Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۲۶/هفته دوم فروردین ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۳

استفاده از روش Real-time PCR و پروب‌های اختصاصی آلل TaqMan به منظور شناسایی جهش‌های نقطه‌ای مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری

دکتر محمد کارگر[۱]، صادق قربانی دالینی[۲]، دکتر عباس دوستی[۳]، نگار صعود[۲]

خلاصه

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری یک ارگانیسم مشکل پسند و کند رشد است که انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن به ۱۰ تا ۱۴ روز زمان نیاز دارد. استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند جایگزین دقیق و مناسبی برای شناسایی هم‌زمان جهش‌های نقطه‌ای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی مقاومت به کلاریترومایسین و جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با آن با استفاده از روش Real-time PCR بود.

روش‌ها: این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۲۰۰ نمونه‌ی بیوپسی تهیه شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد. در ابتدا با استفاده از روش‌های اوره‌آز سریع (RUT) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) وجود هلیکوباکتر پیلوری تشخیص داده شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از روش Real-time PCR، مقاومت به کلاریترومایسین و جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با آن با استفاده از پروب‌های اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، در ۱۶۴ نمونه (۸۲ درصد) هلیکوباکتر پیلوری شناسایی گردید که ۱۰۵ نمونه (۶۴/۲ درصد) حساس و ۵۹ نمونه‌ی (۳۵/۹۸ درصد) آن مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلاریترومایسین بودند. در بین سوش‌های مقاوم شناسایی شده، موتاسیون‌های نقطه‌ای A2144G، A2143G، A2143C و A2142G به ترتیب فراوانی ۲/۴۴ درصد، ۱۵/۸۵ درصد، ۹/۱۵ و ۱۲/۱۹ را داشتند. اما در ۵ نمونه‌ی (۸/۴۷ درصد) مقاوم، هیچ کدام از این ژنوتیپ‌ها شناسایی نشد. در بین سویه‌های دارای مقاومت، ۳۸ نمونه (۲۳/۱۷ درصد) تنها دارای یک ژنوتیپ و ۱۶ نمونه (۹/۷۶ درصد) دارای مخلوطی از ژنوتیپ‌ها بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که تکنیک Real-time PCR به صورت مستقیم توانایی شناسایی هم زمان هلیکوباکتر پیلوری و انواع مقاومت به کلاریترومایسین را در کمترین زمان در نمونه‌های بیوپسی دارد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، کلاریترومایسین، جهش‌های نقطه‌ای، Real-time PCR.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی است که در معده‌ی انسان‌ها مستقر می‌شود و اهمیت آن در بیماری‌های دستگاه گوارش به دلیل نقش بالقوه‌ی آن در ایجاد بیماری‌های قسمت فوقانی مجرای گوارش است (۱). این باکتری عامل اصلی التهاب مزمن معده است و با توسعه‌ی زخم‌های معده و دوازدهه ارتباط دارد. به علاوه یکی از عوامل بروز آدنوکارسینومای معده و لنفوم سلول‌های B مخاطی وابسته به بافت لنفاوی (B-cell mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma) است (۳-۲).

در حال حاضر اولین خط درمان هلیکوباکترپیلوری، درمان ۳ دارویی به مدت ۷ روز است. به طور معمول برای درمان هلیکوباکتر پیلوری از یک ترکیب ضد اسید از دسته‌ی مهار کننده‌های پمپ پروتون (Proton Pump Inhibitors یا PPI) مانند امپرازول، لانزوپرازول و پنتوپرازول و یا دسته‌ی ممانعت کننده‌های H2 مانند سایمتیدین، رانیتیدین،

[۱] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.
[۲] کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، جهرم، ایران.
[۳] استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد کارگر
Email: mkargar@jia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

فوماتیـدین و روکسـاتیدین همـراه بـا یـک یـا دو آنتی‌بیوتیـک (کلاریترومایسـین، آموکسـی‌سـیلین و یـا مترونیدازول) اسـتفاده مـی‌شـود (۵-۴). عفونـت‌هـای هلیکوباکتر پیلوری تا سال ۲۰۰۱ با استفاده از رژیم سه دارویی رایج که یکـی از آنتـی‌بیوتیـک‌هـای اصـلی آن کلاریترومایسین محسوب می‌شـد تـا ۹۰ درصـد قابـل درمان بود (۳).

اما ظهور مقاومت هلیکوبـاکتر پیلـوری نسـبت بـه کلاریترومایسـین موجـب کـاهش تـأثیر درمـانی و استفاده‌ی محدودتر از ایـن دارو شـد (۳). بسـیاری از مطالعات نشان داده است که در بعضی از موارد تـا ۵۰ درصد از سـویه‌هـای هلیکوبـاکتر پیلـوری نسـبت بـه کلاریترومایسین مقـاوم هسـتند کـه ایـن امـر موجـب طولانی شدن طول مدت درمان مـی‌شـود (۶). امـروزه مشخص شده است که استفاده‌ی اشتباه از ماکرولیـدها، بـه ویـژه اریترومایسـین، منجـر بـه ایجـاد و افـزایش مقاومت نسبت به کلاریترومایسین می‌شود (۶).

عامـل اصـلی مقاومـت بـه کلاریترومایسـین در هلیکوباکتر پیلوری عدم اتصال ماکرولیـدها بـه قسـمت 23S rRNA ریبوزوم باکتریایی است. به این ترتیب کـه جایگاه هدف آنتی بیوتیـک بـه وسـیله‌ی متیلاسـیون یـا وقوع جهش‌های خود بـه خـودی نقطـه‌ای در ناحیـه‌ی پپتیدیل ترانسـفراز واقـع در دومـین V ژن 23S rRNA تغییـر مـی‌کنـد (۴). جهـش‌هـای نقطـه‌ای A2142G، A2143G و A2142C شایع‌ترین جهش‌های گزارش شده هستند. همچنین جهـش‌هـای دیگـر ماننـد A2115G، G2141A و T2717C نیز به ندرت گزارش شده‌اند (۷).

در حال حاضر روش متداول بـرای تعیـین مقاومـت هلیکوباکتر پیلوری به کلاریترومایسین بر مبنای اسـتفاده از روش‌های انتشار در آگار و یـا E-test اسـت. مشـکل اصلی روش‌های یاد شده زمان‌بر بودن، وابسـتگی بـیش از اندازه به شرایط آزمایشگاه و تکرارپذیر نبـودن آن‌هـا است. اما روش‌های مولکولی تکرارپذیرند و بـدون نیـاز به کشـت بـاکتری امکـان ارزیـابی مسـتقیم نمونـه‌هـای بیوپسـی را دارنـد (۸). هـدف از انجـام ایـن پـژوهش، اسـتفاده از روش Real-time PCR بـه منظـور بررسـی مقاومت به کلاریترومایسین و جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با آن بود.

روش‌ها

این مطالعه‌ی مقطعی و توصیفی پس از کسب موافقـت کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه و رضایت‌نامه‌ی کتبـی از بیماران، بر روی ۲۰۰ نمونه‌ی بیوپسی تهیـه شـده از بیمـارانی کـه از خـرداد تـا آذر سـال ۱۳۸۸ بـه مرکـز اندوسکوپی بیمارستان هـاجر شـهرکرد مراجعـه کـرده بودند، انجام شد.

در ابتدا آزمون اوره‌آز سـریع، بـا اسـتفاده از کیـت Gastro urease سـاخت شـرکت بهارافشـان، انجـام گردید و نمونـه‌هـا بـه مرکـز تحقیقـات بیوتکنولـوژی دانشـگاه آزاد اسـلامی واحـد شـهرکرد منتقـل شـد. استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت اسـتخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد.

آزمون PCR به منظور تکثیر یک قطعه‌ی ۱۰۹ جفت بازی ژن 16S rRNA بـرای تأییـد حضـور هلیکوبـاکتر پیلوری با اسـتفاده از جفـت پرایمرهـای HP-1 و HP-2 (جدول ۱) و با استفاده از دستگاه مسترسـایکلر سـاخت شرکت اپندورف، بر روی تمـامی نمونـه‌هـای بیوپسـی انجام گردید. تکثیر قطعه‌ی هـدف در حجـم نهـایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتـر DNA الگـو، MgCl2 بـا غلظـت ۱/۵ میلـی‌مـولار، ۰/۲ میکرومـول dNTPs، ۰/۲ میلـی‌مـول از هرکـدام از پرایمرهـا و ۱ واحـد DNA

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. توالی الیگونوکلئوتیدهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر/پروب	قطعه (′3→′5)	هدف
HP-1	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	16S rRNA
HP-2	ATTACTGACGCTGATTGTGC	
HP23S-1	CCACAGCGATGTGGTCTCAG	23S rRNA
HP23S-2	CTCCATAAGAGCCAAAGCCC	
Pwt	Cy5-GGGGTCTTTCCGTCT-BHQ2	Wild type
P44G	TAMRA-GGTCCTTCCGTCTTG-Dabcyl	A2144G
P43G	TET-GGTCTCTCCGTCTTG-Dabcyl	A2143G
P43C	HEX-GGTCTGTCCGTCTTG-Dabcyl	A2143C
P42G	FAM-GGTCTTCCCGTCTTG-Dabcyl	A2142G

پلیمراز Smar Taq (تمامی واکنش‌گرهای یاد شده ساخت شرکت سیناژن) انجام گردید. شرایط دمایی PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در ادامه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و گسترش نهایی انجام گردید. سپس قطعه‌ی تکثیر یافته با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده گردید.

آزمون Real-time PCR با استفاده از جفت پرایمرهای HP23S-1 و HP-23S-2 و پروب‌های تغییر یافته‌ی Pwt، P44G، P43G و P43C گزارش شده توسط Pina و همکاران (۹) به منظور بررسی سویه‌های حساس و سویه‌های مقاوم دارای جهش‌های A2144G، A2143G و A2143C انجام شد. همچنین برای بررسی جهش A2142G، با استفاده از توالی ژن 23S rRNA (GenBank accession no. U27270)، پروب P42G طراحی گردید (جدول ۱).

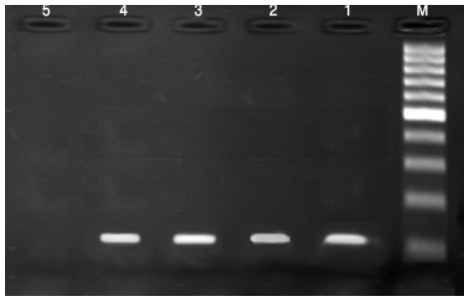
واکنش TaqMan real-time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میلی‌مول dNTP، ۰/۱ میلی‌مول MgCl2، ۱/۵ واحد DNA پلی‌مراز Smar Taq، ۰/۲ میلی‌مول از هرکدام از پرایمرها و پروب‌های Pwt، P44G، P43G، P43C و P42G به ترتیب با غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۱ و ۰/۷۵ میلی‌مول انجام گردید. این واکنش در دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) و با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه، ۴۵ چرخه شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام گردید. تمامی واکنش‌ها ۳ بار تکرار و در هر بار آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی نیز انجام شد. اطلاعات به دست آمده به وسیله‌ی نرم‌افزار rotor-gene 6000 نسخه‌ی ۱/۷ پردازش گردید. در نهایت با استفاده از نتایج به دست آمده، مقادیر CT (چرخه‌ای که مقدار فلورسانس از مقدار زمینه بالاتر می‌رود) محاسبه شد.

یافته‌ها

شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بیوپسی: بر اساس آزمون اوره‌آز سریع، از ۲۰۰ نمونه‌ی مورد مطالعه، ۱۶۴ نمونه (۸۲ درصد) اوره‌آز مثبت بود. نتایج استخراج DNA نمونه‌های بیوپسی اوره‌آز مثبت و PCR ژن 16S rRNA در تمامی آن‌ها (۱۰۰ درصد) باند ۱۰۹ جفت بازی هلیکوباکتر پیلوری را نشان داد (شکل ۱).

www.SID.ir

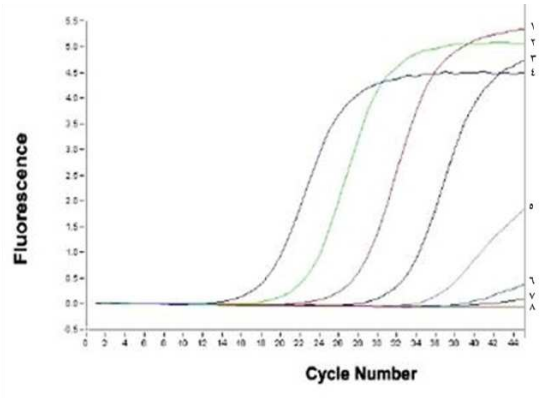
Archive of SID



شکل ۱. قطعه‌ی ۱۰۹ جفت بازی حاصل از PCR ژن ۱۶ S rRNA به منظور تأیید حضور هلیکوباکتر پیلوری. ردیف M سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱ کنترل مثبت، ردیف ۲-۴ نمونه‌های مثبت، ردیف ۵ کنترل منفی.

تعیین حد مرزی CT در آزمون Real-time PCR: تغییرات مقدار فلورسانس در طی ۴۵ چرخه در کانال‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر Rotor-gene مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۱۶۴ نمونه‌ی مورد بررسی، در ۱۴۳ مورد (۸۷/۲ درصد) افزایش فلورسانس تنها در یکی از کانال‌ها مشاهده شد که نشان دهنده‌ی نمونه‌های خالص بود و به همین دلیل تنها یک CT برای آن‌ها ثبت شد. ۱۶ نمونه (۹/۸ درصد) ژنوتیپ مخلوط داشتند و بنابراین افزایش مقدار فلورسانس در بیش از یک کانال مشاهده و بیش از یک CT برای آن‌ها ثبت شد. در این پژوهش مقادیر CT بین ۲۱/۴ تا ۴۳/۶ ثبت گردید. مقادیر CT کمتر از ۳۵ به عنوان نمونه‌های واجد یک ژنوتیپ، مقادیر CT بین ۳۵ تا ۴۰ به عنوان نمونه‌های دارای چند ژنوتیپ و مقادیر CT بیش از ۴۰ به عنوان مثبت کاذب در نظر گرفته شد (شکل ۲).

حساسیت تکنیک TaqMan real-time PCR: برای به دست آوردن حساسیت تکنیک از DNA به دست آمده از کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد و خطی بودن نمودار استاندارد با تهیه‌ی رقت‌های متوالی در دستگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حساسیت تکنیک معادل ۴۰ باکتری است. با توجه به



شکل ۲. نمودار بررسی مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری با تعیین حد مرزی CT در آزمون Real-time PCR. CT کمتر از ۳۵ نشان دهنده‌ی نمونه‌های خالص و CT بین ۳۵ تا ۴۰ نشان دهنده‌ی نمونه‌های دارای چندین ژنوتیپ و CT بیشتر از ۴۰ نشان دهنده‌ی نتایج مثبت کاذب هستند.

این که دو نسخه از ژن 23S rRNA در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، این حساسیت معادل ۸۰ کپی از ژن هدف در نظر گرفته شد. همچنین نتایج به دست آمده از تعیین حساسیت تکنیک بر روی نمونه‌های بیوپسی نیز با نتایج کشت باکتری مشابه بود.

مقاومت به کلاریترومایسین: نتایج Real-time PCR نشان داد که این تکنیک قادر به بررسی مقاومت به کلاریترومایسین در تمامی نمونه‌های بیوپسی (۱۰۰ درصد) است. همچنین پروب‌های مورد استفاده در این تکنیک قادر به شناسایی جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با مقاومت به کلاریترومایسین در ۱۵۹ نمونه از ۱۶۴ نمونه (۹۶/۹۵ درصد) بیوپسی بودند.

نتایج این بررسی نشان داد که از مجموع ۱۶۴ سویه‌ی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده، ۱۰۵ نمونه (۶۴/۰۲ درصد) ژنوتیپ حساس به صورت خالص داشتند. همچنین ۵۹ نمونه (۳۵/۹۷ درصد) دارای ژنوتیپ‌های مقاوم به کلاریترومایسین بودند که از این تعداد ۳۸ نمونه‌ی (۲۳/۱۷ درصد) آن‌ها تنها دارای یک ژنوتیپ مقاوم بودند. از مجموع نمونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مقاوم، ۳ نمونه (۱/۹۳ درصد) ژنوتیپ A2144G، ۱۳ نمونه (۷/۹۳ درصد) ژنوتیپ A2143G، ۷ نمونه (۴/۲۷ درصد) ژنوتیپ A2143C و ۱۵ نمونه (۹/۱۵ درصد) ژنوتیپ A2142G را داشتند. در این بررسی ۱۹ نمونه (۱۱/۵۸ درصد) نیز دارای ژنوتیپ‌های مخلوط بودند. اما پروب‌های مورد استفاده در این پژوهش در ۵ نمونه (۳/۰۵ درصد) قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم نبودند.

بحث

مقاومت به کلاریترومایسین عامل اصلی شکست درمانی با این آنتی‌بیوتیک است. به دلیل مصرف روز افزون ماکرولیدها، نه تنها در درمان هلیکوباکتر پیلوری بلکه در درمان عفونت‌های دستگاه تنفسی نیز میزان شیوع سویه‌های مقاوم در حال افزایش هستند. به همین دلیل پایش سریع و دقیق سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین از نظر بالینی اهمیت قابل توجهی دارد. با روش ارائه شده در این پژوهش می‌توان سویه‌های مقاوم را در حداکثر ۲ تا ۳ ساعت شناسایی نمود. به این ترتیب ارزیابی وجود هلیکوباکتر پیلوری و مقاومت به کلاریترومایسین به سرعت پس از اندوسکوپی فراهم می‌شود. اما مدت این زمان در روش‌های فنوتیپی برای کشت، جداسازی باکتری و ارزیابی نتایج مقاومت حداقل به چند روز می‌رسد (۱۰-۹).

تا کنون گزارش‌های مختلفی در دنیا در مورد شیوع مقاومت به کلاریترومایسین ارائه شده است. اما به دلیل استفاده از روش‌های متفاوت آزمایشگاهی، ارزیابی در مناطق جغرافیایی گوناگون و زمان‌های مختلف، آمار دقیقی در مورد آن وجود ندارد.

به عنوان نمونه Schabereiter-Gurtner و همکاران (۱۱)، Kalach و همکاران (۱۲)، Oleastro و همکاران (۱۳)، Lascols و همکاران (۷)، Russmann و همکاران (۱۴)، van der Ende و همکاران (۱۵) و Fontana و همکاران (۱۶) در سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۴ در مناطق مختلف اروپا با استفاده از روش‌های مختلف شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش‌ها مشخص نمود که بیشترین شیوع مقاومت به کلاریترومایسن در اروپا مربوط به کشور فرانسه است. همچنین نتایج مطالعه‌ی Fontana و همکاران نشان داد که بیشترین اختلاف شیوع در اروپا مربوط به نقاط شمالی و جنوب ایتالیا است. شیوع مقاومت در شمال ایتالیا ۱/۶ درصد و در جنوب آن ۱۴ درصد گزارش گردید. ضمن این که دقیق‌ترین روش شناسایی جهش‌های مقاومتی به کلاریترومایسین تکنیک Real-time PCR گزارش شد (۱۶).

Prazeres و همکاران (۱۷)، Godoy و همکاران (۱۸)، Torres و همکاران (۱۹)، Alarcon و همکاران (۲۰) و Stone و همکاران (۲۱) در سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۳ در کشورهای مختلف قاره‌ی آمریکا با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را ارزیابی نمودند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که کمترین دامنه‌ی شیوع مقاومت مربوط به برزیل (۹/۸ درصد) و بیشترین آن مربوط به ایالات متحده (۵۵ درصد) است.

در سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۶ در آسیای شرقی نیز Pan و همکاران (۲۲)، Liu و همکاران (۶)، Kato و همکاران (۲۳)، Kumala و Rani (۲۴) و Lee و همکاران (۵) با استفاده از روش‌های مختلف میزان شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را بین ۲۰ تا ۲۷ درصد گزارش نمودند. در ایران و در استان چهارمحال و بختیاری، کارگر و همکاران (۲۵) با استفاده از روش PCR-RFLP شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را

www.SID.ir

Archive of SID

۲۲/۶ درصد گزارش نمودند. اما نتایج ما در این پژوهش نشان داد که میزان مقاومت به کلاریترومایسین با استفاده از تکنیک Real-time PCR، ۳۵/۹۸ درصد است. این نتایج نشان می‌دهد که شیوع مقاومت در این منطقه از ایران از کشورهای واقع در آسیای شرقی بیشتر است.

همچنین گزارش‌های متعددی در دنیا در مورد میزان شیوع جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با مقاومت به کلاریترومایسین در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری انجام شده است. Pina و همکاران (۹) و Marais و همکاران (۲۶) از فرانسه، Russmann و همکاران (۱۴) از آلمان، Alarcon و همکاران (۲۰) از آرژانتین، Pan و همکاران (۲۲) از چین، Maeda و همکاران (۲۷)، Matsuoka و همکاران (۲۸)، Matsumura و همکاران (۲۹) و Kato و همکاران (۲۳) از ژاپن و Lee (۵) از کره در سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۴ و با استفاده از تکنیک‌های مختلف به بررسی شیوع این جهش‌ها پرداختند. به طور کلی در مناطق مختلف دنیا ترتیب فراوانی شیوع جهش‌های نقطه‌ای به صورت A2143C□A2142C□A2143G□A2142G□A2144G است. در سال ۲۰۰۷ نیز کارگر و همکاران (۲۵) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP شیوع جهش‌های نقطه‌ای کلاریترومایسین را در استان چهارمحال و بختیاری بررسی نمودند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین شیوع جهش مربوط به جهش A2143G با فراوانی ۶۸/۴ درصد و سپس جهش‌های A2142G و A2142C به ترتیب با فراوانی ۱۵/۸ و ۱۰/۵ درصد است. اما نتایج ما در پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین جهش شناسایی شده مربوط به جهش A2143G با فراوانی ۳۷/۱ درصد و سپس جهش‌های A2142G، A2143C و A2144G به ترتیب با فراوانی ۲۸/۶، ۲۱/۴ و ۵/۷ درصد است. به این ترتیب نتایج دو پژوهش یاد شده نشان می‌دهد که شیوع جهش‌های مقاومت به کلاریترومایسین در این منطقه به صورت A2144G□A2143C□A2142G□A2143G است که به استثنای جهش A2144G، شیوع سایر جهش‌ها با سایر نقاط دنیا یکسان می‌باشد.

با استفاده از روش Real-time PCR می‌توان در ابتدا سویه‌های حساس، مقاوم و مخلوط را شناسایی و سپس نوع جهش را در نمونه‌های مقاوم و مخلوط شناسایی نمود. به این ترتیب امکان شناسایی دقیق سویه‌های حساس و مقاوم وجود دارد. به همین دلیل از این تکنیک می‌توان به منظور شناسایی سریع و مقرون به صرفه سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری و همچنین ارزیابی مستقیم مقاومت به کلاریترومایسین در نمونه‌های بیوپسی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و شهرکرد به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند.

References

1. Goldman RC, Zakula D, Flamm R, Beyer J, Capobianco J. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to Helicobacter pylori ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(7): 1496-500.
2. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, Russmann H. Evaluation of the novel Helicobacter pylori ClariRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of H. pylori in stool specimens from symptomatic children. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 1718-22.
3. Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, Saverymuttu S. PCR-based diagnosis of Helicobacter pylori infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. J Clin Microbiol 2001; 39(4):

www.SID.ir

Archive of SID

1217-20.
4. Taneike I, Suzuki K, Nakagawa S, Yamamoto T. Intrafamilial spread of the same clarithromycin-resistant Helicobacter pylori infection confirmed by molecular analysis. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3901-3.
5. Lee JH, Shin JH, Roe IH, Sohn SG, Lee JH, Kang GH, et al. Impact of clarithromycin resistance on eradication of Helicobacter pylori in infected adults. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(4): 1600-3.
6. Liu Z, Shen J, Zhang L, Shen L, Li Q, Zhang B, et al. Prevalence of A2143G mutation of H. pylori-23S rRNA in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiol 2008; 8: 81.
7. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, et al. Fast and accurate quantitative detection of Helicobacter pylori and identification of clarithromycin resistance mutations in H. pylori isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4573-7.
8. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, et al. Accurate prediction of macrolide resistance in Helicobacter pylori by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(5): 1500-4.
9. Pina M, Occhialini A, Monteiro L, Doermann HP, Megraud F. Detection of point mutations associated with resistance of Helicobacter pylori to clarithromycin by hybridization in liquid phase. J Clin Microbiol 1998; 36(11): 3285-90.
10. Ribeiro ML, attos RG, endonca S, edrazzoli Jr J. Quantitative real-time PCR for the clinical detection of Helicobacter pylori. Genetics and Molecular Biology 2007; 30(2): 431-4.
11. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovach Z, et al. Novel real-time PCR assay for detection of Helicobacter pylori infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4512-8.
12. Kalach N, Benhamou PH, Campeotto F, Bergeret M, Dupont C, Raymond J. Clarithromycin resistance and eradication of Helicobacter pylori in children. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(7): 2134-5.
13. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in Helicobacter pylori. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 397-402.
14. Russmann H, Adler K, Haas R, Gebert B, Koletzko S, Heesemann J. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured Helicobacter pylori by fluorescent in situ hybridization. J Clin Microbiol 2001; 39(11): 4142-4.
15. van der Ende A, van Doorn LJ, Rooijakkers S, Feller M, Tytgat GN, Dankert J. Clarithromycin-susceptible and -resistant Helicobacter pylori isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2648-51.
16. Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori in stool samples. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3636-40.
17. Prazeres MP, De Magalhaes Queiroz DM, Campos Barbosa DV, Aguiar RG, Nogueira ME, Santos A, et al. Helicobacter pylori primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46(6): 2021-3.
18. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda MC, Mendonca S, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in Helicobacter pylori clinical isolates. BMC Gastroenterol 2003; 3: 20.
19. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, Madrazo-De la Garza A, Dehesa M, Gonzalez-Valencia G, et al. Increasing multidrug resistance in Helicobacter pylori strains isolated from children and adults in Mexico. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2677-80.
20. Alarcon T, Vega AE, Domingo D, Martinez MJ, Lopez-Brea M. Clarithromycin resistance among Helicobacter pylori strains isolated from children: prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 486-99.
21. Stone GG, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm RK, Graham DY, et al. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant Helicobacter pylori. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(3): 712-4.
22. Pan ZJ, Su WW, Tytgat GN, Dankert J, van der Ende A. Assessment of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori among patients in Shanghai and Guangzhou, China, by primer-mismatch PCR. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 259-61.
23. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, Reddy R, Asaka M, Kashima K, et al. Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among Helicobacter pylori isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(8): 2214-6.
24. Kumala W, Rani A. Patterns of Helicobacter pylori isolate resistance to fluoroquinolones,

www.SID.ir

Archive of SID

amoxicillin, clarithromycin and metronidazoles. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37(5): 970-4.

25. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Evaluating the prevalence of A2142G, A2143G, and A2142C mutations in clarithromycin resistance Helicobacter pylori in Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran. Journal of Kordestan University of Medical Sciences 2010; 14(4): 72-8.

26. Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Megraud F. Direct detection of Helicobacter pylori resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. Gut 1999; 44(4): 463-7.

27. Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Kanai F, Shirato ri Y, Omata M. Helicobacter pylori specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance. Gut 1998; 43(3): 317-21.

28. Matsuoka M, Yoshida Y, Hayakawa K, Fukuchi S, Sugano K. Simultaneous colonisation of Helicobacter pylori with and without mutations in the 23S rRNA gene in patients with no history of clarithromycin exposure. Gut 1999; 45(4): 503-7.

29. Matsumura M, Hikiba Y, Ogura K, Togo G, Tsukuda I, Ushikawa K, et al. Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of Helicobacter pylori that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 691-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29. No 126. 2nd week. April 2011 Received: 8.9.2010 Accepted: 14.3.2011

Real-Time PCR Assay Using Allele-Specific TaqMan probe for Detection of Clarithromycin Resistance and Its Point Mutations in Helicobacter Pylori

Mohammad Kargar PhD[1], Sadegh Ghorbani-Dalini MSc[2], Abbas Doosti PhD[3], Negar Souod MSc[2]

Abstract

Background: Helicobacter pylori is a fastidious microorganism and therefore standard phenotypic susceptibility tests can take at least 10-14 days. Molecular based diagnostic assays offer an alternative approach to obtain susceptibilities to antibiotics and detection of point mutations with greater accuracy. The aim of this study was the assessment of Clarithromycin resistance and its point mutations by using real-time PCR assay.

Methods: This cross-sectional descriptive study was performed on 200 gastric biopsy specimens obtained from patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy at Hajar hospital in Shahrekord. Initially Helicobacter pylori were identified by rapid urease test (RUT) and polymerase chain reaction (PCR). Then clarithromycin resistance and its point mutations were evaluated by using specific probes and real-time PCR technique.

Findings: Of total samples, 164 (82%) were Helicobacter pylori positive. Overall, a clarithromycin susceptible strains were detected in 105 (64.02%) patients and resistance strains were detected in 59 (35.98%) which were identified as 4 (2.44%) A 2144G, 26 (15.85%) A2143G, 15 (9.15%) A2143C, and 20 (12.19%) A2142G point mutations. Genotype of 5 (8.47%) strains was not detected. Purely resistant strains were detected in 38 (23.17%), while heteroresistant were found in the remaining 16 cases (9.76%).

Conclusion: Results showed that real-time PCR assay has high accuracy to simultaneously identify Helicobacter pylori and clarithromycin resistance types directly in gastric biopsy specimens in short time.

Keywords: Helicobacter pylori, Clarithromycin, Point mutations, Real-time PCR.

[1] Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2] Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Clube, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3] Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
Corresponding Author: Mohammad Kargar PhD, Email: mkargar@jia.ac.ir

www.SID.ir