مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۳، ۱۳۶-۱۳۱

مقایسه ارزش روشهای مختلف تشخیصی در تعیین آلودگی گربه‌ها به هلیکوباکترهای معدی

شهرام جمشیدی[۱]* بهارک اختردانش[۲] مرجان محمدی[۳] فرهنگ ساسانی[۴] سعید بکایی[۵] تقی زهرایی صالحی[۶] محمد مهدی دهقان[۱]

[۱] گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
[۲] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان - ایران
[۳] گروه تحقیقات هلیکوباکتر، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران - ایران
[۴] گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
[۵] گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
[۶] گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۲ بهمن ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۴ اردیبهشت ماه ۱۳۸۵)

چکیده

استفراغ مزمن یکی از اختلالات متداول گوارشی در گربه‌ها به‌شمار می‌رود که در بیشتر موارد به دنبال گاستریت مزمن ایجاد می‌شود. در اکثریت موارد هیچ علت مشخصی در ایجاد گاستریت‌های مزمن مورد تشخیص قرار نگرفته است، با این حال حضور عوامل هلیکوباکتری در نمونه‌های حاصل از بیوپسی معده نقش این عوامل در ایجاد ضایعات گاستریت مزمن گربه‌ها را بیشتر کرده است. این مطالعه با هدف مقایسه ارزش روش‌های مختلف تشخیصی در تعیین آلودگی معده گربه‌ها به اجرام هلیکوباکتر صورت گرفته است. بدین منظور از ۳۰ قلاده گربه ولگرد و ۲۷ قلاده گربه خانگی که ناشتا نگه داشته شده بودند با استفاده از گاستروسکوپ اطفال و پس از ایجاد بیهوشی از دو منطقه آنتروم و بادی نمونه‌برداری به عمل آمد. وضعیت آلودگی به اجرام هلیکوباکتری با انجام آزمایشات سیتولوژی، تست سریع اوره‌آز، هیستوپاتولوژی و واکنش زنجیره پلیمراز تعیین شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده گربه‌های خانگی در کلیه روش‌های تشخیصی به‌شکل معنی‌داری بیش از گربه‌های ولگرد به‌گونه‌های هلیکوباکتر آلوده بودند. در هیچیک از گربه‌های تحت مطالعه آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری مشاهده نشد و بیشتر آنها دارای آلودگی مختلط به دوگونه هیلمانی و فلیس بودند. حساسیت و ویژگی روش‌های تشخیصی مختلف در مقایسه با واکنش زنجیره پلیمراز، در روش تست سریع اوره‌آز به ترتیب ۹۳ و ۴۴ درصد، در رنگ‌آمیزی گیمسای بافتی ۹۷ و ۹۲ درصد و در سیتولوژی ۹۸ و ۹۴ درصد به‌دست‌آمد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه بسیاری از گربه‌ها می‌توانند بدون بروز هیچ‌گونه علامت بالینی به هلیکوباکترهای معدی آلوده باشند. سیتولوژی ساده‌ترین و سریع‌ترین روش غربالگری اولیه در تعیین وضعیت آلودگی هلیکوباکتری معده بود. همچنین با توجه به شباهت مرفولوژیک دوگونه هیلمانی و فلیس و عدم امکان کشت برخی از گونه‌ها، واکنش زنجیره پلیمراز یکی از بهترین روش‌های تعیین هویت گونه‌های هلیکوباکتری آلوده کننده معده گربه‌ها است.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر، گربه، گاستروسکوپی، هیستوپاتولوژی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه

آدنوکارسینوم معده که عوامل هلیکوباکتری در ایجاد آن مقصر قلمداد می‌شوند دومین سرطان شایع و چهاردهمین عامل مرگ و میر انسان محسوب می‌شود(۷). هرچند نقش این ارگانیسم‌های مارپیچی شکل گرم منفی در ایجاد گاستریت و تومور معدی در انسان به اثبات رسیده است اما در خصوص بیماریزایی آنها در حیوانات با توجه به حضور تعداد زیاد این عوامل در معده هنوز بحث‌های زیادی وجود دارد و برخی آنها را به عنوان فلور طبیعی معده تلقی می‌نمایند(۳).

پیچیدگی‌های موجود از نظر بیماریزایی این عوامل و همچنین وجود احتمال انتقال بیماری از حیوانات به انسان باعث گردیده است تا بررسی‌های زیادی بر روی این ارگانیسم‌ها در حیوانات نیز به عمل آید. به منظور تشخیص آلودگی‌های هلیکوباکتری در انسان و حیوانات از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. از روش‌های غیرتهاجمی تشخیصی در انسان می‌توان به بررسی سطح عیار هلیکوباکتری در سرم اشاره نمود. این روش گرچه در انسان به عنوان یک آزمایش غربالگری اولیه کاربرد فراوانی پیدا کرده است، با این حال نتایج بررسی‌های صورت گرفته در حیوانات نشان داده است که این آزمایش در مقایسه با انسان از حساسیت بسیار پایین تری برخوردار است(۱۲). لذا عمده روش‌های تشخیص آلودگی‌های هلیکوباکتری تهاجمی بوده و بر روی نمونه‌های بیوپسی تهیه شده توسط گاستروسکوپی انجام می‌شود.

در این مطالعه در گربه به عنوان یک مدل حیوانی مناسب جهت بررسی آلودگی به هلیکوباکترهای معدی، چهار روش تشخیصی بسیار متداول شامل: آزمایش سریع اوره آز، بررسی سیتولوژی، هیستوپاتولوژی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت تا با استفاده از نتایج آن محققین بتوانند با توجه به محدودیت‌ها و امکانات موجود در شرایط آزمایشگاهی و درمانگاهی بهترین روش تشخیصی را انتخاب نمایند. همچنین لازم به ذکر است در این مطالعه با توجه به قابل کشت نبودن برخی از سویه‌های متداول هلیکوباکتری در گربه‌ها از جمله هلیکوباکتر هیلمانی، روش کشت و جداسازی

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۳۰۹۵-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:shjamshidi@vetmed.ut.ac.ir

جدول ۱- توالی اولیگونوکلئوتیدی پرایمرهای به‌کار رفته در این تحقیق (۱۶).

ژن هدف	منبع	توالی پرایمر	قطعه تکثیر شده (bp)
16SrRNA genes of Helicobacter spp.	Germani (5) (1997)	(f): AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA (r): GTG CTT ATT CGT GAG ATA CCG TCA T	399
ureA and B genes of H. felis	Germani (5) (1997)	(f): GTG AAG CGA CTA AAG ATA AAC AAT (r): GCA CCA AAT CTA ATT CAT AAG AGC	241
reB genes of H. heilmannii	Neiger. (12) (1998)	(f): GGG CGA TAA AGT GCG CTT G (r): CTG GTC AAT GAG AGC AGG	580
ureB genes H. pylori	Clayton (2) (1992)	(f): GCC AAT GGT AAA TTA GTT (r): CTC CTT AAT TGT TTT TAC	411

اجرام مورد استفاده قرار نگرفته است، این درحالی است که در انسان و یا حیواناتی همچون سگ که دارای ارگانیسم‌های هلیکوباکتری قابل کشت هستند این روش نیز می‌تواند در کنار سایر روش‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از میکروسکوپ الکترونی جهت تشخیص تفریقی گونه‌های مختلف هلیکوباکتری و مورفولوژی آنها نیز توسط برخی از محققان پیشنهاد شده اما منوط به امکان دسترسی و وجود تجهیزات لازم بدین منظور خواهد بود و تنها جنبه کاربرد تحقیقاتی دارد (۶).

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۳۰ قلاده گربه ولگرد که با استفاده از تله زنده‌گیر از مناطق مختلف شهر تهران جمع‌آوری شده بودند و ۲۷ گربه خانگی که به منظور معاینات درمانگاهی رایج به درمانگاه دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع می‌شدند، استفاده گردید. وضعیت سلامتی در کلیه حیوانات از طریق معاینات بالینی و همچنین آزمایش شمارش سلول‌های خونی مورد تایید قرار گرفت. به منظور انجام گاستروسکوپی و امکان مشاهده کامل تمام بخش‌های مخاطی معده، کلیه حیوانات به مدت حداقل ۱۲ ساعت قبل از نمونه‌گیری ناشتا نگه داشته شدند. سپس با استفاده از ترکیب تیوپنتال سدیم داخل وریدی و آسپرومازین عضلانی و رعایت دوز پیشنهادی، تحت بیهوشی کامل و پس از قرار دادن حیوان در حال گماری استاندارد (به پهلوی چپ) با استفاده از گاستروسکوپ اطفال مدل VET-VU(Swiss) نمونه برداری با پنس بیوپسی مخصوص صورت گرفت. از هر منطقه ۴ نمونه بیوپسی جمع‌آوری و به منظور انجام آزمایشات زیر مورد استفاده قرار گرفت:

۱- نمونه اول به منظور بررسی وجود آنزیم اوره آز به محیط اوره انتقال داده شد. کلیه این نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد تا ۲۴ ساعت نگهداری می‌شدند و بر مبنای زمان تغییر رنگ محیط از زرد به قرمز به شرح زیر طبقه بندی گردیدند:

درصورت تغییر رنگ محیط تا ۲ ساعت نمونه ۳+، بین ۲ تا ۱۲ ساعت ۲+ و بین ۱۲ تا ۲۴ ساعت ۱+ در نظر گرفته می‌شد. در موارد عدم تغییر رنگ محیط تا ۲۴ ساعت نیز نمونه از نظر وجود آنزیم اوره آز منفی تلقی می‌گردید. لازم به ذکر است این طبقه‌بندی که بر مبنای روش پیشنهادی نایجرو هاپونن (۶،۱۲) صورت گرفته

جدول ۲- شرایط انجام PCR (۱۶).

گونه مورد بررسی	مرحله واسرشتی اولیه	دمای واسرشتی تکثیر ژن و کشیدگی	تعداد و زمان سیکلها	مرحله کشیدگی نهایی
Helicobacter spp.	95ºC for 5 mim	95ºC ,65ºC and 72ºC	40 for 1 mim	72ºC for 7 min
H .felis	94ºC for 5 mim	94ºC ,62ºC and 72ºC	40 for 1 min	72ºC for 10 min
H .heilmannii	94ºC for 3 mim	94ºC ,57ºC and 72ºC	35 for 1 mim	72ºC for 5 min
H .pylori	95ºC for 5 mim	94ºC ,45ºC and 72ºC	40 for 1 mim	72ºC for 10 min

است این امکان را فراهم خواهد ساخت تا برآوردی از میزان تراکم ارگانیسم‌های هلیکوباکتری و بالطبع آنزیم اوره آز در محیط بر مبنای زمان تغییر رنگ محیط اوره به عمل آید.

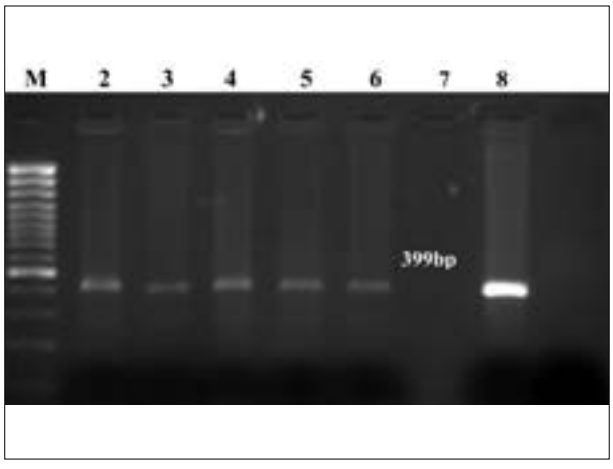
۲- نمونه دوم پس از تهیه گسترش فشاری بر روی لام به منظور بررسی سیتولوژی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور تمام نمونه‌ها پس از ثابت شدن در متانول با استفاده از گیمسا رنگ آمیزی شدند و به منظور حضور اجرام هلیکوباکتری در درشت نمایی روغنی مورد بررسی قرار گرفتند. در کلیه نمونه‌ها بر اساس میزان تراکم ارگانیسم‌های هلیکوباکتری و با استفاده از روش پیشنهادی هاپونن و نایجر طبقه بندی به شرح زیر صورت گرفت: حضور ارگانیسم به تعداد کمتر از ۱۰=۱+، حضور ارگانیسم بین ۱۰ تا ۵۰ ارگانیسم=۲+، حضور بیش از ۵۰ باکتری=۳+.

۳- نمونه سوم به منظور بررسی هیستوپاتولوژیک در داخل لوله محتوی فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارسال گردید. پس از فیکس شدن نمونه‌های ارسالی در داخل فرمالین و غوطه‌وری در پارافین، از آنها مقاطع هیستوپاتولوژیک تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین ائوزین و گیمسا رنگ آمیزی شدند. همچنین در نمونه‌های منفی در روش گیمسا از رنگ آمیزی اختصاصی نقره (وارتین استاری سیلور) به منظور تشخیص قطعی استفاده شد.

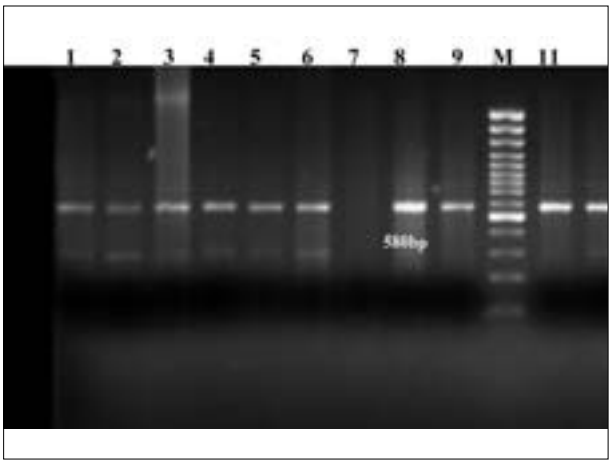
۴- نمونه چهارم پس از استخراج DNA توسط کیت (DNeasy tissue DNA extraction kit ,Qiagen ,USA) در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، جهت انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به آزمایشگاه تحقیقاتی هلیکوباکتر انستیتو پاستور ایران ارسال گردید. کلیه نمونه‌ها تا هنگام انجام آزمایش در فریزر ۷۰- نگهداری گردیدند. نمونه‌هایی که در بررسی با پرایمر اختصاصی جنس ۱۶SrRNA، آلوده به هلیکوباکتر تشخیص داده شدند برای تشخیص استرین هلیکوباکتر با پرایمر اختصاصی گونه (هیلمانی، فلیس، پیلوری) نیز مورد بررسی قرار گرفتند. (جداول ۱،۲). محصولات PCR در ژل آگاروز ۲ درصد به همراه اتیدیوم بروماید ۰/۰۳ درصد الکتروفورز گردید. سپس جهت بررسی حضور باندهای مورد نظر ژل‌های الکتروفورز شده با دستگاه UV مورد بررسی قرار گرفتند (تصاویر ۴-۱).

در نهایت کلیه یافته‌های جمع‌آوری شده از روشهای تشخیصی مختلف، با نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. جهت بررسی همخوانی بین روشهای مختلف تشخیصی نیز از ضریب کاپا استفاده گردید.

نتایج



تصویر۱- تکثیر ژن 16S rRNA.
شماره ۱ مارکر، شماره ۷ کنترل منفی، شماره ۸: کنترل مثبت.

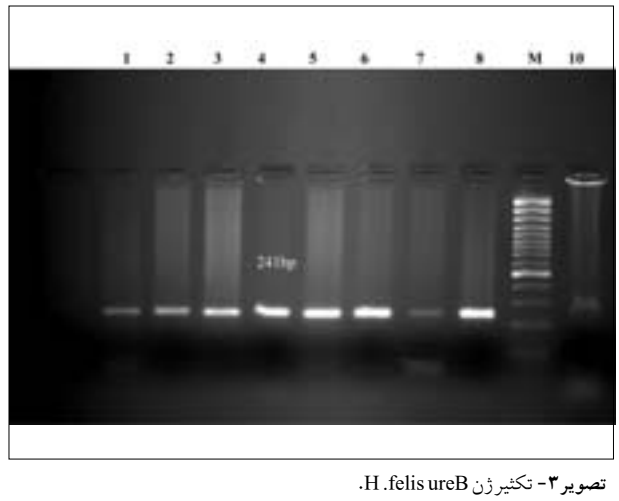


تصویر۲- تکثیر ژن H. helmanni ،ureB.
شماره ۷ کنترل منفی، شماره ۸: کنترل مثبت، شماره ۱۰ مارکر.

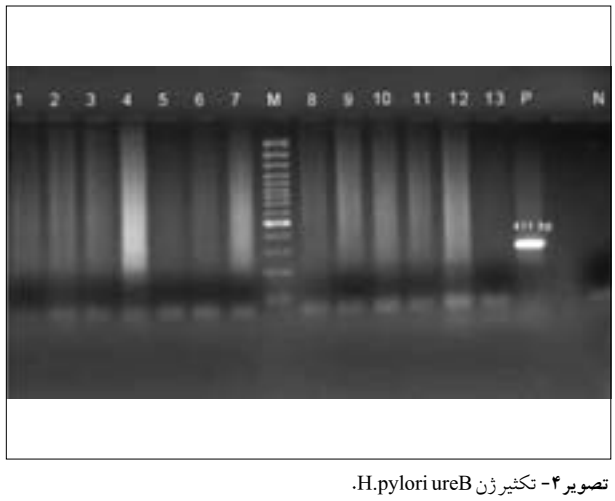
با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۰۰ درصد گربه‌های خانگی و ۵۶/۷ درصد گربه‌های ولگرد دارای آلودگی هلیکوباکتری بودند. براساس آزمون آماری مربع کای ابتلاء گربه‌های خانگی به ارگانیسم‌های هلیکوباکتری به شکل معنی داری بیشتر از گربه‌های ولگرد بود ($p<0/005$). همچنین بر اساس نتایج بدست آمده در این روش تشخیصی میزان آلودگی در ناحیه بادی ۷۸/۳ درصد و در آنتروم ۶۲/۴ درصد بدست آمد که با استفاده از آزمون آماری مک نمار این اختلاف بسیار معنی دار بود($p<0/001$). در عین حال ۵۰/۸ درصد گربه‌های تحت مطالعه آلودگی متقاطع با دو سویه فلیس و هیلمانی داشتند(جدول ۳). درصد شیوع هلیکوباکترهیلمانی در گربه‌های خانگی و ولگرد به ترتیب ۸۱ درصدو ۴۳/۳ درصد بود. لازم به یادآوری است که در هیچ یک از گربه‌های تحت مطالعه آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری وجود نداشت. بر اساس آزمون مربع کای، دو جمعیت گربه‌های خانگی و ولگرد از نظر شیوع هلیکوباکتر هیلمانی اختلاف معنی دار داشتند($p=0/007$). درخصوص آلودگی به هلیکوباکتر فلیس در دوجمعیت تحت مطالعه اختلاف آماری وجود نداشت($p=0/123$) و این ارگانیسم در ۶۶/۶ درصد گربه‌های خانگی و ۴۶/۷ درصد گربه‌های ولگرد مورد تشخیص قرار گرفت.

میزان آلودگی به هلیکوباکترهای معدی با استفاده از روش‌های تشخیصی به کار رفته در این مطالعه بر حسب مناطق مختلف معده در نمودار۱ نشان داده شده است. بر اساس رنگ آمیزی گیمسای بافتی در گربه‌های تحت بررسی بیشتر موارد آلودگی از نوع متوسط و خفیف (کمتر از ۵۰ ارگانیسم در ۱۰ میدان میکروسکوپی) بود و این روش رنگ امیزی نیز آلودگی ناحیه بادی را بیشتر از آنتروم نشان داد. سیتولوژی نیز شیوع آلودگی ناحیه بادی را به شکل معنی داری بیش از آنتروم نشان داد($p=/006$) با توجه به نتایج حاصل از آزمایش سریع اوره آز همانند روش گیمسا آلودگی ناحیه بادی بیشتر از آنتروم بود. همچنین این روش تشخیصی نیز نشان داد که آلودگی در گربه‌ها عمدتا به صورت خفیف یا متوسط (تغییر رنگ در زمان ۲ تا ۲۴ ساعت) وجود دارد.

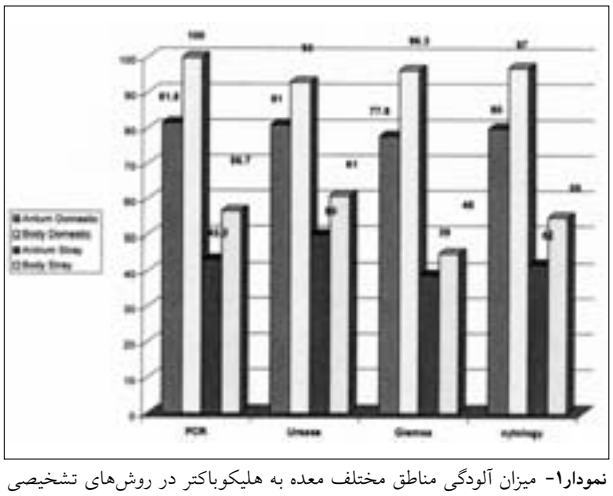
در مقایسه با PCR به عنوان آزمایش استاندارد حساسیت و ویژگی تست اوره آز ۹۳ و ۴۴ درصد، گیمسای بافتی ۹۷ و ۹۲ درصد و سیتولوژی ۹۸ و ۹۴ درصد بدست



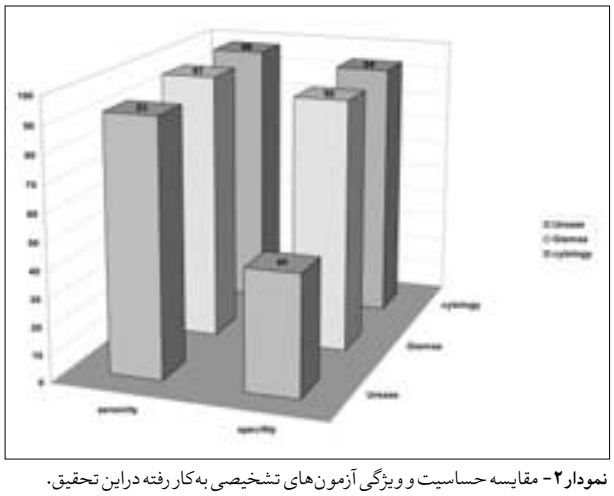
تصویر۳- تکثیر ژن H. felis ureB.
شماره ۸: کنترل مثبت، شماره ۹، مارکر، شماره ۱۰ کنترل منفی.



تصویر۴- تکثیر ژن H.pylori ureB.
P کنترل مثبت و N ستون مربوط به کنترل منفی و M مارکر را نشان می دهد.



نمودار۱- میزان آلودگی مناطق مختلف معده به هلیکوباکتر در روش‌های تشخیصی مختلف.



نمودار۲- مقایسه حساسیت و ویژگی آزمون‌های تشخیصی به‌کار رفته دراین تحقیق.

آمد(نمودار۲). ضریب کاپا که توافق بین نتایج حاصل از روش‌های مختلف تشخیصی را نشان می‌دهد در این تحقیق ۰/۵۵ برآورد گردید که حاکی از توافق نسبی بین آزمایشات مختلف تشخیصی به کار رفته در این تحقیق می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

میزان شیوع اجرام هلیکوباکتری در گربه‌های سالم ۴۰ تا ۱۰۰ درصد و در گربه‌های مبتلا به استفراغ نیز ۵۷ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است(۳،۱۵،۲۱). این در حالی است که کلیه این تحقیقات در گربه‌های خانگی صورت گرفته است و تا کنون گزارش جامعی از وضعیت آلودگی گربه‌های ولگرد به هلیکوباکترهای معدی وجود ندارد. شیوع کلی آلودگی به هلیکوباکترهای معدی در گربه‌های مورد بررسی در این تحقیق ۷۸/۳درصد برآورد گردید که با تحقیقات مشابه همخوانی دارد(۸،۱۲،۱۴،۲۱).

با توجه به وجود این اجرام در حیوانات سالم، نقش آنها در ایجاد گاستریت در دام‌های کوچک با آنچه در انسان توسط هلیکوباکتر پیلوری ایجاد می‌شود تا حدودی متفاوت خواهد بود. پاسخ آماسی محدود و عدم وجود علائم بالینی در بسیاری از سگ و گربه‌های آلوده به گونه‌های هلیکوباکتری به غیر از گونه پیلوری ممکن است نشان دهنده آن باشد که در حیوانات عوامل هلیکوباکتری بیش از آنکه در معده بیماریزا باشند، نقش کامانسال خواهند داشت و علائم بالینی در برخی از سگ‌ها و گربه‌ها بیش از آنکه به پاتوژنیسیته خود باکتری مربوط باشد حاصل از بین رفتن تحمل میزبان در برابر حضور این عوامل مقیم در معده خواهد بود. با این حال در خصوص نقش آنها در ایجاد گاستریت در دام‌های کوچک نیاز به بررسی‌های بیشتری خواهد بود(۳).

نکته قابل توجه در خصوص اختلاف آلودگی هلیکوباکتری در انسان و حیوانات که در نتایج این بررسی یافت شد وجود آلودگی‌های مختلط توسط گونه‌های متفاوت در گربه‌ها است. در بررسی حاضر تقریبا نیمی از گربه‌ها(۵۰/۸) دارای آلودگی همزمان گونه‌های فلیس و هیلمانی بودند. تحقیق اخیری که توسط وندن و بلاک و همکارانش در سال ۲۰۰۵انجام شد نیز شیوع بسیار بالای آلودگی مختلط (۶۲/۸درصد) در گربه‌ها را تایید می‌نماید(۱۹). این امر باعث خواهد گردید ارزش روش‌های تشخیصی سرولوژی و اوره آز در تفریق آلودگی‌های مختلط محدود بماند. در این گونه از آزمایشات تشخیصی تنها امکان تایید یا رد وجود عفونت وجود خواهد داشت و از آنجایی که در معده گربه‌ها تنوع گونه‌ای هلیکوباکتری موجود است و این روشها قادر به تشخیص تفریقی گونه‌ها نیستند، محدودیت کاربرد خواهند داشت. این در حالی است که در انسان با توجه به شیوع قابل توجه آلودگی منفرد به هلیکوباکتر پیلوری، این دو آزمایش می‌توانند به عنوان غربالگری اولیه به خوبی مورد استفاده قرار گیرند(۱۲،۱۸).

در زمینه تنوع گونه‌ای در این بررسی دو گونه هیلمانی و فلیس در گربه‌ها مورد تشخیص قرار گرفت که با تحقیق نوریس، هوانگ همخوانی دارد(۸،۱۴). این در حالی است که در بررسی نایجر تنها حضور هلیکوباکتر هیلمانی گزارش شده است(۱۲). در ضمن در کلیه این بررسی‌ها، مشابه تحقیق حاضر به شیوع بیشتر هلیکوباکتر هیلمانی نسبت به هلیکوباکتر فلیس در گربه‌ها اشاره شده است. در مورد حضور سایر گونه‌های هلیکوباکتری، تحقیق ون دن بلاک در سال ۲۰۰۵ نشان داد که معده گربه‌ها می‌تواند علاوه بر گونه‌های متداولی چون هیلمانی و فلیس با هلیکوباکتر بیزوزرونی، سالمونیس و حتی کاندیداتوس

جدول۳- توزیع فراوانی آلودگی به گونه‌های مختلف جنس هلیکوباکتر برمبنای محل نمونه‌برداری درگربه‌های مورد بررسی.

گونه هلیکوباکتر	آلودگی مختلط				هلیکوباکترهیلمانی				هلیکوباکتر فلیس				سالم	جمع کل
ناحیه نمونه برداری	جمع کل	آنتروم‌وبادی	بادی	آنتروم	جمع کل	آنتروم‌وبادی	بادی	آنتروم	جمع کل	آنتروم‌وبادی	بادی	آنتروم		
جمع کل	۲۹	۱۱	۹	۹	۷	۶	۱	-	۶	۳	۳	-	*۱۵	۵۷

*** درکل گربه‌های مورد بررسی در آزمون PCR، ۱۳ قلاده فاقد آلودگی به جنس هلیکوباکتر بودند. اما از آنجایی که دو قلاده از گربه‌هایی که در جنس هلیکوباکتر قرار داشتند با پرایمرهای هلیکوباکترهای فلیس و هیلمانی مورد ردیابی قرار نگرفتند، تعداد گربه‌های سالم از نظر ابتلا به این دوگونه در جدول ۱۵ قلاده منظور گردیده است.**

هلیکوباکتر سوئیس آلوده گردد که این امر لزوم استفاده از پرایمرهای متعدد را در هنگام کاربرد روش زنجیره‌ای پلی مراز در گربه‌ها گوشزد می‌نماید(۱۹).

شیوع تقریبا ۲ برابر گونه هیلمانی در گربه‌های خانگی نسبت به گروه ولگرد، لزوم تحقیق در زمینه چگونگی وضعیت آلودگی صاحبان آنها را گوشزد می‌نماید، زیرا این فرضیه که نگاهداری گربه می‌تواند عامل خطری جهت ابتلا انسان به گونه‌های غیر از هلیکوباکتر پیلوری شود، توسط محققین مختلفی پیشنهاد شده است(۴،۵،۱۷،۱۹،۲۰). به هر حال علی رغم دقت بسیار بالای روش PCR، هنوز هم این روش تشخیصی به علت نیاز به تجهیزات پیشرفته و هزینه بالای انجام آن در انسان به صورت بالینی به‌کار برده نمی‌شود.

روش سرولوژی با توجه به عدم نیاز به انجام گاستروسکوپی (غیر تهاجمی بودن)، آزمایش غربالگری ایده آلی در انسان می‌باشد. مضافا باید به این نکته نیز توجه داشت که تحریک آنتی ژنی حاصل از هلیکوباکتر پیلوری به دلیل وجود ژن‌های حدت در انسان بسیار قابل توجه‌تر از حیوانات خواهد بود و لذا عیار پادتنی به راحتی قابل ردیابی است. این در حالی است که به نظر می‌رسد عوامل حدتی چون vac A ,cag A در هلیکوباکتر هیلمانی و فلیس حضور ندارد(۱۱) و بنابراین همین امر باعث ایجاد یک پاسخ آماسی خفیف و کانونی در معده و عیار پادتنی پایین در گربه‌های مبتلا می‌گردد(۶). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ با روش سرولوژی انجام شد تنها ۳۷ درصد گربه‌ها آلوده تشخیص داده شدند که نشانگر حساسیت پایین این تست در مقایسه با سایر روشهای تشخیصی است(۱۸).

در خصوص آزمایش سریع اوره آز، امروزه انجام سریع، ساده و کم هزینه این روش تشخیصی آن را به یکی از متداول‌ترین روش‌های تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در انسان تبدیل کرده است. گرچه نتایج حاصل از این آزمایش کیفی و بر مبنای تغییر رنگ محیط است با این حال زمان مورد نیاز جهت تغییر رنگ به میزان تراکم باکتری نیز بستگی خواهد داشت و از این رو با اتخاذ طبقه‌بندی در زمان تغییر رنگ محیط می‌توان تا حدودی نتایج این آزمایش را به شکل کمی تبدیل کرد که خود از مزایای این روش به حساب می‌رود. با این حال فعالیت کمتر این آنزیم در گونه‌های حیوانی در مقایسه با هلیکوباکتر پیلوری در انسان، از ارزش این روش به عنوان یک تست غربالگر سریع در گربه‌ها کاسته است(۶). نتایج این تحقیق نیز نشان داد تغییر رنگ محیط در آلودگی‌های هلیکوباکتری گربه‌ها عمدتا پس از ۱۲ ساعت ایجاد می‌شود. مقایسه نتایج حاصل از این آزمایش با PCR نیز نشان داد که ویژگی آزمایش اوره آز در تشخیص گونه‌های حیوانی هلیکوباکتر بسیار پایین است (۴۴ درصد) و بنابراین احتمالا بسیاری از نتایج مثبت بدست آمده در این مطالعه حاصل آلودگی‌های باکتریایی ثانویه بوده است.

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، سیتولوژی روشی ساده، ارزان، سریع و با حساسیت و ویژگی مناسب در تشخیص هلیکوباکترهای حیوانی می‌باشد که با تحقیق هاپونن و همکارانش همخوانی دارد(۶). از آنجایی که هلیکوباکترهای حیوانی فاکتور اتصال مخاطی ندارند، عمدتا در سطح مخاط معده به سر میبرند و با گسترش‌های فشاری مخاطی به راحتی قابل مشاهده خواهند بود. از سوی دیگر اندازه بزرگ‌تر هلیکوباکترهای حیوانی در مقایسه با هلیکوباکتر پیلوری در انسان مشاهده آنها را ساده‌تر می‌سازد(۱۰). در ضمن این روش امکان تعیین تراکم عوامل باکتریایی را از طریق مشاهده آنها در هر میدان میکروسکوپی را نیز فراهم خواهد نمود.

در روش هیستوپاتولوژی آلودگی‌های هلیکوباکتری از طریق مشاهده این اجرام در بخش‌های مختلف غدد معدی صورت میگیرد ولی تهیه نمونه‌ها در چنین روشی به زمان بسیار طولانی تری نیاز خواهند داشت. به هر حال هیستوپاتولوژی روشی است که در آن علاوه بر بررسی وضعیت آلودگی هلیکوباکتری می‌توان درجه التهاب معده را نیز به طور همزمان بررسی کرد و در تمام تحقیقات مشابه نیز به طور همزمان با سایر روشهای تشخیصی استفاده شده است(۶،۱۲،۱۳).

رنگ آمیزی گیمسای بافتی از حساسیت و ویژگی خوبی برخوردار بوده و نتایج این تحقیق نشان داد که با نتایج حاصل از روش وارتین استاری سیلور همخوانی دارد. این در حالی است که رنگ آمیزی گیمسا بسیار ساده‌تر و ارزان‌تر صورت می‌گیرد. در تحقیقی که جهت تعیین وضعیت آلودگی هلیکوباکتری معده گربه‌ها برای اولین بار در ایران صورت گرفت، ۷۵ درصد گربه‌ها در هیستوپاتولوژی آلوده تشخیص داده شدند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد(۱). از آنجایی که گونه غالب هلیکوباکتری معده گربه‌ها هلیکوباکتر هیلمانی است که غیر قابل کشت است بنابراین تنها روشی که با حساسیت و ویژگی بسیار بالا قادر به تعیین هویت گونه‌های هلیکوباکتری موجود در معده می‌باشد روش PCR خواهد بود(۱۲،۱۳،۱۴). با این حال انجام این روش تا حدودی پیچیده و به وسایل و موادی نیاز خواهد داشت که در حال حاضر مانع از استفاده وسیع بالینی آن در انسان و حیوانات می‌شود.

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که در گربه‌ها بر خلاف انسان ناحیه آنتروم معده از بار آلودگی کمتری نسبت به بادی برخوردار بوده است که این امر در تحقیقات دیگر نیز به اثبات رسیده است(۶،۱۵). بنابراین از نظر بالینی تنها برداشت یک نمونه از ناحیه کورپوس (فوندوس و بادی) جهت تایید آلودگی هلیکوباکتری کفایت خواهد نمود.

در مجموع از آنجا که در گربه‌ها نمیتوان از روش غیر تهاجمی سرولوژی به نحو مطلوب در تشخیص اولیه آلودگی‌های هلیکوباکتری استفاده نمود، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، تهیه یک گسترش از نمونه بیوپسی بافتی جمع‌آوری شده خواهد توانست مشخص کننده وضعیت آلودگی حیوان به عوامل هلیکوباکتری باشد. با این حال اینکه یافتن این عوامل در معده گربه‌ها تا چه حد معنی دار و با علامت بالینی آنها رابطه داشته باشد نیاز به بررسی‌های بیشتری خواهد داشت و تصمیم‌گیری به منظور درمان ضد هلیکوباکتری و مدت درمان به وجود علائم بالینی گاستریت مزمن (استفراغ مزمن، افت وزن و بی اشتهایی طولانی) منوط خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این طرح با مساعدت مالی قطب علمی گروه علوم درمانگاهی وزارت علوم، تحقیقات و فنآوری تامین گردیده است. نویسندگان از تمام افرادی که به نحوی آنان را در جریان این مطالعه یاری نمودند، قدردانی می‌کنند. پرسنل بیمارستان

دام‌های کوچک، آزمایشگاه میکروبیولوژی، آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران وکلیه پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی هلیکوباکتر انستیتوپاستورایران.

References

۱. عبدالرضا پاشایی، پایان نامه جهت دریافت درجه دکتری دامپزشکی، مطالعه هیستولوژیک و میکروبیولوژیک ضایعات معده گربه با تکیه بر نقش هلیکوباکتر پیلوری و دیگر ارگانیسم‌های شبه هلیکوباکتر HLOS، دانشگاه تهران، شماره ۲۸۳۴، سال ۱۳۸۱.

2. Clayton, L., Kleanthous, H ., Morgan,D. D., Puckey, L., TabaqchaliRapid, S.(1993) Fingerprinting of Helicobacter pylori by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 1420-1425.
3. Ettinger, S., Feldman, E.(2005) Text book of small animal veterinary medicine Sixth edition., Saunders
4. 4.Fox, J.G., *et al.*(1997) The expanding genus of Helicobacter,Pathogenic and zoonotic potentials, Gasteroentrol. Dis. 8: 2674-2681.
5. Germani, Y., Dauga,C., Duval,P., Huerre,M., Levy, M., Pialoux,G., Sansonetti, P. and Grimont,P. A.(1997) Strategy for the detection of Helicobacter species by amplification of 16S rRNA genes and identification of H. felis in a human gastric biopsy. Res. Microbiol. 148:315-326.
6. Happonen, I., *et al.*(1996) Occurrence and topoghraphical mapping of gasteric Helicobacters spps and their association with histological changes in apperently healthy dogs and cats. Zentralbi Veterinarmed. 43: 305-315.
7. Houghton, J., Fox, J.G., Wang, T.C.(2002) Gastric cancer: laboratory bench to clinicJ Gastroenterol Hepatol. 17:495-502.
8. Hwang, C.Y., Han, H.R., Youn, H.Y.(2002) Prevalence and clinical characterization of gastric Helicobacter species infection of dogs and cats in Korea. J. Vet. Sci. 3: 123-33.
9. Jalava, K., Stephon, L. W.(1998) Isolation and identification of Helicobacter SPP from canine and Feline gastric mucosa Applied and Environmental Microbiol. 64:3998-4006.
10. Lee, A., Fox, J., Hazell, S.(1993) Pathogenicity of Helicobacter pylori: a perspective. Infect.Immun. 6:1601-1610.
11. Mohammadi, M., Redline,R., Nedrud, J. and Czinn, S.(1996) Role of the host in pathogenesis of Helicobacter-associated gastritis: H. felis infection of inbred and congenic mouse strains. Infect. Immun. 64:238-245.
12. Neiger, R., Dieterich,C., *et al.*(1998) Detection and prevalence of Helicobacter infection in pet cats. J. Clin. Microbiol. 36: 634-637.
13. Neiger, R., Simpson, K. W.(2000) Helicobacter infection in dogs and cats, facts and fiction, J. Internal Vet. Med. 14: 125-133.
14. Norris, C., Marks,R., *et al.*(1999) Healthy cats are commonly colonized with Helicobacter heilmannii that is associated with minimal gastritis, J. Clin. Microbiol. 37: 189-194.
15. Otto,G., *et al.*(1994) Animal public health implications of gasteric colonization of cats by helicobacter spps. J. Clin. Microbiol.32:4 1043-1049.
16. Camargo, P.L., Alfieri, A.A., *et al.*(2003) Use of Polymerase Chain Reaction and Enzymatic Cleavage in the Identification of Helicobacter spp. in Gastric Mucosa of Human Beings from North Paran·, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 98: 265-268.
17. Solnick, J.V.(2003) Clinical significance of Helicobacter species other than Helicobacter pylori, Clin. Infect. Dis. 36:349-54.
18. Strauss, Ayali, D.(2001) Helicobacter SPP infection in cats evaluation of the humoral immune response and prevalence of gastric Helicobacter Spps. Vet. Microbiol. 76: 253-264.
19. Van den Bulck, K., Decostere, A., Baele, M. *et al.*(2005) Identification of Non-Helicobacter pylori Spiral Organisms in Gastric Samples from Humans, Dogs, and Cats, J. Clin. Microbiol. 43:2256-2260
20. Van Loon, S. A., Bart, E. J., den Hertog, P., *et al.*(2003) Helicobacter heilmannii" gastritis caused by cat to child transmission. J. Pediatr. Gastroenterol, 36:407-409.
21. Yamasaki, K., *et al.*(1998) Comperision of gasteric lesions in dogs and cats with and without gasteric spiral organisms. J. American Vet. Med. 212:529-533. 37.

J.Vet.Res. 62,3:131-136,2007

COMPARISON OF THE VALIDITY OF DIFFERENT DIAGNOSTIC METHODS IN DETERMINING GHLO INFECTIONS IN CATS

Jamshidi, Sh.[1]*, Akhtardanesh, B.[2], Mohammadi, M.[3], Sassani, F.[4], Bokaie, S.[5], Zahraei Salehi, T.[6], Dehghan, M. M.[1]

[1] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University, Kerman-Iran*

[3] *Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran-Iran*

[4] *Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[5] *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[6] *Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 22 January 2005 , Accepted 24 April 2006)

Abstract:

The aim of the present study was to Compare different diagnostic methods in the determination of gastric helicobacter infection. 30 healthy stray and 27 domestic cats. were studied The procedure involved taking biopsy samples from antrum and body by pediatric gastroscope in off feed animals. Diagnosis of gastric helicobacter infection by cytology, rapid urease test, histopathology and PCR was also conducted. In all diagnostic methods, helicobacter infection was found to be more prevalent in domestic cats than the stray ones. None of the cats were infected with H. pylori and most of them had mixed infections with H. felis and H. heilmanii. Sensitivity and specificity of different diagnostic methods in comparison with PCR were 93 and 44%, respectively in rapid urease test, 97 and 92% respectively in histopathology and 98 and 94%, respectively in cytology. Based on result of the study most of the cats may be infected with helicobacter spp without any significant clinical signs. Cytology was the most simple and fastest screening methods in the diagnosis of helicobacter infection. With respect to morphologic similarities of H. felis and H. heilmanii and inability to culture H. heilmanii, PCR can be considered as one of the best methods in the identification of infecting helicobacter strains in cats.

Key words: helicobacter, cat, gastroscopy, histopathology, PCR.

***Corresponding author's email:shjamshidi@vetmed.ut.ac.ir, Tel: 021-66923095, Fax: 021-66933222**