مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ٤: از ٦٧-٧٦
زمستان ۱۳۸۹

تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری در نمونه مدفوع به‌وسیله آزمایش PCR-ELISA روی ژن *ure*C

علی علمی[۱]، مهدی فروزنده[۲*]، محمدرضا بوجاری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پردیس همت، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۷/۰۸/۰۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۰۱

چکیده

هدف: هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های مزمن در انسان و قادر به ایجاد عفونت‌های بسیاری ازقبیل پپتیک اولسر، گاستریت، التهاب دوازدهه و دیس‌پپسی غیر اولسری است. وجود یک آزمون معتبر برای تشخیص این باکتری ضروری است. به علل مختلف آزمون‌های موجود از جمله کشت مدفوع، بیوپسی، PCR، آزمون تنفسی اوره‌آز و غیره رضایت‌بخش نیست. در این آزمایش آزمون اختصاصی و حساس PCR-ELISA به‌عنوان آزمون ترجیحی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری از نمونه‌های مدفوع و بیوپسی به‌کار می‌رود.

مواد و روش‌ها: ٦٧ نمونهٔ مدفوع از ۱۲۷ بیماری که براساس علایم بالینی در بیمارستان حضرت رسول اکرم تهران مورد آندوسکوپی گوارش و بیوپسی معده قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. DNA از تمامی نمونه‌های مدفوع و بیوپسی استخراج و سپس آزمون PCR برای ژن *ure*C هلیکوباکتر پیلوری انجام شد. سپس آزمون PCR-ELISA نیز انجام و نتایج مقایسه شد.

نتایج: در آزمایش PCR بین ٦٧ نمونه مدفوع و بیوپسی به‌ترتیب ۳۱ (٤٦/۱ درصد) و ۳٤ (۵۰/۷ درصد) نمونه دارای نتایج مثبت و مابقی منفی بود. همچنین در آزمایش PCR-ELISA از بین ٦٧ نمونه مدفوع و بیوپسی به‌ترتیب ٤۲ (٦۲/٦ درصد) و ٤٧ (۷۰/۱ درصد) نمونه دارای نتایج مثبت بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های مدفوع توسط روش PCR-ELISA دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده و می‌تواند به‌عنوان آزمون اولیه در شناسایی این ارگانیسم به‌کار رود.

کلیدواژگان: هلیکوباکتر پیلوری، نمونه‌های مدفوع و بیوپسی، PCR-ELISA، ژن *ure*C

۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن در انسان بوده و در کشورهای درحال توسعه و توسعه‌یافته به‌ترتیب در مجرای گوارش ۹۰ و ۳۰-۵۰ درصد از افراد کلونیزه می‌شود [۱]. این باکتری عامل طیف متنوعی از عفونت‌ها، از یک گاستریت (Gastritis) ساده تا زخم معده، لنفوما و سرطان معده است [۲، ۳]. چندین

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: foroz@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

آزمون تشخیصی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری دردسترس است. روش‌های تهاجمی مانند کشت، بافت‌شناسی، آزمون اوره‌آز سریع (Rapid Urease Test: RUT) و روش مولکولی نیازمند جمع‌آوری بیوپسی است [٤]. در روش‌های غیرتهاجمی از ایمنواسی (Immunassay)، آزمون تنفسی اوره‌آز (Urease Breath Trest: UBT) و نمونه مدفوع استفاده می‌شود [٥، ٦]. سرولوژی ویژگی پایینی داشته و به‌علاوه نتایج سرولوژی مثبت لزوماً بیانگر وجود عفونت نیست؛ بنابراین پس از ریشه‌کنی عفونت نمی‌توان از این روش استفاده کرد. آزمون UBT نیز فرایندی وقت‌گیر بوده و نیازمند تجهیزات گران‌قیمت است. تلاش‌های متعددی برای کشت هلیکوباکتر پیلوری از نمونه مدفوع انجام شده اما جداسازی باکتری به‌علت دشواری کشت، تنها در موارد معدودی موفقیت‌آمیز بوده است [٧-٩].

بین روش‌های مولکولی روش PCR رایج‌تر بوده و برای تکثیر DNA ی هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع به‌کار می‌رود. در یک مطالعه، این ارگانیسم در ٩٠ درصد افراد آلوده شناسایی شد [١٠] ولی سایر مطالعات کمتر به چنین سطحی از ایزولاسیون باکتری دست یافته‌اند [١١]. این کاهش حساسیت مربوط به وجود عوامل بازدارنده در مدفوع است [١٢] که می‌بایست پیش از انجام PCR حذف شود [١٣]. در سال‌های اخیر محققین روش‌های مولکولی را بر پایه هیبریداسیون محصول PCR با پروب (Probe) اختصاصی شرح داده‌اند. یکی از این روش‌ها تحت عنوان Enzyme- PCR-ELISA) (Linked Immunosorbent Assay آزمونی ساده، حساس و اختصاصی بوده و می‌تواند برای تکثیر و تشخیص ماده ژنتیکی بیماری‌زاهای مختلف به‌کار گرفته شود. طی استفاده از این روش علاوه بر احتراز از اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) به‌عنوان ماده‌ای سرطان‌زا، با رفع محدودیت ناشی از به‌کارگیری ژل در آشکارسازی محصول PCR، حساسیت نهایی افزایش یافته و به‌جای نتایج کیفی، مقادیر کمّی حاصل می‌شود. هدف از این مطالعه ابداع یک آزمون PCR-ELISA اختصاصی و حساس برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های مدفوع و بیوپسی معده بود. به‌علاوه این روش به‌عنوان یک ابزار تشخیصی در موارد بالینی ارزیابی شد.

٢- مواد و روش‌ها

٢-١- کنترل مثبت

سه جدایه مختلف هلیکوباکتر پیلوری حاصل از مطالعه اولیه در محیط بروسلا آگار (Brucella Agar) تحت شرایط میکروایروفیلیک (Microaerophilic) در دمای ٣٧ درجه برای ٦ روز کشت شده و پس از تأیید توسط رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی (گرم منفی- اوره‌آز، اکسیداز و کاتالاز مثبت) از DNA ی استخراج شده آن‌ها به‌عنوان کنترل مثبت در تمام مراحل مطالعه استفاده شد.

٢-٢- سویه‌های باکتری

١٤ جدایه بالینی مختلف از نمونه‌های بالینی شامل ادرار، مدفوع، CSF (Cerebral Spinal Fluid) و خون در آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان طالقانی تهران کشت شد. DNA ی این ١٤ سویه- شامل کلبسیلا (*Klebsiella*)، پروتئوس ولگاریس (*Proteus volgaris*)، ویبرو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*)، اشریشیا کولی (*Escherichia coli*)، سالمونلا تیفی (*Salmonella typhi*)، سراشیا (*Serratia*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*)، آگروباکتریوم (*Agrobacterium*)، انتروباکتر (*Entrobacter*)، شیگلا سونئی (*Shigella sonnei*)، استرپتوکوکوس ویریدانس (*Streptococcus viridans*)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (*Staphylococcus saprophyticus*) و پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*)- دقیقاً مانند سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری پس از رنگ‌آمیزی گرم و تعیین هویت بیوشیمیایی با همان روش استخراج شده و با تکنیک‌های PCR و PCR-ELISA بررسی شد.

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۳- استخراج DNA ی باکتری

کلونی‌های مجزا از هر یک از کشت باکتریایی به میکروتیوب‌های استریل حاوی ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر منتقل شدند. میکروتیوب‌ها نیم ساعت در حرارت ۹٤ درجه قرار گرفته و هر ۵ دقیقه به شدت ورتکس (Vortex) شدند. مایع رویی (Supernatant) جمع‌آوری شده و به‌عنوان DNA ی الگو به‌کار گرفته شد.

۲-٤- نمونه‌های بالینی

از هر بیمار سه نمونه بیوپسی انتروم (Antrum) معده برای آزمایش‌های RUT، بافت‌شناسی و PCR گرفته شد.

۲-۵- آزمون‌های تشخیصی روتین

نمونه بیوپسی انتروم به محیط RUT براث [محیط آزمون CLO (Campylobacter-Like Organism)] منتقل شده و در دمای اتاق انکوبه شد. نتایج آزمون ٤ ساعت بعد از انکوباسیون ثبت شد. برای تشخیص ریخت‌شناسی (Morphology) تیپیک، مقاطع بافتی پارافینه با گیمسا (Giemsa) رنگ‌آمیزی شد.

۲-٦- آماده‌سازی نمونه‌ها برای PCR

نمونه‌های بیوپسی همگن شده (Homogenized) تا زمان استخراج DNA در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محتوای DNA ی نمونه‌های بیوپسی از طریق روش نمک‌زدایی (Salting Out) با استفاده از کیت DNP Cinna Gen استخراج شد. به‌طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتئاز و ۵ میکرولیتر آنزیم پروتئاز به هر ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم بافت معده افزوده و به‌مدت ۱ تا ۳ ساعت در ۵۵ درجه انکوبه شد. سپس ٤۰۰ میکرولیتر بافر لیز افزوده شد، کاملاً ورتکس شد و ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده به این نمونه بیوپسی همگن شده اضافه شد. پس از آن ۲۰ دقیقه در ۲۰ درجه انکوبه و سپس سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب با بافر شستشو مجاور شد. سپس ۵ دقیقه در ٦۵ درجه قرار گرفته و در ۵۰ میلی‌لیتر بافر حلال توسط ۵ دقیقه تکان دادن آرام در ٦۵ درجه سانتی‌گراد حل شد. در نهایت مایع رویی حاوی DNA جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

استخراج DNA از مدفوع با استفاده از کیت استخراج DNA ی مدفوع Bioneer انجام شد. به‌طور خلاصه حدود ۱۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم نمونه مدفوع در ٤۰۰ میکرولیتر بافر لیز و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K حل شده و پس از ورتکس ۱۰ دقیقه در ٦۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در پی ۵ دقیقه سانتریفوژ، مایع رویی به ٤۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی افزوده و ۱۰ دقیقه در ٦۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه و ورتکس شد. سوسپانسیون به‌دست آمده در ستون اتصالی ریخته و لوله سانتریفوژ شد تا مایع کاملاً عبور کند. سپس ستون اتصالی به یک لوله جدید منتقل و بار دیگر سانتریفوژ شد. این فرایند برای بافر شستشوی دوم هم تکرار شد تا اتانول کاملاً حذف شود. پس از انتقال ستون اتصالی به لوله جمع‌آوری، ۲۰۰ میکرولیتر از الوشن بافر (Elution Buffer) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه شده و ظرف یک دقیقه به داخل ستون نفوذ کرد. محلول به‌دست آمده تا زمان آزمودن در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۷- آغازگرها (Primers) و پروب‌های سنتز شده

آغازگرها و پروب‌های الیگونوکلئوتیدی طبق مدل ۳۹٤ سنتز DNA/RNA ساخته شد. آغازگرهای ۹۳۲۷۵ با ترادف:

5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'

و ۹۳۲۷٦ با ترادف:

5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' که قبلاً برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری به‌کار گرفته شده است [۱٤]، با هدف‌گیری توالی ژن ureC (به‌ترتیب به شماره بانک ژنی EMBL X57132 و M60398) یک قطعه DNA با وزن ۲۹٤ جفت‌بازی را تکثیر می‌کند. پروب مورد استفاده

Archive of SID

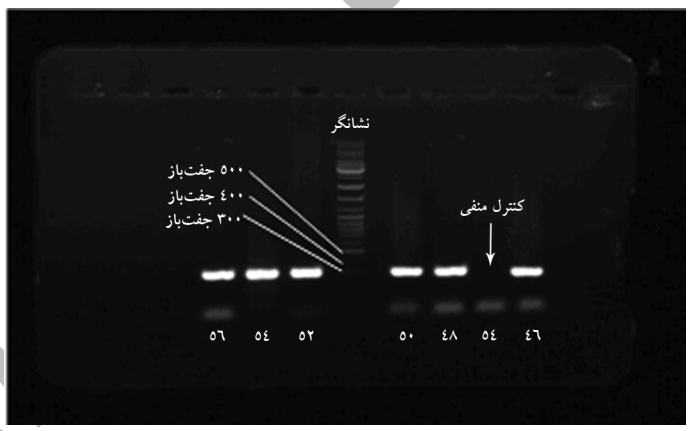
www.SID.ir

('5-CGATTGGGGATAAGTTTGTGA-3') که با اتصال به نوکلئوتیدهای ۱۳۷–۱۵۸ قطعه تکثیر شده برای شناسایی ژن ureC به‌کار رفته است، طبق روش جدیدی مولتی بیوتینه (Multi Biotin) (۸ بیوتین) شد [۱۵].

۲–۸– شرایط PCR و تجزیه و تحلیل DNAی تکثیر شده

واکنش‌ها در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده ترموسایکلر اپندورف (Thermocycler Eppendorf) انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۰/٤ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۲ میکرومول از هر داکسی نوکلوتید تری فسفات، و ۰/۰۱ میکرومول از داکسی اوراسیل تری فسفات نشان‌دار با دیگوکسی‌ژنین (Digoxigenin: DIG) (Boehringer manheim (DIG-dUTP) GmbH, Manheim, Germany) و بافر واکنش (۱۰۰ میلی‌مولار تریس– HCl (pH=۸/۳)، ۵۰۰ میلی‌مولار KCl، ۱۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/۰۱ درصد (وزنی به حجمی) ژلاتین) با یک قطره روغن معدنی (Sigma) پوشانده شد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه آزمایش به آن افزوده شد. مخلوط واکنش برای ۱۰ دقیقه در ۹٤ درجه واسرشته و روی یخ سرد شد. سپس ۲/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمراز (Boehringer) قبل از تکثیر افزوده شد. مراحل تکثیر PCR شامل ۳۰ ثانیه واسرشتگی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال در ٥٤ درجه سانتی‌گراد (حرارت بهینه– شکل ۱) و ۱ دقیقه مرحله طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بودند. پس از ۳۵ چرخه، چرخه نهایی ۱ دقیقه در دمای اختصاصی اتصال و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای طویل‌سازی انجام شد.

روی DNA ی سویه‌های کشت شده هلیکوباکتر پیلوری آزمون PCR انجام گرفت. مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر محصول PCR با استفاده از آگارز (Agarose) ۱ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و بررسی شد (شکل ۱).



شکل ۱ محصول واکنش PCR روی نمونه DNA هلیکوباکتر پیلوری در شیب دمایی ٤٦ الی ٥٦ درجه سانتی‌گراد

۲–۹– آزمون هیبریداسیون بافر

۱۰ میکرولیتر از هر مخلوط ۱ به ۵ رقیق شده PCR به ۲۰ میکرولیتر محلول واسرشتگی (NaOH ۰/۲۵ میلی‌مولار) افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۱۵ میکرولیتر از محصول واسرشته شده، به ۱۱۰ میکرولیتر از بافر هیبریداسیون (حاوی ۱۱۰ نانومول پروب بیوتینه) اضافه شد و با افزودن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به میکروپلیت‌ها و ضمن تکان دادن ملایم در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۷۵ دقیقه، واکنش هیبریداسیون صورت پذیرفت. سپس پلیت‌ها با استفاده از بافر شستشو ۵ بار شسته شده، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ به ۱۰۰۰ رقیق شده پراکسیداز ترب کوهی (DAKO, Copenhagen, Denmark)–

Archive of SID
www.SID.ir

کونژوگه با آنتی DIG- به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای نیم ساعت انکوبه شد. پس از ۵ بار شستشوی پلیت‌ها با بافر شستشو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا- رنگزای ABTS (2,2'-Azinibis [3-ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic acid]-diammonium salt)، H_2O_2- به هر چاهک افزوده شد. واکنش با افزدون ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد NaOH به هر چاهک متوقف شده و جذب نوری (Optical Density: OD) درطول موج ٤٠٥ نانومتر سنجیده شد. یک مخلوط PCR خالی (حاوی آب به‌جای DNA) در ٦ لوله در هر بار سنجش، به‌عنوان بلانک (Blank) آزموده شد.

مقدار سطح حداقل (Cut off) واکنش هیبریداسیون محلول ۰/۳۵ (با افزودن سه برابر انحراف معیار به میانگین OD چاهک‌های بلانک) تعیین شد.

جدول ۱ OD به‌دست آمده از واکنش PCR-ELISA روی ١٤ گونه باکتریایی و هلیکوباکتر پیلوری

نمونه DNA	سودوموناس	پروتئوس میرابیلیس	اشریشیاکلی	سراشیا	انتروباکتر آگروباکتریوم	پروتئوس ولگاریس	استافیلوکوکوس اورئوس	کلبسیلا	سالمونلا	ویبریو	سایرونفیتکوس استافیلوکوکوس	شیگلا	ویریدانس استرپتوکوکوس	هلیکوباکتر پیلوری
OD	۰/۳۳	۰/۲۳	۰/۲۸	۰/۱۸	۰/۲٦ ۰/۲۵	۰/۲۷	۰/۱٤	۰/۲٤	۰/۳۱	۰/۲۰	۰/۲٤	۰/۱٦	۰/۱۹	حداقل ۱/۹۲

۳- نتایج

۳-۱- حساسیت و ویژگی آزمون‌های PCR و هیبریداسیون محلول

رقت‌های بر پایه ۱۰ از DNA ی هلیکوباکتر پیلوری تأیید شد و ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر از غلظت ابتدایی با آزمون PCR ارزیابی شد. آزمون هیبریداسیون محلول توانست دست کم غلظت ۱۰ فمتوگرم از DNA ی هلیکوباکتر پیلوری را تشخیص دهد که تقریباً برابر با ژنوم ۷ هلیکوباکتر پیلوری است؛ در صورتی که در روش رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید تا ۱۰۰ فمتوگرم DNA باکتری تشخیص داده شد (تقریباً ژنوم ۷۰ هلیکوباکتر پیلوری). همچنین حساسیت آزمون‌ها با رقت‌های ۱۰تایی از DNA تکثیر شده در واکنشی برآورد شد که در آن ۱۰ پیکوگرم از DNA هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان الگو استفاده شد. محدوده تشخیص روی ژل آگارز رقت ۱/۱۰ بود، در صورتی که تشخیص رقت ۱/۱۰۰۰ توسط هیبریداسیون نشان می‌داد که این روش برای تشخیص محصول PCR، ۱۰۰ برابر حساس‌تر از تشخیص با ژل است. ویژگی آزمون‌ها با استفاده از ۱۱ جدایه بالینی هلیکوباکتر پیلوری و همچنین ١٤ سویه باکتری از جنس‌های بسیار نزدیک و گونه‌های اوره‌آز مثبت که معمولاً می‌تواند به‌عنوان آلودگی در بیوپسی‌های معده و نمونه‌های مدفوعی یافت شوند، بررسی شد. OD برای تمام جدایه‌های هلیکوباکتر پیلوری بیش از ۱/۹۲ بود، در صورتی که برای سایر سویه‌ها تنها بین ۰/۱۱ و ۰/۲۸ تغییر می‌کرد (میانگین OD برای سایر سویه‌ها ۰/۲۳ محاسبه شد) (جدول ۱).

۳-۲- آزمون‌های تشخیصی

در میان ١٢٤ نمونه بیوپسی معده، آزمون RUT برای ۸۱ بیمار (٦٥/٣ درصد) مثبت شد، در صورتی که ۸۵ بیمار (٦٨/٥ درصد) و ۹۱ بیمار (٧٣/٣ درصد) به‌ترتیب در آزمون‌های PCR و PCR-ELISA نتایج مثبت نشان دادند. هیچ‌یک از بیماران دارای نتایج منفی PCR-ELISA نتایج مثبت PCR نداشتند، و به‌جز یک مورد که در آن آزمون اوره‌آز

Archive of SID

www.SID.ir

تنها آزمون مثبت بود، سایر موارد نتایج منفی RUT برای هر دو آزمون دیگر هم منفی بود (جدول ۲).

جدول ۲ مقایسه تطبیقی نتایج آزمون‌ها در ۱۲۷ بیمار تنها روی نمونه بیوپسی معده

تعداد نمونه	RUT	PCR	PCR-ELISA
٦	-	-	+
٥	-	+	+
٨٠	+	+	+
١	+	-	-
٣٥	-	-	-
مجموع	٨١ (٦٣/٧ درصد)	٨٥ (٦٦/٩ درصد)	٩١ (٧١/٦ درصد)

آزمون‌های PCR و PCR-ELISA در مورد ٦٧ بیمار که نمونه مدفوع داده بودند، انجام شد. نتایج برای ٣١ نمونه (٤٦/٢ درصد) و ٣٤ نمونه (٥٠/٧ درصد) مثبت بود، در صورتی که برای آزمون‌های اوره‌آز، PCR و PCR-ELISA در نمونه‌های بیوپسی مربوط به‌ترتیب ٤٠ (٩٥/٧ درصد)، ٤٢ (٦٢/٦ درصد)، و ٤٧ (٧٠/١ درصد) نتیجه مثبت به‌دست آمد. تمام نمونه‌های PCR-ELISA منفی دارای نتایج PCR و RUT منفی بوده و نتایج یکسان از RUT بیماران دارای PCR منفی حاصل شد (تنها نمونه بیوپسی با RUT مثبت و PCR منفی، نمونه مدفوع نداشت) (جدول ٣).

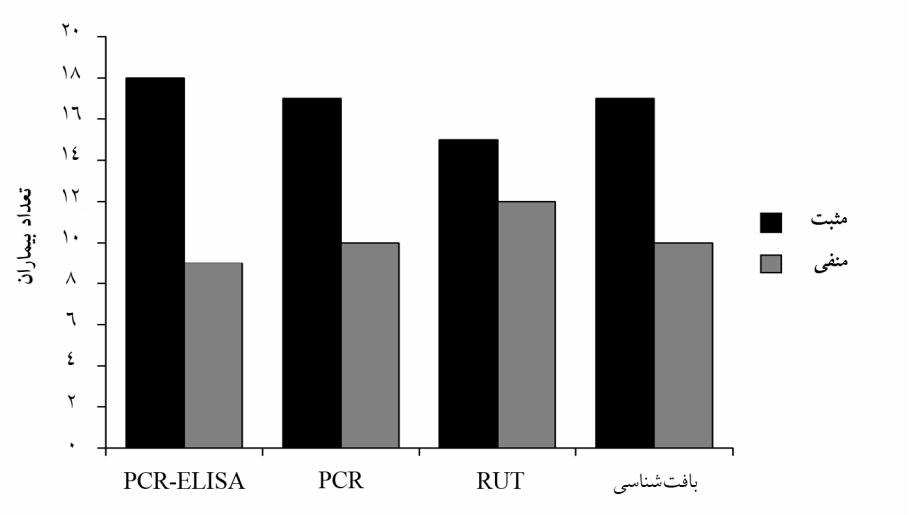
جدول ٣ مقایسه تطبیقی نتایج آزمون‌ها در ٦٧ بیمار دارای هر دو نمونه بیوپسی معده و مدفوع

تعداد بیماران	RUT	PCR		PCR-ELISA	
	بیوپسی	بیوپسی	مدفوع	بیوپسی	مدفوع
٥	−	−	−	+	−
٢	−	+	−	+	−
٦	+	+	−	+	−
٣	+	+	−	+	+
٣١	+	+	+	+	+
٢٠	−	−	−	−	−
مجموع (درصد)	٤٠	٤٢	٣١	٤٧	٣٤

در رنگ‌آمیزی گیمسا ارگانیسم‌های هلیکوباکتر پیلوری در ١٧ بیمار از ٢٧ نفر (٦٢/٩) تشخیص داده شد که با نتایج PCR همخوانی داشت. نتایج مشابهی نیز از PCR-ELISA به‌دست آمد، به استثنای این‌که تنها آزمون مثبت در یک نمونه بود. علایم بالینی و سوابق قبلی بیماری در این مورد خاص وجود عفونت باکتریایی را تأیید می‌کرد. دو مورد از ١٧ بیمار با PCR مثبت به‌همراه ١٠ بیمار دیگر، دارای نتایج منفی RUT بودند (نمودار ١).

DNA ی ١٧ نمونه بیوپسی که در محیط RUT برای جمع‌آوری شده بود، استخراج و آزمون‌های PCR و PCR-ELISA انجام شد که در مقایسه با نمونه جمع‌آوری شده در سالین (Saline) نتایج یکسانی برای آزمون‌ها در همان بیماران به‌دست داد (١٠ مورد مثبت برای PCR و ١١ مورد مثبت برای PCR-ELISA).

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱ مقایسه نتایج PCR-ELISA، PCR و RUT با نتایج بافت‌شناسی

٤- بحث

با توجه به اهمیت بالینی هلیکوباکتر پیلوری و بیماری‌های مرتبط با آن، روش‌های مختلفی برای شناسایی این عفونت ارایه شده است. با معرفی روش‌های مولکولی نه تنها بر ویژگی روش‌های تشخیصی افزوده شده بلکه به تدریج از مقدار نمونه مورد نیاز برای شناسایی ارگانیسم کاسته شده و حساسیت آزمون‌ها نیز افزایش یافته است. یکی از روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون محصول PCR و شناساگر نشان‌دار، روش PCR-ELISA است که در این مطالعه برای اولین بار برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع به‌کار گرفته شده است. این روش بیشتر برای نمونه بیوپسی معده به‌کار رفته و انتظار می‌رود با افزایش حساسیت نسبت به PCR، بتواند مقادیر اندک ژنوم ارگانیسم را در مدفوع شناسایی کند. با توجه به اجتناب از مشکلات نمونه‌گیری تهاجمی، جستجوی توالی‌های اختصاصی DNA ی هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع به‌عنوان یک آزمون تشخیصی از جذابیت زیادی برخوردار بوده و در موارد متعددی به‌کار رفته است [۱۱، ۱۲]. با وجود حساسیت بالای PCR نتایج ضد و نقیضی از مطالعات مختلف به‌دست آمده است. در مطالعه‌ای با آغازگرهای اختصاصی 16S rRNA، باکتری در مدفوع ۹۰ درصد بیماران مبتلا به عفونت شناسایی شد [۱۰]، اما سایرین نتایجی بین ۳۰-۶۰ درصد گزارش کرده‌اند [۱٦، ۱۷] که احتمالاً به دلیل واکنش متقاطع این ژن که در هلیکوباکتر پیلوری و چند گونه دیگر مشابهت دارد، چنین نتایجی به‌دست آمده است. محققان حاضر در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری، ژن ureC را انتخاب کردند که مناسب‌ترین ژن برای تشخیص باکتری در نمونه‌های بالینی در روش‌های مختلف PCR است [۱۸]. این آغازگرهای منطقه‌ای دارای ویژگی کافی برای تشخیص دقیق است، اما پروب تشخیصی مورد استفاده در این آزمون ویژگی بیشتری فراهم کرد و ضمن این‌که ویژگی آن با ١٤ گونه نزدیک باکتریایی بررسی شد، هیچ نتیجه مثبت کاذبی در نمونه‌های مدفوع و بیوپسی به‌دست نیامد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که واکنش PCR توانسته است بدون پاسخ مثبت کاذب، عفونت را در تمامی ۱۷ بیماری که نتیجه آزمون بافت‌شناسی آن‌ها مثبت بوده، تشخیص داده و در ۱۰ بیمار دیگر منفی باشد، در حالی‌که با آزمون RUT دو پاسخ منفی کاذب مشاهده می‌شود. نتیجه واکنش PCR-ELISA در مقایسه با بافت‌شناسی نشان دهنده یک پاسخ مثبت بیشتر است که با توجه به علایم بالینی و حساسیت بافت‌شناسی (بین ۷۲ تا ۸۵ درصد) به‌عنوان بیمار تلقی شد. بدین‌ترتیب حساسیت

Archive of SID

www.SID.ir

PCR و بافت‌شناسی ۹۴/۴ درصد و RUT ۸۳/۳ درصد محاسبه شد. با توجه به نتایج فوق و در نظر گرفتن استفاده از پروب در واکنش PCR-ELISA، حساسیت این روش معادل ۱۰۰ درصد تعیین شد.

از مقایسه نتایج ۱۷ جفت نمونه بیوپسی جمع‌آوری شده در سالین و محیط RUT مشخص شد که می‌توان از نمونه بیوپسی معده پس از آزمون RUT در واکنش‌های PCR و PCR-ELISA نیز استفاده کرده و نیازی به نمونه‌گیری مجزا نیست.

در مطالعه حاضر آزمون PCR-ELISA با ۵ نتیجه مثبت بیشتر برای بیوپسی معده حساسیتی بیش از آزمون PCR نشان می‌دهد. برای نمونه مدفوع حساسیت PCR-ELISA و PCR به‌ترتیب ۷۲ و ۶۵ درصد بر مبنای نتایج PCR-ELISA ی بیوپسی معده است. این میزان حساسیت در مقایسه با بعضی از گزارش‌ها اندکی پایین‌تر بوده [۱۹] و در مقایسه با سایر واکنش‌ها درصد بسیار بیشتری از مبتلایان به عفونت را تشخیص داده است [۱۸، ۲۰]. اهمیت روش جداسازی DNA از مدفوع به دلیل حضور موادی است که قادر به تخریب DNA هستند [۲۱]. به‌علاوه مدفوع حاوی مولکول‌های پلی‌ساکاریدی کمپلکس است که از واکنش PCR ممانعت می‌کند [۲۲] و DNA نیز به‌سختی از مدفوع جدا می‌شود. هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع، اغلب به فرم کوکوئید وجود دارد. تصور می‌شود که تشخیص این فرم از باکتری با استفاده از PCR، نسبت به اشکال میله‌ای شکل آن مشکل‌تر باشد [۱۸]. با توجه به اساس یکسان روش PCR-ELISA و PCR می‌توان چنین استنباط کرد که افزایش موارد مثبت، ناشی از حساسیت بیشتر PCR-ELISA برای عفونت‌هایی است که روی ژل قابل تشخیص نیست. از نتایج به‌دست آمده مشخص شد که آزمون PCR-ELISA روی نمونه مدفوع فاقد پاسخ مثبت کاذب بوده و با وجود ۳ نتیجه منفی کاذب از حساسیتی در حدود ۷۲ درصد برخوردار است که نسبت به PCR این نوع نمونه (با ۵ پاسخ منفی کاذب) حساسیت بالاتری را داراست، اما با در نظر گرفتن تفاوت حساسیت آن نسبت به PCR و PCR-ELISAی بیوپسی معده نمی‌تواند به‌صورت کامل جایگزین این آزمون‌ها شود. از این‌رو با توجه به سهولت نمونه‌برداری مدفوع و ویژگی بالای روش PCR-ELISA، و برای احتراز از انجام آندوسکوپی روی تمامی بیماران، می‌توان از این روش به‌عنوان یک روش غربالگری اولیه سود برد. در این صورت نمونه‌برداری بیوپسی معده تنها از افرادی که واکنش PCR-ELISA ی نمونه مدفوع منفی داشته باشند انجام می‌پذیرد.

به‌کارگیری میکروپلییت علاوه دستیابی به نتایج کمی به‌جای آشکارسازی کیفی روی ژل و امکان مقایسه شدت عفونت در بیماران مختلف یا پیگیری درمان پس از مصرف آنتی‌بیوتیک (که البته نیازمند بررسی جداگانه‌ای است)، استفاده از روش‌های مکانیزه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و مولکولی (برای مطالعات اپیدمیولوژی و بررسی شیوع در انسان) را نیز تسهیل می‌کند.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

۶- منابع

[1] Vaira D, Ricci C, Acciardi C, Gatti L, Berardi S, Miglioli M. The clinical role of stool test (HpSA) in noninvasive diagnosis of Helicobacter pylori infection. Turk J Gastroenterol 2000; 11(2): 97-102.

[2] Makristathis A, Pasching E, Schutze 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):

Archive of SID
www.SID.ir

2772-4.

[3] Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovách Z, Rotter M, Makristathis A. 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.

[4] He Q, Wang JP, Osato M, Lachman LB. Real-time quantitative PCR for detection of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 2002; 40(10): 3720-8.

[5] Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadström T, O'Toole PW. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30(1): 54-8.

[6] de Carvalho Costa Cardinali L, Rocha GA, Rocha AM, de Moura SB, de Figueiredo Soares T, Esteves AM, Nogueira AM, Cabral MM, de Carvalho AS, Bitencourt P, Ferreira A, Queiroz DM. Evaluation of [13C]urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3334-5.

[7] Kelly SM, Pitcher MC, Farmery SM, Gibson GR Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. Gastroenterology 1994; 107(6): 1671-4.

[8] Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet 1992; 340(8829): 1194-5.

[9] Dore MP, Osato MS, Malaty HM, Graham DY. Characterization of a culture method to recover *Helicobacter pylori* from the feces of infected patients. Helicobacter 2000; 5(3): 165-8.

[10] Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P. PCR identification of *Helicobacter pylori* in faeces from gastritis patients. Lancet 1993; 341(8842): 447.

[11] Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. J Clin Microbiol 1990; 28(6): 1300-7.

[12] van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA. Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. J Clin Microbiol 1994; 32(5): 1346-8.

[13] Widjojoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GP, Verhoef J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. J Clin Microbiol 1992; 30(12): 3195-9.

[14] Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, Glupczynski Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cag*A gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1995; 33(10): 2752-6.

[15] Fang S, Bergstrom DE. Fluoride-cleavable biotinylation phosphoramidite for 5'-end-labeling and affinity purification of synthetic oligonucleotides. Nucleic Acids Res 2003; 31(2): 708-15.

[16] Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Schneider

Archive of SID

www.SID.ir

BG. Detection and typing of *Helicobacter pylori cag*A/*vac*A genes by radioactive, one-step polymerase chain reaction in stool samples from children. J Microbiol Methods 2003; 52(2): 197-207.

[17] Russo F, Notarnicola M, Di Matteo G, Leoci C, Caruso ML, Pirrelli M, Caradonna M, Morandi L, Di Leo A. Detection of *Helicobacter pylori cag*A gene by polymerase chain reaction in faecal samples. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999; 11(3):251-6.

[18] Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, Lee CH. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol 1999; 37(3): 772-4.

[19] Moreira D. Efficient Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. Nucleic Acids Res 1998; 26(13): 3309-10.

[20] Wisniewska M, Nilsson HO, Bak-Romaniszyn L, Rechcinski T, Bielanski W, Planeta-Malecka I, Plonka M, Konturek S, Wadstrom T, Rudnicka W, Chmiela M. Detection of specific *Helicobacter pylori* DNA and antigens in stool samples in dyspeptic patients and healthy subjects. Microbiol Immunol 2002; 46(10): 657-65.

[21] Monteiro L, Gras N, Megraud F. Magnetic immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. J Clin Microbiol 2001; 39(10): 3778-80.

[22] Monteiro L, Bonnemaison D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita, Megraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol 1997; 35(4): 995-8.

Archive of SID

www.SID.ir