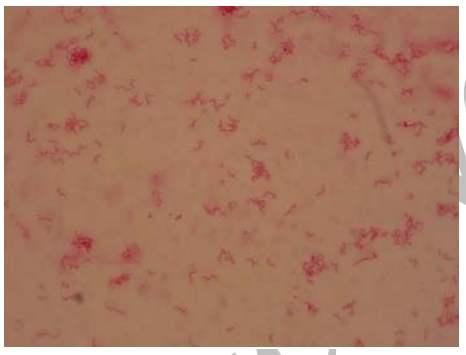
هلیکوباکتر پیلوری اولین بار در سال ۱۸۹۳ در بدن سگ شناسایی شد و در سال ۱۹۰۶ باکتری‌های مشابهی در بدن انسان گزارش گردید. تا این که در سال ۱۹۸۳ در مقاله‌ای، باکتری به علت شباهت به کمپیلوباکتر، کمپیلوباکتر پیلوری و بعد در سال ۱۹۸۹ هلیکوباکتر پیلوری نامیده شد (۱-۴). این باکتری در محیط اسیدی معده انسان مستقر می‌شود و با گاستریت مزمن، سوء هاضمه، زخم معده، زخم اثنی‌عشر و آدنوکارسینومای معده ارتباط دارد. بیش از نیمی از جمعیت دنیا مبتلا به این عفونت می‌باشند. میزان آلودگی بین کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه متفاوت است (۶،۵). شیوع عفونت در کشورهای در حال توسعه بیشتر است و در سنین پایین‌تر کسب می‌شود. میزان آلودگی تا سن ۱۰ سالگی ۵۰-۶۰٪ و در بزرگسالان بیشتر از ۹۰٪ است. برعکس در کشورهای توسعه‌یافته در دوران کودکی، آلودگی کمتر روی می‌دهد و با افزایش سن، افزایش تدریجی شیوع به میزان حدود ۰/۵-۱٪ مشاهده می‌شود و میزان آلودگی تا سن ۲۰ سالگی ۲۰-۳۰٪ و در سنین ۵۰-۶۰ سالگی، حدود ۵۰٪ است.

شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری در میان جمعیتهای مختلف متفاوت است (۸،۷،۳). مطالعه حاضر با هدف تعیین شیوع هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های بیوپسی بیماران و نیز تعیین حساسیت و ویژگی روش کشت، روش میکروسکوپی و آزمایش اوره آز سریع انجام شد.

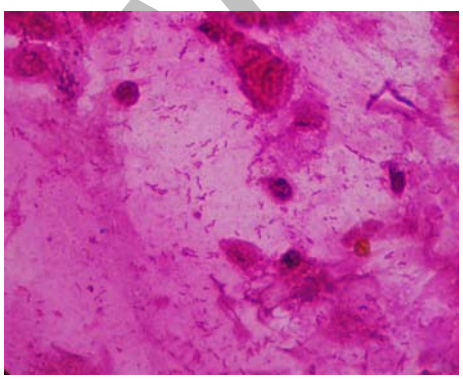
روش بررسی

در این مطالعه تجربی، نمونه‌های بیوپسی معده ۱۹۵ بیمار ۱۲-۷۵ ساله مراجعه‌کننده به بیمارستان ۱۷ شهریور وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد، از شهریور تا اسفند ۱۳۸۳ مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌ها توسط پزشک متخصص تهیه شد و در محیط انتقالی استوارت (Merck) که یکی از بهترین محیطهای انتقالی برای هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد (۹)، به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌های آندوسکوپی سریع کشت می‌شدند؛ در غیراین صورت تا زمان کشت، در یخچال نگهداری می‌شدند. هر نمونه بیوپسی پس از هموژنیزاسیون به سه قسمت تقسیم می‌شد. بخشی از نمونه یکنواخت شده به محیط بروسلا آگار (Merck) حاوی ۵mg /L ونکومایسین، ۵mg /L تری متوپریم، ۱۰mg /L آمفوتریسین B و ۲۵۰۰U/L پلی میکسینB، ۱٪ نشاسته و ۵-۷٪ خون استریل دفیبرینه اسب (تهیه شده از دانشکده دامپزشکی مشهد) تلقیح می‌شد. پلیت‌ها مدت ۵-۷ روز در گرمخانه ۳۷°C دارای ۱۰٪ گاز کربنیک و ۹۰-۱۰۰٪ رطوبت قرار داده می‌شدند؛ همچنین قسمتی از نمونه هموژن به محیط اوره آز سریع انتقال می‌یافت. نتیجه مثبت آزمایش با تغییر رنگ از زرد به ارغوانی در مدت یک ساعت مشخص می‌شد.

شناسایی هلیکوباکترپیلوری با کمک ویژگیهای ظاهری تشخیصی، تهیه اسمیر و رنگ‌آمیزی گرم (شکل ۱)، آزمایش اوره آز، کاتالاز و اکسیداز مثبت، مقاومت در برابر نالیدیکسیک اسید، عدم تولید SH2 و تست اندول منفی صورت می‌گرفت. باقیمانده نمونه هموژن برای تهیه اسمیر و رنگ‌آمیزی گرم نمونه بیوپسی مورد استفاده قرار می‌گرفت (شکل ۲).



شکل ۱- رنگ‌آمیزی گرم از کلنی هلیکوباکتر پیلوری



شکل ۲- هلیکوباکتر پیلوری در نمونه مستقیم با رنگ‌آمیزی گرم

Archive of SID

www.SID.ir

یافته‌ها

تمام نمونه‌های آندوسکوپی با سه روش کشت، بررسی میکروسکوپی و اوره آز سریع مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های با کشت مثبت و یا موارد مثبت برای دو روش تشخیصی از سه روش فوق، مثبت در نظر گرفته می‌شدند (۱).

از مجموع ۱۹۵ نمونه بیوپسی آزمایش‌شده، ۱۲۲مورد (۶۲/۵۶٪) از نظر هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند. این باکتری از تعداد ۱۰۹ مورد (۸۹/۳۵٪) با روش کشت جدا و شناسایی شد.

از ۱۹۵ بیمار، ۱۰۱ نفر زن و ۹۴ نفر مرد بودند. ۶۱ نفر (۶۰/۴٪) از زنان و ۶۱ نفر (۶۴/۸۹٪) از مردان، از نظر هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند (جدول ۱). با توجه به آزمون برابری نسبت، اختلاف معنی‌داری بین شیوع عفونت و جنس وجود نداشت.

سن ۱۱۵ نفراز بیماران (آذر تا اسفند ۱۳۸۳) ثبت شده بود که ۱۲-۷۵ ساله بودند و بیشترین درصد آلودگی بین سنین ۳۲-۴۲ سال (۷۳/۹٪) بود. جدول ۱، تعداد موارد مثبت را با توجه به محدوده سنی بیماران نشان می‌دهد.

حساسیت و ویژگی برای هر یک از سه روش تشخیصی کشت، اوره سریع و رنگ‌آمیزی گرم نمونه مستقیم با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شده و در جدول ۲ ارائه شده است.

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{مثبت کاذب + منفی حقیقی}}$$

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب + مثبت حقیقی}}$$

جدول ۱- آلودگی با هلیکوباکترپیلوری در ارتباط با جنس و سن بیماران

گروههای بیماران		تعداد	تعداد (درصد) نمونه‌های مثبت
جنس:	مرد	۹۴	۶۱ (۶۴/۸۹)
	زن	۱۰۱	۶۱ (۶۰/۴۰)
سن:	۱۲-۲۲	۱۰	۵ (۵۰)
	۲۲-۳۲	۳۵	۱۷ (۴۸/۵۷)
	۳۲-۴۲	۲۳	۱۷ (۷۳/۹۱)
	۴۲-۵۲	۲۶	۱۸ (۶۹/۲۳)
	۵۲-۶۲	۱۴	۶ (۴۲/۸۶)
	۶۲-۷۳	۷	۲ (۲۸/۵۷)

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع هلیکوباکترپیلوری در جوامع و نژادهای مختلف حتی در یک کشور، بسیار متفاوت است (۱۰). میزان شیوع با توجه روش مورد استفاده، وضعیت اجتماعی اقتصادی در دوران کودکی و شرایط جغرافیایی متفاوت است (۱۱).

شیوع عفونت در کشورهای غربی کمتر از ۵۰٪ ولی در کشورهای در حال توسعه به میزان ۷۰-۹۰٪ گزارش شده است (۳). عفونت هلیکوباکترپیلوری در اغلب کشورهای غربی در حال کاهش می‌باشد که مربوط به موفقیت در درمان ترکیبی و بهبود بهداشت شخصی و اجتماعی است که از عفونت مجدد جلوگیری می‌کند (۶).

در این مطالعه شیوع هلیکوباکترپیلوری در بین بیماران مورد بررسی ۶۲/۵۶٪ و بیشترین شیوع عفونت در سنین ۳۲-۴۲ سال بود. پایین‌ترین و بالاترین سن آلودگی به ترتیب ۱۲ و ۶۶ سال بود. بین آلودگی و جنس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در سال ۲۰۰۰، شیوع هلیکوباکترپیلوری بین بیماران مبتلا به زخم معده در یک بیمارستان در سنگاپور ۶۷/۹٪ گزارش شد (۱۲).

در این مطالعه، حساسیت و ویژگی روش کشت به ترتیب ۸۸/۲۴٪ و ۱۰۰٪ بود. در مقایسه با سایر روشها، حساسیت و ویژگی روش کشت بالاتر بود و علاوه بر این با کشت نمونه بیوپسی، امکان جداسازی باکتری و انجام آنتی‌بیوگرام نیز هست. حساسیت و ویژگی آزمایش اوره آز سریع هم به ترتیب ۸۷/۸۰٪ و ۷۶/۶۰٪ بود.

موارد مثبت کاذب در این آزمایش می‌تواند مربوط به آلودگی نمونه بیوپسی با سایر باکتری‌ها بویژه پسودوموناس باشد. موارد منفی کاذب نیز می‌تواند مربوط به کم بودن نمونه بیوپسی باشد. حساسیت و ویژگی برای روش میکروسکوپی نمونه بیوپسی با رنگ‌آمیزی گرم به ترتیب ۸۷/۸۰٪ و ۹۰/۹٪ بود.

جدول ۲- حساسیت و ویژگی هر کدام از سه روش مورد مطالعه

آزمایش	رنگ‌آمیزی گرم نمونه مثبت	اوره آز سریع	کشت
حساسیت (درصد)	۸۷/۸۰	۸۷/۸۰	۸۸/۲۴
اختصاصیت (درصد)	۹۰/۹	۷۶/۶۰	۱۰۰

Archive of SID
www.SID.ir

گزارش نتیجه بر اساس روش میکروسکوپی نیاز به دقت زیاد و تجربه دارد و نمونه مورد استفاده باید با دقت هموژنیزه و رنگ‌آمیزی شود؛ همچنین رنگ‌ها تازه باشند و رسوب نداشته باشند و نمونه باید تازه باشد تا باکتری فرم مارپیچ خود را حفظ کند و به صورت کوکسی در نیاید.

در مطالعه Boyanova و همکاران، حساسیت و ویژگی برای روش کشت به ترتیب ۹۶/۵٪ و ۱۰۰٪، برای روش اوره آز سریع ۴۲/۳٪ و ۹۳/۲٪ و برای روش رنگ‌آمیزی گرم نمونه مستقیم ۷۸/۲٪ و ۸۴/۶٪ گزارش شد (۱). در مطالعه حاضر حساسیت کمتر روش کشت، می‌تواند مربوط به انتقال و یا کشت دیرتر نمونه (پس از گرفتن نمونه آندوسکوپی در بیمارستان ۱۷ شهریور، نمونه در محیط انتقالی به آزمایشگاه بیمارستان قائم انتقال می‌یافت)، قرارگرفتن نمونه در سطح محیط انتقالی و در معرض اکسیژن بودن و یا آغشته‌بودن وسیله آندوسکوپی به مواد ضد عفونی‌کننده باشد.

برای اطمینان بیشتر شناسایی موارد مثبت عفونت هلیکوباکتر پیلوری، استفاده از هر سه روش فوق توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه آقای دکتر سرداری و آقایان محمدی و رشیدی نژاد در دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد جهت در اختیار قرار دادن خون اسب، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

1- Boyanova L, Koumanova R, Lazarova E, Jelev C. Helicobacter pylori and Helicobacter heilmannii in children. A Bulgarian study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 46 (4): 249-52.

2- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Baily & Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed. St.Louis: Mosby; 2002.

3- Glupcznski Y. Infection with Helicobacter. In: Collierr L, Balows A, Sussman M. Topely Wilson's Microbiology and Microbial Infection-Bacterial infection. Vol. 1. 9th ed. USA: Saunders; 1998.

4- Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of Helicobacter pylori in various liquid and plating media. Lett Appl Microbiol. 2000 Mar;30(3):192-6.

5- Bani-Hani KE, Hammouri SM. Prevalence of Helicobacter pylori in Northern Jordan. Endoscopy based study. Saudi Med J. 2001; 22 (10): 843- 47.

6- Ahmed N, Sechi LA. Helicobacter pylori and gastroduodenal pathology: new threats of the old friend. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2005; 4: 1.

7- Petersen AM, Krogfelt KA. Helicobacter pylori: an invading microorganism? A review. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 36 (3): 117-26.

8- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th ed. St.Louis: Mosby; 2002.

9- Veenendaal RA, Lichtendahl-Bernards AT, Pena AS, Endtz HP, van Boven CP, Lamers CB. Effect of transport medium and transportation time on culture of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens. J Clin Pathol. 1993; 46 (6): 561-63.

10- Bani-Hani K, EI-Migdadi F. A comparative study of areas of different barometric pressure. Int J Gastroenterol. 2005; 3 (2): 309-14.

11- Kaur G, Naing NN. Prevalence and ethnic distribution of Helicobacter pylori infection among endoscoped patients in north eastern peninsular Malaysia. Malaysian J Med Sci. 2003; 10(2): 66-70.

12- Vu C, Ng YY. Prevalence of Helicobacter pylori in peptic ulcer disease in a Singapore hospital. Singapore Med J. 2003; 41 (10): 478-81.

Archive of SID

www.SID.ir