دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته باکتری‌شناسی پزشکی

عنوان

بررسی حضور هلیکوباکتر پیلوری *cagA+* در نمونه پلاک دندانی و بیوپسی معده با روش PCR

نگارش

مونا کربلایی

استاد راهنما

دکتر اشرف محبتی مبارز

استاد مشاور

دکتر محسن امینی

۱۳۸۸

پروردگارم؛

هزاران بار سپاس که لیاقت شناخت حرفی هرچند کوچک، از الفبای خلقت را به من ارزانی داشتی...

این مجموعه کوچک را تقدیم می‌کنم به:

پدر و مادر همیشه همراهم، به پاس طراوتی که از حضور سبزشان، به من ارزانی شد؛

مهدی و رضای عزیزم، به خاطر عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان؛

دوستان صمیمی و مهربانم؛ به پاس محبت‌های بی‌دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند؛

تک تک اساتید بزرگواری که تا امروز از ایشان درس معرفت و انسانیت آموخته‌ام؛

یکایک افرادی که، گامی هر چند کوچک در مسیر اعتلای زندگی انسان‌ها برداشته‌اند؛

و...

حضرت دوست که لیاقت طی این مسیر را به من اعطا کرد.

صمیمانه‌ترین قدردانی‌ها و سپاس قلبی‌ام را تقدیم می‌کنم به:

سرکار خانم دکتر اشرف محبتی مبارز، استاد راهنمای نازنینم، به خاطر حمایت‌های همه‌جانبه‌اش وخوبی‌هایی که تنها مختص اوست و بس.

جناب آقای دکتر محسن امینی، استاد مشاور محترمم، به خاطر راهی که به واسطه حضور موثر وی بر من هموار شد.

اساتید محترم گروه باکتری‌شناسی، سرکار خانم دکتر پیرایه، جناب آقای دکتر ستاری، و جناب آقای دکتر بهزادیان که تجارب گران‌بهایشان را در اختیارم نهادند.

دوستان بزرگوارم در گروه باکتری‌شناسی، خصوصاً جناب آقای دکتر جلیل فلاح، جناب آقای دکتر نیما خرم آبادی، خانم دکتر بهاره حاجی خانی، جناب آقای دکتر داوود اسماعیلی، جناب آقای دکتر محمد حقیقی، و سایر عزیزانی که علی‌رغم مشغله زیاد، از هیچ کمکی در راه پیشبرد این پروژه دریغ نکردند.

و ...

عزیزان همراهی که لحظات دشوار کار با دلگرمی‌هایشان حقیقتاً لذت بخش شد.

چکیده

وخامت علایم کلینیکی ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری با حضور شماری از فاکتورهای ویرولانس، بالاخص ژن *cagA* مرتبط است. امروزه از پلاک دندانی به عنوان دومین مخزن این باکتری یاد می‌شود و شواهدی دال بر انتقال هلیکوباکتر پیلوری از این راه نیز در دست است. اما تاکنون سویه *cagA+* هلیکوباکتر پیلوری از پلاک دندانی ردیابی نشده است. بر همین اساس مطالعه فعلی با هدف بررسی حضور هلیکوباکتر پیلوری *cagA+* در نمونه پلاک دندانی و بیوپسی معده با روش PCR طراحی گردید.

از ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان بقیه‌الله نمونه پلاک دندانی و بیوپسی معده با روش اندوسکوپی اخذ شده و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها روی محیط بروسلا آگار غنی شده کشت داده، به مدت ۷- ۵ روز در شرایط میکروآئروفیلیک انکوبه شد. پس از مشاهده رشد، حضور هلیکوباکتر پیلوری با آزمایشات بیوشیمیایی تأیید گردید. هم‌چنین آزمایش PCR برای ژن‌های *ureC* و *cagA* روی نمونه‌ها انجام شد.

در کل ۶۵ بیمار (٪۶۵) دارای نمونه هم‌زمان بیوپسی و پلاک دندانی بودند که از این میان ۳۰ نفر (٪۴۶) دارای کشت مثبت هم‌زمان، ۵۴ نفر (٪۸۳) دارای ژن *ureC* و ۱۵ نفر (٪۲۳) دارای ژن در *cagA* در نمونه پلاک دندانی و بیوپسی به طور هم‌زمان به روش Direct PCR بودند. در ضمن پس از انجام PCR روی کلنی‌های حاصل از کشت روی محیط بروسلا آگار مشخص شد ۳۰ بیمار (٪۴۶) دارای ژن *ureC* و ۱۰ بیمار(٪۱۵/۳) دارای ژن *cagA* بودند. در ضمن ٪۷۵ از بیمارانی که ژن *cagA* در بیوپسی معده و پلاک دندانی آنها شناسایی شد دارای علایم وخیم کلینیکی بودند. به نظر می‌رسد پلاک دندانی مخزن مناسبی جت ذخیره‌سازی هلیکوباکتر پیلوری بوده، در آلوده‌سازی مجدد معده بیمار پس از آنتی‌بیوتیک درمانی موثر واقع شود.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، حفره دهانی، پلاک دندانی، *cagA*

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱. تاریخچه ۲

۱-۲. مورفولوژی و فیزیولوژی ۴

۱-۳. فرم زنده ولی غیر قابل کشت هلیکوباکتر پیلوری ۶

۱-۴. محل زندگی ۷

۱-۵. اهمیت بالینی ۹

۱-۶. فاکتورهای ویرولانس ۱۰

۱-۷. شیوع عفونت ۲۰

۱-۸. تاریخچه طبیعی عفونت ۲۰

۱-۹. اپیدمیولوژی *H. pylori* ۲۱

۱-۱۰. حضور *H. pylori* در دهان و پلاک‌های دندانی ۲۸

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۴۵

۲-۱. جمع‌آوری نمونه ۴۶

۲-۲. روش کشت نمونه‌ها ۴۷

۲-۳. روش شناسایی *H. pylori* ۵۱

۲-۴. روش استخراج DNA از نمونه بافت بیوپسی ۵۲

۲-۵. انجام PCR ۵۵

فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۵۸

۳-۱. نمونه‌گیری ۵۹

۳-۲. توزیع سنی ۷۴

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری، و پیشنهادها ۸۲

۴-۱. جمع‌بندی ۸۳

۴-۲. پیشنهادات ۹۰

فهرست جداول

جدول ۱-۱. باکتری‌های غالب در سطح دندان ۳۱
جدول ۱-۲. گونه های باکتریایی خاص موجود در پلاک دندانی ۳۲
جدول ۱-۳. میزان جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از پلاک دندانی به روش کشت ۳۶
جدول ۱-۴. نرخ جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از پلاک دندانی به روش PCR ۳۸
جدول ۲-۱. سیکل‌های حرارتی PCR ژن‌های UreC و CagA ۵۷
جدول ۳-۱. وضعیت عمومی بیماران گروه ۱ ..... ۶۱
جدول ۳-۲. وضعیت عمومی بیماران گروه ۲ ..... ۶۲
جدول ۳-۳. وضعیت عمومی بهداشت دهان در نمونه‌های پلاک دندانی بیماران ۶۳
جدول ۳-۴. وضعیت و عادات تغذیه‌ای بیماران گروه ۱ ..... ۶۴
جدول ۳-۵. وضعیت و عادات تغذیه‌ای بیماران گروه ۲ ..... ۶۶
جدول ۳-۶. ارتباط علایم گوارشی و حضور هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی و بیوپسی معده بیماران گروه۱ ..... ۶۷
جدول ۳-۷. ارتباط علائم گوارشی وحضور هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی بیماران گروه ۲ ..... ۷۰
جدول ۳-۸. ارتباط یافته‌های حاصل از اندوسکوپی و حضور هلیکوباکتر پیلوری در بیوپسی معده و پلاک دندانی بیماران گروه ۱ ..... ۷۱
جدول ۳-۹. ارتباط یافته‌های حاصل از اندوسکوپی و حضور هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی بیماران گروه۲ ..... ۷۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. تصویر هلیکوباکتر پیلوری با میکروسکوپ الکترونی ۵
شکل ۱-۲. فرم زنده ولی غیر قابل کشت هلیکوباکتر پیلوری در نمونه آب..... ۷
شکل ۱-۳. باکتری‌های کلونیزه شده در مخاط معده ۸
شکل ۱-۴. شمایی میکروسکوپی ازیک اسمیر تهیه شده از پلاک زیرلثه‌ای که نشانگر طیف وسیع و متفاوت میکروارگانیسم‌های حاضر درون پلاک است..... ۲۹
شکل ۱-۵. نمایی از پلیکل شکل گرفته بر روی سطح دندان..... ۳۰
شکل ۱-۶. شمای برخی از اندرکنش‌های بین مولکولی دخیل در پیدایش پلاک دندانی..... ۳۲
شکل ۱-۸. شمایی از باکتری‌های موجود در پلاک دندانی: حضور غالب استرپتوکوک و لاکتوباسیل ۳۳
شکل ۳-۱. مقایسه تعداد بیماران مورد مطالعه از نظر نمونه‌گیری از پلاک دندانی و بیوپسی معده به طور هم‌زمان (گروه ۱) و یا نمونه‌گیری فقط از پلاک دندانی (گروه ۲)..... ۶۰
شکل ۳-۲. توزیع جنسیت بیماران مورد مطالعه: جنس مذکر: ٪۶۶، جنس مونث: ٪۳۴ ..... ۶۰
شکل ۳-۳. بررسی ارتباط سطح تحصیلات بیماران و کشت مثبت نمونه بیوپسی: طبق نتایج به دست آمده رابطه معنی‌داری میان تحصیلات دیپلم و یا پایین‌تر از دیپلم و افزایش نرخ آلودگی با *H. pylori* وجود دارد..... ۶۲
شکل ۳-۴. ارتباط میان نوع گروه خونی بیماران و مثبت بودن کشت پلاک: در این تحقیق بیشترین فراوانی گروه خونی بیماران آلوده با *H. pylori* متعلق به گروه B بود..... ۶۳
شکل ۳-۵. ارتباط میان وضعیت بهداشتی دهان و کشت *H. pylori* در نمونه پلاک دهان. این تحقیق نشان داد بیمارانی که وضعیت بهداشت مناسبی در دهان خود نداشتند، درصد بالایی از کشت مثبت پلاک را به خود اختصاص می‌دادند..... ۶۴
شکل ۳-۶. بررسی ارتباط میان مصرف ماست و حضور هلیکوباکتر پیلوری *cagA+* در پلاک دندانی بیماران گروه ۱: افرادی که روزانه به طور مرتب ماست مصرف می‌کردند، در مقایسه با افرادی که به شکل منظم از ماست استفاده نمی‌کردند درصد کمتری از هلیکوباکتر پیلوری CagA+ را در پلاک دندانی خود داشتند..... ۶۵

شکل ۳-۷. ارتباط میان مصرف ماست و کشت مثبت نمونه بیوپسی: طبق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد افرادی که به طور منظم ماست مصرف می‌کنند درصد کشت مثبت بیوپسی پایین‌تری دارند... ۶۵
شکل ۳-۸. بررسی رابطه عادات غذایی بیماران با آلودگی به *H. pylori* در دهان: به نظر می‌رسد مصرف بیش از حد غذای آماده و مصرف نامنظم ماست و سبزیجات با افزایش حضور این باکتری در دهان در ارتباط است. ۶۷
شکل ۳-۹. رابطه احساس درد در معده در زمان گرسنگی (با بیداری شبانه و بدون بیداری شبانه) با مثبت شدن کشت هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی..... ۶۸
شکل ۳-۱۰. رابطه احساس درد در معده در زمان گرسنگی (با بیداری شبانه و بدون بیداری شبانه) با مثبت شدن کشت هلیکوباکتر پیلوری در بیوپسی معده ۶۸
شکل ۳-۱۱. رابطه احساس نفخ و پری پس از صرف غدا (با و بدون بیداری شبانه) و ریفلاکس(با و بدون بیداری شبانه) با حضور *cagA+ H. pylori* در پلاک دهانی ۶۹
شکل ۳-۱۲. نمودار رابطه احساس نفخ و پری پس از صرف غدا (با و بدون بیداری شبانه) و ریفلاکس (با و بدون بیداری شبانه) با حضور *cagA+ H. pylori* در بیوپسی معده..... ۶۹
شکل ۳-۱۳. رابطه عفونت قبلی با هلیکوباکتر پیلوری (درمان شده، عود کرده) و حضور فعلی این باکتری در پلاک دهانی و بیوپسی معده ۷۰
شکل ۳-۱۴. نمودار رابطه عفونت قبلی با *H. pylori* با حضور این باکتری در پلاک دندانی بیماران گروه ۲ ..... ۷۱
شکل ۳-۱۵. نمودار ارتباط یافته های اندوسکوپی و مثبت شدن کشت پلاک دندانی (الف) و بیوپسی معده (ب) ۷۲
شکل ۳-۱۶. نمودار ارتباط حضور *cagA+ Helicobacter pylori* در پلاک دندانی (الف) و بیوپسی معده (ب) با ابتلا به زخم معده و دفورمیتی معده ۷۳
شکل ۳-۱۷. نمودار توزیع سنی جمعیت مورد مطالعه: با توجه به نمودار مشخص می‌شود انتخاب تصادفی بیماران از توزیع مناسبی برخوردار بوده است. ۷۵

شکل ۳-۱۸. مشخصات نمونه‌های پلاک دندانی بیماران گروه ۱ (درصد رشد روی محیط بروسلا آگـار، ژن *ureC*، و ژن *cagA*) ۷۶
شکل ۳-۱۹. مشخصات نمونه‌های بیوپسی بیماران گـروه ۱: (رصـد رشـد روی محـیط بروسـلا آگـار، ژن *ureC*، و ژن *cagA*) ۷۶
شکل ۳-۲۰. مشخصات نمونه‌های پلاک دندانی و بیوپسی معده بیمارانی که ویژگی‌های یکـسانی داشـتند. ۷۷
شکل ۳-۲۱. مشخصات نمونه‌های پلاک بیماران گروه ۲ (درصد رشد روی محیط بروسلا آگـار، ژن *ureC*، و ژن *cagA*) ۷۸
شکل ۳-۲۲. هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه پلاک دندانی در محیط بروسلا آگـار پـس از هفـت روز انکوباسیون ۷۸
شکل ۳-۲۳. هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه بیوپسی معده در محیط بروسلا آگـار پـس از پـنج روز انکوباسیون ۷۹
شکل ۳-۲۴. آزمایش مثبت اوره آز بر روی نمونه بیوپسی، پنج دقیقه پس از اندوسکوپی ۷۹
شکل ۳-۲۵. نتایج انجامPCR برروی نمونه‌های پلاک دندانی و بیوپسی معده بـا پرایمـر ژن *ureC* جهـت ساخت قطعه به سایز ۴۱۷ bp:چاهک ۱، ۳، ۵، و ۷: نمونه DNA استخراج شده از بیوپسی، چاهـک ۲، ۴، ۶، و۸ نمونه DNA استخراج شده از پلاک دندانی، M: مارکر DNA با سـایز ۱۰۰ bp، چاهـک ۹: کنتـرل منفی، چاهک ۱۰: کنترل مثبت ۸۰
شکل ۳-۲۶. نتایج انجام PCR بر روی نمونه‌های پلاک دندانی و بیوپسی معده با پرایمر ژن *cagA* جهـت ساخت قطعه‌ای به سایزbp ۵۰۶: M: مارکرDNA با سایز ۱۰۰ bp، چاهک ۱و۲: نمونه پلاک CagA منفی، چاهک۳و۴: نمونه بیوپسی CagA منفی، چاهک ۵، ۷، و۱۰: نمونه‌های پلاک دندانی CagA مثبت،چاهـک ۶، ۸، و ۱۱: نمونه‌های بیوپسی CagA مثبت، چاهک ۱۲: کنتـرل مثبـت. هلیکوبـاکتر پیلـوری اسـتاندارد سویه ATCC 53726 ..... ۸۰
شکل ۳-۲۷. set up پرایمر ژن *ureC*. چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک۲: کنترل منفی، M: مارکر DNA با سایز ۱۰۰ bp، چاهک ۳ و ۴: نمونه هلیکوباکتر پیلوری استاندارد سویه ATCC 26695 ..... ۸۱

شکل ۳-۲۸. set up پرایمر ژن *cagA*. چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک ۲: کنترل منفی، M: مـارکر DNA با سایز kbp ۱،چاهک ۴و ۵: نمونه‌های استاندارد *cagA* منفی، چاهک ۶، ۷، و ۸: نمونه هلیکوباکتر پیلوری استاندارد *cagA* مثبت سویه ATCC 53726..... ۸۱

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱. تاریخچه

در سال ۱۸۷۴، بوچر[1] وجود ارگانیسم‌های مارپیچی را در معده پستانداران گزارش کرد. تا سال ۱۹۰۰ این مطلب توسط دیگران نیزثابت شد و سالمون[2] نشان داد که باکتری‌های مارپیچی که سگ‌ها و گربه‌ها را آلوده می‌کنند، می‌توانند به موش‌ها نیز متقل شوند. این پدیده اخیراً در تکامل ایمنی‌سازی در برابر هلیکوباکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۱].

در ۱۹۰۶ برای اولین بار این باکتری‌ها توسط کرینیتز[3] در معده انسان دیده شد و تا پایان سال ۱۹۴۰ دو گزارش دیگر نیز در این زمینه منتشر گردید. این گزارش‌ها نشان داد که حدود ۴۰٪ افراد در معده خود حامل این نوع باکتری خاص هستند که در آن زمان گمان می‌شد نوعی اسپیروکت است [۲].

همه این مطالعات در اروپا انجام شده بود و متاسفانه نخستین مطالعات در امریکا چنین نتایجی در بر نداشتند؛ چنان‌که پالمر[4] در سال ۱۹۵۴ در کتاب "گاسترو انترولوژی" یادآور شد که نتوانسته است باکتری را در نمونه‌هایی که از معده ۱۱۸۰ بیمار از طریق مکش به دست آورده بود، پیدا کند.

در سال ۱۹۲۴ هم‌چنین موضوع دیگری مطرح شد و آن این بود که لوک[5] و وست[6] دریافته بودند که در معده انسان اوره آز به مقدار فراوان فعالیت دارد [۲].

در سال ۱۹۵۹ مشخص شد که این فعالیت بر اثر تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها از بین می‌رود و در نتیجه باید منشاء این آنزیم، باکتری باشد. به هر حال ارتباط بین اوره آز معده و باکتری‌های مارپیچی معده تا

[1] Botcher
[2] Salomon
[3] Kreinitz
[4] Palmer
[5] Luck
[6] West

سال ۱۹۸۴ مشخص نشد. در این مرحله به علت بی‌اعتقادی عمومی به این موضوع و نیز ناتوانی در کشت باکتری، پیشرفت کار متوقف شد.

هلیکوباکتر پیلوری برای اولین بار در مرکز مطالعات استرالیای غربی کشت داده شد، اما اولین گزارشات این مرکز چندان امیدوارکننده نبود [۳، ۴].

فانگ[1] با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی دیده بود که باکتری‌ها به سلول‌های بافت پوششی حمله نمی‌کنند و چنین نتیجه گرفت که این باکتری‌ها پاتولوژیک نیستند. به‌رغم این، وارن[2] روی این مساله پافشاری می‌کرد و مشاهدات جالبی داشت مبنی بر اینکه بسیاری از بیمارانی که ورم یا زخم معده داشتند با ارگانیسم‌های مارپیچی شکل یا شبیه کمپیلوباکتر آلوده شده بودند.

بنابراین، مارشال[3] را تشویق کرد که از طریق اندوسکوپی، از بافت معده نمونه‌برداری کرده و با استفاده از روش‌های مخصوص کشت کمپیلوباکتر که آن زمان در دسترس بود، آنها را کشت دهد. این کشت در مدت زمان معمول ۴۸ ساعت، منفی بود. اما با افزایش انکوباسیون به مدت ۵ روز کشت مثبت شد. مارشال این نظریه وارن را که ورم و زخم‌های معده و اثنی عشر به علت عفونت ایجاد می‌شوند، پذیرفت و آن را کامل کرد [۱].

در سال ۱۹۸۴، رولاسون[4]، استون[5]، و رادز[6] از یک بیمارستان در بیرمنگهام و استیر از بیمارستان ساتمپتون نیز گزارش کردند که بیماران مبتلا به ورم و زخم معده بیش از گروه کنترل سالم، به باکتری مارپیچی آلوده بودند. بنابراین، سه گروه بدون هیچ‌گونه ارتباطی با هم، رابطه هلیکوباکتر پیلوری را با این بیماری ثابت کردند [۵].

مارشال فکر می‌کرد باکتری جدید، یک کمپیلوباکتر است که در ناحیه دهانه معده دیده می‌شود و بنابراین آن را کمپیلوباکتر پیلوریدیس[7] نامید. سپس با توجه به دستور زبان، پیلوریدیس به پیلوری اصلاح شد و زمانی که متوجه شدند 16srRNA این باکتری مشابه 16srRNA کمپیلوباکتر نیست، کلمه

[1] Founge
[2] K.Warren
[3] B. Marshall
[4] Rolason
[5] Stone
[6] Rodz
[7] campylobacter pyloridis

کمپیلوباکتر به هلیکوباکتر[1] تغییر یافت و این گونه جدید رسماً به عنوان یک گونه مجزا در فهرست اسامی باکتری‌ها ثبت شد [۴، ۶].

۱-۲. مورفولوژی و فیزیولوژی

تنوع مورفولوژیکی قابل‌توجهی میان انواع گونه‌های *H. pylori* وجود دارد. شکل سلول‌ها از باسیل‌های ساده با فلاژل قطبی فاقد غلاف که کاملاً شبیه کامپیلوباکتر هستند تا اشکالی با پیچیدگی بیشتر؛ سلول‌های مارپیچی بلند با فیبرهای پری‌پلاسمیک فلاژل‌های چندتایی غلاف‌دار متفاوت است.

از میان گونه‌های معدی، هلیکوباکتر فلیس[2] از این جهت با بقیه متفاوت است که به جای فلاژل واجد فیبرهای پری‌پلاسمیک است [۷].

به‌طور کلی گونه *H. pylori* دارای چهار تا هشت فلاژل قطبی غلاف‌دار است که غالباً به‌صورت باسیل‌های خمیده و یا S شکل و گرم منفی که ۰/۵- ۰/۶ میکرومتر عرض و سه میکرومتر عرض دارد و پهنای آن نیز ۲/۶ میکرومتر است [۸].

غلاف فلاژل این ارگانیسم ادامه غشای خارجی دیواره سلولی است. برخی از فلاژل‌ها یک حباب انتهایی دارند. حین مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ماده‌ای مشابه گلیکو کالیکس گاهی در اطراف سلول‌ها دیده می‌شود. در کشت بر روی آگار، فرم‌های مارپیچی کمتر معمول هستند و سلول‌ها به‌صورت خمیده بیشتر دیده می‌شود.

H. pylori پس از قرار گرفتن در معرض هوا، پس از یک تا دو ساعت در هوای اتاق به فرم کوکوئید مبدل شده و در این حالت قابل کشت دادن نیست. در ضمن به‌نظر نمی‌رسد فرم‌های کوکوئید *H. pylori* بیماری‌زا باشند.

H. pylori برای رشد نیاز به (CO_2 (۳ -۵٪ و رطوبت بالا دارد. هیچ‌کدام از سویه‌های جنس هلیکوباکتر به صورت هوازی رشد نمی‌کنند و برای رشد نیاز به فراهم آوردن شرایط میکرو آئروفیلیک دارند. محیط کشت این باکتری باید حاوی مکمل‌های خون، هم‌چنین، سرم و نشاسته مشابه باشد.

[1] helicobacter
[2] helicobacter felis

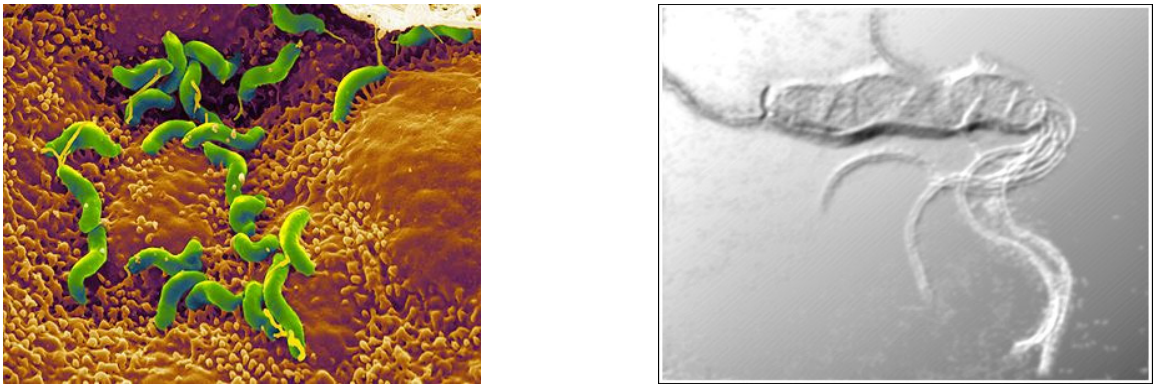
بهترین محیط کشت *H. pylori*، بروسلا آگار، کلمبیا آگار، به همراه ٪۱۰- ۵ خون اسب است. در صورتی که محیط واجد سرم جنین گوساله (FCS)[1] باشد، رشد بهتری مشاهده می‌شود.

تمامی سویه‌ها در۳۷ درجه سانتیگراد رشد و برای تولید کلنی به ۵- ۳ روز زمان نیاز دارند [۹].

کلنی‌های *H. pylori* گرد کوچک و خاکستری بوده و در صورتی‌که بیش از یک هفته انکوبه شوند بزرگتر از دو میلی‌متر می‌شوند. این کلنی‌ها خاصیت همولیتیک کمی روی محیط بلاآگار با خون اسب دارند، حرکت روی آگار دیده نمی‌شود.

سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری به‌صورت قابل‌توجهی مولد کاتالاز و اکسید آز هستند. از دیگر مشخصات کلیدی این باکتری احیای نیترات به نیتریت، هیدرولیز آلکالین فسفاتاز، هیدرولیز اوره، هیدرولیز ایندوکسیل استات، و فعالیت گاما گلوتامیل ترانس پپتداز است. تمامی سویه‌های این باکتری دی ان آز مثبت هستند [۱۰].

یکی از آنزیم‌های کلیدی و بهترین راه تشخیص این باکتری اوره آز است و حداکثر فعالیت آن در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و pH: ۲ -۸ است [۱۱، ۱۲].



شکل ۱-۱. تصویر هلیکوباکتر پیلوری با میکروسکوپ الکترونی

[1] Fetal Calf Serum

۱-۳. فرم زنده ولی غیر قابل کشت هلیکوباکتر پیلوری

H. pylori در مواجه با برخی شوک‌های محیطی مانند فراوانی اکسیژن، قرار گرفتن در مقابل مواد ضد میکروبی، وغیره از فرم باسیلی و خمیده خود مبدل به فرم کوکوئید می‌شود که دراین حالت قابل کشت دادن نیست.

این حالت دورمنت یا خفته‌باکتری اصطلاحاً فرم زنده ولی غیر قابل کشت (VBNC)[1] نامیده می‌شود که در شماری از پاتوژن‌ها نیز دیده می‌شود و از لحاظ عفونت‌زایی اهمیت قابل توجهی دارد [۱۳].

باکتری‌ها در فرم VBNC قادر به رشد روی محیط‌های روتین باکتریولوژیک و تشکیل کلنی نمی‌باشند، اما در عین حال زنده هستند و درجات خفیف فعالیت‌های متابولیک در آنها دیده می‌شود.

گرچه باید به یاد داشت وضعیت VBNC باکتری کاملاً از گرسنگی[2] آنها که در زمان کاهش متابولیسم و کمبود مواد غذایی ایجاد می‌شود، متفاوت است؛ زیرا باکتری‌ها در حالت گرسنگی کاملاً قابل کشت هستند.

مهم‌ترین شرایطی که باعث فرورفتن اغلب باکتری‌ها به فرم VBNC می‌شوند عبارت‌اند از: کمبود شدید مواد غذایی، انکوباسیون در حرارتی متفاوت از طیف دمایی نرمال رشد باکتری، غلظت افزایش یافته اسموتیک (مثلاً آب دریا)، غلظت بالای اکسیژن، و قرار گرفتن در معرض نور سفید.

چه باکتری‌ها در فرم VBNC قادر به ایجاد عفونت کامل در انسان باشند یا نه، این وضعیت فیزیولوژیک اهمیت فراوانی دارد، زیرا دیده شده در شماری از پاتوژن‌ها، باکتری در حالت VBNC قادر به آغاز مراحل ابتدایی عفونت در میزبان خود است، هم‌چنین بر اساس بیانیه اخیر سازمان بهداشت جهانی، مبنی بر اهمیت وجود فرم VBNC باکتری‌ها در غذا، باید با باکتری در این فرم مانند باکتری ویرولان برخورد کرد.

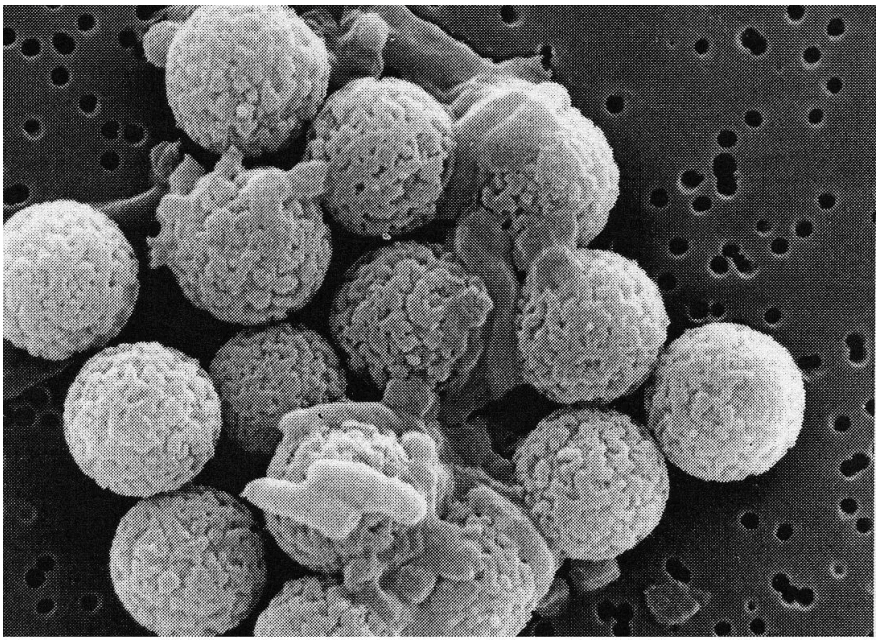
مطالعات صورت گرفته برروی *H. pylori* حاکی از وجود DNA این باکتری در آب رودخانه، آب چاه، فاضلاب، و آب زیر زمینی بوده و گمان بر این است که ارگانیسم مزبور قابلیت انتقال از طریق آب به فرم دهانی- مدفوعی را داراست. مخزن *H. pylori* و راه اصلی انتقال آن هنوز شناخته نشده است.

[1] Viable But Non-Culturable
[2] starvation

با این وجود کاملاً اثبات شده است که این باکتری زمانی که با محیط آبی مواجه می‌شود به فرم VBNC فرو می‌رود و این وضعیت ارتباط مستقیمی با دمای محیط نیز دارد [۱۴].

سلول‌ها تا ۲۶ ساعت پس از ورود به وضعیت VBNC قادر به تولید رونوشت‌های DNA هستند. نهایتاً این نکته نیز تایید شده است که فرم VBNC هلیکوباکتر پیلوری در مقابل آنتی‌بیوتیک‌هایی که معمولاً در موارد زخم معده تجویز می‌شوند کاملاً مقاوم است [۱۵].

در ضمن *H. pylori* تا زمانی که وارد بدن یک میزبان مناسب شود و موفق به ایجاد دور کامل عفونت گردد، حالت دورمنت خود را حفظ کرده و در محیط باقی می‌ماند [۱۶].



شکل ۱-۲. فرم زنده ولی غیر قابل کشت هلیکوباکتر پیلوری در نمونه آب

۱-۴. محل زندگی

انواع گونه هلیکوباکتر غالباً در مخاط معده انسان و شمار کثیری از میزبان‌های پستاندار، مانند سگ‌ها، گربه‌ها، گوسفندها، خوک‌ها، و دام‌ها زندگی می‌کنند.

جداسازی این ارگانیسم از نقاط خارج از معده، ندرتاً صورت می‌گیرد، اما امروزه محققان قادر به جداسازی این باکتری از پلاک دندانی، بزاق، و مدفوع هستند.

H. pylori در محیط طبیعی شامل خاک، آب رودخانه، و آب دریاها نیز یافت می‌شود، اما از آنجا که جداسازی این باکتری از چنین مکان‌هایی تنها توسط PCR امکان‌پذیر است، هنوز از احتمال زنده ماندن آن در طبیعت مطمئن نیستیم.

سطح مخاط معده، اصلی‌ترین محل زندگی *H. pylori* است. باکتری‌ها درون و زیر لایه موکوس زندگی می‌کنند. در این موقعیت pH تقریباً خنثی است. اکثر سوش‌های *H. pylori* درسطح سلول‌های اپی‌تلیال یافت می‌شوند. اما هر نقطه‌ای از معده شانس آلوده شدن با این باکتری را دارد [۱۷].

مناطقی که در معده، دوازده، یا هر نقطه دیگری در مجاری گوارشی دچار متاپلازی می‌شوند در خطر آلوده شدن با *H. pylori* هستند.

بررسی با میکروسکوپ الکترونی گویای آن است که به سلول‌های مخاط معده انسان چسبیده و گاهی موجب ایجاد پداستال می‌شود. *H. pylori* قادر است مژک‌ها را از کار بیاندازند، سلول‌ها را صاف کند، ماده تشکیل دهنده اسکلت سلولی را تخریب نماید، و کمپلکس‌های درون سلولی را تغییر دهد.

شکل ۱-۳. باکتری‌های کلونیزه شده در مخاط معده