Original Article

Comparison PCR and Culture Methods for Detect Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*

Somayeh Allahkarami[1], Mohammad hassan Shahhosseiny[2], Nasim Hayati Roodbari[3], Davood Esmaili[4]

[1] M.Sc. of Microbiology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad university,Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor,Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran
[4] Assisstant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Baqyatollah

ABSTRACT

Background:
Helicobacter pylori (*Pylori*) was the most common cause of chronic gastritis and was linked to peptic ulcer disease and gastric cancer. Environmental factors such as water a reservoir of *H.pylori* which infect human. a Non-culture bacteria in coccoid forms widespread in aquatic environments.The objective of this study was elevating the diagnostic value of PCR and culture methods for for diagnosis coccoid forms of *H.pylori*.

Materials and Methods:
ITo induce coccoid forms, ten different strains of *H.pylori* (H1-H10) were inoculated into 30 drinking water samples. Then, the samples were incubated at three different temperatures of 4°C, 22°C and 37°C for the durations of 30 and 60 days. The samples were cultured on brucella blood agar and DNA was also extracted also from them and PCR performed on samples.

Results:
percentage of *H.pylori* cells detected at specified temperatures by the culture were 0%, 10% and 0% in the first month and were 0%,10%,30% in the second month whereas by the PCR molecular method were 30%, 80%, and 30% in the first month and were 20%, 20%, and 40% in the second month, respectively.

Conclusion:
finding show PCR methodis more capable than culture fordetect the coccoid forms of *H.pylori*, therefore this method could be used to detect non- culture forms.

Keywords: *Helicobacter pylori*, coccoid, PCR, Culture

please cite this paper as:
Allahkarami S, Shahhosseiny MH, Hayati Roodbari N, Esmaili D. Comparison PCR and Culture methods for detect Coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Govaresh* 2014;19:175-81.

Corresponding author:
Somayeh Allahkarami, MSC
Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran
Tel: + 98 21 44844946
Fax:+ 98 21 44861889
E-mail: skarami77@yahoo.com
Received: 14 Apr. 2014
Edited: 01 Jul. 2014
Accepted: 02 Jul. 2014

ID.ir

مقاله پژوهشی

مقایسه دو روش PCR و کشت برای شناسایی اشکال کوکوئید هلیکوباکترپیلوری

سمیه اله کرمی[۱]، محمدحسن شاه حسینی[۲]، نسیم حیاتی رودباری[۳]، داوود اسماعیلی[۴]

[۱] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
[۴] استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه بقیه الله، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
هلیکوباکترپیلوری (*H.pylori*) شایع ترین علت گاستریت مزمن بوده و با بیماری زخم معده و سرطان معده مرتبط است. فاکتورهای محیطی از قبیل آب به عنوان مخزنی برای هلیکوباکترپیلوری می باشد که در انسان ایجاد عفونت می کند. باکتریهای زنده اما غیرقابل کشت به صورت اشکال کوکوئیدی در محیط های آبی گسترده هستند. هدف از این مطالعه، ارزیابی ارزش تشخیصی PCR در مقایسه با روش کشت جهت شناسایی فرم های کوکوئید هلیکوباکترپیلوری می باشد.

روش بررسی:
جهت القای فرم های کوکوئید، ۱۰ سویه هلیکوباکترپیلوری (H1-H10) درون ۳۰ نمونه آب آشامیدنی تلقیح شدند. سپس نمونه ها در سه دمای متفاوت شامل ۴°C، ۲۲°C و ۳۷°C برای مدت زمان های ۳۰ و ۶۰ روز انکوبه شدند . نمونه ها در محیط بروسلا بلادآگار کشت داده شدند و DNA نیز از آنها استخراج شد و تست PCR با هدف ژن glmM هلیکوباکترپیلوری بر روی نمونه ها انجام گرفت.

یافته ها:
درصد سلول های شناسایی شده در دماهای تعیین شده توسط کشت به ترتیب ۰٪ ، ۱۰٪ و۰٪ در ماه اول و ۰٪ ، ۱۰٪ و۳۰٪ در ماه دوم بودند در حالی که توسط روش ملکولیPCR، ۳۰٪ ،۸۰٪ و۳۰٪ در ماه اول و ۲۰٪ ،۲۰٪ و۴۰٪ در ماه دوم بودند.

نتیجه گیری:
با توجه به این که تست PCR قابلیت بیشتری نسبت به روش کشت در شناسایی فرم های کوکوئیدی هلیکوباکترپیلوری را داراست ، بنابراین این روش می تواند در تشخیص این فرم های سخت رشد و غیرقابل کشت استفاده شود.

کلید واژه: هلیکوباکترپیلوری، کوکوئید، PCR، کشت

گوارش/ دوره ۱۹، شماره ۳/پاییز ۱۳۹۳/ ۱۸۱-۱۷۵

زمینه و هدف:

هلیکوباکترپیلوری *H.pylori* (*Helicobacter pylori*) باسیل گرم منفی و میکروآئروفیلی است که به عنوان عامل عمده خطر زخم های معده و دوازدهه و سرطان معده شناخته شده است.(۱) مطالعات انجام شده در کشورهای درحال توسعه با وضعیت اجتماعی و اقتصادی پایین و مدیریت ضعیف آب آشامیدنی نشان می دهد که عوامل محیطی در انتقال عفونت *H.pylori* دخیل و مهم می باشند. به این ترتیب، آب احتمالاً به عنوان مخزنی برای *H.pylori* محسوب می گردد. شواهدی وجود دارد که ارتباط میان مصرف آب آشامیدنی و عفونت با هلیکوباکترپیلوری را در برخی کشورها نشان می دهد.(۱۴-۲) در حال حاضر نزدیک به ۹۰ درصد از جمعیت جوان در ایران مبتلا به عفونت هلیکوباکترپیلوری هستند (۱۵) که تقریباً ۵۰٪ از آنها قبل از سن ۱۵ سالگی آلوده می شوند.(۱۶) نرخ پایین ریشه کنی(۱۷) و میزان بالای عود عفونت(۱۸) بر اهمیت کنترل هلیکوباکترپیلوری به عنوان یک مشکل بهداشتی در ایران می افزاید. *H.pylori* درآب و مواجه با برخی شوک های محیطی

نویسنده مسئول: سمیه اله کرمی
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
تلفن: ۰۲۱-۴۴۸۴۴۹۴۶
نمابر: ۰۲۱-۴۴۸۶۱۸۸۹
پست الکترونیک: skarami77@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۳
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۳/۴/۱۰
تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۱

مانند کمبود شدید مواد غذایی، انکوباسیون در حرارتی متفاوت از طیف دمایی نرمال رشد باکتری، غلظت افزایش یافته اسموتیک (مثلا آب دریا)، غلظت بالای اکسیژن و قرار گرفتن در معرض نور سفید، کشت های کهنه و شرایط سخت محیطی از فرم باسیلی و خمیده خود به فرم کوکوئید مبدل می شود که دراین حالت قابل کشت دادن نیست. این حالت نهفته باکتری اصطلاحا فرم Viable but non-culturable (زنده اما غیر قابل کشت) نامیده می شود که از لحاظ عفونت زایی اهمیت قابل توجهی دارد.(۱۹) فرم کوکوئید هلیکوباکترپیلوری در مقابل آنتی بیوتیک هایی که معمولا در موارد زخم معده تجویز می شوند کاملاً مقاوم است(۲۰) و تا زمانی که وارد بدن یک میزبان مناسب شود و موفق به ایجاد دور کامل عفونت گردد، حالت نهفته خود را حفظ کرده و در محیط باقی می ماند. (۲۱) باکتری ها در فرم VBNC قادر به رشد روی محیط های روتین باکتریولوژیک و تشکیل کلنی نمی باشند، اما در عین حال زنده هستند و درجات خفیف فعالیت های متابولیک در آنها دیده می شود. چه باکتری ها در فرم VBNC قادر به ایجاد عفونت کامل در انسان باشند یا نه، این وضعیت فیزیولوژیک اهمیت فراوانی دارد، زیرا باکتری دراین حالت قادر به آغاز مراحل ابتدایی عفونت در میزبان خود است.(۲۲) بر اساس بیانیه اخیر سازمان بهداشت جهانی، مبنی بر اهمیت وجود فرم VBNC باکتری ها در غذا، باید با باکتری در این فرم مانند باکتری ویرولان برخورد کرد. مطالعات صورت گرفته برروی *H.pylori* حاکی از وجود DNA این باکتری در آب رودخانه، آب چاه، فاضلاب و آب زیر زمینی بوده و گمان بر این است که ارگانیسم مزبور قابلیت انتقال از طریق آب به فرم دهانی- مدفوعی را داراست.(۲۳) این باکتری زمانی که با محیط آبی مواجه می شود به فرم کوکوئید فرو می رود که تا ۴۸ ساعت نیز قادر به تولید رونوشت های DNA می باشد و این وضعیت ارتباط مستقیمی با دمای محیط دارد. (۲۴) این تغییرات در لوله های آب در آزمایشگاه ما و توسط سایر محققان مشاهده شده است.(۲۷-۲۵) شناسایی باکتری در وضعیت VBNC توسط روش های معمول از قبیل کشت دشوار می باشد. برای غلبه بر این مشکل، یک سری از روش های مستقل از کشت از قبیل روش های مبتنی بر PCR برای شناسایی *H.pylori* در نمونه های محیطی مورد بررسی قرار گرفته اند. هدف از این پژوهش، شناسایی فرم های کوکوئید هلیکوباکترپیلوری در آب توسط روش PCR با هدف ژنی glmM (UreC) و مقایسه آن با روش کشت در شناسایی این فرم ها می باشد.

روش بررسی:

تهیه سوش هلیکوباکتر پیلور ی استاندارد و روش کشت: سوش استاندارد *H.pylori* به شماره N:oC30 از مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید و در محیط بروسلا بلاد آگار کشت داده شد. پلیت ها در شرایط میکروآئروفیلک با گاز پک به مدت ۷-۵ روز در انکوباتور ۳۷° C انکوبه شدند.

استخراج DNA از سوش استاندارد: DNA از کلنی های حاصل با روش DNG plus با استفاده از کیت DNP استخراج گردید.

بهینه نمودن تست PCR برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری: پرایمرهای مورد استفاده برای آزمون PCR بر پایه ژن glmMکه با استفاده از نرم افزار Primer explorer طراحی شدند در جدول ۱ آمده است. مخلوط PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: DDW:۱۴ میکرولیتر، بافر ۱۰X:۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰mM:) ۰/۷۵:میکرولیتر، dNTP Mix (۱۰mM): ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر Forward (10µM):۱ میکرولیتر، پرایمر Reverse (10µM):۱ میکرولیتر، آنزیم Taq Polymerase (5u/µ): ۰/۳ میکرولیتر، DNA الگو (DNA استخراجی از سوش استاندارد) تهیه گردید. پروفایل حرارتی بهینه شده برای تکثیر ژن هدف شامل:۳۰ ثانیه واسرشتگی در ۹۳ درجه سانتی گراد،۲۰ ثانیه اتصال در ۵۴ درجه سانتی گراد و۲۰ ثانیه مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد می باشد که این روند به تعداد۳۵ سیکل جهت تکثیر انجام شد و محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ حاوی سایبرگرین در باقر TBE 0.5در کنار سایز مارکر ۵۰ جفت بازی فرمنتاس الکتروفورز گردید.

کلونینگ محصول PCR: عمل کلون کردن محصول PCR پس از خالص سازی این محصول با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمنتاس (cat:K1214) و در وکتور pTZ57R این کیت انجام شد. پلاسمیدهای حاصل توسطPlasmid Mini Extraction Kit کمپانی Bioneer استخراج واز آنها جهت تعیین سکانس نوکلئوتیدی و نیز کنترل مثبت قابل اطمینان در تست های PCR استفاده شد.

تعیین حساسیت پرایمرها: جهت تعیین حساسیت، سوسپانسیونی از کشت تازه هلیکوباکترپیلوری تهیه شد و سپس DNA با روش DNG plus از آن استخراج و غلظت و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. DNA استخراجی به روش رقیق سازی از ۱۰۰۰۰۰۰ تا ۱ کپی رقیق شد.

تعیین اختصاصیت پرایمرها: بدین منظور، پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر انواع مختلف DNA های انسانی (Human)، موش (Mouse)، ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis) ، اشرشیا کولی (Escherichia coli)، استرپتوکوکوس پنومونیه(Streptococcus pneumonia) و سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa) بکار گرفته شد و سپس مورد تست PCR قرار گرفتند.

تهیه نمونه: در این مطالعه، جهت القای فرم های کوکوئیدی، تعداد ۳۰ نمونه آب آشامیدنی هرکدام به مقدار ۴۰۰۰ میکرولیتر توسط ۱۰ سویه هلیکوباکترپیلوری (H1-H10) بدست آمده ازنمونه های بالینی به صورت دستی آلوده شدند. مقدار اولیه باکتری تلقیح شده 10^5 cells/ml بود.

Archive of SID

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در PCR

Prime	Sequence (5'…….3')
Forward primer	5' ACGCCCT TTCTTCTCAA G 3'
Reverse primer	5' CGCC TGTTTTAGCG TAAT 3'

سپس این نمونه ها در ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم و در۳ دمای متفاوت ۴ (شرایط سرما) ۲۲ (دمای اتاق) و ۳۷ (انکوباتور) درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از آن، در دو زمان متفاوت از این آب ها نمونه برداری صورت گرفت. اولین نمونه برداری از آبها پس از یک ماه و دومین نمونه برداری در ماه دوم انجام گردید. در هر بار نمونه برداری، نمونه های حاصل کشت داده شدند و نیز جهت تشخیص وجود هلیکوباکترپیلوری در آنها مورد تست PCR قرار گرفتند.

کشت نمونه ها: نمونه آب های آلوده شده در محیط بروسلا بلاد آگار کشت داده شدند و پلیت ها در شرایط میکروآئروفیل با گازپک به مدت ۷-۵ روز در انکوباتور C۳۷° انکوبه شدند و سپس از لحاظ رشد و تشکیل کلنی در محیط بررسی شدند.

استخراج DNA از نمونه ها و انجام تست PCR: استخراج DNA از نمونه ها با روش جوشاندن (Boiling) انجام شد به این صورت که در هر بار نمونه برداری، مقدار µl ۱۴۰۰ ازهر نمونه به طور مجزا به داخل لوله ها منتقل گردید. نمونه ها یک بار spin گشته و سپس در دور rpm ۱۰۰۰۰ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی حاصل، تخلیه گشته و رسوب به وسیله ورتکس درمقدار µl۲۰۰ آب حل گردید. محلول به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از این زمان، لوله ها با دورrpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی حاوی DNA از رسوب جدا شد. در نهایت برای هر۳۰ نمونه، تست PCR با استفاده از پرایمرهای ژن glmM انجام شد. نتایج تست برروی ژل آگارز ۲٪ و سایبرگرین و نور UV توسط دستگاه ترنس ایلومینیتور مورد بررسی قرار گرفت. در پایان، نتایج حاصل از کشت و تست PCR بر روی نمونه ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها:

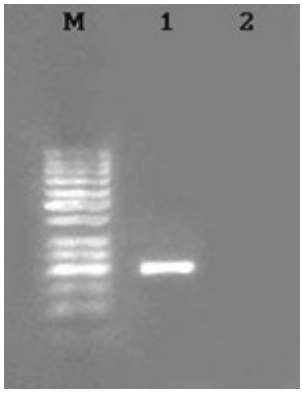
بهینه نمودن تست PCR: نتیجه تست PCR بهینه شده ژن glmM هلیکوباکترپیلوری برروی ژل آگارز ۲٪ به طول bp ۲۰۱ در شکل ۱ قابل مشاهده می باشد.

تعیین حساسیت پرایمرها: در این تست که با استفاده از تهیه رقت های متوالی از DNA هلیکوباکترپیلوری انجام شد، با وجود ۱۰ کپی از DNA تکثیر انجام شدکه این نتایج حساسیت بالای پرایمرهای مورد استفاده را نشان می دهد(شکل ۲).

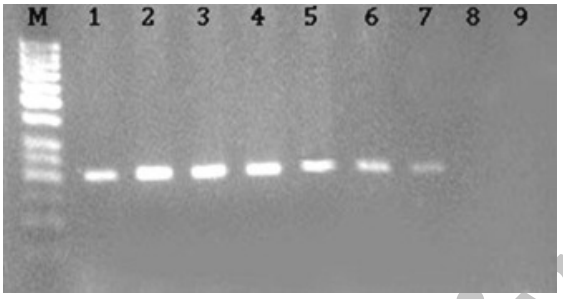
تعیین اختصاصیت پرایمرها: اختصاصیت پرایمرها توسط تست ۱۰۰٪ PCR گزارش شد و همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود این تست در واکنش با DNA سایر گونه های بکارگرفته شده هیچ نوع محصول و باند ناخواسته ای بدست نداده و تنها با DNA هلیکوباکترپیلوری واکنش داده.

نتایج حاصل از کشت و PCR نمونه ها:

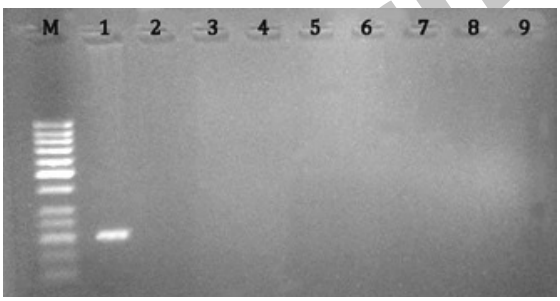
از ۳۰ نمونه آب آلوده کشت داده شده در محیط بروسلا بلاد آگار، تنها ۴ نمونه در محیط کشت رشد داشته و تشکیل کلنی دادند. DNA



شکل ۱: تست PCR بهینه شده ژن glmM هلیکوباکترپیلوری. M: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی فرمنتاس،۱: محصول ۲۰۱ جفت بازی ژن glmM هلیکوباکترپیلوری، ۲: کنترل منفی



شکل ۲: تعیین حساسیت پرایمرها با استفاده ازرقت های متوالی DNA هلیکوباکترپیلوری. M: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی فرمنتاس ،۱: کنترل مثبت، ۲ :۱۰۰۰۰۰عددDNA، ۳ :۱۰۰۰۰۰عددDNA، ۴ :۱۰۰۰۰عددDNA، ۵: ۱۰۰۰عدد DNA، ۶: ۱۰۰عددDNA،۷: ۱۰عددDNA، ۸: ۱عددDNA، ۹: کنترل منفی



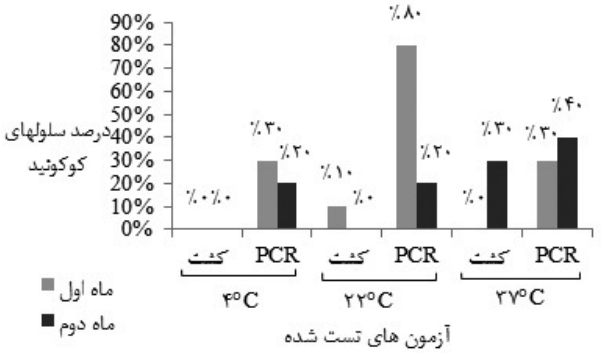
شکل ۳: تعیین اختصاصیت پرایمرها. M: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی فرمنتاس، ۱: کنترل مثبت، ۲: DNAانسان (Human)، ۳: DNAموش (Mouse)، ۴: DNAساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)، ۵: DNAمایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)، ۶: DNA اشرشیا کولی (Escherichia coli)، ۷: DNAاستریتوکوکوس پنومونیه (Streptococcus pneumonia)، ۸: DNA سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa)، ۹: کنترل منفی

Archive of SID

SID.ir

مربوط به ۳۰ نمونه که به روش boiling استخراج شدند، طبق شرایط بهینه شده مورد تست PCR قرار گرفتند که تعداد۲۲ نمونه نتیجه مثبت نشان دادند، بدین صورت که پس از لودکردن نمونه ها برروی ژل آگارز ۲٪ و انجام الکتروفورز، نمونه هایی که دارای ژن glmM هلیکوباکترپیلوری بودند دقیقا مطابق با باند کنترل مثبت مربوط به سویه استاندارد، اندازه ۲۰۱ جفت باز سایز مارکر فرمنتاس را نشان دادند.

با توجه به نمودار ۱، در ماه اول تنها ۱ نمونه در دمای ۲۲°C در محیط کشت دارای رشد بوده و این در حالی است که ۳ نمونه در دمای ۴°C، ۸ نمونه در دمای ۲۲°C و ۳ نمونه در دمای ۳۷°C توسط PCR. دارای جواب های مثبت گشتند. در ماه دوم تنها ۳ نمونه در دمای ۳۷°C در محیط کشت رشد نشان دادند اما در دماهای ۴°C، ۲۲°C و ۳۷°C به ترتیب ۲،۲و۴ نمونه در این ماه توسط PCR دارای جواب های مثبت شدند. این نتایج نشان دهنده دقت و قابلیت بالای روش PCR نسبت به روش کشت در تشخیص سلول های کوکوئیدی می باشد.



نمودار ۱: مقایسه نتایج حاصل از کشت و PCR نمونه های کوکوئید ۳۰ و ۶۰ روزه در دماهای ۴°C، ۲۲°C و ۳۷°C

بحث:

با وجود تفاوت در حساسیت و اختصاصیت تست های تشخیصی جهت شناسایی هلیکوباکترپیلوری، نشان داده شده که حساسیت روش هایی از قبیل کشت میکروبی،تست اوره آز سریع(RUT) ، بافت شناسی و تست های آنتی ژن مدفوعی، زمانی که تعداد باکتری های موجود در نمونه اندک باشند غیرقابل اعتماد می باشند.(۲۸) با این حال، روش کشت روش استانداردی برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری می باشد اما این باکتری یک میکروارگانیسم سخت رشد می باشد و در شرایط محیطی و محیط های آبی به فرم کوکوئیدی تبدیل می شود.(۲۹) حساسیت پایین روش کشت توسط فاکتورهایی نظیر تعداد کم میکروارگانیسم ها و یا از دست رفتن حیات میکروارگانیسم ها در طی انتقال و یا تغییر شکل باکتری به فرم کوکوئیدی قابل بیان می باشد.(۳۰) اشکال کوکوئیدی توسط روش های کشت، RUT و هم چنین بافت شناسی قابل تشخیص نبوده و به همین علّت تست های مولکولی از قبیل PCR جهت شناسایی آنها درنمونه ها، آب ها و سایر منابع زیستی، آزمونی بسیار کارآمد می باشد.(۳۱) زویت[1] و همکاران در سال۱۹۹۳ یک ارزیابی مقایسه ای بین حساسیت روش کشت و PCR برای شناسایی عفونت هلیکوباکترپیلوری در ۳۲ نمونه بیوپسی معده انجام دادند. در این آزمایش ۲۳ نمونه از لحاظ وجودDNA هلیکوباکترپیلوری در آنها توسطPCR مثبت و تنها ۱ نمونه توسط کشت شناسایی شد. درآزمایشی دیگر در ۲۰ نفر از افراد مبتلا به زخم معده، ۱۷ نمونه دارای پاسخ های مثبت کشت و PCR بودند. وی بیان داشت در صورت رساندن به موقع نمونه ها به آزمایشگاه به دلیل عدم تشکیل فرم های کوکوئیدی، حساسیت روش کشت می تواند به اندازه ی PCR باشد در غیر این صورت روش PCR دارای ارزش تشخیصی در شناسایی عفونت می باشد.(۳۲) درآزمایشی که در سال ۱۹۹۹ توسط فابره[2] و همکاران جهت شناسایی هلیکوباکترپیلوری بر روی نمونه ها صورت گرفت، عنوان کردند که تست PCR دارای اختصاصیت و حساسیت بالاتری نسبت به روش های دیگر از جمله کشت می باشد.(۳۳) شقاقی افضلی و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی حضور هلیکوباکترپیلوری در ۱۱۷ نمونه بافت بیوپسی معده به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مراز براساس ژن های ureA و ureC و ۱۶SrRNA و روش کشت و تست اوره آز سریع در بیماران مشکوک به عفونت های ناشی از هلیکوباکترپیلوری پرداختند. در این مطالعه روش PCR مبتنی ژن اوره آز C از حساسیت و اختصاصیت بالایی نسبت به سایر روشها برخوردار بود.(۳۴) شهامت وهمکاران در سال ۲۰۰۴ با تلقیح سلولهای هلیکوباکترپیلوری در آب و انکوباسیون آنها در دما و زمان های متفاوت و کشت آنها در محیط بلاد آگار و شمارش زنده (viable count) مشاهده کردند که ۹۹٪ از سلول های موجود به اشکال کوکوئیدی تغییر یافتند. آن ها سلول های کوکوئیدی و مارپیچی موجود در نمونه ها را توسط PCR با هدف ژنی glmM با حساسیت ۰/۱pg از DNA این باکتری شناسایی کردند.(۲۶و۳۵) هلیکوباکترپیلوری در محیط های آبی به صورت فرم های کوکوئیدی گسترده می باشد. تماس با منابع محیطی بالقوه آلوده از قبیل آب آشامیدنی محلّی، شناکردن در رودخانه و مصرف سبزیجات آلوده به مدفوع نیز به عنوان عوامل خطر برای کسب عفونت *H.pylori* گزارش شده اند.(۱۰) در مطالعه ای که توسط الوندی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی شیوع هلیکوباکترپیلوری در نمونه های آب آشامیدنی در کرمانشاه صورت گرفت، DNA هلیکوباکترپیلوری توسط PCR با هدف ژنی ureC در ۳۵٪ از نمونه های آب شیر و ۸۷٪ از نمونه های آب چاه یافت شد. در این آزمایش تعداد ۶ کپی از DNA شناسایی شد که حساسیتی بیش از آزمایش مارا بدست داده. وی شیوع بالای هلیکوباکترپیلوری درنمونه های آب آشامیدنی را شاهدی قوی از انتقال این باکتری از طریق آب دانست.(۳۶) شیی[3] و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی بیماریزایی و عفونت هلیکوباکترپیلوری تغییر شکل یافته از فرم مارپیچی به کوکوئیدی پرداختند. آنها با تلقیح کوکوئیدهای القا شده در آب شیر استریل به موش های آزمایشگاهی مشاهده کردند که پس از ۲۸ روز تمامی آنها از بین رفتند. آنها با مشاهدات خود توسط میکروسکوپ الکترونی نتیجه گرفتند با این که ویرولانس کوکوئیدهای القایی توسط آب نسبت به اشکال مارپیچی کاهش یافته امّا آن ها هنوز هم دارای فعالیت اوره آز و چسبندگی به سلول های اپی تلیال را دارا می باشند(۳۷). بناسا[4] و همکاران با ارزیابی های کدورت سنجی سلول های هلیکوباکترپیلوری تلقیح شده در محیط مایع مشاهده کردند که توده باکتریایی تا روز پنجم

1. Zwet
2. Fabre
3. She
4. Benaissa

Archive of SID

.ir

به طور تصاعدی افزایش یافته اما از روز هفتم قابل شناسایی نبود. آنها با کشت سلولهای موجود هیچ گونه رشدی در محیط کشت مشاهده نکردند. این شواهد نشان دهنده ی تغییرشکل باکتری ها به اشکال کوکوئیدی بود که قادر به تقسیم تحت شرایط کشت نیستند. آنها عنوان کردند که کوکوئیدهای سه ماهه هنوز قادر به حفظ برخی متابولیسم های خود می باشند که برای حفاظت ساختارهای سلولی نظیر DNA ضروری هستند. آنها توانستند سلول های هلیکوباکترپیلوری را که در محیط کشت قادر به رشد نبودند، را توسط PCR شناسایی کنند.(۳۸) سولامی[1] در سال ۲۰۱۰ روش کشت و PCR را برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری در آب های آشامیدنی استان بصره ی عراق مورد مقایسه قرار داد که از میان ۱۰۰ نمونه با نتایج منفی کشت، تعداد۴ نمونه توسط PCR شناسایی شدند. در آزمایشی دیگر با کشت تعداد ۲۶۶ نمونه از آب های آشامیدنی در محیط کلمبیا آگار اصلاح شده (MCUA) تعداد ۷۸ نمونه با تکیه براوره آز مثبت بودن در این محیط شناسایی شدند. وی اظهار داشت ترکیبی از نتایج PCR با کشت در نمونه های آب می تواند تصویر دقیق تری از شناسایی هلیکوباکترپیلوری را ارائه دهد.(۳۹)

حساسیت تست PCR در مطالعه حاضر برابر با ۱۰ ملکول DNA بود که به این ترتیب کمترین میزان میکروارگانیسم با کمک این تست قابل شناسایی بودند. در این بررسی از ۳۰ نمونه آب آلوده شده توسط سویه های هلیکوباکترپیلوری ۱۴ نمونه در ماه اول و ۸ نمونه در ماه دوم با روش PCR با هدف ژنی glmM از لحاظ وجود DNA هلیکوباکترپیلوری در آنها شناسایی شدند در حالی که از این تعداد تنها ۱ نمونه در ماه اول و ۳ نمونه در ماه دوم توسط روش کشت دارای نتایج مثبت بودند. در این مطالعه ۳ مورد از نمونه ها با نتیجه منفی در کشت ماه اول در دمای ۳۷°C دارای نتیجه مثبت در کشت ماه دوم بودند که این به علت تغییرات مورفولوژیکی و انکوباسیون در دمای بهینه رشد باکتری می باشد که باعث شده به فرم قابل کشت مبدل شده و قادر به تشکیل کلنی در محیط گردد. هم چنین در این دما میزان نمونه های شناسایی شده درماه دوم بیش از ماه اول با روش PCR بوده که نشان می دهد هلیکوباکترپیلوری در دمای ۳۷°C میزان بالایی از رشد را داراست. در دمای محیط (Room temperature) که ۲۲°C می باشد، در ماه های اول و دوم به ترتیب تعداد ۸ و ۲ نمونه توسط PCR تشخیص داده شد که ماه اول دارای بیشترین تعداد سلول شناسایی شده توسط PCR را داراست و این نشان می دهد که سلول ها در دمای محیط دارای قابلیت ماندگاری بالایی در مدت زمان کوتاهی را در شکل کوکوئید دارا می باشند و با توجه به این که تنها ۱ نمونه در ماه اول دارای رشد برروی محیط کشت بود می توان گفت در این دما با کاهش دمای بهینه ی رشد، متابولیسم سلول های باکتری نیز کاهش یافته و سلول ها به تدریج به فاز مرگ پیش رفته و از تعداد آنها در ماه دوم کاسته شده. با بررسی میزان رشد و بقاء در دمای ۴°C هیچ نتیجه مثبتی از کشت باکتری ها مشاهده نشد اما ۳ نمونه در ماه اول و ۲ نمونه در ماه دوم توسط PCR شناسایی شدند که این نتایج با توجه به توقف رشد و متابولیسم میکروارگانیسم ها در دمای ۴°C و کمترین میزان PCR نسبت به دو دمای دیگر قابل بیان است.

1. Sulami

نتیجه گیری:

با توجه به این که منفی شدن نتیجه کشت هلیکوباکترپیلوری به معنی عدم آلودگی با هلیکوباکترپیلوری نیست و نیز تغییر مورفولوژیک این باکتری به فرم های کوکوئید در آب که یکی ازاصلی ترین مشکلات در راه شناسایی این باکتری محسوب می گردد و از سویی با در نظر گرفتن نواقص روش‌های کشت در تشخیص فرم های کوکوئید، بنابراین می توان از تست PCR به عنوان یک روش مناسب و قابل اعتماد و با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص ژن اوره آز C در آب های آشامیدنی و فاضلاب های شهری که منابع بالقوه آلودگی محسوب می گردند استفاده کرد. در این مطالعه آزمون PCR با تعداد جواب مثبت قطعی بیشتر نسبت به روش کشت، حساسیتی بیش از کشت را نشان داده است.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از کمک های موسسه ایرانیان ژن فناور (IGF) و پرسنل آن به ویژه مشاوره ی خانم دکتر الهام مسلمی و هم چنین آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله و مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی در این زمینه، قدردانی می شود.

REFERENCES

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-75.
2. Bunn JE, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. Detection of Helicobacter pylori DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett Appl Microbiol* 2002;34:450-4.
3. Janzon A, Sjoling A, Lothigius A, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm AM. Failure to detect Helicobacter pylori DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh,using highly sensitive real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3039-44.
4. Hegarty JP, Dowd M, Baker KH. Occurrence of Helicobacter pylori in surface water in the United States. *Appl Microbiol* 1999;87:697-701.
5. Azevedo NF, Pinto AR, Reis NM, Vieira MJ, Keevil CW. Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water-stressed Helicobacter pylori to stainless steel 304 and polypropylene. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2936-41.
6. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996;110: 1031-35.
7. Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y. Helicobacter pylori DNA in drinking water in Japan. *Microbiol Immunol* 2001;45:515-9.
8. Johnson CH, Rice EW, Reasoner DJ. Inactivation of Helicobacter pylori by chlorination. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4969-70.

Archive of SID

SID.ir

9. Cellini L, Di Campli E, Grande R, Di Bartolomeo S, Prenna M, Pasquantonio MS, Pane L. Detection of Helicobacter pylori associated with zooplankton. *Aquat Microb Ecol* 2005;40:115-20.
10. Fujimura S, Kato S, Kawamura T. Helicobacter pylori in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. *Lett Appl Microbiol* 2004;38: 517-21.
11. Queralt N, Bartolome R, Araujo R. Detection of Helicobacter pylori DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *Appl Microbiol* 2005;98:889-95.
12. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb A, Ahi JD, et al. Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of Helicobacter pylori: a South Indian perspective. *Singapore Med J* 2007;48:543-9.
13. Sen K, Schable NA, Lye DJ. Development of an internal control for evaluation and standardization of a quantitative PCR assay for detection of Helicobacter pylori in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 2007;73: 7380-7.
14. Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y, Calva JJ. Helicobacter pylori in water systems for human use in Mexico City. *Water Sci Technol* 2001;43:93-8.
15. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. *J Clin Pathol* 2004;57:37-42.
16. Mikaeli J, Malekzadeh R, Ziad-Alizadeh B, Nasseri-Mogaddam S, Valizadeh M, Khoncheh R, et al. Prevalence of Helicobacter pylori in two Iranian provinces with high and low incidence of gastric carcinoma. *Arch Iranian Med* 2000;3:6-9.
17. Fakheri H, Malekzadeh R, Merat S, Khatibian M, Fazel A, Alizadeh BZ, et al. Clarithromycin vs. furazolidone in quadruple therapy regimens for the treatment of Helicobacter pylori in a population with a high metronidazole resistance rate. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:411-6.
18. Zendehdel N, Nasseri-Moghaddam S, Malekzadeh R, Massarrat S, Sotoudeh M, Siavoshi F. Helicobacter pylori reinfection rate 3 years after successful eradication. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:401-4.
19. Ozcakir O, Akyon Y. Hypermutation and treatment of Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2006;11:304.
20. Hua J, Ho B. Is the coccoid form of Helicobacter pylori viable? *Microbios* 1996;87:103-12.
21. Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the and cytoskeleton. *EMBO J* 1999;18: 578-85.
22. Cellini L, Allocati D, Angelucci T, Iezzi E, Campli Di, Marzio L, et al. Coccoid Helicobacter pylori not culturable in vitro reverts in mice. *Microbiol Immunol* 1994;38:843-50.
23. Percival S, Thomas J. Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms. *J Water Health* 2009;7:469-77.
24. Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L, Battistelli M, Falcieri E, Baffone W. Morphological changes and outer membrane protein patterns in Helicobacter pylori during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol* 2004;27:353-60.
25. Mai UEH, Shahamat M, Colwell RR. Survival of Helicobacter pylori in the environment in a dormant but viable stage. *Rev Esp Enferm Dig* 1990;78 Suppl 1:17.
26. Shahamat M, Mai U, Paszko-Kolva C, Kessel M, Colwell RR. Use of autoradiography to assess viability of Helicobacter pylori in water. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1231-5.
27. Velazquez M, Feirtag JM. Helicobacter pylori: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Int J Food Microbiol* 1999;53:95-104.
28. Vaira D, Holton J, Menegatti M, Landi F, Ricci C, Ali' A, et al. Blood tests in the management of Helicobacter pylori infection. *Gut* 1998;43 Suppl 1: 39-46.
29. Khanolkar-Gaitone S, Reubish G, Lee C, Stadtländer CT. Isolation of bacteria other than Helicobacter pylori from stomachs of squirrel monkeys (Saimiri spp) with gastritis. *Dig Dis Sci* 2000;45:272-80.
30. Goldstein NS. Chronic inavtive gastritis and coccoid Helicobacter pylori in patient treated for gastroesophageal reflux disease orwith H.pylori eradication therapy. *Am J Clin Pathol* 2002;118:719-26.
31. Shahosseiny M, Tehrani M. Polymerase Chain Reaction (PCR). 1nd ed. Iran: Islamic Azad University publishers; 2005.
32. Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA. Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of Helicobacter pylori from antral biopsy samples. *J Clin Microbiol* 1993;31: 1918-20.
33. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, et al. Polymerase chain reaction assay for the detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut* 1994;35:905-8.
34. Sheghaghi B, Dorani S, Behzadiyan nejad GH. H.pylori Molecular diagnosis in biopsy specimens of patients suspected to have H.pylori infection. 4th Congress of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University 2001; 84246.
35. Shahamat M, Alavi M, Watts J, Gonzalez J, Sowers K, Maeder D,et al. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of Helicobacter pylori. *J Clin Microbiol* 2004;42:3613-9.
36. Alvandi AH, Abiri R, Aryan E, Rezaei M, Bagherabadi S. High frequency of Helicobacter pylori DNA in drinking water in Kermanshah, Iran, during June–November 2012. *Water and Health* 2013;10:2150-56.(In Press)
37. She FF, Lin JY, Liu JY, Huang C, Su DH. Virulence of waterinduced coccoid Helicobacter pylori and its experimental infection in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:516-20.
38. Benaissa M, Babin P, Quellard N, Pezennec L, Cenatiempo Y, Fauchere JL. Changes in Helicobacter pylori ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun* 1996;64: 2331-5.
39. Al-Sulami AA, Al-Taee AM, Juma'a MG. Isolation and identification of Helicobacter pylori from drinking water in Basra governorate, Iraq. *East Mediterr Health J* 2010;16: 920-5.

Archive of SID