

Μικροσκοπική εξέταση - Καλλιέργεια

Ευγενία Αναστασάκου

Το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ανήκει στο γένος *Helicobacter*, είδη του οποίου έχουν απομονώσει από τον άνθρωπο αλλά και διάφορα ζώα. Είναι Gram αρνητικό βακτηρίδιο με χαρακτηριστική σπειροειδή μορφολογία, μικροαερόφιλο, ουρεάση, θετικό, και κινητό. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο μισός πληθυσμός της γης έχει προσβληθεί από το μικρόβιο αυτό, ότι η μόλυνση πραγματοποιείται κυρίως κατά την παιδική ηλικία και ότι εφ' όσον εγκατασταθεί το μικρόβιο στο στομάχι του ανθρώπου, παραμένει εφ' όρου ζωής.

Το *H. pylori* ανευρίσκεται μέσα στη βλέννη και στα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του άντρου, καθώς και ότι το βακτήριο έχει αυξημένη κινητική ικανότητα σε ιξώδες περιβάλλον, όπου η κίνησή του αυτή διευκολύνεται από την έκκριση διαφόρων ενζύμων.

Η μικροσκοπική εξέταση γίνεται από το υλικό βιοψίας. Η πλέον ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος είναι η ανίχνευση του *H. pylori* σε τομές πολλαπλών τεμαχίων βιοψίας από το βλεννογόνο του στομάχου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σαν σε μέτρο συγκριτικής αξιολόγησης των διαφόρων άλλων μεθόδων.¹

Τεμάχιο βιοψίας συνθλίβεται ανάμεσα σε δύο αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζεται με χρώση ή Giemsa, Carbon Fuchsin ή acridine orange. Εάν το δείγμα είναι θετικό, τότε τα σπειροειδή ή καμπύλα *H. pylori* είναι ορατά στη

μικροσκοπική εξέταση κατά αθροίσματα μέσα στο στρώμα της βλέννης, ορισμένα δε από αυτά μοιάζουν με φτερά γλάρου.

Η ευαισθησία της μεθόδου φθάνει μέχρι 90% εάν εξετασθούν δύο ή περισσότερες βιοψίες² και η ειδικότητα μέχρι 90%.

Με μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά έναντι του *H. pylori* είναι δυνατή η αναζήτηση του βακτηριδίου σε δείγματα βιοψίας του γαστρικού βλεννογόνου με τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι 98%.³

Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια του *H. pylori* παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες, είναι χρονοβόρα και η ευαισθησία της δεν είναι πολύ υψηλή. Παρόλα αυτά όμως είναι μέθοδος αναφοράς διότι είναι η μόνη που παρέχει, ζωντανά τα βακτηριακά στελέχη και καθιστά δυνατή τη μελέτη διαφόρων ιδιοτήτων. Η διαδικασία της καλλιέργειας περιλαμβάνει τη λήψη δειγμάτων κατά τη γαστροσκόπηση, τη μεταφορά του δείγματος σε ειδικά υλικά μεταφοράς, τον εμβολιασμό σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, την επώαση σε μικροαερόφιλες συνθήκες και τέλος την ταυτοποίηση του μικροβίου.⁴

Λήψη δειγμάτων - Μεταφορά

Κατάλληλα δείγματα για την καλλιέργεια του *H. pylori* είναι τεμάχια βιοψίας που έχουν πρόσφατα ληφθεί από το πυλωρικό άντρο του στομάχου. Μετά τη λήψη, το ιστοτεμάχιο τοποθετείται σε υλικό μεταφοράς. Σαν υλικά μεταφοράς έχουν χρησιμοποιηθεί: αποστειρωμένη γλυκόζη 20% ή φυσιολογικός ορός στους 4°C, Nutrient broth, Brucella broth και υλικό Stuarts.⁵ Συστηματικές όμως μελέτες για τα υλικά μεταφοράς δεν έχουν γίνει. Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιούμε με επιτυχία θειογλυκολικό ζυμό από τον οποίο έχει επιτευχθεί ανάπτυξη του *H. pylori* ακόμα και μετά παραμονή 24 ωρών σε 4°C.

Υλικά και συνθήκες καλλιέργειας

Θρεπτικά υλικά που έχουν συχνότερα χρησιμοποιηθεί είναι:

- Αιματούχο άγαρ 5-10% αίμα αλόγου
- Σοκολατόχρωμο άγαρ
- Thayer-Martin
- Skirrow medium (3-6)
- Dent medium 7% αίμα αλόγου (oxid)

- Egg Yolk Emulsion (EYE) agar
- GAB-CAMP
- Wiekins-Chulgren με αίμα αλόγου και αντιβιοτικά

Πολλοί συγγραφείς αναφέρουν ότι η προσθήκη αντιβιοτικών είναι χρήσιμη λόγω της προκαλούμενης αναστολής άλλων μικροβίων, που προέρχονται κυρίως από το ανώτερο αναπνευστικό, και επιμολύνουν τις βιοψίες. Η παράλληλη χρήση ενός εκλεκτικού από ενός μη εκλεκτικού υλικού για την απομόνωση του *H. pylori* συνιστάται γιατί βελτιώνει την ευαισθησία της καλλιέργειας κατά 25%.⁶ Η επώαση του βακτηρίου γίνεται στους 37°C, σε μικροαερόφιλες συνθήκες (5% οξυγόνο, 10% CO₂, 85% άζωτο) με υγρασία. Οι μικροαερόφιλες συνθήκες επιτυγχάνονται με αρκετούς τρόπους που περιλαμβάνουν απομάκρυνση του ατμοσφαιρικού αέρα και αντικατάστασή του από μίγμα αερίων ή, πιο απλά, χρήση αναερόβιων φιαλών με φακελάκια αναερόβιων συνθηκών χωρίς καταλύτη ή με ειδικά φακελάκια δημιουργίας μικροαερόφιλων συνθηκών και καταλύτη.

Χρόνος επώασης¹

Ο απαιτούμενος χρόνος καλλιέργειας εξαρτάται από το στέλεχος και κυμαίνεται συνήθως από 3 έως 6 ημέρες. Οι αποικίες του *H. pylori* έχουν διάμετρο 1-2 μμ, είναι διαφανείς και ελαφρά αιμολυτικές. Η αρχική ταυτοποίηση βασίζεται στη μορφολογία της αποικίας, στη Gram χρώση, στη θετική αντίδραση οξειδάσης και καταλάσης και κυρίως στη δοκιμή ουρεάσης. Η ταχεία αλλαγή χρώματος του υλικού ουρίας εντός 1-2 λεπτών είναι η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα του *H. pylori*. Οι ανακαλλιέργειες του *H. pylori* δεν είναι πάντα επιτυχείς. Το 60% των στελεχών *H. pylori* δεν αναπτύσσονται μετά την 8η ανακαλλιέργεια και μόνο το 8% ξεπερνούν τις 20 ανακαλλιέργειες.⁷ Καλλιερημένα στελέχη *H. pylori*, που παραμένουν εκτεθειμένα στον ατμοσφαιρικό αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου, πάνω από μια ώρα, έχουν μειωμένες πιθανότητες να αναπτυχθούν σε ανακαλλιέργειες. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανώς στην αυξημένη ευαισθησία του μικροοργανισμού στο οξυγόνο, αν και έχει αναφερθεί ότι στελέχη *H. pylori* μπορούν να επιβιώσουν ύστερα από δίωρη έκθεση σε ατμόσφαιρα 95% οξυγόνου και 5% CO₂.⁷ Η συντήρηση του μικροοργανισμού είναι δύσκολη. Ο συνηθισμένος τρόπος διατήρησης με λυοφιλοποίηση δεν είναι κατάλληλος για το *H. pylori*. Έχει προταθεί η L-ξήρανση, δηλαδή ξήρανση εναιωρημάτων *H. pylori* κατευθείαν από υγρή κατάσταση.³ Άλλος τρόπος είναι η συντήρησή του στους -70°C σε διδιάλυμα πεπτόνης 1% με γλυκερόλη 25% ή σε 1 ml απινιδωμένο ορό αλόγου.

Συνήθης αίτια αποτυχίας της καλλιέργειας

Το *H. pylori* είναι κατανεμημένο στο βλεννογόνο του άντρου κατά περιοχές και έτσι είναι πιθανό να λαμβάνεται βιοψία από περιοχή μη αποικισμένη με βακτηρία με συνέπεια η καλλιέργεια να αποβαίνει αρνητική. Ο χρόνος μεταφοράς του μικροοργανισμού έχει καθοριστική σημασία. Όσο πιο σύντομα μεταφέρεται το δείγμα στο εργαστήριο, τόσο μεγαλύτερες είναι οι πιθανότητες επιτυχημένης καλλιέργειας. Αν και πολλές εταιρείες ισχυρίζονται ότι το υλικό μεταφοράς που παρασκευάζουν επιτρέπει την καλλιέργεια του μικροβίου ακόμα και 24 ώρες μετά τη λήψη της βιοψίας, πιστεύουμε ότι η καλλιέργεια πρέπει να γίνεται σύντομα, το πολύ εντός δύο ωρών από τη λήψη της βιοψίας. Εάν τηρηθούν οι παραπάνω προϋποθέσεις, η καλλιέργεια έχει υψηλή ευαισθησία που πλησιάζει το 90% με ειδικότητα 100%.⁷

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barthel JS, Everett ED. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infections: the "gold standard" and the alternatives. Rev infect Dis 1990;12(suppl 1):S107-14.
2. Parsonnet J, Welch K, Compton C. et al. Simple microbiologic detection of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 1988;26:948-9.
3. Husson MO, Leclerc H. Detection of *Helicobacter pylori* in stomach tissue by use of a monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1991;29:2831-34.
4. Κανσουζίδου-Κανακούδη Α, Δανιηλίδης Β, Σουπήμης Τ, Σακελλαρίδης Α. Απομόνωση *Campylobacter pyloridis* από μία περίπτωση οξέως γαστρίτιδος. Εφαρ Κλιν Μικροβιολ Εργ 1987;2:23-8.
5. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990;9:1-13.
6. Kempston J, Fuksa M, Matlow A, Mazcon N, Haber G, Kortan P, Karmali M. Corex for recovery of *Campylobacter pylori* from antral biopsies. J Clin Microbiol 1987;25:1117-8.
7. Μεντής Α, Τζουβελέκης Α. Το *Helicobacter pylori* στις γαστροπάθειες. Εργαστηριακές διαγνωστικές μέθοδοι. Εφαρ Κλιν Μικροβιολ Εργ Διαγν 1991;6:159-78.