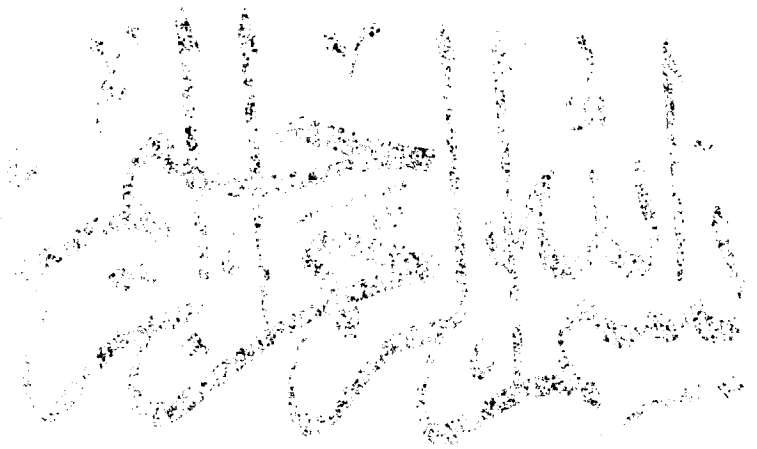


هدیه
صحافی نوس
(مشهد)
۸۴۲۹۷۴۴

۴۸۳۸۶

تذهیب شماره ۱۹۰ ـ فرهنگسرای میردشتی ـ تهران : ۲ـ۶۴۹۰۶۶۱ ـ مشهد : ۰۵۱۱ـ۸۵۴۴۹۵۱ ـ حق چاپ محفوظ (اثر هوشنگ نعمتی)

دانشگاه الزهرا (س)

پایان نامه کارشناسی ارشد ۱۳۸۲/۷/۲۰

« میکروبیولوژی »

عنوان :

غربالسازی کودکان و نوجوانان آلوده به عفونت هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روشهای غیر تهاجمی جستجوی آنتی ژن مدفوعی و کشت مدفوع

استاد راهنما :

خانم دکتر طاهره فلسفی

نگارش :

نرگس ولی زاده

۴۸۳۸۶

تابستان ۸۲

تقدیم به پدر گرامیم

و

وجود پر از مهر مادر عزیزم

به

خواهر عزیزم نجمه

که تجلی گاه آرزوهایم آینده روشن اوست

تقدیم به مشوق اصلی راهم

همسر عزیزم

مهربان صبوری که با نسیم محبت او این پایان نامه تحقق یافت

من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق

از تمامی عزیزانی که در ارائه هر چه بهتر این پایان نامه مرا یاری نموده اند، اساتید ارجمندم سرکار خانم دکتر طاهره فلسفی و خانم فاطمه مبشری که با راهنمایی و همرامی آنها این تحقیق میسر شد، جناب آقای دکتر حاجیان تهرانی، آقای دکتر بوترابی،آقای روزبهانی و سایر پرسنل محترم آزما یشگاه تحقیقاتی پیشتاز طب زمان که همکاری بسیاری با من نموده اند، صمیمانه سپاسگذارم و زحمات تمامی این عزیزان را ارج می نهم.

فهرست

۱- فصل اول ۱

۱-۱ تاریخچه ۲

۱-۲ طبقه بندی ۵

۱-۳ اپیدمیولوژی ۷

۱-۴ نحوه انتقال ۹

۱-۵ ویژگیهای میکروبشناسی هلیکوباکترپیلوری ۹

۱-۵-۱ مورفولوژی ۱۰

۱-۵-۲ دیواره سلولی و غشاء خارجی هلیکوباکترپیلوری ۱۲

۱-۶ ژنوم هلیکوباکترپیلوری ۱۴

۱-۷ فیزیولوژی هلیکوباکترپیلوری ۱۵

۱-۸ خصوصیات بیوشیمیایی ۱۶

۱-۹ شاخص های پاتوژنیک هلیکوباکترپیلوری ۲۱

۱-۱۰ بیماریهای مرتبط با هلیکوباکترپیلوری ۲۴

۱-۱۰-۱ هلیکوباکترپیلوری و التهاب مزمن معده ۲۶

۱-۱۰-۲ هلیکوباکترپیلوری و زخمهای گوارشی (Peptic ulcer diseases) ۲۷

۱-۱۰-۳ مکانیسم ایجاد زخم دوازدهه توسط هلیکوباکترپیلوری ۲۷

۱-۱۰-۴ هلیکوباکترپیلوری و زخم معده ۲۸

۱-۱۰-۵ عفونت هلیکوباکترپیلوری در کودکان ۲۹

۱-۱۰-۶ عفونت هلیکوباکترپیلوری و سرطان معده ۳۱

۱-۱۰-۷ مکانیسم ایجاد سرطان معده توسط هلیکوباکترپیلوری ۳۴

۱-۱۱ پاسخ ایمنی در برابر هلیکوباکترپیلوری ۳۵

۱-۱۲ تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری ۳۷

۱-۱۲-۱ روش کشت میکروارگانیسم ۳۸

۱-۱۲-۲ بافت شناسی ۳۹

۱-۱۲-۳ تست اوره از سریع ۴۰

۱-۱۲-۴ روشهای مبنی بر انجام PCR بر روی نمونه بیوپسی

۵-۱۲-۱ روشهای تشخیص غیرتهاجمی ۴۰
۱-۵-۱۲-۱ سرولوژی ۴۰
۲-۵-۱۲-۱ تستهای تنفس اوره ۴۲
۳-۵-۱۲-۱ کشت مدفوع ۴۲
۴-۵-۱۲-۱ تشخیص DNA هلیکوباکترپیلوری با استفاده از PCR ۴۴
۵-۵-۱۲-۱ تشخیص آنتی ژنهای هلیکوباکترپیلوری در مدفوع ۴۵
۱۳-۱ درمان ۴۷
۱۴-۱ واکسیناسیون ۴۹

۲- فصل دوم : مروری بر پیشینه تحقیق

۳- فصل سوم مواد وروشها

۲-۱ دستگاهها و وسایل موردنیاز ۵۴
۲-۳ مواد، محیطهای کشت، مکمل محیطها، معرفها ورنگهای لازم جهت کشت ۵۵
۳-۳ دستگاههای موردنیاز جهت انجام الیزا ۵۵
۴-۳ مواد و وسایل موردنیاز جهت الیزا ۵۵
۵-۳ طرز تهیه محیطهای کشت ۵۶
۱-۵-۳ محیط بلادآگار هلیکوباکترپیلوری ۵۶
۲-۵-۳ محیط تیوگلیکولات ۵۷
۳-۵-۳ محیط کشت اوره هلیکوباکترپیلوری ۵۸
۴-۵-۳ محیط بلوهوریزونت آگار ۵۸
۵-۵-۳ محیط نیترات ۵۹
۶-۵-۳ محیط هیپورات ۵۹
۷-۵-۳ محیط نگهدارنده ۶۰
۶-۳ طرز تهیه رنگهای گرم برای رنگ آمیزی ۶۰
۱۰-۳ انجام تست کاتالاز ۶۱
۱۱-۳ انجام تست اکسیداز ۶۱
۱۲-۳ طرز تهیه لوله های شماره ۰/۵ ، ۳ و ۵ مک فارلند ۶۲

۳-۱۳ جمع آوری و نگهداری نمونه ها ۶۳
۳-۱۴ کشت نمونه های بیوپسی ۶۳
۳-۱۵ کشت نمونه های مدفوع ۶۴
۳-۱۶ تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از مدفوع کودکان ۶۵
۳-۱۶-۱ طرز تهیه محیطهای آنتی بیوگرام ۶۶
۳-۱۶-۲ انجام روش دیسک دیفیوژن ۶۶
۳-۱۶-۳ انجام روش رقت آگار ۶۶
۳-۱۷ اسلاید آگلوتیناسیون تست ۶۷
۳-۱۸ تست الیزا ELISA ۶۷

۴- فصل چهارم: نتایج

۴-۱ نتایج استانداردکردن تست الیزا ۷۲
۴-۱-۱ خصوصیات سویه های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه بیوپسی ۷۲
۴-۱-۲ بررسی های انجام شده روی نمونه بیوپسی ۷۳
۴-۱-۳ ارتباط بین تست سریع اوره آز، کشت بافت و جستجوی آنتی ژن در مدفوع ۷۴
۴-۲ توزیع درصد فراوانی بیماران برحسب جنس ۷۵
۴-۳ توزیع درصد فراوانی بیماران برحسب گروه سنی ۷۶
نمودار هیستوگرام میزان درصد فراوانی گروههای سنی مختلف ۷۷
نمودار فراوانی عفونت برحسب گروه سنی ۷۸
نمودار هیستوگرام میزان درصد فراوانی بیماران برحسب جنس ۷۹
۴-۴ توزیع درصد فراوانی بیماران برحسب شکایت اصلی ۷۹
۴-۵ توزیع درصد فراوانی بیماران برحسب سابقه عفونت در خانواده ۸۰
۴-۶ توزیع درصد فراوانی بیماران برحسب مناطق مختلف تهران ۸۲
۴-۷ نتایج کشت نمونه های مدفوع براساس روشهای استفاده شده ۸۲
۴-۸ توزیع درصد فراوانی بیماران با استفاده از اسلاید آلگوتیناسیون نمونه مدفوع ۸۳
۴-۹ مقایسه روشهای کشت و جستجوی آنتی ژن در مدفوع ۸۳
۴-۱۰ نتایج آنتی بیوگرام سوشهای جدا شده از مدفوع

۱۱-۴ خصوصیات سوشهای جدا شده از مدفوع

۵- فصل پنجم : بحث

۶- **فصل ششم : منابع**

چکیده

هلیکوباکترپیلوری عمده ترین سبب گاستریت مزمن، زخم اثنی عشر و معده، و یکی از عوامل مولد سرطان معده می باشد. شروع عفونت مزبور غالبا در کودکی است. در حال حاضر، بهترین طریقه تشخیص عفونت فعال، انجام تست گوناگون بر روی نمونه بیوپسی است ولی انجام آندوسکوپی در کودکان مشکل می باشد لذا ابداع روشی غیرتهاجمی راهکاری برای این مشکل است . به منظور راه اندازی این روش ۲۰ کودک و نوجوان که به مرکز طبی کودکان امام خمینی مراجعه کرده و سمپتومهای بیماری و مشاهدات آندوسکوپی دال برعفونت فعال داشته و تست اوره آز سریع آنها اکثرا مثبت بود، انتخاب گردیدند. سپس نمونه های بیوپسی و مدفوع آنها به دو روش کشت ارگانیسم و جستجوی آنتی ژن اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از تست های اسلاید آگلوتیناسیون (آنتی بادی مونوکلونال) و ELISA (آنتی سرم پلی کلونال) مورد بررسی قرار گرفتند. برای کشت از محیط های کامپی بلادآگار اصلاح شده - (Modified –Campy blood- Agar) و بلوهوریزونت آگار (Bleu Horisont Agar) استفاده گردید برای انجام آزمون الیزا از کیت جدید Equipar و به عنوان شاهد مثبت و منفی، از سویه های خالص شده هلیکوباکترپیلوری و کامپیلوباکتر ژژونی به ترتیب استفاده گردید.

سپس تعداد ٤٣٠ نمونه مدفوع که از کودکان و نوجوانان ۱۸-٤ سال از مناطق مختلف تهران جمع آوری گردیده بودند به روشهای فوق مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مورد ۲۰ بیمار شاهد، هماهنگی بسیار خوبی بین نتایج تست سریع اوره آز برروی نمونه بیوپسی ونتایج جستجوی آنتی ژن، بویژه الیزا مشاهده گردید.

٤٦/٩٧٪ از ٤٣٠ نمونه مدفوع بررسی شده به توسط تست الیزا، مثبت بودند در حالی که نتایج اسلاید آگلوتیناسیون آنها ۲۹/۱٪ مثبت بود . کشت مدفوع با استفاده از ماده مهارکننده اسیدهای صفراوی موفقیت آمیز بود. میزان عفونت در دوجنس تفاوت معنی داری نشان نداد اما میزان عفونت در گروههای سنی مختلف، تفاوت داشت و با افزایش سن عفونت بالا می رود. هم چنین تفاوت قابل ملاحظه ای بین مناطق مختلف نمونه گیری مشاهده گردید.

نتایج فوق دال بر موثر و دقیق بودن روش غیرتهاجمی جستجوی آنتی ژن هلیکوباکترپیلوری در مدفوع بویژه الیزا برای جستجوی عفونت است. مثبت بودن ٤٧/٩٧٪ از کودکان تست شده می تواند در رابطه بامیزان بالای عفونت کودکان باشد.

فصل اول

مقدمه

۱-۱ تاریخچه

وجود باکتریهای مارپیچی شکل در معده انسان برای اولین بار در سال ۱۸۷۵ کشف شدند. این باکتریها توسط Bottcher و Letulle در کف و حاشیه های زخم های معده مشاهده شدند و بدین ترتیب اولین نظریه در مورد اینکه باکتریها سبب زخم معده می شوند، ارائه شد. در سال ۱۸۸۹ باکتریهای مارپیچی در ترشحات معده بوسیله Jaworski پیدا شد. متعاقباً در سال ۱۸۹۲ Bizzozero وجود باکتریهای مارپیچی شکل را در مخاط معده سگ گزارش نموده و این باکتریها را درون سیتوپلاسم واکوئلهای سلولهای کناری معده پیدا کرد و حدود صدسال بعد یعنی در سال ۱۹۹۶ بود که این ارگانیسم ها برای همین کشف به نام *Helicobacter Bizzozeronii* نامیده شدند. چهار سال بعد یعنی در سال ۱۸۹۶ بود که سوشها به طور موفقیت آمیزی با هلیکوباکتر بیزوزرونی توسط Salomon آلوده شدند. سرانجام در سال ۱۹۰۶ Krienitz و Luger در سال ۱۹۱۷ وجود باکتریهای مارپیچی شکل را در نسوج نکروزه یک بیمار مبتلا به سرطان معده گزارش کردند.[۱۸۶]

ارتباط بین باکتری های مارپیچی شکل و التهاب معده در انسان و میمون توسط Doenges در سال ۱۹۳۸ گزارش شد.[۳۱] در سال ۱۹۷۵ مطالعات هیستوپاتولوژیک توسط Steer ارتباط یک باکتری مارپیچی شکل را با التهاب معده نشان داد و از آن زمان به بعد تحقیق گسترده ای درباره میکروبشناسی آن برای جداسازی باکتری جدید و ارتباط احتمالی آن با بیماریهای معدی گوناگون آغاز شد.[۱۱۷و۳۱و۹۲و۳۸] در سال ۱۹۷۲ R.waren یک پاتولوژیست استرالیایی, به باکتریهای خمیده در نمونه های بیوپسی معده که برای آزمایشات پاتولوژیکی فرستاده می شد توجه کرد. این ارگانیسم ها در درون مخاط معده وجود نداشتند اما در لایه های مخاطی دربرگیرنده بافت حضور داشتند. بعد یک پزشک جوان بنام باری مارشال B. Marshall به مشاهدات وارن علاقمند شد و شروع به جداکردن ارگانیسم از نمونه های بیوپسی نمود از آنجائیکه میکروارگانیسم های

مزبور ظاهری خمیده و گرم منفی داشتند آنها از روش های جدا کردن کمپیلوباکتر و گرماگذاری در شرایط میکروآئروفیلیک استفاده کردند و از آن جهت، که اغلب کمپیلوباکترها تحت این شرایط در مدت ۴۸ ساعت رشد می کنند پلیت هایی که در مدت ۳ روز رشد نداشتند دورانداخته می شدند. کشت های اولیه از تقریبا ۲۰ بیمار منفی بودند اما به طور اتفاقی یک کشت برای مدت ۵ روز به علت تعطیلی عید پاک گرماگذاری شد و کلنی ها رویت شدند.[۲۹]

بدین ترتیب در سال ۱۹۸۲ مارشال و ۱۹۸۳ وارن موفق به کشت میکروارگانیسمی شبیه کمپیلوباکتر مارپیچی، که در معده انسان رشد می کند، شدند.[۲۹و۸۱] و متعاقب آن در سال ۱۹۸۵ ارتباط آن با زخم های پپتیک (peptic ulcers) نشان داده شد.[۳۸و۹۲و۱۱۷]

۲-۱ طبقه بندی

در سال ۱۹۸۳ هنگامی که برای اولین بار هلیکوباکتر پیلوری از دیگر میکروارگانیسم ها متمایز گردید. مارشال آن را به دلیل خصوصیات شکلی مشابه و رشد در محیط اختصاصی کمپیلوباکتر , میکروارگانیسم شبیه کمپیلوباکتر نامید. در سال ۱۹۸۴مارشال آنرا کمپیلوباکتر پیلوریدیس نامید که بعدا به کمپیلوباکتر پیلوری که از نظر لغوی صحیح تر بود تغییر یافت . اما به دلیل تفاوتهای زیادی که با کمپیلوباکتر داشت از جمله آنالیز ۱۶s rRNA در سال ۱۹۸۹ توسط godwin و همکارانش در جنس جدید هلیکوباکتر قرار گرفت.[۱۰۵]

نزدیکترین جنس های مرتبط به هلیکوباکتر عبارتند از: ولینلا Wolinella, کمپیلوباکترو تیولوم[۳۱] به طور کلی تا به امروز حداقل ۲۳ گونه رسماً در جنس هلیکوباکتر قرار گرفته اند و تعدادی نیز رسماً نامگذاری نشده اند.[۱۰۵و۳۵] که در بین آنها ۸ گونه در معده انسان وحیوانات زندگی می کنند و توانسته اند آنها را کشت دهند. مهمترین آنها عبارتند از *H Pylori* که در معده انسان و میمون رزوس وجود دارد

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران

H.acinonychis با نام قبلی *H. acinoayx* در معده چیتا *H.bizzozeroni* در معده سگ [۲،۱۰۲و۶۵]. و بقیه عبارتند از *H.bovis* در معده گوساله *H.felis* در معده سگ و گربه، *H.Heilmannii* در معده پریماتهای غیرانسان، *H.suis* در معده خوک، *H.mustelae* در معده راسو، *H.salomonis* در معده سگ.[۱۰۵]

درمیان آنها، *H.mustelae* که در سال ۱۹۸۴ از معده راسو جدا شده، شباهتهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی زیادی به *H.pylori* دارد.[۲۹و۱۰۵] و تمایز بین *H.acinonyx* و *H.pylori* که از نظر ژنتیکی خیلی به هم نزدیکند نیز مشکل است.[۱۰۲و۱۰۰] بعضی از اعضای این جنس در روده زندگی می کنند که مهمترین آنها عبارتند از:

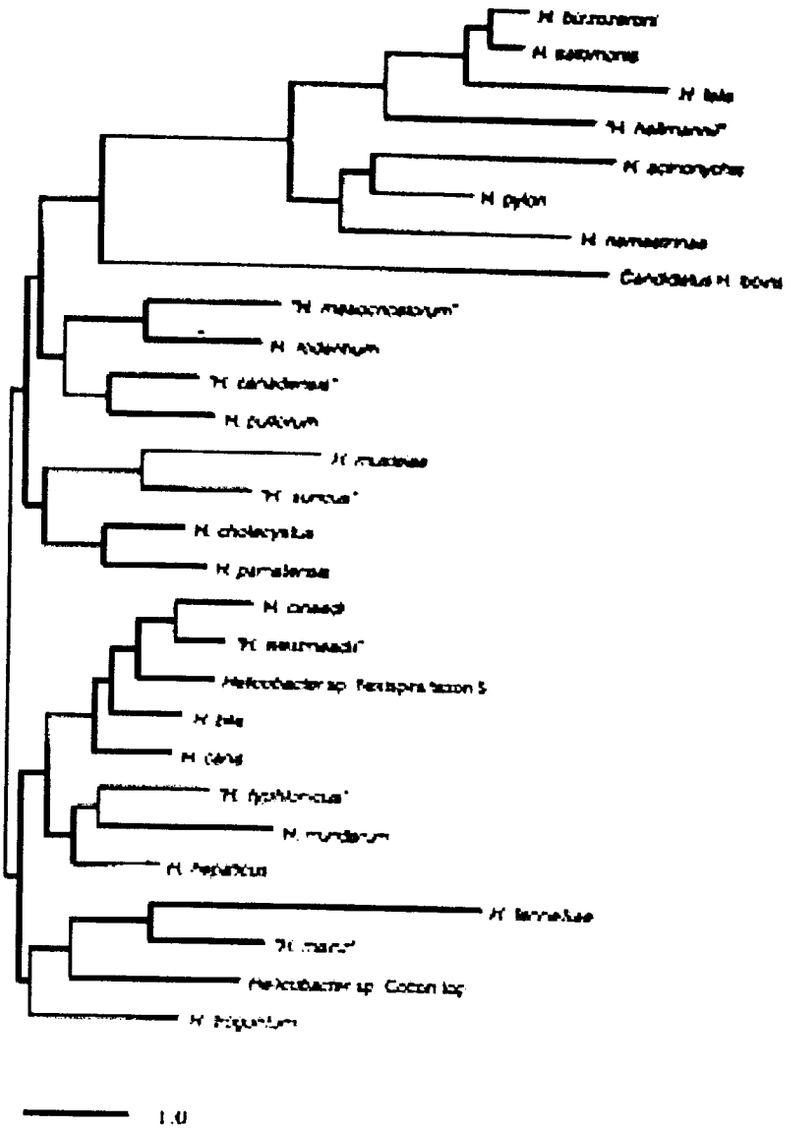
H.bilis در روده انسان، موش و سگ، *H.canis* در روده انسان و سگ، *H.cinaedi* در روده انسان، هامستر، *H.cholecystus* در روده هامستر، *H.fennelliae* در روده انسان، *H.hepaticus* در روده موش، *H.muridarum* در روده موش و موش صحرایی، *H.pullorum* در روده انسان و جوجه، *H.mainz* در روده انسان *H.rodentium* در روده موش.[۱۰۵] و *H.rappini* در روده سگ، موش و انسان[۳۵]

بعضی از گونه های نامبرده شده زئونوتیک (مشترک بین انسان و حیوان) هستند مثل *H. canis* , *H . pullorum* , *H .cinaedi* و *H.rappini* [۳۵]

اخیراً نیز برای اولین بار یک سوش جدید از هلیکوباکترپیلوری از کبد یک زن ۲۳ ساله که به علت بیماری ویلسون دچار سیروز شده بود جدا شده است. جداسازی آن از کبد تأیید می کند که هلیکوباکتر پیلوری، کبد انسان را نیز می تواند کلنیزه کند.

در بین اعضای جنس هلیکوباکتر گونه های *H.nemestrinae*، *H.acinonyx*، *H.bilis*، *H.felis*، *H.salomonis*، نیز پروتئین مختص گونه هلیکو باکتر پیلوری را بیان می کنند . این پروتئین ۲۶کیلو دالتون وزن دارد و مشابه یک الکیل هیدروپراکسید ردوکتاز است و بیماران آلوده، آنتی بادی در مقابل این پروتئین تولید می کنند. نقش این پروتئین، حمایت در مقابل فشار اکسیداتیو است.[۶۵]

شکل زیر شجره فیلوژنیکی گونه های هلیکو باکترپیلوری رابراساس ترادف ۱۶ s rRNA نشان میدهد.



تاکسونومی H.pylori 26695 نیز در زیر نشان داده شده است [۱۲۱]

Kingdom	:	Bactaria
Intermediate Rank 1	:	Proteobacteria
Intermediate Rank 2	:	Epsilon sudivision
Intermediate Rank 3	:	Helicobacter group
Genus	:	Helicobacter
Spectes	:	pylori
Strain	:	26695