مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۶/ بهمن و اسفند ۱۳۹۳/ ۷۴-۶۷

مقاله پژوهشی

ارزیابی محیط کشت کلمبیا آگار غنی شده با تخم مرغ به منظور جداسازی *هلیکوباکتر پیلوری* از نمونه های بیوپسی

فریده یاری[۱]، رامین عبیری[۲]، محمد سلیمانی[۱]، ابوالفضل قلی پور[۳]، امیر هوشنگ الوندی[۲*]

[۱]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران؛ [۲]گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران؛

[۳]گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/٤

چکیده:

زمینه و هدف: **هلیکوباکتر پیلوری اولین باکتری سرطان زای شناخته شده و عامل بیماری های گاسترودئودنال متعددی است. هدف از این پژوهش ارزیابی محیط کشت غنی شده با تخم مرغ به منظور جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی گرفته شده از بیماران مبتلا به بیماری های گاسترودئودنال و مقایسه آن با تست اوره آز سریع بوده است.**

روش بررسی: **این مطالعه مقطعی (توصیفی- تحلیلی) بر روی ۱۹۲ بیمار مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی کرمانشاه در سال۱۳۹۱ انجام شد. از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم و دو نمونه بیوپسی از ناحیه کورپوس گرفته شد. نمونه های بیماران با استفاده از آزمون های تست اوره آز سریع و کشت در محیط انتخابی کلمبیا آگار غنی شده با تخم مرغ و حاوی آنتی بیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از کشت از رنگ آمیزی گرم و آزمایشات بیوشیمیایی به منظور تعیین هویت نهایی هلیکوباکتر پیلوری استفاده گردید. برای به دست آوردن حساسیت، ویژگی و کارآیی از نرم افزارهای kappa calculator و SPSS استفاده شد.**

یافته ها: **از مجموع ۱۹۲ نمونه بیوپسی گرفته شده ۹۸ نمونه (۵۱/۱۰ درصد) در آزمون اوره آز سریع مثبت و ۸۷ نمونه (٤٥/۳۱ درصد) به وسیله کشت مثبت شدند. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی روش کشت به ترتیب ۷٦/۵، ۸۷/۲ ، ۸٦/۲ و ۷۸/۰ درصد و کارایی این روش ۸۱/۰ درصد می باشد.**

نتیجه گیری: **این مطالعه نشان می دهد که محیط کلمبیا آگار غنی شده با تخم مرغ به عنوان محیط کشت اختصاصی مناسب برای جداسازی هلیکوباکتر پیلوری می باشد. این محیط کشت دارای حساسیت، ویژگی و کارآیی بالایی است و از لحاظ هزینه مقرون به صرفه بوده و نیز از جهت تهیه کردن به راحتی در دسترس می باشد.**

واژه های کلیدی: ***هلیکوباکتر پیلوری***، **کشت، کلمبیا آگار تخم مرغ دار، تست اوره آز سریع.**

مقدمه:

هلیکوباکتر پیلوری باسیل گرم منفی خمیده میکروآ ئروفیل می باشد (۱). این باکتری یکی از گسترده ترین عفونت های مزمن در انسان بوده و شیوع آن در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته به ترتیب ۹۰ و۵۰-۳۰ درصد می باشد (۵-۲). این باکتری در مخاط معده کمتر از ۲۰٪ افراد کمتر از ۳۰ سال وجود دارد؛ اما میزان شیوع این ارگانیسم در افراد ۶۰ ساله (از جمله افراد فاقد علامت) به ۴۰ تا ۶۰٪ افزایش می یابد (۶، ۷). باکتری موجب التهاب معده (گاستریت) و به دنبال آن بیماری هایی نظیر زخم معده، زخم دوازدهه می شود. همچنین برای سرطان معده و لنفوم (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue= MALT). به عنوان فاکتور خطر محسوب می شود (۸، ۹). بنابراین کاربرد روش هایی که موجب شناسایی صحیح عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران می شود از اهمیت زیادی برخوردار است.

***نویسنده مسئول:** کرمانشاه- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه- گروه میکروب شناسی- تلفن: ۰۹۱۸۸۳۹۸٤۹۰، E-mail:ah_alvandi@kums.ac.ir

روش های شناسایی هلیکوباکتر پیلوری به دو گروه تهاجمی و غیر تهاجمی تقسیم بندی می شود. روش های تهاجمی شامل تست اوره آز سریع (RUT)، کشت و هیستولوژی است و روش های غیر تهاجمی شامل تست بررسی آنتی ژن مدفوعی و تست تنفسی اوره می باشد. علاوه بر روش های یاد شده، از روش های مولکولی نظیر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده می شود (۱۰).

امروزه کشت به عنوان یکی از استانداردهای طلایی برای جداسازی و تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بالینی (۱۱، ۱۲) و نیز به منظور جداسازی آن از نمونه های محیطی همچون آب و مواد غذایی استفاده می شود (۱۳). در حال حاضر جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی معده به عنوان یک روش تشخیصی مطرح بوده و به صورت تحقیقاتی انجام می شود. از طرف دیگر در مواردی که بیمار به درمان های رایج آنتی بیوتیکی پاسخ نمی دهد الزامی است از کشت و تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی استفاده گردد (۱۱، ۱۲).

برای جداسازی اولیه هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های مختلف محیطی و بالینی از محیط کشت اختصاصی غنی شده با مکمل های مختلف همچون خون دفیبرینه گوسفند، سرم اسب، سرم جنین گوساله و زرده تخم مرغ به همراه ایزوویتالکس استفاده می گردد (۱۶-۱۴). به کار بردن این مواد باعث افزایش هزینه کشت و جداسازی هلیکوباکتر پیلوری می گردند. از جمله محیط های پایه ای که برای جداسازی هلیکوباکتر پیلوری استفاده می شود می توان برین هارت اینفیوژن آگار، بروسلا آگار، کلمبیا آگار و تریپتیک سوی آگار و یا محیط های مایع شامل بروسلا یا مولرهینتون را نام برد (۱۶). برای غنی کردن این محیط ها می توان ۵ تا ۱۰ درصد خون دفیبرینه گوسفند یا سرم اسب، ۱۰-۲ درصد سرم گوساله یا ۱-۰/۲ درصد بتا- سیکلودکسترین اضافه کرد (۱۷، ۱۸). همچنین جهت اختصاصی کردن این محیط ها از آنتی بیوتیک های آمفوتریسین B، ونکومایسین، تری متوپریم و پلی میکسین B با غلظت های خاصی استفاده می شود (۱۲). بنابراین کشف و توسعه محیط های اختصاصی برای کشت و جداسازی این باکتری که از نظر هزینه مقرون به صرفه تر باشد و نیز از نظر دسترسی به راحتی تهیه گردد، ضرورت دارد.

از آنجاکه تا لحظه آماده سازی این مقاله محیط کشت غنی شده با زرده تخم مرغ به تنهایی در هیچ مطالعه ای استفاده نشده است و نیز هیچگونه ارزیابی بالینی، یعنی استفاده از نمونه بیوپسی از آن به عمل نیامده است، این پژوهش با هدف ارزیابی محیط کشت غنی شده با تخم مرغ به منظور جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی گرفته شده از بیماران مبتلا به بیماری های گاسترودئودنال مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی کرمانشاه و مقایسه آن با تست اوره آز سریع انجام شده است.

روش بررسی:

این مطالعه به صورت مقطعی (توصیفی- تحلیلی) بر روی ۱۹۲ بیمار مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی در سال ۱۳۹۱ انجام شد. این بیماران پس از معاینه توسط پزشک و تکمیل پرسش نامه (ثبت مشخصات دموگرافیک و سابقه مصرف دارو) تحت آندوسکوپی قرار گرفتند. افرادی که سابقه مصرف داروی بیسموت و یا مصرف آنتی بیوتیک جهت درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری را در مدت دو هفته گذشته داشتند از مطالعه خارج شدند (۱۹).

بیماران گاسترودئودنال (بیماران مبتلا به التهاب معده (گاستریت)، زخم های معده و دوازدهه و سوءهاضمه) مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان امام خمینی شهر کرمانشاه توسط پزشک متخصص تحت آندوسکوپی قرار گرفته و تشخیص بیماری بر اساس نمای بالینی انجام گرفت. دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم و دو نمونه بیوپسی از ناحیه کورپوس هر بیمار به وسیله پنس استریل گرفته شد.

یکی از هر کدام برای آزمایش اوره آز سریع و نمونه های دوم برای کشت استفاده شد. نمونه های گرفته شده جهت انجام آزمایش اوره آز سریع در محیط اوره آز مایع و نمونه بیوپسی دیگر در محیط ترانسپورت و دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان انتقال به آزمایشگاه و کشت آن نگهداری شد.

محیط اوره آز سریع شامل ۲۰ گرم اوره، ۰/۱ گرم مخمر، ۰/۰۹۵ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4)، ۰/۰۹۱ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) و ۰/۰۱ گرم فنل رد در هشتصد میلی لیتر آب مقطر حل و اسیدیته آن با استفاده از اسید کلریدریک تنظیم گردید (pH=۷±۰/۱). سپس حجم محلول به یک لیتر رسانده شد. این محیط به وسیله فیلتراسیون استریل شد و با استفاده از کلنی های خالص هلیکوباکتر پیلوری کنترل گردید (۲۰). لازم به ذکر است که حساسیت و ویژگی این محیط در مطالعات موازی بر اساس استاندارد های طلایی تشخیص هلیکوباکتر پیلوری مشخص گردیده و مقالات آن در حال آماده سازی برای انتشار است (عبیری و همکاران اطلاعات منتشر نشده). نمونه بیوپسی اگر حداکثر ۴ ساعت بعد از انتقال به داخل محیط اوره آز سریع باعث تغییر رنگ از زرد به ارغوانی شد به عنوان نمونه اوره آز مثبت تلقی گردید.

در این مطالعه از محیط کشت کلمبیا آگار غنی شده با زرده تخم مرغ برای جداسازی اولیه باکتری استفاده شد. برای تهیه ی ۵۰۰ میلی لیتر از این محیط مقدار ۲۱ گرم از پودر پایه محیط کشت در ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل و پس از حرارت دادن روی شعله، برای استریل شدن، ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱و فشار ۱۵ پوند اتو کلاو گردید. پس از اتوکلاو، زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۰ درجه سانتی گراد رسید، در کنار شعله به محیط فوق ۵۰ میلی لیتر زرده تخم مرغ صاف شده اضافه شد. جهت اختصاصی کردن محیط کشت به محیط آنتی بیوتیک های ونکومایسین (۱۰mg/L)، آمفوتریسین B (۲/۵mg/L) و تری متوپریم (۵mg/L) اضافه شد(Sigma, Germany). محیط کشت پس از تهیه در پلیت های استریل تقسیم و جهت اطمینان از عدم آلودگی، ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پلیت های سالم تا هنگام مصرف و حداکثر به مدت دو هفته در داخل کیسه های پلاستیکی در چهار درجه سانتی گراد نگهداری شدند. نمونه بیوپسی با استفاده از لوپ استریل روی سطح محیط، کشت داده شد. هر نمونه برروی حداقل سه پلیت تلقیح گردید.

شرایط میکروآئروفیل با استفاده گاز پک نوع C (Merck, Germany) برقرار گردید و پلیت ها در دمای ۳۷°C و رطوبت بالا به مدت ۳ الی ۷ روز نگهداری شدند. در روز سوم وضعیت رشد پلیت ها بررسی شد و در صورت وجود کلنی های با ظاهر گرد، برآمده، صاف، شفاف و قوام آبکی و دارای قطر نیم تا یک میلی متر تحت آزمایشات بیوشیمیایی تأییدی قرار گرفتند. تست های بیوشیمیایی شامل آزمون اوره آز، تست کاتالاز، اکسیداز و رنگ آمیزی گرم بر روی کلنی ها انجام گردید. در صورت عدم رشد پلیت ها در همان شرایط تا ۷ روز نگهداری شدند.در صورت عدم رشد در روز هفتم پلیت ها حذف شدند.

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزارهای kappa calculator و SPSS برای به دست آوردن حساسیت و ویژگی مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته ها:

سن بیماران مورد مطالعه بین ۸۷-۱۷ سال با میانگین سنی ۱۷/۶۱±۵۰/۵ سال بود، در این جامعه آماری ۸۵ بیمار زن (۴۴/۲ درصد) با میانگین سنی ۱۸/۴۴±۴۹/۰۹ سال و ۱۰۷ نفر مرد (۵۵/۸ درصد) با میانگین سنی ۱۶/۶۴±۵۰/۶۴ سال بودند. از این تعداد ۱۱۸ بیمار (۶۱/۴ درصد) سرپایی و ۷۴ بیمار (۳۸/۶ درصد) بستری شده در بخش داخلی و سایر بخش ها بودند.

از ۱۹۲ نمونه بیوپسی گرفته شده از افراد مبتلا به بیماری های گاستروودئودنال ۹۸ نمونه (۵۱/۱ درصد) در آزمایش اوره آز سریع و ۸۷ نمونه (۴۵/۳۱ درصد) در

کشت نمونه های بیوپسی مثبت شد (جدول شماره ۱). در میان بیمارانی که آزمایش اوره آز سریع آن ها مثبت بود جنس ۳۸ بیمار (۳۸/۷۷ درصد) زن و ۶۰ بیمار (۶۱/۲۳ درصد) مرد بودند. در میان بیمارانی که کشت نمونه بیوپسی آن ها مثبت بود جنس ۲۹ بیمار (۳۳/۳۳ درصد) زن و ۵۸ بیمار (۶۶/۶۷ درصد) مرد بودند.

جدول شماره۱: نتایج آزمایشات کشت و اوره آز سریع روی نمونه های بیوپسی بیماران مبتلا به بیماری های گاستروودئودنال به تفکیک نوع بیماری

آزمایش ها	بیماری					تعداد کل
	سرطان معده	زخم پپتیک	گاستریت	ازوفاژیت	نرمال	
تست اوره آز مثبت	۱۷	۲۲	۳۵	۱٤	۱۰	۹۸
تست اوره آز منفی	۳	۲٦	۳۷	۱۹	۹	۹٤
کشت مثبت*	۱۵	۲۱	۳۱	۱۳	۷	۸۷
کشت منفی	۵	۲۷	٤۱	۲۰	۱۲	۱۰۵

*در محیط کشت کلمبیا آگار غنی شده با زرده تخم مرغ

حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی روش کشت نسبت به تست اوره آز سریع به عنوان استاندارد طلایی به ترتیب ۷۶/۵، ۸۷/۲، ۸۶/۲ و ۷۸/۰ درصد به دست آمد (جدول شماره ۲). همخوانی (Concordance) بین کشت و اوره آز سریع (استاندارد طلایی) با ضریب کاپا برابر ۰/۶۳۶۱ و توافق ۸۱/۰ درصد می باشد. این میزان ضریب کاپا (۰/۶۳۶۱) به معنی توافق قابل قبول و معتبر بین تست اوره آز سریع و کشت در محیط مورد آزمایش در این مطالعه می باشد.

جدول شماره۲: نتایج اوره آز سریع به عنوان استاندارد طلایی و کشت نمونه های بیوپسی

		اوره آز سریع (استاندارد طلایی)	
	نتیجه	مثبت	منفی
کشت*	مثبت	۷۵ (مثبت واقعی)	۱۲ (مثبت کاذب)
	منفی	۲۳ (منفی کاذب)	۸۲ (منفی واقعی)

*در محیط کشت کلمبیا آگار غنی شده با زرده تخم مرغ

بحث:

هدف از این پژوهش ارزیابی محیط کشت غنی شده با تخم مرغ به منظور جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی گرفته شده از بیماران مبتلا به بیماری های گاستروودئودنال مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی کرمانشاه و مقایسه آن با تست اوره آز سریع می باشد. کشت به عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری استفاده می شود. این روش علیرغم گران بودن و پایین بودن سرعت رشد یک روش متداول در جداسازی هلیکوباکتر پیلوری می باشد. مهمترین مزیت کشت توانایی جداسازی هلیکوباکتر پیلوری در بیمارانی است که نیازمند انجام ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی هستند و یا در مورد بیمارانی که دارای عفونت پایدار و پیچیده اند و برای درمان و مدیریت عفونت نیازمند انجام آزمایش های مولکولی روی باکتری جداسازی شده و تعیین سویه آن می باشند (۲۱).

از ۱۹۲ نمونه بیوپسی گرفته شده از افراد مبتلا به بیماری های گاستروودئودنال ۹۸ نمونه (۵۱/۱ درصد) در آزمون اوره آز سریع مثبت و در کشت نمونه های بیوپسی ۸۷ نمونه (۴۵/۳۱ درصد) مثبت شد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی روش کشت در این مطالعه نسبت به آزمون اوره آز سریع (استاندارد طلایی) به ترتیب ۷۶/۵، ۸۷/۲، ۸۶/۲ و ۷۸ درصد می باشد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که کارآیی این روش ۸۱ درصد می باشد.

در این مطالعه از یک اوره آز مایع in-house به عنوان استاندارد طلایی استفاده شد. آزمایش اوره آز

سریع در مطالعات زیادی به عنوان استاندارد طلایی یا به تنهایی و یا در ترکیب با روش های دیگر استفاده شده است (۲۴-۲۲). نشان داده شده است که اوره آز سریع in-house نیز مانند انواع استاندارد آن دارای حساسیت و ویژگی بالایی می باشد (۲۱، ۲۵).

محیط های متعددی به عنوان محیط های اختصاصی جداسازی هلیکوباکتر پیلوری استفاده شده است (۱۴-۱۱، ۱۶)؛ اما مطالعاتی نشان داده است که هیچ یک از این محیط ها در جداسازی هلیکوباکتر پیلوری ارجحیت ندارند و میزان جداسازی و نیز حساسیت و ویژگی آنها در یک محدوده می باشد (۱۳، ۲۶، ۲۷). پیشنهاد شده است که محیط کشتی می تواند نسبت به بقیه دارای ارجحیت باشد که دارای محتویات ساده باشد و نیازمند اضافه نمودن مواد غنی کننده گران قیمت مانند خون و فرآورده های خونی نباشد (۲۸).

در مطالعه حال حاضر میزان جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی برابر با ۸۷/۱۹۲ (۴۵/۳۱ درصد) بود که از میزان مثبت شدن آزمایش اوره آز سریع ۹۸/۱۹۲ (۵۱/۱ درصد) کمتر است. فراوانی نسبی و مطلق کمتری در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری توسط کشت نسبت به آزمایش اوره آز سریع در مطالعات فراوانی به دست آمده است (۲۱، ۳۲-۲۹). حضور ارگانیسم های آلوده کننده در نمونه بیوپسی باعث کاهش حساسیت روش کشت می گردد. خطر آلودگی می تواند با استفاده از گندزدایی مناسب فورسپس کاهش یابد (۳۳). باید ذکر کنیم که مطالعاتی نیز وجود دارند که فروانی نسبی و مطلق تشخیص هلیکوباکتر پیلوری توسط کشت نسبت به آزمایش اوره آز سریع بیشتر بوده است (۳۴).

حساسیت روش کشت در مطالعات مختلف و بر اساس استاندارد های طلایی مختلف از ۴۶/۶ تا ۹۶/۵ درصد گزارش شده است. باید خاطر نشان کنیم در تمامی این مطالعات از خون و فرآورده های خونی و یا سایر مواد غنی کننده گران قیمت در ترکیب با محیط های پایه مختلفی مانند کلمبیا آگار، مولر هینتون آگار و بروسلا آگار استفاده شده است (۳۸-۳۴). بر پایه نتایج به دست آمده در این مطالعه حساسیت محیط کشت به کار رفته در مطالعه حاضر هر چند در مقایسه با دو مطالعه (۲۳، ۳۸) کمتر است؛ اما در مقایسه با سایر مطالعات بیشتر می باشد (۳۴-۳۱، ۳۶).

برای جداسازی اولیه هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی، لازم است از محیط های اختصاصی غنی شده و دارای آنتی بیوتیک استفاده شود. نوع محیط کشت و همچنین غنی کردن این محیط ها با مکمل های مختلف همچون سرم اسب، سرم جنین گوساله، خون و فرآورده های خونی و ایزوویتالکس باعث افزایش هزینه مصرفی این روش می گردند. همخوانی (Concordance) بین کشت و تست اوره آز سریع در این مطالعه (کاپای برابر با ۰/۶۳۶۱) معتبر و قابل قبول می باشد.

از طرفی هزینه پایین، در دسترس بودن مواد و بالا بودن حساسیت و ویژگی محیط کشت مورد بررسی نسبت به سایر مطالعاتی که در آن ها از فرآورده هایی گران قیمت استفاده شده است، نشان می دهد که این محیط کشت به عنوان محیطی مناسب برای کشت و جداسازی هلیکوباکتر پیلوری می باشد. هر چند محیط غنی شده با تخم مرغ در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۱ به منظور کشت هلیکوباکتر پیلوری به کار رفته است؛ اما تفاوت های زیر بین محیط به کار رفته در آن پژوهش و مطالعه حاضر وجود دارد. در محیط به کار رفته در پژوهش مذکور یکی از محتویات به کار رفته ایزوویتالکس می باشد که هم هزینه تهیه این ماده بالاست و نیز تهیه آن مشکل می باشد.

از طرف دیگر در مطالعه مذکور به منظور ارزیابی پنج نوع محیط کشت، باکتری خالص استفاده شده است و از نمونه بیوپسی معده بیماران استفاده نشده است (۳۹).

نتیجه گیری:

در این مطالعه محیط کلمبیا آگار غنی شده با تخم مرغ به عنوان محیط کشت اختصاصی برای

جداسازی هلیکوباکتر پیلوری گزارش می گردد. این محیط کشت دارای حساسیت، ویژگی و کارآیی بالایی است و از لحاظ هزینه مقرون به صرفه بوده و نیز از جهت تهیه کردن به راحتی در دسترس می باشد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با شماره ۹۱۳۶۴ می باشد.

منابع:

1. Hussein N, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, et al. Differences in virulence markers between helicobacter pylori strains from Iraq and those from Iran: Potential importance of regional differences in h. pylori-associated disease. J Clin Microbiol. 2008; 46(5): 1774–79.
2. Dabiri H, Maleknejad P, Yamaoka Y, Feizabadi MM, Jafari F, Rezadehbashi M, et al. Distribution of Helicobacter pylori cagA, cagE, oipA and vacA in different major ethnic groups in Tehran, Iran. J Gastroenterol Hepatol. 2009; 24(8): 1380-6.
3. Goh KL, Cheah PL, Md N, Quek KF, Parasakthi N. Ethnicity and *H. pylori* as risk factors for gastric cancer in Malaysia: a prospective case control study. Am J Gastroenterol 2007; 102(1): 40-5.
4. Esmailei M. Prevalence of H. pylori infection in children with peptic disorders. J Shahrekord Univ Med Sci. 1999; 1 (4): 31-35.
5. Rahimian G, Yousofi H, Nasiri J, Ganji F. The frequency and risk factors of Helicobacter pylori in children of 6 years old from Shahrekord in 2006. J Shahrekord Univ Med Sci. 2008; 10 (3): 49-54.
6. Qiu H, Zhang L, Keshari R, Wang G, Zhou Z, Xu D, et al. Relationship between H. pylori infection and clinicopathological features and prognosis of gastric cancer. BMC Cancer. 2010; 10: 374.
7. Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of Stool-PCR test for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. World J Gastroenterol. 2009; 15(4): 484-88.
8. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 449-90.
9. Eskandari A, Mahmoudpour A, Abolfazli N, Lafzi A. Detection of *Helicobacter pylori* using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010; 15 (1): 28-31.
10. Secka O, Antonio M, Tapgun M, Berg D, Bottomley C, Thomas V, et al. PCR-based genotyping of Helicobacter pylori of Gambian children and adults directly from biopsy specimens and bacterial cultures. Gut Pathogens. 2011; 3(1): 5.
11. Tummala S, Sheth SG, Goldsmith JD, Goldar-Najafi A, Murphy CK, Osburne MS, et al. Quantifying gastric *Helicobacter pylori* infection: a comparison of quantitative culture, urease breath testing, and histology. Dig Dis Sci. 2007; 52(2): 396-401.
12. Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect Helicobacter pylori: from culture to molecular biology. Helicobacter. 2007; 12 (Suppl 2): 6-11.
13. Corry JEL, Atabay HI, Forsythe SJ, Mansfield LP. Culture media for the isolation of campylobacters, helicobacters and arcobacterrs. In: Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM. Handbook of Culture Media for Food Microbiology**.** 2nd ed, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science. 2013; pp: 271-316.
14. Borlace GN, Jones HF, Keep JS, Butler RN, Brooks DA. Helicobacter pylori phagosome maturation in primary human macrophages. Gut Pathogens. 2011; 3(1): 3.
15- Hussein N. Helicobacter pylori and gastric cancer in the Middle East: A new enigma? World J Gastroenterol. 2010; 16(26): 3226-34.
16. Hasler V, Owyang C. Approach to the patient with gastro intestinal disease. In: Braunwald E, Hauser S, Fauci A. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill; 2008: 966-78.
17. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Compression of three methods of polymerase chain reaction, culture and rapid urease test in diagnosis of Helicobactr pylori in gastric biopsy specimen. Koomesh. 2010; 11(3): 198-203.

18. Esmaeili D, Mohabati Mobarez A, Hatef Salmanian A, Zavaran HA. Optimization of Helicobacter pylori culture in order to prepare favorable antigens. J Bacteriol Res. 2009; 1(9): 101-4.
19. Zullo A, Hassan C, Lorenzetti R, Winn S, Morini S. A clinical practice viewpoint: to culture or not to culture Helicobacter pylori? Dig Liver Dis. 2003; 35(5): 357-61.
20. Atlas RM, Snyder JW. Handbook of Media for Clinical Microbiology. 15th ed. Boca Raton: CRC Press; 2006: 466.
21. Arismendi-Morillo G, Hernandez I, Mengual E, Fuednmayor A, Romero G, Lizarzábal M. Comparison of three methods based on endoscopic gastric biopsies for diagnosis of Helicobacter pylori active infection in a clinical setting. Arq Gastroenterol. 2011; 48(3): 190-4.
22. Ricci C, Holton J, Vaira D. Diagnosis of Helicobacter pylori: invasive and non-invasive tests. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007; 21(2): 299-313.
23. Megraud F, European Paediatric Task Force on Helicobacter p. Comparison of non-invasive tests to detect Helicobacter pylori infection in children and adolescents: results of a multicenter European study. J Pediatr. 2005; 146(2): 198-203.
24. Ramis IB, de Moraes EP, Fernandes MS, Mendoza-Sassi R**,** Obirajara R, Renan C, et al. Evaluation of diagnostic methods for the detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. Braz J Microbiol. 2012; 43(3): 903-8.
25. Shahidi MA, Fattahi MR, Farshad S, and Alborzi A. Validation of an in-house made rapid urease test kit against the commercial CLO-test in detecting *Helicobacter pylori* infection in the patients with gastric disorders. J Res Med Sci. 2012; 17(3): 212-16.
26. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. Growth of Helicobacter pylori in various liquid and plating media. Lett Appl Microbiol. 2000; 30(3): 192-6.
27. Stevenson TH, Lucia LM, Acuff GR. Development of a selective medium for isolation of Helicobacter pylori from cattle and beef samples. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(2): 723-7.
28. Olivieri R, Bugnoli M, Armellini D, Bianciardi S, Rappuoli R, Bayeli PF, et al. Growth of Helicobacter pylori in media containing cyclodextrins. J Clin Microbiol. 1993; 31(1): 160-62.
29. Vilaichone RK, Gumnarai P, Ratanachu-Ek T, Mahachai V, Nationwide survey of Helicobacter pylori antibiotic resistance in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 77(4): 346-9.
30. Soltan Dallal MM , Rahimi Forushani A, Bakhtiari R. The comparative study of three methods of microscopic, urease test and culture in diagnostic of Helicobacter pylori causing peptic ulcer. Medical Lab J. 2012 (Issue 1): 13-18.
31. Zendedel A, Moradimoghadam F, Almasi V, Zivarifar H. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori in Mashhad, Iran. J Pak Med Assoc. 2013; 63(3): 336-9.
32. Suhaila N, Hussin S, Rahman MM. Comparative efficacy sensitivity and specificity of the tests used for the Diagnosis of Helicobacter pylori. Pak J Biol Sci. 2010; 13(21): 1057-61.
33 Ribeiro ML, Godoy AP, Benvengo YH, Ecclissato CC, Mendonca S, Pedrazzoli J, Jr. The influence of endoscopic procedures upon the contamination of Helicobacter pylori cultures. Arq Gastroenterol. 2004; 41(2): 100-3.
34. Minami M, Ohta M, Ohkura T, Ando T, Torii K, Hasegawa T, et al. Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification method as a novel, rapid and safe system for detection of Helicobacter pylori. J Clin Microbiol. 2006; 44(11): 4032-37.
35. Nakhaei Moghadam M, Khajehkarramedini M, Malekzadeh F, Khoshnava Foomani A. Prevalence of Helicobacter pylori in gastric biopsy samples and to determine the sensitivity and specificity of the diagnostic methods. Ofogh-e-Danesh. 2005; 2: 37-40.
36. Fazeli SA, Saffari M, Yazdani R, Tavakoli A, Khamechian T, and Sharif H. A comparative study on different diagnostic methods for Helicobacter Pylori. Feyz. 2001; 2: 8-14.
37. 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): 249-5.
38. Kim HD, Kim DH, Park H, Kim WJ, Ahn YS, Lee YJ, et al. Detection of Helicobacter pylori in Gastric Aspirates Using a Monoclonal Antibody-Based Test. Gut and Liver. 2013; 7(1): 30-34.
39. Westblom TU, Madan E, Midkiff BR. Egg yolk emulsion agar, a new medium for the cultivation of Helicobacter pylori. J Clin Microbiol. 1991; 29(4): 819-21.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2015 Feb, Mar; 16(6): 67-74. **Original article**

Evaluation of the egg yolk enriched columbia agar for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens

Yari F[1], Abiri R[2], Soleymani M[1], Gholipour A[3], Alvandi AH[2*]
[1]Microbiology Dept., Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, I.R. Iran;
[2]Microbiology Dept., Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R. Iran;
[3]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 5/Nov/2013 Accepted: 24/Jan/2014

Background and aims: Helicobacter pylori is the first known carcinogenic bacterium and cause of several gastroduodenal disorders. Therefore, detection and treatment of *H. pylori* infection is very important. The aim of this study was to evaluate egg yolk enriched columbia agar for isolation of *H. pylori* from gastric biopsy specimens of patients suffering from gastroduodenal disorders referring to Imam Khomeini Hospital, Kermanshah and comparison with rapid urease test.
Methods: The study was an analytic descriptive cross-sectional survey that was carried out on 192 patients referred to Imam Khomeini Hospital in Kermanshah in 2013. Two gastric antrum biopsies and two corpus biopsies were taken from each patient and *H. pylori* infection was detected using rapid urease test and culture on egg yolk enriched columbia agar supplemented with antibiotics. After culture gram staining method and biochemical tests were used to detect identification of *H. pylori*. Data were analyzed using kappa calculator and SPSS software to calculate sensitivity and specificity.
Results: The rates of diagnosis of *H. pylori* infection in 192 biopsy specimens taken from patients with gastroduodenal diseases by rapid urease test and culture were 51.10% and 45.31% respectively. The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of the culture were 76.5%, 87.2%, 86.2, and 78.0% respectively. The results showed that the test accuracy (effectiveness) of the method was 81%.
Conclusion: This study indicates that egg yolk enriched columbia agar is an appropriate medium with high sensitivity, specificity and efficiency for isolation of *H. pylori* that is a low-cost and available culture medium.

***Keywords: Helicobacter pylori*, Culture, Egg yolk enriched Columbia, Rapid urease test.**

Cite this article as: Yari F, Abiri R, Soleymani M, Gholipour A, Alvandi AH. Evaluation of the egg yolk enriched columbia agar for isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 16(6): 67-74.

[*]Corresponding author:
Microbiology Dept., Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah. I.R. Iran, E-mail: ah_alvandi@kums.ac.ir.