Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره پنجم، صفحه ۶۰-۴۹

(مقاله مروری) اساس و کارایی روش های تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* (*Helicobacter pylori*)

طاهر محمدیان[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی

نویسنده مسؤول: دکتر طاهر محمدیان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.
t.mohamadian@shahryariau.ac.ir

دریافت: ۸۸/۱۲/۲۴ پذیرش: ۸۹/۳/۲۶

چکیده

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، میکروآئروفیلیک و تاژکداری است که نخستین بار از نمونه بیوپسی معده انسان در سال ۱۹۸۳ جداسازی شد. این ارگانیسم احتمالاً معمولترین عفونت مزمن باکتریایی در انسان ها است، و تقریباً نیمی از جمعیت جهان را آلوده نموده است. اهمیت بالینی زیاد آلودگی به این باکتری منجر به توسعه روش های تشخیصی زیادی شده است. روش های تشخیص هلیکوباکتر پیلوری به دو دسته تهاجمی و غیرتهاجمی تقسیم می‌شوند. روش های تهاجمی مستقیماً از روی نمونه‌های بیوپسی معده، باکتری را تشخیص می‌دهند، در حالیکه روش های غیر تهاجمی بر اساس بررسی نمونه‌های مختلف (بعنوان مثال سرم، ادرار و هوای بازدمی) می‌باشند، که بصورت غیرمستقیم وجود *هلیکوباکتر پیلوری* را تشخیص می‌دهند.

اخیراً روش های ایمنی-آنزیمی برای تشخیص مستقیم هلیکوباکتر پیلوری توسعه یافته که قادر است، آنتی‌ژنهای این باکتری را در مدفوع تشخیص دهد. این روشها که روش های آنتی‌ژن مدفوعی نامیده می‌شوند، به دلیل غیرتهاجمی بودن بصورت وسیعی مورد استفاده قرار گرفته است. دوگروه از روش های اخیر وجود دارد که روش های بر مبنای آنتی‌بادی های پلی-کلونال و روش های بر مبنای آنتی‌بادی های مونوکلونال نامیده می‌شوند. بنظر می‌رسد بکارگیری آنتی‌بادی های پلی‌کلونال در مقابل آنتی‌ژن های اختصاصی *هلیکوباکتر پیلوری* نظیر آلکیل هیدروپراکسید ردوکتاز می‌تواند کارایی اینگونه روش ها را افزایش دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

هلیکو باکتر پیلوری (*H. pylori*) یک باسیل گرم منفی، میکروآئروفیلیک، تاژکدار و مارپیچی شکل بوده که نخستین بار در سال ۱۹۸۳ بوسیله مارشال و وارن از نمونه‌های بیوپسی معده انسان جداسازی و معرفی گردید (۱). احتمالاً این باکتری معمولترین عفونت مزمن باکتریال در انسان بوده که تقریباً نیمی از جمعیت جهان را آلوده نموده است (۶-۲). آن عامل اصلی التهاب مزمن معده، زخم معده، زخم دوازدهه، سوء هاضمه‌های بدون زخم (non-ulcer dyspepsia)، سرطان معده و لنفومای بافت لنفوئیدی همراه مخاط معده MALT (lymphoma) بوده (۱۴-۵) و حتی برخی از بیماری ها واختلات خارج از دستگاه گوارش نظیر، بیماری نارسایی خونی قلب (IHD)، بیماری ریوی انسدادی مزمن (COPD)، کم خونی فقر آهن (IDA)، اختلال خونی ITP (idiopathic thrombocytopenic purpura)، همچنین بیماری های مغزی و عصبی نظیر میگرن و آلزایمر، بعلاوه ویار حاملگی به آن نسبت داده می‌شود (۲۶-۱۴).

همچنین بدلیل نقش اساسی این باکتری در ایجاد یکی از کشنده ترین سرطان ها در دنیا یعنی آدنوکارسینومای معده، آژانس بین المللی تحقیقات در سرطان وابسته به سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۱۹۹۴ آنرا در رده ی یک سرطان زاها قرار داده است (۹).

از این رو جهت تشخیص عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران و تعیین شیوع آلودگی آن در جوامع، روش های مختلفی بکار گرفته شده است ولی بعلت تنوع ژنومی در این باکتری (۲۹-۲۷) و توانائی های محدودی که هر یک از این روش ها دارند در استفاده از یک روش تشخیصی توافق حاصل نشده است (۳۴-۳۰) و لذا محققین بدنبال دست یابی به یک روش اختصاصی، سریع، ساده، کم هزینه و تکرار پذیر (reproducible) ودر عین حال دارای حساسیت (sensitivity) و ویژگی (specificity) زیاد هستند. هدف این مقاله بررسی اساس روش های مختلف تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* و ارزیابی کارایی این روش ها است. اما قبل از ورود به بحث مناسب است، مروری بر معیارهای ارزیابی تست های تشخیصی آزمایشگاهی داشته باشیم.اساساً جهت توصیف مشخصات هر تست آزمایشگاهی از اصطلاحاتی چون حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت (positive predictive value) و ارزش اخباری منفی (negative predictive value) استفاده می‌شود. این پارامترهای اخیر با شیوع (prevalence) بیماری در جامعه، مختلف و متنوع می‌گردد. شیوع یک بیماری در یک جامعه به نسبتی از افراد در جامعه اطلاق می‌گردد که بیماری را دارند. یک تست کامل، همه افراد دارای بیماری را با ثبت نتایج مثبت، شناسایی می‌کند (حساسیت ۱۰۰٪). از نظر عددی این است تعداد افراد مثبت واقعی (true positive) تقسیم بر تعداد افراد TP بعلاوه تعداد افراد منفی کاذب (false negative): TP/(TP + FN). علاوه براین، یک تست کامل همه افراد سالم و بدون بیماری را با ثبت نتایج منفی واقعی (true negative)، خواهد شناخت (ویژگی ۱۰۰٪): TN/(TN + FP)، که در آن FP (false positive)، تعداد افرادی است که بطور کاذب نتایج مثبت را نشان داده‌اند. برای مثال اگر شیوع یک بیماری ۴۰٪ است (یعنی ۴۰۰ نفر از هر ۱۰۰۰ نفر بیماری را دارند) و یک تست از هر ۴۰۰ نفر بیمار، ۳۴۰ نفر را بطور صحیح بیمار شناسایی می‌کند، پس حساسیت این تست، ۸۵٪ است و اگر یک تستی از ۶۰۰ نفر سالم، ۴۸۰ نفر را بطور صحیح سالم شناسایی می‌کند، پس ویژگی آن ۸۰٪ است. اگر شیوع بیماری فقط ۱۰٪ باشد، حساسیت و ویژگی تغییری نخواهند کرد و از ۱۰۰ نفر ۸۵ نفر را دارای بیماری و از ۹۰۰ نفر ۷۲۰ نفر را سالم و بدون بیماری خواهد شناخت. ارزش اخباری مثبت (PPV) یک تست عبارت است از میزان صحت یک نتیجه مثبت حاصل از تست و درصد قابل پیش بینی یک مثبت واقعی، و آن از نظر عددی برابر است با تعداد افراد مثبت واقعی (TP) تقسیم بر TP بعلاوه تعداد افرادی که بصورت کاذب نتیجه مثبت نشان داده اند: TP/(TP+ FP)، اما ارزش اخباری منفی (NPV) عبارت است از میزان صحت یک نتیجه منفی حاصل از تست و درصد قابل پیش بینی یک منفی واقعی و آن از نظر عددی از تقسیم تعداد موارد منفی واقعی (TN) بر TN بعلاوه منفی کاذب: TN(TN+FP)، بدست می آید (۳۶-۳۵).

امروزه جهت تشخیص آلودگی به هلیکو باکتر پیلوری از دو دسته از روش ها استفاده می‌شود، که عبارتند از: روش های تهاجمی (invasive tests) که روش های بر اساس بیوپسی نیز نامیده می‌شود و در آنها نیاز به آندوسکپی بیماراست تا نمونه بیوپسی برای انجام آزمایش گرفته شود و روش های

www.SID.ir

Archive of SID

غیر تهاجمی (non-invasive tests) که نیازی به آندوسکپی بیمار نیست (جدول۱).

جدول ۱. روش های تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* (۳۷)

۱- روش های تهاجمی	۲- روش های غیرتهاجمی
کشت بافت شناسی روش سریع اوره‌آز روشهای مولکولی	روش تنفسی اوره روش های بر اساس آنتی‌بادی روش های آنتی‌ژن مدفوعی

روش هـــای تهـــاجمی : از نظـــر تـــاریخی آلـــودگی بـــا *هلیکوباکتر پیلوری* نخست بوسیله بافت‌شناسی، سپس روش سریع اوره‌آز و سرانجام بوسیله کشت تشخیص داده مـی شـد. بـــه عبـــارت دیگـــر بوســـیله روش هـــای تهـــاجمی هـــم *هلیکوباکتر پیلوری* کشـف گردیـد و هـم نخسـتین روش هـای تشخیص آلودگی افراد با این باکتری می‌باشند.

این روش ها بر روی بیوپسی بدست آمـده از آندوسـکپی معـده بوده و بدلیل اینکه بطـور مسـتقیم بـه دنبـال شـواهدی بـرای تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند از حساسیت و ویژگـــی بـــالایی برخوردارنـــد و بعنـــوان روش مرجـــع gold) (standard جهت تشـخیص آلـودگی بـه *هلیکوبـاکتر پیلـوری* به کار می‌روند. در این دسته، روش های زیر جای دارند.

روش سریع اوره‌آز یا RUT (rapid urease test)

این روش بر اساس فعالیت آنزیم اوره‌آز *هلیکوباکتر پیلـوری* در نمونه بیوپسی است که سوبسترای اوره را در حضور یک معـرف رنگی نظیر فنـل رد (phenol red) بـه آمونیـاک و دی اکسـید کربن تبدیل می نماید.

$$NH_2\text{-}CO\text{-}NH_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$$
$$NH_3 + H2O \rightarrow NH_4^+ + OH^-$$

با افزایش pH توسط آمونیاک و در نتیجه تغییر رنگ معـرف، وجود *هلیکوباکتر پیلوری* تشخیص داده مـی‌شـود. تسـت هـای بـر ایـن اسـاس بـا نـام هـای تجـاری CLOtest, HpFast, PyloriTek, CPtest, EndoscHp قابل دسـترس مـی‌باشـند. نشـان داده شـده اسـت کـه حساسـیت و ویژگـی ایـن روش بـه ترتیـب ۹۵-۸۵ ٪ و۱۰۰-۹۵٪ اسـت (۳۱، ۳۵، ۴۰-۳۸). این روش در مقایسه بـا سـایر روش هـای تهـاجمی سـریعتر و ارزانتر قابل انجام می‌باشد.

کشت (culture)

در ایـن روش، نمونـه بیوپسـی در شـرایط میکروآئروفیلیـک (آتمسـفر حـاوی اکسـیژن ۵٪ و دی‌اکسـید کـربن ۱۰-۵٪) در محـیط‌هـای اختصاصـی Brucella blood agar حـاوی وانکومایسـین (vancomycine)، پلـی‌میکسـین (polymixin B)، و تـری‌متـوپریم (trimethoprim) بـه مـدت ۵-۳ روز در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتیگراد کشـت داده مـی‌شـود و سـپس کولـونی هـا بوسـیله رنـگ آمیـزی گـرم (Gram stain) و تست های بیوشیمیایی نظیر اکسـیداز، اوره‌آز و کاتـالاز مـورد بررسی قرار می‌گیرد. کشت هلیکوباکتر پیلوری اثبـات قطعـی آلـودگی بـه ایـن بـاکتری بـوده، امـا توانـایی جـدا سـازی *هلیکوباکتر پیلوری* از نمونه‌های بیوپسی وابسـته بـه امکانـات و تجربه آزمایشگاه ها است و بـه همـین دلیـل بـرای ایـن روش حساسیت متفاوتی گـزارش مـی‌گـردد. امـا ویژگـی ایـن روش ۱۰۰٪ بوده و اکثر تحقیقات برای این روش حساسـیت کمتـر از۱۰۰٪ اما بیشتر از ۹۰٪ در نظر گرفته‌اند (۳۵، ۴۲-۳۱).

بافت شناسی (histology)

بافت شناسی، نخستین روش برای تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* بـوده و بوسـیله مارشـال و وارن ابـداع گردیـده اسـت (۴۳). این روش بر مبنای رنگ آمیزی های مختلف بیوپسـی بـوده و در آن دو هدف اصلی دنبال می‌گردد. نخست مشاهده مسـتقیم *هلیکوبـــاکتر پیلـــوری* و دوم، بررســـی تغییـــرات شـــکل (morphologic) بافت معده، ناشی از وجود این بـاکتری اسـت (۴۴). بنابراین بافت شناسی تنها روشی است که می‌توانـد هـم *هلیکوباکتر پیلوری* را شناسایی کند و هم آسیب های ناشـی از این آلـودگی را آشـکار سـازد (۴۵). روش هـای رنـگ آمیـزی زیادی وجود دارد که شامل وارتـین-اسـتاری، هماتوکسـیلین-ائوزین، جنتا، تولوئیدین آبی، رومانوسکی و رنـگ‌آمیـزی هـای ایمنـی-شـیمی مـی‌باشـد، امـا رایجتـرین آنهـا روش گیمسـا (Giemsa staining) بـوده اسـت (۳۵، ۳۷، ۴۲). مطالعـات نشان می‌دهد که وقتی باکتری وجود داشـته باشـد بـا بررسـی دقیق آن با این روش، می‌توان آن را تشخیص داد و هیچکـدام از رنگ آمیزی ها بـر دیگـری ارجـح نیسـتند ولـی بـا اینحـال

www.SID.ir

Archive of SID

حساسیت بافت شناسی را عموماً ۹۵-۹۰ ٪ و ویژگی آن را ۹۸-۹۵ ٪ می دانند (۳۱، ۴۱، ۴۶-۴۵).

روش های مولکولی (molecular methods)

این روش ها اصولاً بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و بر مبنای تشخیص قسمتی از ژنوم *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه‌های بیوپسی می‌باشد. بر این اساس روش های مختلف PCR نظیر Real time PCR، RFLP-PCR، Nested PCR بنا شده است (۳۳، ۴۹ -۴۷). مزیت این روش بر سایر روش های براساس بیوپسی آن است که بوسیله این روش می توان ژن های آختصاصی دیگر در *هلیکوباکتر پیلوری* را تشخیص داد، خصوصاً ژن هایی که نقش مهمی در بیماریزایی این باکتری دارند (۵۱-۵۰)، و همچنین بوسیله این روش میتوان ژن های مرتبط با مقاومت این باکتری در مقابل آنتی بیوتیک ها را شناسایی کرد (۴۲،۵۲).

در روش PCR برای تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* از ژنهای مختلفی نظیر 16S rRNA، 23S rRNA ژنهای زیرواحدهای A، B و C اوره‌آز ، ژنهای *Cag A* و *Vac A* ، flaA و پروتئین شوک حرارتی (hsp) جهت طراحی پرایمرها استفاده شده است (۳۵-۳۴). محققین حساسیت و ویژگی PCR را بترتیب ۹۳/۲٪ و ۹۶/۲٪ محاسبه نموده‌اند (۴۱).

بعلاوه جهت تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* به روش PCR از نمونه‌های غیر بیوپسی نظیر بزاق، پلاک های دندانی و نمونه های مدفوع نیز استفاده شده است، اما نتایج مطلوبی در استفاده از نمونه‌های اخیر بدست نیامده است (۵۴-۵۳)، این موضوع احتمالاً ناشی از تجزیه تدریجی DNA باکتری در مدفوع بوده و یا ناشی از وجود مهار کنندگان PCR در مدفوع می‌باشد (۵۷-۵۵).

با این وجود در سالهای اخیر بسیاری از مطالعات تحقیقاتی نتایج نوید بخش در تشخیص DNA *هلیکوباکتر پیلوری* در مدفوع بوسیله PCR گزارش نموده‌اند. علاوه بر این اخیراً بوسیله PCR بسیاری از ژنهای مرتبط با مقاومت در مقابل آنتی‌بیوتیک هایی چون کلاریترومایسین، ماکرولیدها و کینون ها شناسایی شده است. بعنوان مثال بوسیله این تکنیک جهش در ژن 23S rRNA شناخته شده که *هلیکوباکتر پیلوری* را قادر به مقاومت در مقابل کلاریترومایسین می‌سازد (۴۵، ۳۷، ۳۵،۳۴).

امروزه بدلیل اینکه تکنیک PCR پر زحمت و گران است بیشتر در کارهای تحقیقاتی بکار گرفته می‌شود، بنظر می‌رسد در آینده نزدیک بتواند جایگاه مناسبی بعنوان یک تست روتین آزمایشگاهی در تشخیص آلودگی به این باکتری قرار گیرد.

روش های غیرتهاجمی

این روش ها جهت تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* از نمونه‌های خونی، تنفسی، ادراری، بزاقی و مدفوع بیمار استفاده می‌کنند. درحقیقت دو نوع متفاوت از این روش ها وجود دارد: مستقیم (direct) و غیرمستقیم (indirect). تست های مستقیم همانند تست های تهاجمی در جستجوی شواهد مستقیم وجود *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند بنابراین آنها قادرند عفونت فعال یعنی باکتری زنده را در افراد تشخیص دهند به همین دلیل به آنها تست های فعال (active tests) نیز می‌گویند نظیر تست آنتی‌ژن مدفوعی، که وجود آنتی‌ژن های باکتری را در مدفوع تشخیص می‌دهد و یا تست تنفسی اوره که فعالیت آنزیم اوره‌آز این باکتری را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. اما تست های غیرمستقیم با ارزیابی شواهد غیرمستقیم نظیر وجود آنتی‌بادی ها بر ضد *هلیکوباکتر پیلوری* در سرم، ادرار یا بزاق افراد، آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* را تشخیص می‌دهند (۵۹-۵۸). در واقع اندیکاسیون های بالقوه جهت استفاده از تست های غیرتهاجمی شامل موارد زیر است: ۱- غربالگری بیمارانی که نیاز به بررسی مستقیم مخاط معده ندارند. ۲- مواردی که بدست آوردن بیوپسی مشکل است، برای مثال در زخم های گوارشی خون ریزی دهنده (bleeding ulcers) و در درمان های ضد انعقادی (anticoagulant therapy)، ۳- ارزیابی کارایی درمان، ۴- مطالعات اپیدمیولوژیک، ۵- بررسی وجود آلود گی به *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماری های خارج دستگاه گوارشی و ۶- در مطالعات واکسیناسیون در مقابل *هلیکوباکتر پیلوری* (۶۰،۳۷).

مهمترین روش های غیر تهاجمی تشخیص هلیکوباکتر پیلوری، شامل موارد زیر است:

روش تنفسی اوره یا UBT (urea breath test)

روش تنفسی اوره نخستین روش غیرتهاجمی در تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* است که در سال ۱۹۸۷ یعنی فقط چند سال از کشف این باکتری توسط دیوید گراهام به جامعه پزشکی ارائه گردید (۶۱). آن دقیق‌ترین روش غیرتهاجمی در تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* بوده (۶۰) و بر اساس فعالیت آنزیم اوره‌آز *هلیکوباکتر پیلوری* استوار شده است، بنابراین قادر است عفونت فعال را تشخیص دهد. به این

www.SID.ir

Archive of SID

ترتیب که در صورت وجود این باکتری، اوره نشاندار بشکل ^{14}C یا ^{13}C، خورده شده توسط بیمار به دی اکسید کربن و آمونیاک هیدرولیز می‌گردد. دی اکسیدکربن نشاندار پس از جذب خون، از طریق دستگاه تنفسی در هوای بازدمی دفع خواهد شد که قابل ردیابی و تشخیص توسط دستگاه های شمارشگر (scintillation counter) یا اسپکترومتر جرمی (mass spectrometer) می‌باشد. حساسیت و ویژگی این تست بترتیب ۹۷٪ و ۹۵٪ در اکثر مطالعات بدست آمده است (۵۹، ۶۵-۶۲). به دلیل حساسیت و ویژگی بالای آن، بسیاری از محققین آنرا بعنوان روش مرجع در نظر گرفته اند.

روش های بر اساس آنتی بادی (tests based on antibodies)

پس از کولونیزاسیون معده توسط *هلیکوباکتر پیلوری* سیستم ایمنی میزبان تحریک شده و یکی از پاسخ های آن تولید آنتی بادی بر علیه آنتی‌ژن های باکتری است. روش های بر اساس آنتی‌بادی که روش های ایمونولوژیک نیز نامیده می شوند، بر مبنای تشخیص آنتی‌بادی های اختصاصی IgG و IgA و IgM بر علیه آنتی‌ژن های *هلیکوباکتر پیلوری* در خون، ادرار و یا بزاق بیمار می‌باشد (۸۰-۶۶). بر این اساس چند روش که از تکنیک های مختلف بیوشیمیایی بهره می گیرند در دسترس قرار گرفته است که عبارتند از:

الایزای منظم (regular ELISA)

الایزاهای منظم از گروه تست های اولیه غیرتهاجمی است که پس از کشت موفقیت‌آمیز *هلیکوباکتر پیلوری* در دسترس قرار گرفت (۴۲). اینگونه الایزاها رایج‌ترین روش های تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* در مطالعات اپیدمیولوژیک و تعیین میزان شیوع آن در جوامع است. در واقع این تست ها جهت تشخیص کمی و کیفی آنتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن های *هلیکوباکتر پیلوری* در سرم (serum ELISA) ، ادرار (urine ELISA) و بزاق (salivary ELISA) از تکنیک ایمنی-آنزیمی (EIA) در قالب الایزا استفاده می‌کنند (۷۷-۶۶). اینگونه الایزاها جهت پوشش‌دهی چاهک ها از سه نوع آنتی‌ژن استفاده می‌کنند که عبارتند از: آنتی‌ژن های خام (crude antigen) نظیر سلول های کامل (whole cells) و سونیکات های سلول های کامل باکتری، عصاره‌های سلولی نظیر عصاره های گلیسین (glycine extracts) و آنتی‌ژن های در مقابل گرما پایدار (heat-stable antigens) و یا از چند پروتئین خالص یافته یا نوترکیب نظیر اوره‌آز (۸۱، ۸۵) .

مطالعات نشان می‌دهد پاسخ IgA و IgM از نظر کلینیکی جهت تشخیص آلودگی به این باکتری مفید نمی‌باشد (۲،۳۷،۸۳- ۸۱)، علاوه بر این اصولاً اینگونه روشها که بر پایه شناسایی آنتی بادیهاست، قادر نیستند یک آلودگی فعال (وجود *H. pylori* زنده در بدن) را از یک آلود گی گذشته تمییز دهند. به این دلیل که غلظت آنتی‌بادی در خون افرادی که عفونت فعال ندارند به مدت طولانی بالا باقی می‌ماند و بیشتر بیمارانی که در آنها این باکتری بوسیله آنتی‌بیوتیکها ریشه کن شده است، سطح بالای آنتی بادی را به مدت طولانی حفظ می‌کنند (۵۸، ۵۹، ۶۶،۸۲، ۴۵). مسئله اساسی دیگر در این روشها، انتخاب آنتی ژن در پوشش دهی چاهکهای پلیتهای الایزا است، زیرا تحقیقات نشان می‌دهد بالاترین کارایی این تستها در مطالعاتی است که از کیتهایی استفاده نموده‌اند که در آن منطقه جغرافیایی توسط نژادهای *هلیکوباکتر پیلوری* محلی آن منطقه استاندارد شده‌اند (۴۵، ۴۲). براین مبنا است که برخی مطالعات نشان می‌دهد که نژادهای آسیایی *هلیکوباکتر پیلوری* متفاوت از نژادهای سایر مناطق دنیاست و این امر موجب کاهش حساسیت اینگونه الایزا گردیده است (۴۹، ۷۰). در هر صورت بررسیهای متا- آنالیزی حساسیت و ویژگی الایزا سرمی که به آن تست سرولوژیک (serological test) نیز گویند، را بترتیب ۹۴٪ -۵۴ ٪ و ۹۷٪ -۵۹٪ در نظر گرفته است (۸۴ ، ۸۶). بسیاری از مطالعات صحت الایزا ادراری را قابل مقایسه با الایزا سرمی می‌دانند، اما بنظر می رسد الایزا بزاقی در مقایسه با الایزا سرمی از حساسیت و ویژگی مناسبی برخوردار نیست (۲ ، ۵۸).

با این وجود بسیاری از مطالعات سرولوژی را بدلیل ارزان بودن، در دسترس بودن و همچنین سهولت انجام آن در تحقیقات اپیدمیولوژی *هلیکوباکتر پیلوری* توصیه نموده‌اند، اما جهت تأیید ریشه‌کنی در افراد درمان یافته توصیه نمی‌کنند (۱۲۴،۱۲۳، ۶).

سنجشهای ایمنوبلات (immunoblot assay)

اینگونه تستها بر اساس تکنیک وسترن بلات (Western blot) جهت تشخیص آنتی‌بادیها در سرم، ادرار یا بزاق بر علیه برخی پروتئینهای اختصاصی *هلیکوباکتر پیلوری* نظیر *CagA* و *VacA* بنا شده است (۴۱ ، ۵۸). بسیاری از مطالعات حساسیت و ویژگی آنرا در حد الایزای سرمی یافته اند (۲ ،۴۱ ،۷۰).

www.SID.ir

Archive of SID

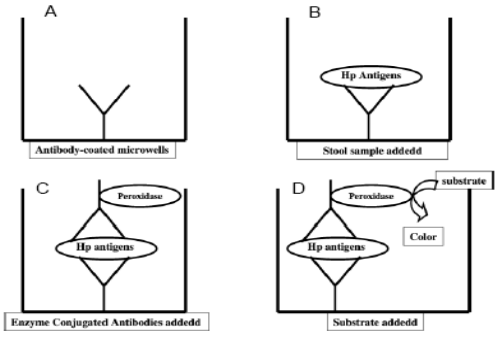
ایمونوکروماتوگرافی (immunochromatography)

کیت RAPIRUN بر اساس اصول ایمونوکروماتوگرافی برای تشخیص سریع آنتی بادی برضد *هلیکوباکتر پیلوری* در ادرار طراحی شده است. ظاهراً حساسیت و ویژگی آن قابل مقایسه با الایزا سرمی می‌باشد (۲،۴۹ ، ۷۸). از آنجائی که آن می‌تواند در مطب پزشکان استفاده شود و در زمان کوتاه وجود *هلیکوباکتر پیلوری* در بیمار را تشخیص دهد بر الایزاها برتری دارد (۲، ۸۵).

روشهای آنتی ژن مدفوعی (stool antigen tests)

این روشها همانند روشهای تهاجمی بطور مستقیم بدنبال تشخیص وجود یا عدم وجود *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشد، بنابراین در گروه تستهای فعال قرار دارد که قادر است وجود عفونت فعال را تشخیص دهد. در حقیقت آنها بر مبنای تشخیص آنتی‌ژنهای *هلیکوباکتر پیلوری* در مدفوع بیماران بوده و بر این اساس تکنیک الایزا بخدمت گرفته شده است.

در اینگونه روشها، درون چاهکهای الایزا آنتی‌بادی بر ضد آنتی ژنهای باکتری پوشش می‌دهند، هنگام انجام آزمایش با افزایش مقادیر بسیار کم سوسپانسیون مدفوع بیمار به درون چاهک، چنانچه آلوده به باکتری باشد، آنتی بادیهای مذکور قادرند به آنتی‌ژنهای مربوطه متصل گردند. در واقع اصل براین است که سلولهای مخاط معده هر یک تا سه روز تجدید می شوند، بنابراین با کنده شدن آنها و دفع به درون مدفوع، تعدادی از باکتریهای معده آلوده را با خود همراه می‌سازند (۸۹-۸۷). در مرحله بعد در انجام این تست، آنتی بادی ثانویه کنژوگه به آنزیم نظیر پراکسیداز اضافه می‌کنند، که در صورت به دام افتادن *هلیکوباکتر پیلوری* یا آنتی ژنهای آن، بین دو آنتی‌بادی ساندویچ می‌گردد، و در مرحله نهایی با افزایش سوبسترای آنزیمی و تشکیل کمپلکس رنگی آن آشکار می‌گردد (شکل ۱).



شکل ۱. اساس تست آنتی ژن مدفوعی (۵۸)

امروزه دو گروه از این روشها در دسترس می‌باشد. گروه نخست این روشها که از اواخر دهه ۱۹۹۰ وارد آزمایشگاهها شد، از آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد *هلیکوباکتر پیلوری* جهت پوشش‌دهی چاهکهای الایزا، استفاده می‌کند، به همین دلیل تستهای آنتی‌ژن مدفوعی بر اساس پلی‌کلونال (polyclonal antibody –based stool antigen tests)نامیده می‌شوند. نخستین کیت بر این اساس توسط یک شرکت آمریکائی بنام Meridian Diagnostics ساخته شده است و بنام HpSA™ شناخته می‌شود (۹۱-۹۰). آنتی‌بادی پلی‌کلونال در این نوع کیت بر ضد *هلیکوباکتر پیلوری* در خرگوش تولید شده و بوسیله تکنیک ایمنی افینیته (immunoaffinity) خالص شده است (۹۳-۹۲). در سال ۱۹۹۸ اداره کل دارو و غذای ایالات متحده (FDA) این روش را برای تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* و همچنین پیگیری کارایی ریشه کنی در بالغین تأیید و تصدیق نموده است. امروزه کیتهای بر اساس آنتی‌بادی پلی‌کلونال توسط سایر شرکتها از کشورهای دیگر نیز ساخته شده است از جمله کیت Apollo *H. Pylori* Antigen Test از چین، Equipar HpSA Test از ایتالیا و Novitec® از سویس می باشند. اما اخیراً گروه دوم این تست ها که از چند آنتی‌بادی مونوکلونال جهت پوشش‌دهی چاهکهای الایزا استفاده می‌کند، در دسترس قرار گرفته است. مطالعات زیادی در بررسی کارایی روشهای برمبنای پلی‌کلونال انجام یافته است و میانگین حساسیت این روش را ۹۱٪ و میانگین ویژگی آنرا ۹۳٪ یافته‌اند (۱۰۱-۸۸) ، که قابل مقایسه با UBT بوده (۹۱-۸۹) و حتی با وجود نژادهای متفاوت *هلیکوباکتر پیلوری* در آسیا، حساسیت و ویژگی این روش بسیار مناسب بدست آمده است (۹۴-۹۲). با این وجود تنها چند مطالعه کارایی تستهای بر مبنای پلی‌کلونال را کمتر از UBT در پیگیری درمان ریشه کنی باکتری گزارش نموده‌اند و یا در برخی شرایط بیماران نظیر خونریزی ناشی از زخم دستگاه گوارش (gastroduodenal ulcer bleeding) کارایی نامناسب برای این نوع تستها بدست آمده است (۱۰۳-۱۰۲).

گروه دوم از روشهای آنتی‌ژن مدفوعی تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* که نسل دوم کیتهای آنتی ژن مدفوعی می‌باشند در اوایل دهه ۲۰۰۰ ساخته و بکار گرفت ه شده است. در طراحی این گروه از روشها از چند آنتی بادی مونوکلونال بر علیه آنتی ژنهای *هلیکوباکتر پیلوری* استفاده شده است به همین دلیل آنها را بنام تستهای آنتی‌ژن مدفوعی بر اساس

www.SID.ir

Archive of SID

مونوکلونال (monoclonal antibody-based stool antigen tests) می‌شناسند. نخستین کیت از این روش FemtoLab *H. pylori*™ نامیده می‌شود که توسط یک شرکت آلمانی عرضه شده است. امروزه سایر شرکتها از نقاط مختلف دنیا نیز قادر به ارائه اینگونه کیتها می‌باشند از جمله آنها کیت Amplified IDEIA HpStAR ساخت دانمارک، کیت ImmunoCard STAT و HePy-Stool ساخت ایتالیا و Simple H. pyl ساخت اسپانیا می‌باشد.

تاکنون مطالعات زیادی کارایی اینگونه روشها را ارزیابی نموده و در تمام این مطالعات حساسیت و ویژگی بسیار عالی برای آن در هر دو گروه بالغین و بچه‌ها هم در تشخیص اولیه آلودگی و هم در تأیید و پیگیری درمان بدست آمده است (۱۱۳-۱۰۴).

بعنوان مثال در سال ۲۰۰۶ یک متا-آنالیز وسیع با استفاده از ۲۴۹۹ بیمار توسط Gisbert و همکارانش حساسیت و ویژگی روشهای بر مبنای مونوکلونال را قبل از درمان بترتیب ۹۴٪ و ۹۷٪ و با استفاده از ۹۵۷ بیمار حساسیت و ویژگی پس از درمان بترتیب ۹۳٪ و۹۶٪ بدست آورده اند (۱۱۳).

بعلاوه در بسیاری از مطالعات، مقایسه کارایی روشهای پلی کلونال با روشهای مونوکلونال نشان می‌دهد که روشهای پلی‌کلونال حساسیت و کارایی کمتری نسبت به روشهای مونوکلونال دارند (۱۱۳-۱۰۶). کاهش کارایی اینچنین تستها را به علتهای زیر نسبت می‌دهند: الف- کاهش حساسیت که منجر به نتایج منفی کاذب در افراد تحت درمان که هنوز باکتری در آنها کاملاً ریشه کن نشده است، ناشی از تراکم کم باکتری با مصرف دارو می‌دانند که باعث می‌شود که آنتی‌ژنهای دفعی در مدفوع برای ایجاد نتایج مثبت کافی نباشد (۱۱۲). ب- جهت تهیه آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال برای این تستها از تزریق داخل صفاقی آنتی‌ژنهای *هلیکوباکتر پیلوری* به خرگوشها استفاده می شود. اولاً در انواع مختلف از کیتهای پلی‌کلونال از ترکیبات آنتی‌ژنی متفاوت برای تهیه این نوع آنتی‌بادی استفاده شده است (۱۱۲-۱۱۱). ثانیاً این روش تهیه آنتی‌بادی یک مجموعه‌ای از آنتی‌بادیها را بدست می‌دهد که در هر حیوان متفاوت است (۱۱۳-۱۱۲).

ج- کاهش ویژگی آنتی‌ژنیک در تهیه آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال باعث بروز واکنش متقاطع (cross reactivity) با آنتی‌ژنهای گونه‌های دیگر هلیکوباکتر شده که منجر به نتایج مثبت کاذب می‌گردد و آن بدلیل احتمال وجود گونه‌های دیگر هلیکوباکتر نظیر *هلیکوباکتر بیلیس* (*Helicobacter bilis*)، *هلیکوباکتر راپینی* (*Helicobacter rappini*)، *هلیکوباکتر هیلمانی* (*Helicobacter heimanii*) در دستگاه گوارش انسان است (۱۱۵-۱۱۴).

از آنجائیکه تهیه آنتی بادیهای پلی کلونال در مقایسه با مونوکلونال به دلیل هزینه کمتر تهیه آن، رایج تراست و بعلاوه در مدت زمان کوتاه تری تهیه آن میسر است، عده ای از محققین معتقدند که با انتخاب آنتی‌ژنهای اختصاصی و تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه آنها و بکارگیری این آنتی‌بادیها در کیتهای آنتی‌ژن مدفوعی بر اساس پلی‌کلونال، می توان کارایی آنها را افزایش داد. یکی از این آنتی ژنهای اختصاصی *هلیکوباکتر پیلوری* آنتی ژن مختص گونه آن با وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون می‌باشد که امروزه به عنوان آنزیم آلکیل هیدرو پراکسید ردوکتاز (AhpC) شناخته می‌شود.

در سال ۱۹۹۱، O'Toole و همکارانش این پروتئین ۲۶ kDa مختص گونه را از بسیاری از نژادهای *هلیکوباکتر پیلوری* جداسازی نمودند و نشان دادند که آن از نظر آنتی‌ژنی بی نظیر است (۱۱۶) . در سال ۱۹۹۷ یک گروه از محققین به سرپرستی Hook-Nikanne با آنالیز پروتئینهای لیزات سلولی (whole cell lysate) نژادهای مختلف *هلیکوباکتر پیلوری* از نقاط مختلف دنیا، به این نتیجه رسیدند که باند تقریباً ۲۵ kDa در الگوی SDS-PAGE پروتئینها در همه نژادها یافت می‌شود (۱۱۷).

در ایران نیز در سال ۲۰۰۴ دکتر شیخیان و همکارانش با انجام وسترن بلاتینگ عصاره پروتئینی مدفوع بیماران آلوده به باکتری، نشان دادند که باند دارای وزن مولکولی ۲۶ کیلو دالتون در الگوی بلاتینگ همه افراد آلوده یافت می‌شود و همانند سایر محققین آنرا به عنوان ابزار تشخیصی معرفی نمودند (۱۱۸).

امروزه این پروتئین را به نام الکیل هیدروپراکسید ردوکتاز (AhpC) می‌شناسند و در طی چند سال اخیر بسیاری از محققین دیگر نشان دادند که آن از پروتئینهای حفظ شده در *هلیکوباکتر پیلوری* بوده و از نظر آنتی ژنیک بی‌نظیر می‌باشد. محمدیان و همکارانش در دانشگاه علوم پزشکی تهران به منظور استخراج و تخلیص آنتی‌ژن پروتئینی مختص گونه *هلیکوباکتر پیلوری* چند روش سریع، ساده، کم هزینه را ارائه نمودند (۱۲۱-۱۱۹) و بعلاوه در یک روش کم هزینه و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه آنتی‌بادی پلی کلونال، علیه آن تهیه گردید (۱۲۲). آنالیز ایمونوژنیسیته بوسیله تکنیکهای دات بلاتینگ (dot blotting) و وسترن بلاتینگ (Western blotting) با استفاده از این آنتی‌بادی نشان داد که آن قادر به

www.SID.ir

Archive of SID

آشکار سازی پروتئین مذکور در عصاره پروتئینی باکتری است. بعلاوه آنها نشان دادن که این پروتئین را می‌توان در عصاره پروتئینی مدفوع افراد آلوده به باکتری بوسیله آنتی‌بادی تهیه شده تشخیص داد (۱۲۲).

اخیرا پوراکبری و همکارانش با کلونینگ ژن AhpC *H. pylori* در *E. coli* و تهیه پروتئین خالص و سپس تهیه آنتی بادی پلی‌کلونال آن در خرگوش بوسیله ایمونوبلاتینگ پروتئین AhpC را در مدفوع ۸۴ بیمار کودک و بزرگسال ارزیابی کردند. آنها حساسیت ۸۳/۳٪ و ویژگی ۹۱/۷٪ را برای این تست بر اساس AhpC ، محاسبه نمودند که کارایی قابل قبول برای تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* در کودکان و بالغین می‌باشد (۱۲۵).

نتیجه گیری

با توجه به شیوع زیاد آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* در جوامع، و عوارض وخیم ناشی از این آلودگی، تشخیص باکتری از اهمیت زیادی برخوردار است. روشهای تشخیص به دو دسته تهاجمی و غیر تهاجمی تقسیم می‌شوند. روشهای تهاجمی که در روی نمونه‌های بدست آمده از آندوسکوپی معده انجام می شوند، چون بطور مستقیم بدنبال شناسایی وجود *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند، دارای حساسیت و ویژگی زیاد بوده و قادر به تشخیص عفونت فعال هستند به همین دلیل بعنوان روشهای مرجع، مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما معایب اینگونه روشها عبارتند از: هزینه زیاد، نیاز به بکار گیری تجهیزات تخصصی ، درد و ناراحتی در بیمار، بعلاوه نمونه برداری از بافت معده با انتقال برخی از بیماریهای عفونی دیگر نظیر هپاتیت و ایدز نیز همراه است. بطور کلی، عدم توزیع یکنواخت باکتری در دیواره معده افراد آلوده، موجب خطای نمونه برداری می شود که منجر به نتیجه منفی کاذب می‌گردد. مجموعه‌ای از این عوامل، استفاده روشهای تهاجمی در تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* را محدود می‌سازد. به همین دلیل محققین بدنبال ابداع روشی ساده، سریع، مقرون به صرفه و دارای حساسیت و ویژگی زیاد برای تشخیص آلودگی به این باکتری می‌باشند.

در اکثر روشهای غیرتهاجمی، تشخیص وجود *هلیکوباکتر پیلوری* یعنی تشخیص آلودگی افراد به این باکتری، بصورت غیرمستقیم از روی نمونه‌های سرمی، ادراری، بزاقی و ... است. به همین دلیل، این قبیل روشها قادر به تشخیص عفونت فعال نمی‌باشند از این رو، آنها حساسیت و ویژگی کمتری از روشهای تهاجمی دارند. روشهایی که وجود آنتی‌ژنهای دفعی *هلیکوباکتر پیلوری* در مدفوع را مورد بررسی قرار می‌دهند، روشهای آنتی ژن مدفوعی نامیده می‌شوند. و براساس واکنشهای ایمنی - آنزیمی در قالب الایزا بنا شده اند. مزایای استفاده از این گونه روشها عبارتند از: سهولت روش نمونه‌گیری، امکان نگهداری طولانی نمونه ، عدم نیاز به استفاده از تجهیزات پیچیده و گران قیمت، و نیروی انسانی متخصص، زمان نسبتاً کوتاه انجام آزمایش. امروزه دو گروه از این روشها بخدمت گرفته شده است. نخستین گروه از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال علیه آنتی‌ژنهای پیکره باکتری جهت پوشش‌دهی چاهک های الایزا استفاده می‌کند که بوسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص شده است. اما دومین گروه از تعدادی از آنتی بادی‌های مونوکلونال علیه برخی از آنتی ژنهای *هلیکوباکتر پیلوری* جهت پوشش‌دهی چاهک های الایزا استفاده می‌کند.

مطالعات بسیاری از محققین نشان می‌دهد که حساسیت و ویژگی کیتهای‌های بر مبنای مونوکلونال بالاتر از کیتهای‌های بر اساس پلی کلونال می‌باشد و علت این امر را به افزایش ویژگی آنتی ژنیک (antigenic specificity) نسبت داده اند. اما تهیه و تولید آنتی بادی‌های پلی‌کلونال در مقایسه با تهیه و تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال دارای مزایایی شامل ارزان بودن، زمان کوتاه جهت تهیه و تولید(۶۰-۴۵ روز) می باشد در حالیکه تهیه و تولید آنتی بادیهای مونوکلونال ۱۲-۳ ماه به طول می‌انجامد. تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال برخلاف تولید آنتی بادی‌های مونوکلونال به تخلیص کامل آنتی ژن نیاز دارد. بعلاوه آنتی‌بادی‌های پلی کلونال، تقریباً برای همه روش‌های ایمونوشیمیایی مناسب هستند. به دلیل مجموعه‌ای از مزایای مذکور در تأمین کیت‌های بر مبنای پلی‌کلونال، بسیاری از محققین بدنبال ارتقاء کیفیت این گونه از روش‌ها می‌باشند. براین اساس عده ای از محققین معتقدند که با انتخاب آنتی ژنهای اختصاصی *هلیکوباکتر پیلوری* و تهیه آنتی بادی پلی‌کلونال علیه آنها و استفاده از آنها در طراحی اینگونه از روشها، می توان کارایی آنها را افزایش داد. بر این اساس استفاده از آنتی بادی پلی‌کلونال بسیار اختصاصی در مقابل آنتی ژن‌های اختصاصی *هلیکوباکتر پیلوری* نظیر آنتی ژن مختص گونه یعنی آلکیل هیدروپراکسید ردوکتاز این باکتری، در طراحی اینگونه روشها پیشنهاد می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Marshal BJ, Warren JR. *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. Lancet. 1983; 1:1273-1275.
2- Kabir S. *Review article: clinic-based testing for Helicobacter pylori infection by enzyme immunoassay of faeces, urine and salive*. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17: 1345-1354.
3- Dattoli VCC, Veiga RV, da Cunha SS, Pontes-de Cavalho LC, Barreto ML, et al. *Seroprevalence and potential risk factors for Helicobacter pylori infection in Brazillian children.* Helicobacter. 2010; 15: 273-278.
4- Fock KM, Ang TL. *Epidemiology of Helicobacter pylori infection and gastric cancer in Asia.* J Gastroenterol Hepatol. 2010; 25: 479-486.
5- Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. *Helicobacter pylori: a poor man's gut pathogen?* Gut Pathog. 2010; 2(1):2.
6- McColl KEL. *Helicobacter pylori infection*. N Engl J Med. 2010; 362(17): 1597-1604.
7- Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferraro F, Chiesa C. *Consequences of Helicobacter pylori infection in children*. World J Gastroenterol. 2010; 16(41): 5181-5194.
8- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori infection*. N Engl J Med. 2002; 347: 1175-1186.
9- Makola D, Peura DA, Crowe S. *Helicobacter pylori infection and related gastrointestinal diseases*. J Clin Gastroenterol. 2007; 41: 548-558.
10- de Vries AC, Kuipers EJ. *Helicobacter pylori infection and nonmalignant diseases.* Helicobacter. 2010; 15 (Suppl. 1): 29-33.
11- Wu M-S, Chow L-P, Lin J-P, Chiou S-H. *Proteomic identification of biomarkers related to Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease: Challenges and opportunities*. J Gastroenterol Hepatol. 2008; 23: 1657-1661.
12- Tanih NF, Ndip LM, Clarke AM, Ndip RN. An *overview of pathogenesis and epidemiology of Helicobacter pylori infection*. Afr J Microb Res. 2010; 4(6): 426-436.
13- Huang JQ, Hunt RH. Review article: *Helicobacter pylori and gastric cancer-the clinician's point of view*. Aliment Pharmacol Ther. 2000; 14(suppl.3): 48-54.
14- Cremonini F, Gasbarrini A, Armuzzi A, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori-related diseases*. Eur J Clin Inves. 2001; 31: 431-437.
15- Franceschi F, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori and extragastric diseases*. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007; 21: 325-334.
16- Tsang KW, Lam S-K. *Helicobacter pylori and extra-digestive diseases*. J Gastroenterol Hepatol. 1999; 14: 844-850.
17- Hino M,Yamane T, Park K, Takubo T, Kitagawa S, Higuchi K, Arakawa T. *Platelet recovery after eradication of Helicobacter pylori in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.* Ann Hematol. 2003; 82: 30-32.
18- Figura N, Franceschi F, Santucci A, Bernardini G, Gasbarrinin G. *Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection.* Helicobacter. 2010; 15(suppl. 1): 60-68.
19- Lenzi C, Palazzuoli A, Giordano N, Alegente G, Gonnell Campagna MS, et al. H. *pylori infection and systemic antibodies to CagA and heat shock protein 60 in patients with coronary heart disease.* World J Gastroenterol. 2006; 12: 7815-7820.
20- Gencer M, Ceylan E, Yildiz Zeyrek F, Aksoy N. *Helicobacter pylori seroprevalence in patients with chronic obstructive pulmonary disease and its relation to pulmonary function tests.* Respiration. 2007; 74: 170-175.
21- Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M. *A haematologist's view of unexplained iron deficiency anemia in males: Impact of Helicobacter pylori eradication*. Blood Cells Mol Dis. 2007; 38: 45-53.
22- Kodama M, Kitadai Y, Ito M, Kai H, Masuda H, Tanaka S, et al. *Immune response to CagA protein is associated with improved platelet count after Helicobacter pylori eradication in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.* Helicobacter. 2007; 12: 36-42.
23- Matsukawa Y, Kato K, Hatta Y, Iwamoto M, Mizuno S, Kurihara R, et al. *Helicobacter pylori eradication reduces platelet count in patients without idiopathic thrombocytopenic purpura.* Platelets. 2007; 18: 52-55.
24- Kountouras J, Gavalas E, Zavos C, Stergiopoulos C, Chatzopoulos D, Kapetanakis N,et al. *Alzheimer's disease and Helicobacter pylori infection: defective immune regulation and apoptosis as proposed common links.* Med Hypotheses. 2007; 68(2): 378-388.
25- Mavromichalis I, Zaramboukas T, Giala MM. *Migraine of gastrointestinal origin*. Eur J Pediatr. 1995; 154: 406-410.
26- Aytac S, Turkay C, Kanbay M. *Helicobacter pylori stool antigen assay in hyperemesis gravidarum: a risk factor for hyperemesis gravidarum or not?* Dig Dis Sci. 2007; 52: 2840-2844.
27- Kraft C, Stack A, Josenhans C, Niehus E, Dietrich G, Correa P, et al. *Genomic changes during chronic Helicobacter pylori infection*. J Bacteriol. 2006; 188(1): 249-254.
28- Lundin A, Björkholm B, Kupershmidt I, Unemo M, Nilsson P, Andersson DI, et al. *Slow genetic divergence of Helicobacter pylori strains during long-term colonization.* Infect Immun. 2005; 73(8): 4818-4822.
29- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. *DNA diversity among clinical isolates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting*. Nucl Acids Res. 1992; 20: 5137-5142.
30- Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C, Gatta L, Geminiani A, et al. *Review article: invasive and non-invasive tests for Helicobacter pylori infection.* Aliment Pharmacol Ther. 2000; 14(Suppl. 3): 13-22.
31- Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. *Review article: diagnosis of Helicobacter pylori infection.* Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16 (Suppl. 1): 16-23.
32- Rautelin H, Lehours P, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter*. 2003; 8(Suppl. 1): 13-20.
33- Krogfelt K A, Lehours P, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter. 2005; 10(Suppl. 1): 5-13.
34- Calvet X, Lehours P, Lario S, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter. 2010; 8(Suppl. 1): 7-13.

www.SID.ir

Archive of SID

35- Ricci C, Holton J, Vaira D. *Diagnosis of Helicobacter pylori: Invasive and non-invasive tests*. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2007; 21: 299-313

36- Marshal WJ, Bangert SK. *Clinical Chemistry*. Philadelphia: Mosby 2008, 1-13.

37- Hirschl AM, Makristathis A. *Methods to detect Helicobacter pylori: From culture to molecular biology*. Helicobacter. 2007; 12(Suppl.2): 6-11.

38- Bermejo F, Boixeda D, Gisbert JP, Defarges V, Sanz JM, Redondo C, et al. *Rapid urease test utility for Helicobacter pylori infection diagnosis in gastric ulcer disease.* Hepatogastroenterology. 2002; 49(44): 572-575.

39- Tseng CA, Wang MW, Wu DC. *Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection.* Dig Dis Sci. 2005; 50: 449-452.

40- Onders RP. *Detection methods of Helicobacter pylori: accuracy and costs.* Am Surg. 1997; 63: 665-668.

41- Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergey B, Barberis C, Talby P,et al. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection: Non-invasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests*. Am J Gastroenterol, 2001; 96: 353-358.

42- Selgrad M, Kandulski A, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori: diagnosis and treatment.* Curr Opin Gastroenterol. 2009; 25: 549-556.

43- Marshal BJ, Warren JR. *Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration*. Lancet. 1984; 1:1311-1315.

44- Janulaitytė-Günther D, Günther T, Pavilonis A, Kupčinskas L. *What Bizzozero never could image - Helicobacter pylori today and tomarrow*. Medicina. 2003; 39: 542-549.

45- Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. *Helicobacter pylori diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009*. Eur J Pediatr. 2010; 169(1): 15-25.

46- Calvet X, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, lario S, Ramírez-Lázaro M, Quesada M, et al. *Accuracy of diagnostic tests for Helicobacter pylori: A reappraisal*. Clin Infect Dis. 2009; 48: 1385-1392.

47- Valentine JL, Arthur RR, Mobley HLT, Dick JD. *Detection of Helicobacter pylori by using the polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol. 1991; 29(4): 689-695.

48- Farshad S, Rasouli M, Alborzi A. *Simultaneously detection of Helicobacter genus and Helicobacter pylori species using a Multiple PCR method.* Iran Biomed Journal. 2004; 8(4): 205-209.

49- Makristathis A, Hirschl AM, Lehours P, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection.* Helicobacter. 2004; 9(Suppl. 1): 7-14.

50- Domínguez-Bello MG, Cienfuentes C, Romero R, García P, Gómez I, Mago V, et al. *PCR detection of Helicobacter pylori in string-absorbed gastric juice*. FEMS Microbiol Let. 2001; 198(1): 15-16.

51- Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, Ohtani M, Ito Y, Suto H, et al. *Identification of Helicobacter pylori and the Cag A genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool*. FEMS Immun Med Microbiol. 2005; 44: 261-268.

52- Kwon DH, Osato MS, Graham DY, El-Zaatari FAK. *Quantitative RT-PCR analysis of multiple genes encoding putative metronidazole nitroreductases from Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents. 2000; 15(1): 31-36.

53- Vinette KMB, Gibney K, Proujansky R, Fawcett P. *Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing H. pylori infection in pediatric patients*. BMC Microbiol. 2004; 4:5.

54- Kabir S. *Detection of Helicobacter pylori DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review.* Helicobacter. 2004; 9(2): 115-123.

55- Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. *Detection of Helicobacter pylori DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors.* J Microbiol Methods. 2001; 45(2): 89-94.

56- Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. *Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model*. J Clin Microbiol. 1997; 35: 995-998.

57- Moreira D. *Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations*. Nucleic Acid Res. 1998; 26(13): 3309-3310.

58- Gatta L, Ricci A, Tampieri A, Vaira D. *Non-invasive techniques for the diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Clin Microbiol Infect. 2003; 9(6): 489-496.

59- Vakil N, Vaira D. *Non-invasive tests for the diagnosis of H. pylori infection.* Rev Gastroenterol Disord. 2004; 4(1): 1-6.

60- Dzierżanowska-Fangrat K, Lehours P, Mégraud F, Dzierżanowska D. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection.* Helicobacter, 2006; 11(suppl.1): 6-13.

61- Graham DY, Klein PD, Evans DJ JR, Evans DG, Alpert Lc, Opekun Ar, Boutton TW. *Campylobacter pylori detected noninvasively by the ^{13}C-urea breath test*. Lancet. 1987; i: 1174-1177.

62- Abrams DN, Koslowsky I, Matte G. *Pharmaceutical interference with the [^{14}C] carbon urea breath test for the detection of Helicobacter pylori infection*. J Pharm Pharmaceut Sci. 2000; 3: 228-333.

63- Nakamura RM. *Laboratory tests for the evalution of Helicobacter pylori infections*. J Clin Lab Anal. 2001; 15(6): 301-307.

64- Kawakami E, Machado RS, Reber M, Patricio FRS. *^{13}C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing Helicobacter pylori infection in children and adolscents*. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2002; 35: 39-43.

65- Gisbert JP, Pajares JM. *Review article: ^{13}C-urea breath test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection-a critical review.* Aliment Pharmacol Ther. 2004; 20: 1001-1017.

66- Stone MA. *Non-invasive testing for Helicobacter pylori. Postgrad Med J. 1999; 75: 74-77.*

67- *Sharma TK, Young EL, Miller S, Cutler AF. Evaluation of a rapid, new method for detecting serum IgG antibodies to Helicobacter pylori*. Clin Chem. 1997; 43(5): 832-836.

68- Gerstenecker B, Eschweiler B, Vögele H, Koch HK, Hellerich U, Kist M. *Serodiagnosis of Helicobacter pylori infections with an enzyme immunoassay using the chromatographically purified 120 kilodalton protein.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 11(7): 591-601.

69- Salama SM, Wefuan JN, Shiro-Koulla S, Mbakop A, Tagni-Sartre M, Ndam ECN, et al. *Value of whole-cell antigen extracts for serologic detection of Helicobacter pylori.* J Clin Micriobiol. 1993; 31(12): 3331-3332.

70- Leung WK, Chow TP, Ng EKW, Chan FKL, Chung SCS, Sung JJY. *Validation of a new immunoblot assay for diagnosis of Helicobacter pylori in the Asian*

www.SID.ir

Archive of SID

population. Aliment Pharmacol Ther. 2001; 15: 423-428.

71- Yamamoto S, Uemura N, Okamoto S, Yamaguchi S, Mashiba H, Tachikawa T. *A new rapid test for detecting anti-Helicobacter pylori antibody excreted into urine.* Helicobacter. 2000; 5(3): 160- 164.

72- De Pascalis R, Del Pezzo M, Nardone G, Budillon G, Lavitola A. *Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for determining salivary immunoglobulin G response to Helicobacter pylori*. J clin Microbiol. 2003; 37(2): 430-432.

73- Watanabe K, Joh T, Seno K, Sasaki M, Todoroki I, Miyashita M, et al. *Development and clinical application of an immunoassay using intact Helicobacter pylori attached to a solid phase as an antigen*. Clin Biochem. 2001; 34: 291-295.

74- Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, Schütze K, Hirschl A, Mégraud F, et al. *European multicenter validation trial of two new non-invasive tests for the detection of Helicobacter pylori antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test*. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 18: 927-931.

75- Rocha GA, Oliveira AMR, Queiroz DMM, Mendes EN, Moura SB, Oliveira CA, et al. *Serodiagnosis of Helicobacter pylori infection by Cobas Core ELISA in adults from Minas Gerais, Brazil.* Braz J Med Biol Res. 1998; 31(10): 1263-1268.

76- Frenck RW, Fathy HM, Sherif M, Mohran Z, Mohammedy H, Francis W, et al. *Sensitivity and specificity of various tests for the diagnosis of Helicobacter pylori in Egyptian children.* Pediatrics. 2006; 118(4): 1195- 1202.

77- Hoang TTH, Wheeldon T-U, Bengtsson C, Phung DC, Sörberg M, Granström M. *Enzyme-linked immunosorbent assay for Helicobacter pylori needs adjustment for the population investigated*. J Clin Microbiol. 2004; 42(2): 627-630.

78- Fujisawa T, Kaneko T, Kumagai T, Akamatsu T, Katsuyama, Kiyosawa K, et al. *Evalution of urinary rapid test for Helicobacter pylori in general practice*. J Clin Lab Anal. 2001; 15: 154-159.

79- Granstrom M, Lehours P, Bengtsson C, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori.* Helicobacter. 2008; 13(Suppl.1): 7-12.

80- Monteiro L, Oleastro M, Lehours P, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter. 2009; 14(Suppl.1): 6-14.

81- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(9): 720-741.

82- Goodwin CS, Mendall MM, Norththfield TC. *Helicobacter pylori infection.* Lancet. 1997; 349: 265-269.

83- Laheij RJF, Straatman H, Jansen BMJ, Verbeek ALM. *Evaluation of commericially available Helicobacter pylori serology kits: a review*. J Clin Microbiol. 1998; 36(10): 2803-2809.

84- Loy CT, Irwig LM, Katelaris PH, Talley NJ. *Do commercial serological kits for Helicobacter pylori infection differ in accuracy? A meta-analysis*. Am J Gastroenterol. 1996; 91: 1138-44.

85- Basset C, Holton J, Ricci C, Gatta L, Tampieri A, Perna F. *Review article: diagnosis and treatment of Helicobacter: a 2002 updated review.* Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17(Suppl. 2): 89-97.

86- CzinnSJ. *Helicobacter pylori infection: detection, investigation, and management*. J Pediatr. 2005; 146: S21-S26.

87- Li Y-H, Guo H, Zhang P-B, Zhao X-Y, Da SP. *Clinic value of Helicobacter pylori stool antigen test, ImmunoCard STAT HpSA, for detecting H. pylori infection.* World J Gastroenterol. 2004; 10(6): 913-914.

88- Vaira D, Vakil N, Menegatti M, van't Hoff B, Ricci C, Gatta L, et al. *The stool antigen test for detection of Helicobacter pylori after eradication therapy.* Ann Intern Med. 2002; 136: 280-287.

89- Shepherd AJ, Williams CL, Dohherty CP, Hossack M, Preston T, McColl KEL, et al. *Comparison of an enzyme immunoassay for the detection of Helicobacter pylori antigens in the faeces with the urea breath test*. Arch Dis Child. 2000; 83: 268-270.

90- Islam S, Weilert F, Babington R, Dickson G, Smith AC. *Stool antigen testing for the diagnosis and confirmation of eradication of Helicobacter pylori infection: a prospective blinded trial*. Intern Med J. 2005; 35: 526-529.

91- Braden B, Posselt H-G, Ahrens P, Kitz R, Dietrich CF, Caspary WF. *New immunoassay in stool provides for Helicobacter pylori screening in children. Pediatrics.* 2000; 106(1): 115-117.

92- Yee YK, Yip KT, Que TL, Chang KK, Li KF, Lee CK, et al. *Efficacy of enzyme immunoassay for the detection of Helicobacter pylori antigens in frozen stool specimen.* Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16: 1739-1742.

93- Falsafi T, Valizadeh N, Sepehr S, Najafi M. *Application of a stool antigen test to evaluate the incidence of Helicobacter pylori infection in children and adolescent from Tehran, Iran*. Clin Diagn Lab Immunol. 2005; 12(9): 1094-1097.

94- Wong BCY, Xia HH-X, Cheung HKL, Ng FH, Wong SY, Chow KC, et al. *Evaluation of two stool antigen tests for the detection of Helicobacter pylori infection in the Chinese population*. J Gastroenterol Hepatol. 2003; 18:26-31.

95- Kato S, Ozawa k, Okuda M, Fujisawa T, Kagimoto S, Konno M, et al. *Accuracy of the stool antigen test tor the diagnosis of childhood Helicobacter pylori infection: a multicenter Japanese study*. Am J Gastroenterol. 2003; 98(2): 296-300.

96- Vaira D, Malfertheiner P, Mégraud F. *Diagnosis of Helicobacter pylori infection with a new non-invasive antigen-based assay.* Lancet. 1999; 354:30-33.

97- Makristathis A, Pasching E, Schütze K, Wimmer M, Rotter ML, Hirschl AM. *Detection of Helicobacter pylori in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay.* J Clin Microbiol. 1998; 36(9): 2772-2774.

98- Kim Ps, Lee J, Pai SH, Kim Y-B, Cho JK, Lee JW, et al. *Detection of Helicobacter pylori antigen in stool by enzyme immunoassay.* Yonsei Med J. 2002; 43(1): 7-13.

99- Sabbi T, De Angelis P, Colistro F, Dall'Oglio L, di Abriola GF, Castro M. *Efficacy of noninvasive tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection in pediatric patients*. Arch pediatr Adolesc Med. 2005; 159: 238-241.

100- Parente F, Maconi G, Porro GB, Caselli M. *Stool test with polyclonal antibodies for monitoring Helicobacter pylori eradication in adults: a critical reappraisal*. Scand J Gastroenterol. 2002; 7: 747-749.

101- Gulcan EM, Varol A, Kutlu T, Cullu F, Erkan T, Adal E, et al. *Helicobacter pylori stool antigen test.* Indian J pediatr. 2005; 72(8): 675-678.

www.SID.ir

Archive of SID

102- Bildari C, Biagini R, Dulbecco P, Iiritano E, Gambaro C, Mele MR. *Stool antigen assay (HpSA) is less reliable than urea breath test for post-treatment diagnosis of Helicobacter pylori infection*. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16: 1733-1738.

103- van Leerdam ME, van der Ende A, ten Kate FJ, Rauws EA, Tytgat GN. *Lack of accuracy of the noninvasive Helicobacter pylori stool antigen test in patients with gastrodudenal ulcer bleeding*. Am J Gastroenterol. 2003: 98(4): 798-801.

104- Veijola L, Myllyluoma E, Korpela R, Rautelin H. *Stool antigen tests in the diagnosis of Helicobacter pylori infection before and after eradication therapy*. World J Gastroenterol. 2005; 11(46): 7340-7344.

105- Koletzko S, Konstantopoulos N, Bosman D, Feydt-Schmidt A, van der Ende A, Kalach N, et al. *Evaluation of a novel monoclonal enzyme immunoassay for detection of Helicobacter pylori antigen in stool from children*. Gut. 2003; 52(6): 804-806.

106- Trevisani L, Sartori S, Rossi MR, Ruina M, Matarese V, Gullini S, et al. *Evaluation of a new rapid immunoassay for detection of Helicobacter pylori in faeces: a prospective pilot study*. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 21: 485-489.

107- Weingart V, Rüssmann H, Koletzko S, Weingart J, Höchter W, Sackmann M. *Sensitivity of a novel stool antigen test for detection of Helicobacter pylori in adult outpatients before and after eradication therapy*. J Clin Microbiol. 2004; 42(3): 1319-1321.

108- Lehmann FS, Beglinger C. *Current role of Helicobacter pylori stool tests*. Digestion. 2003; 68: 119-123.

109- Domínguz J, Forné M, Blanco S, Prat C, Gali N, Latorre I, et al. *Comparison of a monoclonal with a polyclonal antibody-based enzyme immunoassay stool test in diagnosing Helicobacter pylori infection before and after eradication therapy*. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 23: 1735-1740.

110- Antoš D, Crone J, Konstantopoulos N, Koletzko S. *Evaluation of a novel rapid one-step immunochromatographic assay for detection of monoclonal Helicobacter pylori antigen in stool samples from children*. J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 2598-2602.

111- Gisbert JP, Pajares JM. *Stool antigen test for diagnosis of Helicobacter pylori: a systematic review*. Helicobacter. 2004; 9(4): 347-368.

112- Gisbert JP, de la Morena F, Abraira V. *Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of H. pylori infection: a systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol. 2006; 101: 1921-1930.

113- Dore MP, Negrini R, Tadeu V, Marras L, Maragkoudakis E, Nieddu S, et al. *Novel monoclonal antibody-based Helicobacter pylori stool antigen test*. Helicobacter. 2004; 9(3): 228-232.

114- Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, et al. *Hepatic Helicobacter species identified in bile, and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis*. Gastroenterology. 1998; 114(4):755-763.

115- Kabir S. *Detection of Helicobacter pylori in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay*. J Med Microbiol. 2001; 50: 1021-1029.

116- O'Toole PW, Logan SM, Kostrzynska M, Wadstrom T, Trust TJ. *Isolation and biochemical and molecular analyses of a species-specific protein antigen from the gastric pathogen Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 1991; 173: 505-513.

117- Höök-Nikanne J, Perez Perez GI, Blaser MJ. *Antigenic characterization of Helicobacter pylori strains from different parts of the world*. Clin Diagn Lab Immunol. 1997; 4: 592-597.

118- Sheikhian A, Hassan ZM, Mustafaie A, Shokri F, Malekzadeh R Siavoshi F. *Extraction of the outer membrane proteins of H. pylori and evaluation of their presence in stool of the infected individual*. Iran Biomed J. 2004; 8: 83-88.

119- Mohammadian T, Doosti M, Paknejad M, Siavoshi F, Massarrat S. *A simple and cost-effective method for rapid purification of alkyl hydroperoxide reductase from Helicobacter pylori and its antibody production*. DARU. 2008. 16(3): 174-181.

120- Mohammadian T. *Extraction, isolation and purification of species-specific protein antigen from Helicobacter pylori and its polyclonal antibody production [dissertation]*. Tehran: Tehran University of Medical Sciences (TUMS); 2008.

121- Mohammadian T, Doosti M, Paknejad M, Siavoshi F, Massarrat S. *Preparative SDS-PAGE electroelution for rapid purification of alkyl hydroperoxide reductase from Helicobacter pylori*. Iranian J Pub Health. 2010; 39(1): 85-91.

122- Mohammadian T, Doosti M, Paknejad M, Siavoshi F, Massarrat S, Soukhtanloo M. *Production of polyclonal antibody against alkyl hydroperoxide reductase of Helicobacter pylori and its antigenicity*. Hybridoma. 2008; 27(6): 481-485.

123- Kusters J, van Vliet AHA, Kuipers EJ. *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(3): 449-490.

124- Shimoyama T, Oyama T, Matsuzaka M, Danjo K, Nakaji S,Fukuda S. *Comparison of a stool antigen test and serology for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in mass survey*. Helicobacter. 2009; 14: 87-90.

125- Pourakbari B, Mirsalehian A, Maleknejad P, Mamishi S, Azhdarkosh H, Ebrahimi Daryani N, et al. *Evaluation of a new antigen for diagnosis of Helicobacter pylori infection in stool of adult and children*. Helicobacter. 2011; 16: 42-46.

www.SID.ir