

تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری در نمونه مدفوع به وسیله آزمایش PCR-ELISA روی ژن *ureC*

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

پذیرش مقاله: ۸۹/۱۰/۰۱

دریافت مقاله: ۸۷/۰۸/۰۶

چکیده

هدف: هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت‌های مزمن در انسان و قادر به ایجاد عفونت‌های بسیاری از قبیل 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 به عنوان آزمون ترجیحی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری از نمونه‌های مدفوع و بیوپسی به کار می‌رود.

مواد و روش‌ها: ۶۷ نمونه مدفوع از ۱۲۷ بیماری که براساس علائم 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 *ureC* هلیکوباکتر پیلوری انجام شد. سپس آزمون PCR-ELISA نیز انجام و نتایج مقایسه شد.

نتایج: در آزمایش PCR بین ۶۷ نمونه مدفوع و بیوپسی به ترتیب ۳۱ (۴۶/۱ درصد) و ۳۴ (۵۰/۷ درصد) نمونه دارای نتایج مثبت و مابقی منفی بود. همچنین در آزمایش PCR-ELISA از بین ۶۷ نمونه مدفوع و بیوپسی به ترتیب ۴۲ (۶۲/۶ درصد) و ۴۷ (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 به عنوان آزمون اولیه در شناسایی این ارگانیزم به کار رود.

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

۱- مقدمه

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

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن در انسان بوده و در کشورهای در حال توسعه و توسعه‌یافته به ترتیب در مجرای گوارش ۹۰ و

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوتکنولوژی، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶

و بیوپسی معده بود. به‌علاوه این روش به‌عنوان یک ابزار تشخیصی در موارد بالینی ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- کنترل مثبت

سه جدایه مختلف هلیکوباکتر پیلوری حاصل از مطالعه اولیه در محیط بروسلا آگار (Brucella Agar) تحت شرایط میکروایرووفیلیک (Microaerophilic) در دمای ۳۷ درجه برای ۶ روز کشت شده و پس از تأیید توسط رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی (گرم منفی - اوره‌آز، اکسیداز و کاتالاز مثبت) از DNA استخراج شده آن‌ها به‌عنوان کنترل مثبت در تمام مراحل مطالعه استفاده شد.

۲-۲- سویه‌های باکتری

۱۴ جدایه بالینی مختلف از نمونه‌های بالینی شامل ادرار، مدفوع، CSF (Cerebral Spinal Fluid) و خون در آزمایشگاه میکروپزشناسی بیمارستان طالقانی تهران کشت شد. DNAی این ۱۴ سویه - شامل کلبسیلا (*Klebsiella*), پروتئوس و لگاریس (*Proteus vulgaris*), ویبرو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*), اشیریشیا کولی (*Escherichia coli*), سالمونلا تیفی (*Salmonella typhi*), سراشیا (*Serratia*), استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) - سودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*), آگروباکتریوم (*Agrobacterium*), انتروباکتر (*Enterobacter*), شنیگلا 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.

آزمون تشخیصی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در دسترس است. روش‌های تهاجمی مانند کشت، بافت‌شناسی، آزمون اوره‌آز سریع (Rapid Urease Test: RUT) و روش مولکولی نیازمند جمع‌آوری بیوپسی است [۴]. در روش‌های غیرتهاجمی از ایمنواسی (Immunassay)، آزمون تنفسی اوره‌آز (Urease Breath Test: UBT) و نمونه مدفوع استفاده می‌شود [۵، ۶]. 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 [۷-۹].

بین روش‌های مولکولی روش PCR رایج‌تر بوده و برای تکثیر DNAی هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع به‌کار می‌رود. در یک مطالعه، این ارگانیزم در ۹۰ درصد افراد آلوده شناسایی شد [۱۰]. ولی سایر مطالعات کمتر به چنین سطحی از ایزولاسیون باکتری دست یافته‌اند [۱۱]. این کاهش حساسیت مربوط به وجود عوامل بازدارنده در مدفوع است [۱۲] که می‌بایست پیش از انجام PCR حذف شود [۱۳]. 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 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) آزمون 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 کمی حاصل می‌شود. هدف از این مطالعه ابداع یک آزمون PCR-ELISA اختصاصی و حساس برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های مدفوع

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 ۹۴ درجه قرار گرفته و هر ۵ دقیقه به شدت ورتکس (Vortex) شدند. مایع رویی (Supernatant) جمع‌آوری شده و به عنوان DNA ی الگو به کار گرفته شد.

۲-۴- 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 برات [محیط آزمون Clostridium (Campylobacter-Like Organism) CLO] منتقل شده و در دمای اتاق انکوبه شد. نتایج آزمون ۴ ساعت بعد از انکوباسیون ثبت شد. برای تشخیص ریخت‌شناسی (Morphology) تیبیک، مقاطع بافتی پارافینه با گیمسا (Giemsa) رنگ‌آمیزی شد.

۲-۶- 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. به طور خلاصه ۱۰۰ میکرولیتر بافر پروتاز و ۵ میکرولیتر آنزیم پروتاز به هر ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم بافت معده افزوده و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در ۵۵ درجه انکوبه شد. سپس ۴۰۰ 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 ۶۵ درجه قرار گرفته و در ۵۰ میلی‌لیتر بافر حلال توسط ۵ دقیقه تکان دادن آرام در ۶۵ 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. به طور خلاصه حدود ۱۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم نمونه مدفوع در ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز و ۲۰ میکرولیتر پروتیناز K حل شده و پس از ورتکس ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در پی ۵ دقیقه سانتریفوژ، مایع رویی به ۴۰۰ میکرولیتر بافر اتصالی افزوده و ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل اضافه و ورتکس شد. سوسپانسیون به دست 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 به دست آمده تا زمان آزمودن در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

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

آغازگرها و پروب‌های الیگونوکلوئوتیدی طبق مدل ۳۹۴ سنتز DNA/RNA ساخته شد. آغازگرهای ۹۳۲۷۵ با ترادف:

3'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-5'

و ۹۳۲۷۶ با ترادف:

3'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-5' که قبلاً

برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری به کار گرفته شده است [۱۴]، با هدف‌گیری توالی ژن ureC (به ترتیب به شماره بانک ژنی EMBL X57132 و M60398) یک قطعه DNA با وزن ۲۹۴ جفت‌بازی را تکثیر می‌کند. پروب مورد استفاده

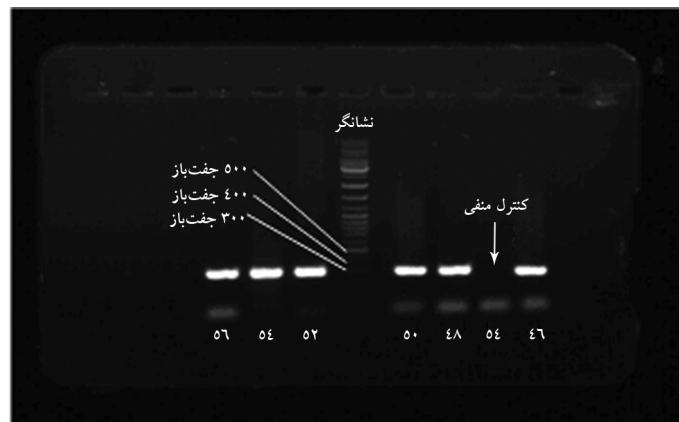
تریس - HCl (pH=۸/۳)، ۵۰۰ میلی‌مولار KCl، ۱۵ میلی‌مولار MgCl₂ و ۰/۰۱ درصد (وزنی به حجمی) ژلاتین) با یک قطره روغن معدنی (Sigma) پوشانده شد و ۱۰ میکرولیتر از نمونه آزمایش به آن افزوده شد. مخلوط واکنش برای ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه و اسرشته و روی یخ سرد شد. سپس ۲/۵ واحد از آنزیم Taq پلیمرز (Boehringer) قبل از تکثیر افزوده شد. مراحل تکثیر PCR شامل ۳۰ ثانیه و اسرشته‌گی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال در ۵۴ درجه سانتی‌گراد (حرارت بهینه - شکل ۱) و ۱ دقیقه مرحله طول‌سازی 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 طول‌سازی 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).

۵'-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 DNA

تکثیر شده

واکنش‌ها در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده ترموسایکلر اپندورف (Thermocycler Eppendorf) انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۲ میکرومول از هر داکسی نوکلئوتید تری فسفات، و ۰/۰۱ میکرومول از داکسی اوراسیل تری فسفات نشان‌دار با دیگوکسی‌ژنین (Boehringer manheim (DIG-dUTP) (Digoxigenin: DIG) (GmbH, Mannheim, Germany) و بافر واکنش (۱۰۰ میلی‌مولار



شکل ۱ محصول واکنش PCR روی نمونه DNA هلیکوباکتر پیلوری در شیب دمایی ۴۶ الی ۵۶ درجه سانتی‌گراد

۲-۹- آزمون هیبریداسیون بافر

۱۰ میکرولیتر از هر مخلوط ۱ به ۵ رقیق شده PCR به ۲۰ میکرولیتر محلول و اسرشته‌گی (NaOH) ۰/۲۵ میلی‌مولار) افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. ۱۵ میکرولیتر از محصول و اسرشته 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 به مدت 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) -

متوقف شده و جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موج ۴۰۵ نانومتر سنجیده شد. یک مخلوط PCR خالی (حاوی آب به جای DNA) در ۶ لوله در هر بار سنجش، به عنوان 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.

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)، به هر چاهک افزوده شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد NaOH به هر چاهک

جدول ۱ OD به دست آمده از واکنش PCR-ELISA روی ۱۴ گونه باکتریایی و هلیکوباکتر پیلوری

هلیکوباکتر پیلوری	استرپتوکوکوس ویریدانس	شیگلا	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس	ویبریو	سالمونلا	کلیبسیلا	استافیلوکوکوس اورئوس	پروتئوس وگاریس	آگروباکتریوم	انتروباکتر	سراتیا	اشریشیاکلی	پروتئوس میرابلیس	سودوموناس	نمونه DNA	OD
حداقل	۰/۱۹	۰/۱۶	۰/۲۴	۰/۲۰	۰/۳۱	۰/۲۴	۰/۱۴	۰/۲۷	۰/۲۵	۰/۲۶	۰/۱۸	۰/۲۸	۰/۲۳	۰/۳۳		
۱/۹۲																

PCR، ۱۰۰ برابر حساس‌تر از تشخیص با ژل است. ویژگی‌های آزمون‌ها با استفاده از ۱۱ جدایه بالینی هلیکوباکتر پیلوری و همچنین ۱۴ سویه باکتری از جنس‌های بسیار نزدیک و گونه‌های اوره‌آز مثبت که معمولاً می‌تواند به عنوان 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).

۲-۳- آزمون‌های تشخیصی

در میان ۱۲۴ نمونه بیوپسی معده، آزمون RUT برای ۸۱ بیمار (۶۵/۳ درصد) مثبت شد، در صورتی که ۸۵ بیمار (۶۸/۵ درصد) و ۹۱ بیمار (۷۳/۳ درصد) به ترتیب در آزمون‌های PCR و PCR-ELISA نتایج مثبت نشان دادند. هیچ‌یک از بیماران دارای نتایج منفی PCR-ELISA نتایج مثبت PCR نداشتند، و به جز یک مورد که در آن آزمون اوره‌آز

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 ۱۰ تا ۱ از DNA تکثیر شده در واکنشی برآورد شد که در آن ۱۰ پیکوگرم از DNA هلیکوباکتر پیلوری به عنوان 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

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
۶	-	-	+
۵	-	+	+
۸۰	+	+	+
۱	+	-	-
۳۵	-	-	-
مجموع	۸۱ (۶۳/۷ درصد)	۸۵ (۶۶/۹ درصد)	۹۱ (۷۱/۶ درصد)

۴۲ (۶۲/۶ درصد)، و ۴۷ (۷۰/۱ درصد) نتیجه مثبت به دست 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 ۳).

آزمون‌های PCR و PCR-ELISA در مورد ۶۷ بیمار که نمونه مدفوع داده بودند، انجام شد. نتایج برای ۳۱ نمونه (۴۶/۲ درصد) و ۳۴ نمونه (۵۰/۷ درصد) مثبت بود، در صورتی که برای آزمون‌های اوره‌آز، PCR و PCR-ELISA در نمونه‌های بیوپسی مربوط به ترتیب ۴۰ (۹۵/۷ درصد)،

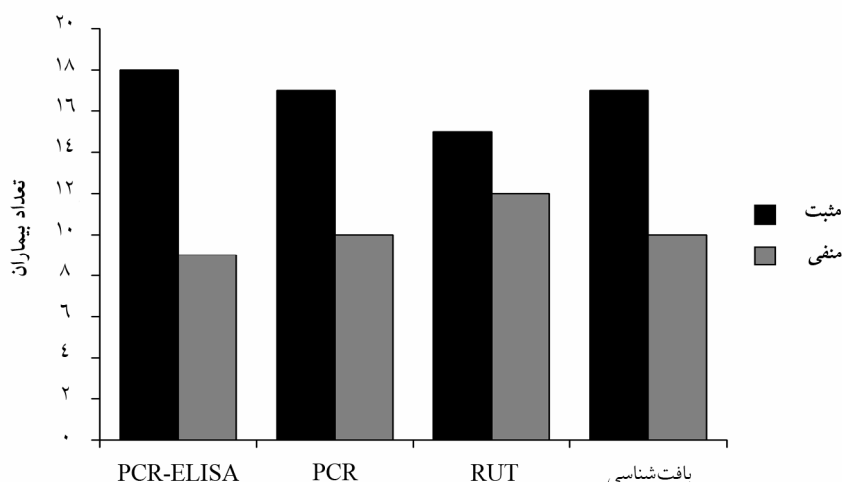
جدول ۳ مقایسه تطبیقی نتایج آزمون‌ها در ۶۷ بیمار دارای هر دو نمونه بیوپسی معده و مدفوع

تعداد بیماران	RUT		PCR		PCR-ELISA	
	بیوپسی	مدفوع	بیوپسی	مدفوع	بیوپسی	مدفوع
۵	-	-	-	-	+	-
۲	-	+	+	-	+	-
۶	+	+	+	-	+	-
۳	+	+	+	-	+	+
۳۱	+	+	+	+	+	+
۲۰	-	-	-	-	-	-
مجموع (درصد)	۴۰	۴۲	۴۲	۳۱	۴۷	۳۴

(نمودار ۱).

DNA ی ۱۷ نمونه بیوپسی که در محیط RUT برآش جمع‌آوری شده بود، استخراج و آزمون‌های PCR و PCR-ELISA انجام شد که در مقایسه با نمونه جمع‌آوری شده در سالیین (Saline) نتایج یکسانی برای آزمون‌ها در همان بیماران به دست داد (۱۰ مورد مثبت برای PCR و ۱۱ مورد مثبت برای PCR-ELISA).

در رنگ‌آمیزی گیمسا ارگانسیم‌های هلیکوباکتر پیلوری در ۱۷ بیمار از ۲۷ نفر (۶۲/۹) تشخیص داده شد که با نتایج PCR همخوانی داشت. نتایج مشابهی نیز از PCR-ELISA به دست آمد، به استثنای این که تنها آزمون مثبت در یک نمونه بود. علائم بالینی و سوابق قبلی بیماری در این مورد خاص وجود عفونت باکتریایی را تأیید می‌کرد. دو مورد از ۱۷ بیمار با PCR مثبت به همراه ۱۰ بیمار دیگر، دارای نتایج منفی RUT بودند.



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

بیماران مبتلا به عفونت شناسایی شد [۱۰]، اما سایرین نتایجی بین ۳۰-۶۰ درصد گزارش کرده‌اند [۱۶، 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 ۱۴ 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 علائم بالینی و حساسیت بافت‌شناسی (بین ۷۲ تا ۸۵ درصد) به‌عنوان بیمار تلقی شد. بدین ترتیب حساسیت

۴- 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 ارگانیزم 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 ارگانیزم 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

تشخیص نیست. از نتایج به دست 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-ELISA بیوپسی معده نمی‌تواند به صورت کامل جایگزین این آزمون‌ها شود. از این رو 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 به عنوان 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.

به کارگیری میکروپلیت علاوه دستیابی به نتایج کمی به جای 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.

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 سالیان 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 به ترتیب 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]. به علاوه مدفوع حاوی مولکول‌های پلی‌ساکاریدی کمپلکس است که از واکنش PCR ممانعت می‌کند [۲۲] و DNA نیز به سختی 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

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):

- 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] Widjoatmodjo 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 *cagA* 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

- BG. Detection and typing of *Helicobacter pylori* *cagA/vacA* 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 cagA* 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 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, Rehcinski 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, Bonnemaïson 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.