Original Article

مقایسه دو روش PCR و تست اوره‌آز سریع در شناسایی *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه بافت بیوپسی معده

پرستو چمن رخ[1*]، محمدحسن شاه حسینی[2,3]، مهناز مظاهری اسدی[4]، طاهر نژاد ستاری[1]، داوود اسماعیلی[5]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- موسسه ایرانیان ژن فناور(IGF)، تهران، ایران.
۴- گروه بیوتکنولوژی محیط زیست، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
۵- گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه بقیه الله، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: *هلیکوباکترپیلوری* به عنوان یک عامل عمده خطـر در زخم‌های معده و دوازدهه و سرطان معده شناخته شده است. به علل مختلف، آزمایش‌هایی همانند کشت، کاملاً رضایت‌بخش نمی‌باشد. هدف از این مطالعه، مقایسه تست اوره‌آز (RUT) با روش PCR در شناسایی *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه‌های بافت بیوپسی معده می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سوش استاندارد *H.pylori* (N:oC30) تهیه گردید. در تست PCR از پرایمرهـای ژن glmM (ureC) استفـاده گردید. تست PCR به وسیلـه روش‌هـای حساسیت و ویژگی اپتیمایز گردید. سپس تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی مرضی متشکل از بافت بیوپسی معده تهیه گردید. تست اوره آز سریع بر روی تمامی نمونه‌های جمع آوری شده انجام گردید. از تمامی نمونه‌ها، به روش DNG استخراج DNA صورت گرفت. سپس نمونه‌ها توسط آزمون PCR بررسی گردیدند.

نتایج: در تست اپتیمایز شده PCR، محصول ۲۹۴ bp تکثیر گردید. حساسیت تست PCR، CFU ۱۰ به دست آمد. در آزمون ویژگی با نمونه‌های DNAی غیر از هلیکوباکتر پیلوری، هیچ محصول ناخواسته‌ای مشاهده نگردید. از ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده، ۶۴٪ از نمونه‌ها توسط تست اوره‌آز سریع و ۷۶٪ توسط تست PCR، مثبت گزارش گردیدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه آزمون PCR درتشخیص *هلیکوباکترپیلوری* در نمونه بافت بیوپسی دارای دقت، حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به تست اوره آز سریع می‌باشد، بنابراین از این روش می‌توان به منظور شناسایی *H.pylori* استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ***هلیکوباکترپیلوری*، ژن glmM ،PCR، تست اوره آز سریع.**

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری H.pylori(Helicobacter pylori)، باسیل گرم منفی و میکروآئروفیلی است که در مخاط معده اغلب به صورت مارپیچی (۱) و در محیط کشت به صورت خمیده دیده می‌شود (۲). این باکتری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی، سرطان معده و لنفوم می‌باشد (۳). همچنین عفونت با *هلیکوباکتر پیلوری* در ارتباط با بیماری‌های غیرگوارشی نظیر بیماری‌های عروق مغزی و عروق کرونر قلب، فشارخون بالا، سردردهای میگرنی، کهیر مزمن، استفراغ دوران بارداری و غیره گزارش شده است (۴). شناسایی به موقع و صحیح این عامل باکتریایی کمک زیادی به درمان به موقع و زودهنگام آن می‌نماید. روش‌های تشخیص این باکتری عبارتند از: الف- روش‌های تهاجمی (نیازمند نمونه گیری از بافت معده): مانند بررسی بافت شناسی، کشت باکتری، آزمون اوره آز سریع (RUT: Rapid Urease Test) و روش‌های مولکولی مانند PCR. این روش‌ها بر روی بیوپسی بدست آمده از اندوسکوپی معده بوده و بدلیل اینکه به طور مستقیم به دنبال شواهدی برای تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند، از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردارند و به عنوان روش مرجع (gold standard) جهت تشخیص آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* به کار می‌روند. ب- روش‌های غیرتهاجمی مانند: تست اوره‌آز تنفسی (Breath Urease Test)UBT و تست آنتی‌ژن مدفوعی (Stool Antigen) و تست‌های سرولوژیک می‌باشند (۴، ۵). در میان روش‌های غیر تهاجمی، تست‌های سرولوژیک برای تشخیص *هلیکوباکترپیلوری* پیشنهاد شده‌اند که کم هزینه و سریع بوده و به عنوان تست‌های غربالگری اولیه شناخته می‌شوند، با این وجود ارزش تشخیصی نسبتاً پایین آزمون‌های سرولوژیک برای ارزیابی عفونت فعال باعث شده که با روش‌های دیگر جایگزین شوند. به علاوه نتایج سرولوژی مثبت لزوماً بیانگر وجود عفونت نیست، بنابراین پس از ریشه‌کنی عفونت نمی‌توان از این روش استفاده کرد (۴،۵). آزمون UBT نیز فرآیندی وقت‌گیر بوده و نیازمند تجهیزات گران‌قیمت است و همچنین به دلیل حضور دیگر باکتری‌های اوره‌آز مثبت در درون حفره دهان و معده باعث به وجود آمدن نتایج مثبت کاذب می‌گردد (۶). در میان روش‌های تهاجمی، تلاش‌های متعددی برای کشت *هلیکوباکتر پیلوری* انجام شده اما جداسازی باکتری به علت دشواری کشت، وقت‌گیر بودن و وجود

* **نویسنده مسئول: پرستو چمن رخ**، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۳۷۲۷۲۷۶۷۹
Email: p.chamanrokh@gmail.com

مشکلات تکنیکی، تنها در موارد معدودی موفقیت آمیز بوده است (۷، ۸). برای غلبه بر این مشکلات، روش‌های مختلفی غیر از کشت، برای شناسایی *H.pylori* در نمونه‌های بالینی مورد تست قرار گرفته است (۹، ۱۰). روش آسیب‌شناسی، بسیار حساس و اختصاصی است ولی گاهی وجود برخی ضایعات متاپلازی یا آتروفی شده سیستم گوارش، مصرف داروهای مهارکننده پمپ پروتون یا بیسموت، طولانی بودن زمان تشخیص و هزینه بالا، کاربرد این روش تشخیصی را محدود می‌کند (۱۱). آزمون اوره‌آز سریع (RUT)، بر اساس فعالیت آنزیم اوره‌آز *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه بیوپسی است که سوبسترای اوره را در حضور یک معرف رنگی نظیر فنل رد (phenol red) به آمونیاک و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌نماید. با افزایش pH توسط آمونیاک و در نتیجه تغییر رنگ معرف، وجود *هلیکوباکتر پیلوری* تشخیص داده می‌شود. این روش در مقایسه با دیگر روش‌های دیگر همچون کشت و بررسی بافت، سریع‌تر و ارزان‌تر قابل انجام می‌باشد ولی حساسیت این تست بستگی به تراکم ارگانیسم دارد، به این معنی که هنگامی‌که ارگانیسم‌ها فراوان‌اند، دارای حساسیت بالا و در زمان کم بودن تعداد ارگانیسم حساسیت تا ۳۰ درصد کاهش می‌یابد. بنابراین، این تست در زمان درمان سودمند نیست و تا ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیوپسی قابل تغییر است (۱۲،۱۳). علاوه بر روش‌های یاد شده، روش‌ها بر مبنای تکثیر در شرایط in-vitro مانند PCR است که نسبت به بقیه روش‌ها از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است و مستقیماً بر روی نمونه‌های بیوپسی به کار برده می‌شود. PCR به دلیل پیچیدگی نسبت به سایر روش‌ها از قبیل کشت، RUT و سرولوژی، اغلب در مواردی که نمونه آلودگی شدید به فلورنرمال دارد یا تعداد باکتری بسیار کم است، مزیت فراوانی داشته و حساسیت بسیار بالایی را به دست می‌دهد و به همین علت مورد توجه قرار گرفته است (۱۴). مطالعات متعددی در سراسر دنیا جهت بررسی ارزش تشخیصی این تست صورت گرفته است. هرچند این مطالعات از نظر نتایج حاصله تا حدودی متفاوت می‌باشند ولی در مجموع به نظر می‌رسد که بخش بزرگی از مطالعات عموما این آزمایش را به عنوان یک روش مناسب تشخیصی قابل قبول می‌دانند (۱۵-۱۷).

ژن‌های هدف جهت تشخیص مولکولی در این عامل عموماً 16S rRNA و سکانسهای تصادفی کروموزوم و antigen gene (SSA) gene the 26-kDa specific-species و the urease A (ureA) gene و the urease C (ureC) gene یا نام جدید آن the phosphosamine mutase gene (glmM) را هدف قرار می‌دهند (۱۸، ۱۹). هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تست PCR با هدف ژنی glmM نسبت به تست RUT در تشخیص سریع عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در نمونه‌های بیوپسی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان بقیه الله و بیمارستان بوعلی دانشگاه آزاد اسلامی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه سوش *هلیکوباکتر پیلوری* استاندارد و روش کشت: سوش استاندارد *H.pylori* به شماره N:oC30 از مرکز تحقیقات بیماری‌های کبد و گوارش علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید و در محیط بروسلا بلاد آگار غنی شده کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط میکرو آئروفیلک با گاز پک به مدت ۷-۵ روز در انکوباتور ۳۷ °C انکوبه شدند (۲۰).

استخراج DNA از سوش استاندارد: از کلنی‌های حاصل، DNA با روش DNG Plus با استفاده از کیت DNP (Sinaclon) استخراج گردید.

بهینه نمودن تست PCR برای تشخیص *هلیکوباکترپیلوری*: پرایمرهای مورد استفاده جهت آزمون PCR بر پایه ژن glmM، درجدول ۱ آمده‌اند (۱۹،۲۱). مخلوط PCR به ترتیب زیر تهیه گردید: DDW: ۱۴ میکرولیتر، بافر 10X: ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰mM): ۰/۷۵ میکرولیتر، dNTP Mix (۱۰mM): ۰/۵میکرولیتر، پرایمر (۱۰µM) Forward: ۱میکرولیتر، پرایمر (۱۰µM) Reverse: ۱ میکرولیتر، آنزیم Taq Polymerase (۵u/µL) : ۰/۳ میکرولیتر، DNA الگو (DNA استخراجی از سوش استاندارد): ۵ میکرولیتر و حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌باشد. همچنین پروفایل دمایی جهت تکثیر ژن glm M به صورت زیر بهینه گردید: دمای واسرشت شدن: ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای چسبیدن: ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل شدن: ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و به منظور حصول نتیجه بهتر، طویل شدن نهایی را به مدت ۵ دقیقه در همین دما ادامه یافت و این روند به تعداد ۳۵ سیکل انجام گردید. تست PCR در شرایط بهینه شده انجام گرفت و محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ حاوی سایبر گرین در بافر TBE 0.5X الکتروفورز گردید.

جدول ۱ـ پرایمرهای بر پایه ژن glmM مورد استفاده در PCR

Primer	Sequence (5'…….3')
Primer forward	5' AAGCTT TTAGGGGTGTTAGGGGTT T 3'
reverse primer	5' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 3'

کلونینگ محصول PCR به عنوان کنترل مثبت: بعد از خالص‌سازی، محصول PCR با استفاده از کیت T/A cloning فرمنتاس (cat:K1214) و وکتور pTZ57R کلون گردید. پلاسمیدهای حاصل با Plasmid Mini Extraction Kit کمپانی Bioneer استخراج گردید. سپس با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصول PCR تایید گردید و از آن‌ها به عنوان کنترل مثبت در تست‌های PCR استفاده گردید.

تعیین حساسیت تست PCR: بدین منظور، یک سوسپانسیون ازکشت تازه‌ی *هلیکوباکترپیلوری* که غلظت آن در OD=600 nm برابر با 0.9×10^9CFU/ml می‌باشد تهیه گردید و با روش DNG Plus، DNA آن استخراج گردید. DNA استخراج شده توسط روش رقیق‌سازی، تا ۱ کپی رقیق گردید.

تعیین ویژگی تست PCR: جهت ویژگی، DNAهای انسانی (Human)، موش (Mouse)، *ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)*، *اشرشیا کولی (Escherichia coli)*، *مایکوپلاسما پنومونیه (Mycoplasma pneumonia)*، *هرپس سیمپلکس ویروس (Herpes Simplex Virus)*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)*، استخراج گردید و مورد تست PCR قرار گرفت.

تهیه نمونه: در این مطالعه مقطعی، از ۱۰۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی دانشگاه آزاد اسلامی و بیمارستان بقیه الله که همگی تحت پوشش بیمه بوده‌اند و با علائم بالینی سوءهاضمه با علائم

شبه‌زخم، سوءهاضمه با علائم شبه‌موتیلیتی، سوءهاضمه با علائم غیراختصاصی، علائم ریفلاکس معده و عوارض زخم بودند، که ۲۰ نفر از این‌ها قبلاً درمان آنتی‌بیوتیکی شده ولی بعد از ۲ سال مجدداً مبتلا شده بودند، عمل آندوسکوپی انجام و ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده تهیه گردید.

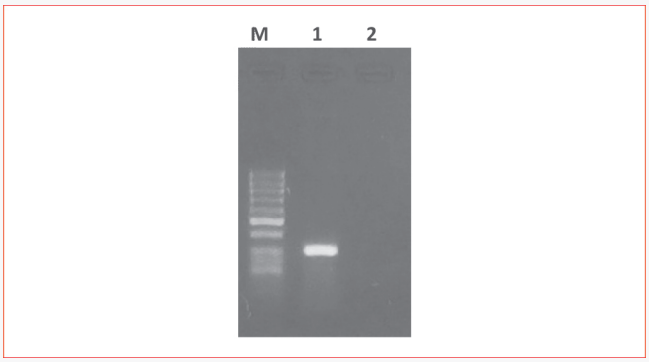
انجام تست اوره‌آز سریع: برای بررسی فعالیت اوره‌آز سریع، کیت فعالیت اوره‌آز سریع بهار افشان مورد استفاده قرار گرفت بدین صورت که ویال شفاف و در پوش دار همراه با کیت را به میزان تقریبی نصف حجم با محلول اوره‌آز سریع پر کرده و سپس یک قطعه حاصل از بیوپسی معده هر فرد را در آن قرار داده و بعد از گذاشتن درپوش آن را به آرامی تکان داده و تا یک ساعت صبر کرده و سپس شدت تغییر رنگ مشاهده گردید.

استخراج DNA ازنمونه‌های بافت بیوپسی: قطعه دیگر از بافت بیوپسی هر بیمار، برای آزمایش‌های مولکولی در ویال‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه مرکز تحقیقاتی ایرانیان ژن فناور برده شد. نمونه بیوپسی درون لوله استریل تکه‌تکه شد و سوسپانسیون یکنواختی به دست آمد. سپس DNA با کمک کیت DNP سیناکلون (Cat:DN811530) از نمونه‌های بافت بیوپسی بیماران با روش plus DNG استخراج گردید.

انجام تست PCR بر روی نمونه‌های استخراجی: برای هر ۱۰۰ نمونه تست PCR به وسیله پرایمرهای ژن glmM انجام گرفت. نتایج تست بر روی ژل آگارز ۲٪ و سایبر گرین و نور UV توسط دستگاه ترنس‌ایلومینیتور مورد بررسی قرار گرفت.

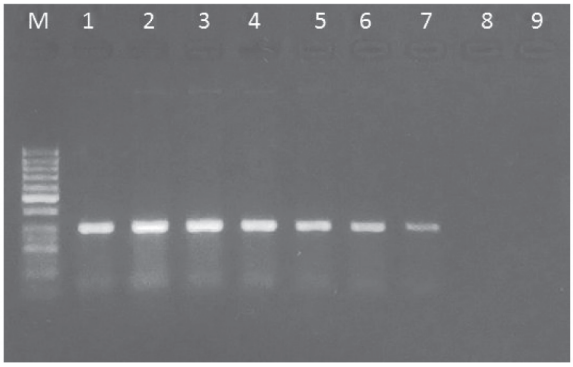
نتایج

بهینه نمودن تست PCR: نتیجه تست PCR بهینه شده ژن glmM *هلیکوباکتر پیلوری* (۲۹۴ bp) بر روی ژل آگارز ۲٪ به شکل ۱ مشاهده گردید.



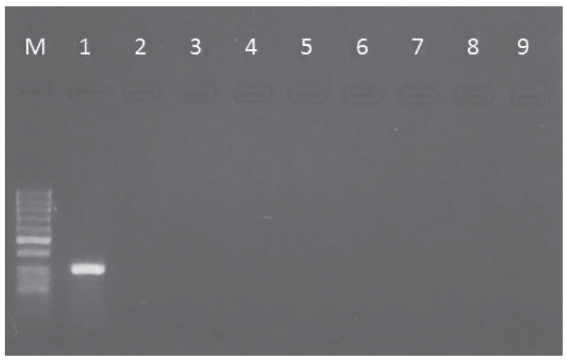
شکل ۱- تست PCR بهینه شده ژن glmM *هلیکوباکتر پیلوری*. M: سایز مارکر فرمنتاس ۵۰جفت بازی ، ۱: محصول ۲۹۴جفت بازی ژن glmM *هلیکوباکترپیلوری*، ۲: کنترل منفی

تعیین حساسیت تست PCR: تست حساسیت PCR با تهیه رقت‌های متوالی از DNA *هلیکوباکتر پیلوری* انجام گرفت که نتایج نشان داد که با وجود فقط ۱۰ کپی از DNA، تکثیر انجام می‌گیرد و در تیترهای کمتر از ۱۰ کپی از DNA، باندی مشاهده نشد که نشان از حساسیت بالای تست می‌باشد (شکل ۲).



شکل۲- تست حساسیت PCR با استفاده از رقت‌های متوالی DNA هلیکوباکتر پیلوری، M: سایز مارکر جفت بازی ۵۰ فرمنتاس، ۱: کنترل مثبت ۲: ۱۰۰۰۰۰۰عدد DNA 3: 100000 عدد DNA 4: 10000 عدد DNA 5: 1000عدد DNA 6: 100 عدد DNA 7: 10 عدد DNA 8: 1 عدد DNA 9: کنترل منفی

تعیین ویژگی تست PCR: تست ویژگی PCR با DNA گونه‌های مختلف انسان (Human)، موش (Mouse)، *ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)*، *اشرشیاکولی (Esch-richia coli)*، *مایکوپلاسما پنومونیه (Mycoplasma pneumonia)*، *هرپس سیمپلکس ویروس (Herpes Simplex Virus)*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)* انجام گرفت و هیچ نوع محصول و باند ناخواسته‌ای مشاهده نگردید که نشان دهنده این

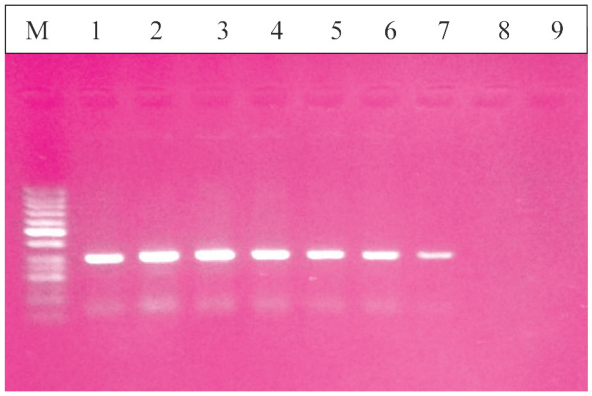


شکل ۳- تست ویژگی PCR. M: سایز مارکر ۵۰جفت بازی فرمنتاس
1: کنترل مثبت
2: DNA انسان (Human)
3: DNA موش (Mouse)
4: DNA *ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)*
5: DNA *اشرشیاکولی (Escherichia)*
6: DNA *مایکوپلاسما پنومونیه (Mycoplasma pneumonia)*
7: DNA *هرپس سیمپلکس ویروس (Herpes Simplex Virus)*
8: DNA *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)*
9: کنترل منفی

است که تست PCR دارای ویژگی بسیار بالایی بوده و فقط با DNA *هلیکوباکتر پیلوری* واکنش نشان داد و ویژگی تست ۱۰۰٪ گزارش گردید (شکل ۳).

نتایج حاصل از تست اوره‌آز سریع و PCR نمونه‌های بیوپسی:

از ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی، تعداد ۶۴٪ با استفاده از کیت تست اوره‌آز سریع بهار افشان دارای جواب مثبت شدند، بدین صورت که پس از قرار دادن نمونه مورد نظر در معرف آماده مصرف، باعث تغییر رنگ معرف از زرد اولیه به قرمز و نهایتا ارغوانی گردیدند و شدت آلودگی سبب کوتاه شدن زمان واکنش و تغییر رنگ از قرمز پررنگ به ارغوانی می‌گردید و نمونه‌های بیوپسی که فاقد باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* بودند، رنگ معرف را تغییر نداده و به همان رنگ اولیه زرد باقی ماندند. DNA مربوط به ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده که به روش DNG plus استخراج گردیدند و طبق شرایط بهینه شده مورد تست PCR قرار گرفتند. تعداد ۷۶٪ نتیجه مثبت قطعی نشان دادند، بدین صورت



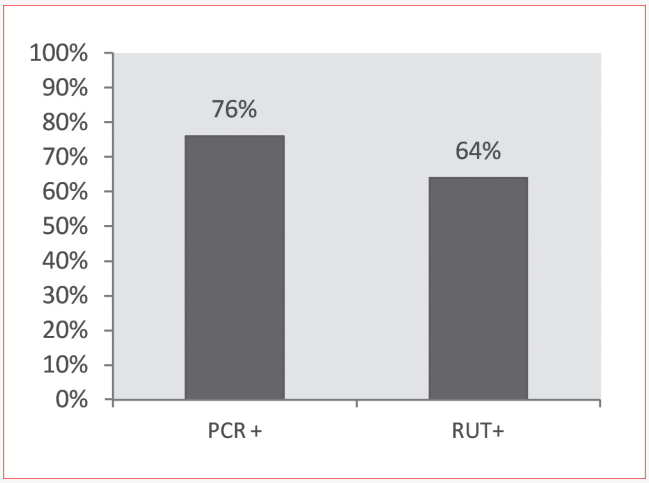
شکل ۴- تست PCR نمونه بافت بیوپسی معده. M: سایز مارکر ۵۰ جفت بازی فرمنتاس، ۱: کنترل مثبت ،۲-۷: نمونه‌های مثبت،۸ : نمونه منفی، ۹: کنترل منفی

که پس از لود نمودن نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۲٪ و انجام الکتروفورز، نمونه‌هایی که دارای ژن glmM *هلیکوباکتر پیلوری* بودند دقیقاً مطابق با باند کنترل مثبت مربوط به سویه استاندارد، اندازه ۲۹۴ جفت باز سایز مارکر فرمنتاس را نشان دادند (شکل ۴).

به طور کلی از مقایسه ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده، ۶۴٪ از نمونه‌ها توسط تست اوره‌آز دارای جواب مثبت و ۷۶٪ توسط تست PCR دارای جواب‌های مثبت گشتند (نمودار ۱). که این نشان‌دهنده حساسیت و دقت بالای روش PCR نسبت به روش اوره‌از سریع در امر تشخیص می‌باشد.

بحث

با توجه به شیوع زیاد آلودگی به *هلیکوباکتر پیلوری* در جوامع و عوارض وخیم ناشی از این آلودگی، تشخیص سریع و درست باکتری از اهمیت زیادی برخوردار است. Jang-jih lu و همکارانش در سال ۱۹۹۸ با انجام آزمون PCR برروی ۵ ژن متفاوت از *H.pylori* شامل ژن 16SrRNA، توالی‌های تصادفی ژنی، ژن SSA، ژن ureA و ژن



نمودار ۱- مقایسه نتایج PCR و RUT در ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده

UreC (glmM) و مقایسه آن‌ها با یکدیگر دریافتند که ژن UreC (glmM) با اختصاصیت ۹۶٪ و حساسیت ۱۰۰٪، مناسب‌ترین ژن مورد استفاده در شناسایی مولکولی *H.pylori* محسوب می‌گردد (۲۲). بابک شقاقی افضلی و همکارانش در سال ۲۰۰۱ به شناسایی حضور *هلیکوباکتر پیلوری* در ۱۱۷ نمونه بافت بیوپسی معده به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس ژن‌های ureA و ureC و 16SrRNA و روش کشت و تست اوره‌آز سریع در بیماران مشکوک به عفونت‌های ناشی از *هلیکوباکترپیلوری* پرداختند. در این مطالعه روش PCR مبتنی بر ژن اوره‌آز C از حساسیت و اختصاصیت بالایی نسبت به سایر روش‌ها برخوردار بود (۲۳). Smith و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با مقایسه سه روش PCR نشان دادند که PCR ژن ureC به منظور تکثیر یک قطعه ۲۹۴ جفت بازی، اختصاصی‌ترین و حساس‌ترین روش، PCR می‌باشد (۲۴). در این مطالعه نیز از ژن UreC (glmM) استفاده گردید که دارای حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی بود.

روش‌های تهاجمی که بر روی نمونه‌های بدست آمده از آندوسکوپی معده انجام می‌شوند، چون بطور مستقیم بدنبال شناسایی وجود *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند، دارای حساسیت و ویژگی زیاد بوده و قادر به تشخیص عفونت فعال هستند؛ به همین دلیل به عنوان روش‌های مرجع، مورد استفاده قرار می‌گیرند. تست اوره آز سریع یکی از متداول‌ترین تست شناسایی *H.pylori* در روش‌های تهاجمی می‌باشد. مزایای عمده این تست راحت بودن روش آزمایش، انجام دادن تست در مطب یا محل اندوسکوپی می‌باشد، اما حساسیت کمی دارد. کیفیت نمونه بیوپسی شاید دلیلی برای کاهش حساسیت و ویژگی RUT باشد، به عنوان مثال آلودگی نمونه بیوپسی به خون، اسید معده یا رفلاکس صفراوی، موجب کاهش حساسیت و ویژگی تست RUT می‌شود و یا دلیل دیگر کاهش حساسیت، زمانی‌که تعداد باکتری‌های موجود در نمونه، اندک باشند و یا به علت حضور سایر میکروارگانیسم‌های اوره‌از مثبت، نتایج مثبت کاذب ایجاد گردد (۱۵،۲۵).

Yakoob و همکاران در پاکستان در سال ۲۰۰۴، چهل درصد از بیماران مبتلا به علایم گوارشی را با استفاده از روش RUT شناسایی کردند (۲۶). همچنین Tzang و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در تایوان،

توانستند با بررسی ۱۱۱ بیمار، ۵۵/۵۸٪ از بیماران دارای مشکلات گوارشی را با روش RUT شناسایی نمایند (۲۷). با توجه به این که منفی شدن آزمون اوره‌آز سریع به مبنای عدم آلودگی با *H.pylori* نیست، بنابراین استفاده از آزمایش‌های تاییدی مکمل با توجه به امکانات موجود برای بررسی مجدد نمونه‌های دارای نتایج مثبت کاذب و یا منفی جهت تشخیص و کنترل بیماری توصیه می‌گردد.

PCR یکی از روش‌های سریع و بسیار حساس برای تشخیص DNA و حضور میکروارگانیسم در مقادیر بسیارکم است که تکنیکی ساده و دقیق است که در مدت زمان کوتاهی قابل انجام و خطاهای تشخیصی را به میزان بسیار بیشتری پائین می‌آورد و حساسیت روش‌های تشخیصی را بالا می‌برد.

در بررسی که در سال ۱۹۹۴ بر روی نمونه‌های بافت بیوپسی معده توسط Fabre و همکاران انجام گرفته بود، عنوان نمودند که تست PCR دارای اختصاصیت و حساسیت بالاتری نسبت به روش‌های دیگر از جمله روش RUT می‌باشد (۲۸).

دکتر کارگر و همکاران در سال ۲۰۱۰ اعلام نمودند که روش PCR در مقابل تست اوره آز سریع و کشت از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار است و از این روش می‌توان به منظور تایید نهایی در شناسایی *H.pylori* استفاده نمود (۲۵).

حساسیت تست PCR در این مطالعه برابر با ۱۰ مولکول DNA بود که به این ترتیب کمترین میزان میکروارگانیسم با کمک این تست قابل شناسایی بودند. دراین بررسی از ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده ۷۶٪ با روش PCR و ۶۴٪ توسط روش RUT دارای نتایج مثبت بودند. در این مطالعه ۹ مورد از نمونه‌ها با نتیجه منفی در PCR دارای نتیجه مثبت کاذب در اوره آز سریع بودند که این می‌تواند به علت آلودگی نمونه بیوپسی به خون، اسید معده یا رفلاکس صفراوی و یا به علت حضور سایر میکروارگانیسم‌های اوره‌آز مثبت مانند پروتئوس و لاکتوباسیل‌های معده باشد. همچنین در این مطالعه، ۲۱ مورد از نمونه‌ها با نتیجه مثبت PCR دارای نتیجه منفی RUT بودند که این می‌تواند به علت کم بودن تعداد باکتری فعال موجود (حداقل ده هزار باکتری) و شرایط محیط معده به عنوان محرک بیان ژن اوره‌آز می‌باشد، همچنین این باکتری در شرایطی مانند تغییر pH، افزایش اکسیژن و اثر آنتیبیوتیک‌هایی مثل آموکسی‌سیلین به حالت کوکوئیدی تغییر شکل می‌یابد، که فرم کوکوئید هلیکوباکتر باعث کاهش فعالیت اوره‌آز می‌گردد و با توجه به این‌که درمان آنتی‌بیوتیکی بیماران موجب حذف فرم فعال باکتری از معده و کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز می‌گردد و همچنین داروهای مهارکننده پمپ پروتونی نیز موجب کاهش فعالیت آنزیم اوره‌از و در نتیجه کاهش حساسیت این تست می‌گردد (۲۹) و چون در این پژوهش، ۲۰ نفر از بیماران قبلا درمان شده بودند و مجددا مبتلا شده بودند، می‌توان گفت این عوامل می‌توانند از مهم‌ترین موارد خطای منفی کاذب آزمون اوره آز سریع محسوب گردند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه منفی شدن آزمون اوره‌آز سریع به معنی عدم آلودگی با *هلیکوباکتر پیلوری* نیست و مثبت شدن آن هم به علت حضور قطعی این باکتری نمی‌باشد و ممکن است به علت آلودگی با دیگر باکتری‌های اوره‌آز مثبت باشد، بنابراین می‌توان از تست PCR به عنوان یک روش مناسب و قابل اعتماد و با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص ژن اوره آز C در نمونه‌های بافت بیوپسی استفاده نمود. در این مطالعه، آزمون PCR با تعداد جواب مثبت قطعی بیشتر نسبت به روش RUT، حساسیتی بیش از RUT را نشان داده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله کمال تشکر و قدردانی خود را از کمک‌های بی‌شائبه موسسه دانش‌بنیان ایرانیان ژن‌فناور و پرسنل محترم این موسسه و همچنین آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله و مرکز تحقیقات بیماری‌های کبد و گوارش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی ابراز می‌نمائیم.

References

1. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. The Lancet. 1983; 1(8336): 1273-5.
2. Archer JR, Romers S, Ritchie AE, Hamacher ME, Steiner BM, Bryner JH, Schell RF. Characterization of unclassified microaerophilic bacteria associated with the gasteroenteritis. J Clin Microbiol. 1988; 26(1): 101-5.
3. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Bordovsky M, et al. A pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(25): 14648-53.
4. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and liver disease. 8th ed. 2006; Philadelphia: Saunders.
5. Hasler V, Owyang C. Approach to the patient with gastro intestinal disease. In: Braunwald E, Hauser S, Fauci A. Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. 2008; New York: McGraw-Hill; p 966-978.
6. Osaki T, Mabe K, Hanawa T, Kamiya Sh. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of Helicobacter pylori infection. Journal of Medical Microbiology. 2008; 57(7): 814- 819.
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. 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.

9. Engstrand L. Helicobacter in water and waterborne routes of transmission. J Appl Microbiol. 2001; 90:80–84.
10. Sasaki K, Tajiri Y, Sata M, Fujii Y, Matsubara F, Zhao M, et al. Helicobacter pylori in the natural environment. Scand J Infect Dis. 1999; 31(3):275–279.
11. Versalovic J. Helicobacter pylori, pathology and diagnostic strategies. Am J clin Pathol. 2003; 119(3):403-12.
12. Goodwin CS, Blincow ED, Warren JR, Waters TE, Sanderson CR, Easton L. Evaluation of cultural techniques for isolating Campylobacter pyloridis from endoscopic biopsies of gastric mucosa. J Clin Pathol. 1985; 38(10): 1127-31.
13. Monteiro L, Gras N, Vidal R, Cabrita J, Megraud F. Detection of Helicobacter pylori DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. Journal of Microbiological Methods. 2001; 45(2): 89–94.
14. Blaser MJ. Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases. EMBO Reports. 2006; 7 (10): 956–60.
15. Ho SA. Direct polymerase chain reaction test for detection of Helicobacter pylori in humans and animals. J Clin Microbiol.1991; 29(11):2543–2549.
16. Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree FF, Olckers A, Botha SJ,et al. Evaluation of a novel heminested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of Helicobacter pylori in saliva and dental plaque. J Clin Microbiol. 2002;40(1):205–209.
17. Mishra KK, Srivastava S, Dwivedi PP, Prasad KN, Ayyagari A. UreC PCR based diagnosis of Helicobacter pylori infection and detection of cag A gene in gastric biopsies. Indian J Pathol Microbiol. 2002; 45(1): 31-37.
18. Bunn J E, MacKay W G, Thomas J E, Reid D C, Weaver L T. Detection of Helicobacter pylori DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. Lett Appl Microbiol. 2002; 34(6):450- 454.
19. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chang SKF, et al. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol. 1999; 37(3):772–774.
20. Esmaeili D, Mohabati Mobarez A, Hatef Salmanian A, Zavaran HA. Optimization of Helicobacter pylori culture in order to prepare favorable antigens. Journal of Bacteriology Research. 2009; 1(9): 101-104. [In Persian]
21. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of Helicobacter pylori in gastric biopsy samples and dental plaque. J Med Microbiol. 1993; 39(5):338-344.
22. Jang-jih L,cherng-lih P, Rong-yaun S, Chi-hsiang C, Qinyuan L, Sonny K, et al. Comparison of Five PCR Methods for Detection of Helicobacter pylori DNA in Gastric Tissues. J Clin Microbiol. 1999, 37(3):772.
23. 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. [In Persian]
24. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, et al. Comprasion of three PCR method for detection of Helicobacter pylori DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens.World J Gastroenterol. 2004; 10(13): 1958-1960.
25. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Compression of three methods of polymerase chain reaction, culture and rapid urease test in diagnosis of Helicobactr pylori in gastric biopsy specimen. Koomesh. 2010; 11 (3):198-203. [In Persian]
26. Yakoob J, Jafri W, Abid S, Jafri N, Abbas Z, Hamid S, et al. Role of rapid urease test and histopathology in diagnosis of Helicobacter pylori infection in developing country. BMC Gastroenterol. 2005; 5(25): 38-41.
27. Tzeng GE, Lin YL, Chu YT. Comparsion of four diagnostic methods for Helicobacter pylori. Tzu Chi Med J. 2005; 17(5): 339-343.
28. 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(7):905-908.
29. Kargar M, Razavizadegan S H, Eshraghian K, Rajpout M Y, Ghorbani-Dalini S, Kargar M. Role of Rapid Urase test in comparison with PCR for Helicobacter Pylori Infection diagnosis. Journal of Microbial World. 2009; Journal of Microbial World. 2009, 2(1), 31-36. [In Persian]

Original Article

Comparison PCR method and Rapid Urease Test to detect *Helicobacter Pylori* in the gastric biopsy tissue samples

Chamanrokh P[1*], Shahhosseiny MH[2, 3], Mazaheri Assadi M [4], Nejadsattari T[1], Esmaili D[5]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, Iran
3- Iranian Gene Fanavar institute (IGF), Tehran, Iran
4- Environmental Biotechnology Group, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.
5- Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Baqyatollah University, Tehran, Iran.

Received: 09 Apr 2013 Accepted: 21 Jun 2013

Abstract

Background & Objective: *Helicobacter pylori* has been recognized as a major risk factor in gastric and duodenum ulcers and gastric cancer. Some laboratory tests, such as culture, are not entirely satisfying. The aim of this study is to compare RUT with PCR in identifying *H. pylori* in the gastric biopsy tissue samples.

Materials & Methods: First, the standard *H.pylori* sample (N:oC30) was provided. primers or the glmM (ureC) gene were used In PCR method . The PCR test was optimized by sensitivity and specificity methods. Then 100 clinical samples composed of stomach tissue biopsy were prepared. The rapid urease test was conducted on all obtained samples to identify *H.pylori*. DNA was extracted from samples using DNG plus technique. Then, samples were studied using PCR method.

Results: The 294 bp product was amplified in the optimized PCR test. The PCR test sensitivity was obtained at 10 CFU. Any unwanted products were not seen in the specificity test with the exception of *H. pylori* DNA samples. Of 100 stomach biopsy samples, 64% were reported as positive by RUT and 76% by the PCR test.

Conclusion: Given that the PCR test has higher sensitivity and specificity to detect *H.pylori* comparing rapid ureaas test, therefore this method could be used to detect *H.pylori*.

Keywords: ***Helicobacter pylori*, glmM, PCR, Rapid Ureas Test**

*** Corresponding author: Chamanrokh Parastoo,** Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University,Tehran, Iran
Tel: +989372727679
Email: p.chamanrokh@gmail.com