فراوانی هلیکوباکتر پیلوری در بلوک‌های پارافینی بیماران مبتلا به التهاب مزمن لوزه (۱۳۸۸ - ۸۹)

دکتر علی‌اصغر پهلوان* دکتر فرزانه احمدپور قزوینی** دکتر تقی ناصرپور فریور*** پوران جوهری****
دکتر فرشید صفدریان***** دکتر رضا نجفی‌پور******

* استادیار میکروبیولوژی مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** دانشجوی پزشکی عمومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
*** دانشیار میکروبیولوژی مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
**** کارشناس پرستاری مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
***** استادیار گوش و حلق و بینی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
****** استادیار ژنتیک مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، تلفن ۳۳۲۴۹۷۱- ۰۲۸۱
Email: taghin@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸

چکیده

زمینه: میزان بالای جراحی برداشتن لوزه و احتمال استقرار هلیکوباکتر پیلوری در آن به علت هیپرتروفی، احتمال وجود ارتباط بین حضور هلیکوباکتر پیلوری در لوزه و هیپرتروفی مزمن را مطرح می‌کند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین فراوانی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه لوزه بیماران مبتلا به هیپرتروفی لوزه انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش توصیفی بر روی ۱۰۳ نمونه پارافینه تهیه شده از لوزه بیماران مبتلا به هیپرتروفی لوزه مراجعه‌کننده به بیمارستان قدس شهر قزوین از اردیبهشت ۱۳۸۸ تا تیر ۱۳۸۹ انجام شد. تمام نمونه‌ها پس از استخراج DNA از نظر وجود هلیکوباکتر پیلوری با روش real-time PCR بررسی شدند.

یافته‌ها: از ۱۰۳ نمونه مورد بررسی، در۲۲ مورد (۲۱/۳۵٪) DNA هلیکوباکتر پیلوری یافت شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها و از آنجاکه هلیکوباکتر جزء فلور طبیعی لوزه نیست، به نظر می‌رسد هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به عنوان یکی از علل هیپرتروفی لوزه مطرح شود.

کلیدواژه‌ها: هیپرتروفی لوزه، هلیکوباکتر پیلوری، التهاب مزمن لوزه

Archive of SID

مقدمه:

به طور کلی برداشتن لوزه حلقی (آدنوتونسیلکتومی) به شکل اولیه مربوط به انسداد راه هوایی فوقانی به دنبال هیپرتروفی لوزه حلقی است که خود را با علایم خروپف، وقفه تنفسی حین خواب و یا شرایط عفونت مزمن، نظیر عفونت عودکننده لوزه‌ها نشان می‌دهد. علایم انسداد شدید راه هوایی که نشان‌دهنده میزان هیپرتروفی لوزه حلقی است، شامل خروپف شدید، خواب آلودگی طی روز، اشکال در رشد و احتمالاً شب ادراری است.[۱]

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، خمیده، کوچک و اوره آز مثبت است که با التهاب معده، زخم معده، آدنوکارسینوم معده و بافت لنفاوی همراه موکوس مرتبط است.[۲] مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند که این باکتری قادر به تهاجم و استقرار در معده و شیره آن، موکوس ناحیه دهانی و بزاق بیماران است.[۳و۴] با توجه به

www.SID.ir

وجود سیستم لنفاوی در لوزه‌ها و تحریک واکنش‌های التهابی پس از استقرار هلیکوباکتر در موکوس گوارشی، امکان ایجاد التهاب لوزه در هیپرتروفی به وسیله تحریک ژن باکتری وجود دارد. روش‌های متعددی برای تشخیص این باکتری در نمونه‌های بالینی وجود دارد که ازمهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کشت، PCR و Real-time PCR اشاره کرد.[۵]

در ارتباط با حضور هلیکوباکتر پیلوری در بافت لوزه حلقی یافته‌های متناقضی گزارش شده است. مطالعه انجام شده بر روی۳۰ نمونه بافت لوزه و لوزه حلقی ۲۰ کودک ۲ تا ۱۰ ساله با استفاده از آزمون اوره آز سریع (RUT)، کشت و PCR نشان داد که آزمون PCR دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد بود؛ در حالی که آزمون اوره آز سریع در تشخیص این باکتری در مناطق خارج از معده دقت کم‌تری داشت.[۶]

مطالعه دیگری نشان داد که ۴۸ درصد از نمونه‌های لوزه جدا شده به علت التهاب و ۲۴ درصد از نمونه‌های فاقد التهاب (گروه شاهد) حاوی هلیکوباکتر پیلوری بودند.[۷]

با این وجود مطالعه دیگری بر روی ۱۰۱ نمونهٔ حاصل از جراحی بافت لوزه و لوزه حلقی ۶۲ کودک با استفاده از آزمون‌های اوره آز سریع، ایمونوهیستوشیمی، فیش و PCR-DEIA جهت تشخیص ژن vacA نشان داد که بافت لوزه حلقی نمی‌تواند به عنوان مخزن خارج معدی این باکتری تلقی شود.[۸]

نظر به وجود ابهام گسترده و گزارش‌هایی با نتایج مختلف، مطالعهٔ حاضر با هدف تعیین فراوانی هلیکوباکتر پیلوری در بیماران دچار التهاب لوزه مزمن، به روش Real-Time PCR انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه توصیفی که از اردیبهشت ۱۳۸۸ تا تیر ۱۳۸۹ انجام شد، ۱۰۳ بیمار مبتلا به هیپرتروفی لوزه که بنابر شاخص‌های شایع برداشتن لوزه، در بیمارستان قدس شهر قزوین تحت این عمل جراحی قرار گرفته بودند، به طور اتفاقی و بدون محدودیت سنی و جنسی وارد مطالعه شدند. بیمارانی که طی ۲ هفته قبل از جراحی، آنتی‌بیوتیک یا داروی کاهندهٔ اسید معده مصرف کرده بودند یا به برداشتن لوزه نیاز داشتند، از مطالعه خارج شدند.

تمامی بیماران پس از توضیح روش کار با رضایت شخصی وارد مطالعه شدند.

طی عمل جراحی برداشتن لوزه بیمار تحت بی‌هوشی عمومی قرار گرفت و دهان بیمار با گذاشتن وسیلهٔ عبور هوا (Davis gag) باز شد. سپس لوزه‌های بیمار جدا و در محلول نرمال سالین استریل قرار داده شد و به آزمایشگاه آسیب‌شناسی منتقل شد. از نمونه لوزه پارافینه شده، بلوک تهیه شد.

پس از پارافین زدایی از این بلوک‌ها نمونهٔ بیوپسی جدا شد و در ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج DNA با استفاده از محلول پروتئیناز K (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) هضم شد. DNA بافت با استفاده از روش فنل وکلروفورم استخراج شد. مقدار DNA حاصل با این روش معادل ۱۰±۲۰۰ نانوگرم بود.

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: پرایمرهای مورد استفاده بوروکوآ و همکاران[۹] به صورت پرایمر رو به جلو و آشکارگر 5’-FAMAAGGTAGGTGAAAATTCCTC CTACCBHQ1HEGGGACCACGGGGTCTTT-3’ و پرایمر برگشت 5’-TGCGAAATTCCTTGTCGG-3’.

PCR با استفاده از Premix EX Taq از شرکت تاکارا (Takara) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده از نمونه بیوپسی، ۰/۱ میکرومول از پرایمر برگشت و ۰/۸ میکرومول از پرایمر 23Ssc رفت بود.

تکثیر مطابق روش بوروکوآ و همکاران با انجام تغییرات لازم برای به کارگیری در دستگاه ABI Prism 7500 (Applied Biosystem Sequence Detection System) انجام شد.[۹] یک مرحله واسرشت اولیه (Denaturation) در

Archive of SID

www.SID.ir

دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و بـه دنبـال آن ۵۰ سـیکل واسرشـت اولیـه در دمـای ۹۵ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحلـه اتصـال بـه پرایمـر (Annealing) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۴ ثانیه و مرحله گسترش (Extension) در دمـای ۷۲ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد.

فلورسنت در مرحله اتصال به پرایمر برای هر ۴ کانال و با انتخاب گزینهAuto collect data و Collect data at annealing خوانده شد. سیکل آستانه (CT) برای هر کانال به عنوان تعداد سیکلی که در آن فلورسانس از حـد آستانه گذر کند، محاسبه شد.

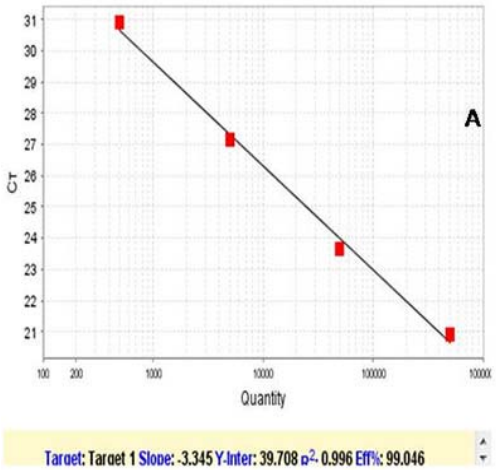
کنترل مثبت استخراج، با مشخص شدن یـک قطعـه ژن β- هموگلوبین با اسـتفاده از کانـال سـایبرگرین و بـا اسـتفاده از پرایمرهـای BGLO1 - 5’ACACAACTGTGTGTTCACTAGC - 3’ و 5’- CAACTTCATCCACGTTCACC-3’ BGLO2 حاصل شد.

این آزمایش در یک لوله دیگر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از Premix EX Taq شرکت تاکارا (ژاپن)، ۵ میکرولیتـر از DNA استخراج شـده از بیوپسـی، ۰/۲۵ میکرومـول از الیگونوکلئوتیدهای پرایمر و ۰/۵X سایبرگرین سـیگما بـا برنامه یک سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۱۰ ثانیه و بـه دنبـال آن ۴۰ سـیکل در دمـای ۹۵ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۱۰ ثانیه انجام شد.

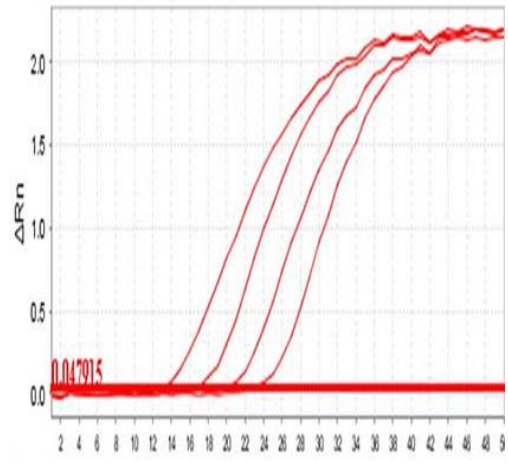
*** یافته‌ها:**

ابتـدا روش real-time PCR بـر روی هلیکوبـاکتر پیلوری ATCC 26695 انجام و فرآینـد آزمـایش تثبیـت شد. منحنی استاندارد مربوطـه بـرای انـدازه‌گیـری مقـدار DNA در یک نمونه ناشناخته رسم شد (نمودار شماره ۱). ضریب رگرسیون خطی در این آزمایش ۰/۹۹۶ و کـارآیی PCR برابر ۹۹ درصد بـود. از ۱۰۳ نمونـه بیوپسـی لـوزه مـورد بررسـی، در ۲۲ مـورد (۲۱/۳۵ درصـد) DNA هلیکوباکتر پیلوری یافت شد. منحنی تکثیری رقت‌های مختلف استانداردهای این آزمون ارائه شده است (نمـودار شماره ۲).

نمودار ۱- منحنی استاندارد



نمودار ۲- فلورسنت رقیق شده استاندارد از ۱×۱۰^{۵} تا ۱×۱۰^{۲}

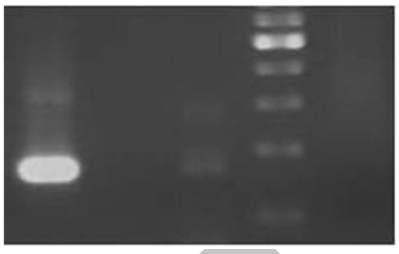


نتیجـه محصـولات حاصـل از PCR قسـمتی از ژن ۲۳SrRNA را در سـویه اسـتاندارد هلیکوبـاکتر پیلـوری ATCC 26695 نشان می‌دهـد (ایـن سـویه بـه عنـوان کنترل استفاده شده است) (شکل شماره ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۱- الگوی الکتروفورز محصولات Scorpion real-time PCR در ژل آگاروز به ترتیب از سمت چپ: کنترل+، کنترل-، نمونه‌های مثبت بیماران و 100bp Ladder



* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که در نمونه‌های لوزه به دست آمده از برداشتن لوزه بیماران دچار هیپرتروفی لوزه، هلیکوباکتر پیلوری از شیوع بالایی برخوردار بود.

روش‌های متعددی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بالینی وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کشت، PCR و Real-time PCR اشاره کرد. حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش آزمایشگاهی شناسایی این باکتری پس از کشت، روش Real-time PCR است. در این پژوهش از روش Scorpion Real-time PCR به منظور ارزیابی وجود هلیکوباکتر پیلوری در لوزه بیماران دچار هیپرتروفی لوزه و التهاب لوزه مزمن استفاده شد و از آنجا که این باکتری جزء فلور طبیعی لوزه نیست، این مطالعه مبین آن است که در نمونه‌های لوزه به دست آمده از بیماران مبتلا به هیپرتروفی لوزه، هلیکوباکتر پیلوری شیوع بالایی دارد. گزارش‌های متعددی در مورد ارتباط هلیکوباکتر پیلوری و التهاب لوزه مزمن وجود دارد. کوسانو و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که هلیکوباکتر پیلوری موجود در بافت لوزه قادر به رشد در محیط کشت نیست. با این وجود پاولیک و همکاران در مطالعه خود موفق به کشت دادن هلیکوباکتر پیلوری از بافت لوزه شدند.[۱۰و۱۱]

جلاویک و همکاران در مطالعه خود با استفاده از روش RUT و کشت نمونه‌های لوزه ۷۷ کودک ۴ تا ۱۴ساله به این نتیجه رسیدند که لوزه مخزن مناسبی برای هلیکوباکتر پیلوری در کودکان نیست که این یافته مخالف نتایج مطالعه حاضراست.[۱۲]

در مطالعه‌ای که توسط انور و همکاران به روش CLO-test روی ۱۹ بیمار انجام شد، ۱۱ بیمار (۵۷/۸۹ درصد) از نظر وجود هلیکوباکتر پیلوری مثبت و ۸ نفر (۴۲/۱۱ درصد) از نظر وجود این باکتری منفی بودند که نشان‌دهنده استقرار قابل توجه هلیکوباکتر پیلوری در لوزه است و با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد.[۱۳]

شیراک و همکاران در مطالعه خود که به روش PCR جهت جستجوی هلیکوباکتر پیلوری در نمونهٔ لوزه۲۳ بیمار انجام دادند، در ۷ بیمار (۳۰ درصد) این باکتری وجود داشت و از این تعداد ۵ نفر (۷۱ درصد) دارای ژن cag-A بودند.[۱۴] بولوت و همکاران نیز مطالعه‌ای به روش PCR جهت یافتن ژن cag-A هلیکوباکتر و یافتن ارتباط بین وجود این باکتری و هیپرتروفی لوزه حلقی انجام دادند. آن‌ها نتیجه گرفتند که وجود ژن مذکور با ایجاد و پیشرفت هیپرتروفی لوزه حلقی مرتبط است که نتایج دو مطالعه اخیر با یافته‌های مطالعه حاضر همخوان است.[۱۵]

ایگور و همکاران در مطالعه‌ای که به روش RUT و PCR جهت جستجوی هلیکوباکتر در نمونه‌های لوزه انجام دادند، ارتباط معنی‌داری بین وجود این باکتری و التهاب لوزه مزمن و هیپرتروفی لوزه حلقی پیدا نکردند که این یافته مخالف نتیجه مطالعه حاضراست.[۱۶]

تفاوت بین نتایج مطالعه‌های مختلف می‌تواند به علت تفاوت در دقت و اختصاصی بودن روش کار باشد. برای مثال، روشRUT و سایر روش‌های سرولوژی حساسیت و ویژگی لازم را در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری به خصوص در محیط لوزه ندارند. در نتیجه پاسخ‌های متفاوت با نتایج مطالعه حاضر را می‌توان به توانایی پایین روش کار آن‌ها نسبت داد. با توجه به حساسیت و ویژگی بسیار بالای روشPCR Scorpion real-time در مقایسه با سایر روش‌های آزمایشگاهی بوروکوآ و همکاران[۹]، به نظر می‌رسد نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر از اعتبار

Archive of SID

www.SID.ir

بالایی برخوردار باشد که می‌تواند با مطالعه‌های بعدی و در مقیاس بزرگ‌تر مورد تأیید قرار گیرد. تأیید این یافته می‌تواند کاهش موارد برداشتن لوزه را از طریق درمان آنتی‌بیوتیکی ضد هلیکوباکتر پیلوری به دنبال داشته باشد.

* سپاس‌گزاری:

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به علت پشتیبانی مالی از این پایان‌نامه تحقیقاتی دوره دکترای پزشکی عمومی و آقای دکتر پوراکبری برای در اختیار گذاشتن سویه استاندارد هلیکوباکتر پیلوری تشکر می‌شود.

* مراجع:

1. Cummings CW, Haughey BH, Thomas JR, et al. Cumming`s otolaryngology head and neck surgery. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2005. 4150-61

2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6th ed. USA: Mosby; 2009. 328-32

3. Oshowo A, Gillam D, Botha A, et al. Helicobacter pylori: the mouth, stomach and gut axis. Ann Periodontol 1998 Jul; 3 (1): 276-80

4. Song Q, Lange T, Spahr A, et al. Characteristic distribution pattern of Helicobacter pylori in dental plaque and saliva detected with nested PCR. J Med Microbiol 2000 Apr; 49 (4): 349-53

5. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, et al. Jawetz`s medical microbiology. 25th ed. USA: McGraw-Hill; 2007. 371-3

6. Abdel-Monem MH, Magdy EA, Nour YA, et al. Detection of Helicobacter pylori in adenotonsillar tissue of children with chronic adenotonsillitis using rapid urease test, PCR and blood serology: a prospective study. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011 Apr; 75 (4): 568-72

7. Lin HC, Wu PY, Friedman M, et al. Difference of Helicobacter pylori colonization in recurrent inflammatory and simple hyperplastic tonsil tissues. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2010 May; 136 (5): 468-70

8. Vilarinho S, Guimarães NM, Ferreira RM, et al. Helicobacter pylori colonization of the adenotonsillar tissue: fact or fiction? Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2010 Jul; 74 (7): 807-11

9. Burucoa C, Garnier M, Silvain C, et al. Quadruplex real-time PCR assay using allele-specific scorpion primers for detection of mutations conferring clarithromycin resistance to Helicobacter pylori. J Clin Microbiol 2008 Jul; 46 (7): 2320-6

10. Kusano K, Inokuchi A, Fujimoto K, et al. Coccoid Helicobacter pylori exists in the palatine tonsils of patients with IgA nephropathy. J Gastroenterol 2010 Apr; 45 (4): 406-12

11. Pavlík E, Lukes P, Potuzníková B, et al. Helicobacter pylori isolated from patients with tonsillar cancer or tonsillitis chronica could be of different genotype compared to isolates from gastrointestinal tract. Folia Microbiol (Praha) 2007; 52 (1): 91-4

12. Jelavic B, Bevanda M, Ostojic M, et al. Tonsillar colonization is unlikely to play important role in Helicobacter pylori infection in children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2007 Apr; 71 (4): 585-90

13. Unver S, Kubilay U, Sezen OS, Coskuner T. Investigation of Helicobacter pylori colonization in adenotonsillectomy specimens by means of the CLO test. Laryngoscope 2001 Dec; 111 (12): 2183-6

14. Cirak MY, Ozdek A, Yilmaz D, et al. Detection of Helicobacter pylori and its CagA Gene in tonsil and adenoid tissues by PCR.

Archive of SID

www.SID.ir

Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003 Nov; 129 (11): 1225-9

15. Bulut Y, Agacayak A, Karlidag T, et al. Association of cagA+ Helicobacter pylori with adenotonsillar hypertrophy. Tohoku J Exp Med 2006 Jul; 209 (3): 229-33

16. Eyigor M, Eyigor H, Gultekin B, et al. Detection of Helicobacter pylori in adenotonsillar tissue specimens by rapid urease test and polymerase chain reaction. Eur Arch Otorhinolaryngol 2009 Oct; 266 (10): 1611-3

Archive of SID

www.SID.ir