مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره پانزدهم، تابستان ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی سریع هلیکوباکترپیلوری توسط روش ملکولی PCR در مقایسه با تست اوره آز سریع (RUT)

سمیه اله کرمی[*۱]، محمدحسن شاه حسینی[۲و۳] ، نسیم حیاتی رودباری[۴]، داوود اسماعیلی[۵]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی
[۲]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
[۳]موسسه ایرانیان ژن فناور(IGF)، تهران، ایران
[۴]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه ، گروه زیست شناسی
[۵]استادیار، دانشگاه بقیه الله، دانشکده علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکترپیلوری (*H.pylori*) به عنوان یک عامل عمده خطر زخمهای معده و دوازدهه و سرطان معده شناخته شده است . روش های مختلفی برای تشخیص این میکروارگانیسم شناخته شده که متداول ترین آن ها به خصوص در بیمارانی که تحت آندوسکوپی قرار می گیرند، تست اوره آز سریع (RUT)می باشد ، اما این تست برای ایجاد نتایج مثبت و منفی کاذب بالقوه می باشد . لذا بکارگیری روشی سریع ، ساده و آسان اما با دقت بالا جهت تایید این تست در آزمایشگاه ها مورد نیاز می باشد . هدف این مطالعه ارزیابی ارزش تشخیصی تست اوره آز سریع در قیاس با روش ملکولی PCR در شناسایی هلیکوباکترپیلوری می باشد .

مواد و روش ها: این مطالعه بر روی ۱۰۰ نمونه ی بیوپسی بدست آمده از بیماران مبتلا به سوء هاضمه که تحت آندوسکوپی قرار گرفته بودند انجام شد. تست اوره آز سریع بر روی تمامی نمونه ها صورت گرفت و سپس تست PCR با پرایمرهای طراحی شده جهت ژن *glmM* صورت پذیرفت . ارزش تشخیصی تست های RUT و PCR با استفاده از نرم افزار SPSS مورد بررسی های مقایسه ای قرار گرفت .

یافته ها: محصول تست PCR بهینه شده با طول ۲۰۱ جفت باز به درستی تکثیر یافت و بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید. بررسی پرایمرهای انتخاب شده با DNA های مختلف ، اختصاصیت بالایی را نشان داد . حساسیت تست PCR به تعداد ۱۰ باکتری (10CFU) با اختصاصیت ۱۰۰٪ بود . در این مطالعه ۸۵٪ از نمونه ها توسط تست PCR شناسایی شدند در حالیکه تنها ۶۳٪ از آنها توسط RUT شناسایی شدند.

نتیجه گیری: در این مطالعه ثابت شد که تست PCR به دلیل حساسیت و اختصاصیت بالا می تواند جهت تشخیص هلیکوباکترپیلوری درنمونه های بالینی و نمونه های بدست آمده از تست اوره آز مورد استفاده قرار گیرد.

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

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری(*Helicobacter pylori*) یکی از شایع ترین عفونت های مزمن در انسان بوده و در کشورهای درحال توسعه و توسعه یافته به ترتیب در مجرای گوارش ۹۰ و ۵۰-۳۰ درصد از افراد کلونیزه می شود(۳۰) . این باکتری عامل طیف متنوعی از عفونت ها، از یک گاستریت (Gastritis) ساده تا زخم معده،

آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی
Email :skarami77@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

لنفوما و سرطان معده است (۲۳،۲۶). در حال حاضر روشهای مختلفی برای تشخیص عفونت با هلیکوباکترپیلوری مورد استفاده است که به دو دسته تهاجمی (نیازمند نمونه گیری از بافت معده) و غیر تهاجمی تقسیم می شوند (۹). از جمله تستهای تهاجمی می توان به تست اوره آز سریع (RUT[1]) و روش ملکولی PCR و بررسی بافت شناسی و از آزمایشهای غیرتهاجمی به تست اوره تنفسی(UBT[2]) و تست آنتی ژن مدفوعی [3]اشاره کرد (۴،۱۵) . کشت باکتری از روشهای دیگر تشخیصی است که به دلیل وقت گیر بودن و وجود مشکلات تکنیکی ، چندان مورد استقبال نبوده و برای تشخیص و نیز ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری متداول نمی باشد. تستهای سرولوژیک نیز برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری پیشنهاد شده اند که کم هزینه و سریع بوده و به عنوان تستهای غربالگری اولیه شناخته می شوند. با این وجود ارزش تشخیصی نسبتا پایین آزمونهای سرولوژیک برای ارزیابی عفونت فعال باعث شده است که با روشهای دیگر جایگزین شوند. به علاوه نتایج سرولوژی مثبت لزوماً بیانگر وجود عفونت نیست ؛ بنابراین پس از ریشه کنی عفونت نمی توان از این روش استفاده کرد(۱۲،۱۷). آزمون UBT نیز فرآیندی وقت گیر بوده و نیازمند تجهیزات گران قیمت است . تلاش های متعددی برای کشت هلیکوباکتر پیلوری انجام شده اما جداسازی باکتری به علت دشواری کشت، تنها در موارد معدودی موفقیت آمیز بوده است(۲۹،۲۰،۸) .

هلیکوباکترپیلوری به دلیل داشتن فعالیت اورهآز، اوره را به آمونیاک و دیاکسیدکربن تبدیل میکند. آمونیاک با تغییر pH محیط درحضور فنلرد باعث تغییر رنگ محیط میشود. این تست به دلیل اثبات سریع عفونت در داخل اتاق آندوسکوپی کاربرد فراوانی دارد و نسبت به هیستولوژی و کشت ارزش اقتصادی دارد. حساسیت این تست بستگی به تراکم ارگانیسم دارد. هنگامیکه ارگانیسمها فراوانند، دارای حساسیت بالا و در زمان کم بودن تعداد ارگانیسم حساسیت تا ۳۰ درصد پایین میآید. بنابراین، این تست در زمان درمان سودمند نیست و تا ۲۴ ساعت بعد از تلقیح بیوپسی قابل تغییر است (۱۴،۲۵) .

بین روش های مولکولی روش PCR رایج تر بوده و برای تکثیر DNA هلیکوباکترپیلوری در بیوپسی به کار می رود. به طور کلی لزوم وجود و طراحی تکنیک های تشخیص مولکولی زمانی مورد توجه قرار گرفت که مشخص شد روش های متداول تشخیص بیماری های عفونی ، دارای حساسیت پایینی بوده و همچنین گاهی میکرو ارگانیسم ها قادر به رشد در محیط آزمایشگاه نبوده، نیاز به محیط کشت پیچیده ای دارند و یا زمان انکوباسیون برای رشد طولانی است. تکثیر اسید نوکلئیک و روش های هیبریداسیون ، بیومولکول ها را در نمونه های بالینی تشخیص داده و در کوتاه کردن زمان لازم برای تشخیص و تعیین میکرو ارگانیسم در نمونه های بالینی مؤثر می باشند(۷). از این روش برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری در بیوپسی معده، عصاره معدی، پلاک دندان و مدفوع استفاده میشود. آزمون 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 بسیارکم است مزیت فراوانی داشته و حساسیت بسیار بالایی را به دست میدهدو به همین علت مورد توجه قرار گرفته است (۴). مطالعات متعددی در سراسر دنیا جهت بررسی ارزش تشخیصی این تست صورت گرفته است. هرچند این مطالعات از نظر نتایج حاصله تا حدودی متفاوت می باشند ولی در مجموع به نظر می رسد که بخش بزرگی از مطالعات عموما این آزمایش را به عنوان یک روش مناسب تشخیصی قابل قبول می دانند(۱۸،۱۵،۱۳،۱۰،۸،۶،۳،۲). چندین لوکوس از DNA ی هلیکوباکترپیلوری به عنوان هدف مورد استفاده قرار میگیرد که شامل 16SrRNA، ژنهای اورهآزA وB و ژن *glmM (UreC)* که کد کننده فسفوگلوکوموتاز می باشد که در مطالعات متعددی اختصاصیت بالای روش PCR با هدف ژنی *glmM* در تشخیص هلیکوباکترپیلوری به اثبات رسیده است (۱۹) . هدف از مطالعه حاضر ارزیابی ارزش تشخیصی تست PCR با هدف ژنی *glmM* به عنوان روش استاندارد ، سریع و دقیق با حساسیت و اختصاصیت بالا نسبت به روش RUT در تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری در بیماران مبتلا به سوء هاضمه و ناراحتی های معده می باشد .

مواد و روش ها

۱ Rapid Urease Test
۲ Urea Breath Test
۳ *Helicobacter pylori* Stool Antigen

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

در این مطالعه، ۱۰۰بیمار مبتلا به ناراحتی های معدی و زخم معده مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیه اله تحت بررسی قرار گرفتند. بیماران توسط پزشک متخصص تحت آندوسکوپی قرارگرفتند . از هر بیمار نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم (Antrum) معده گرفته شد و نمونه ها بطور مستقیم با استفاده از تست اوره آز سریع جهت تشخیص هلیکوباکترپیلوری در آنها بررسی شدند. این تست بر اساس تغییر رنگ محیط از زرد به صورتی با تبدیل اوره به آمونیاک در حضور معرف فنل رد صورت پذیرفت. نتایج تست اوره آز سریع پس از تلقیح ، پیگیری و یادداشت شد. سپس از تمامی نمونه ها استخراج DNA به روشDNG Plus جهت تشخیص ملکولی هلیکوباکترپیلوری صورت پذیرفت. به منظور بهینه نمودن تست PCR، سوش هلیکوباکترپیلوری (N:oC30) از مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشکده پزشکی دانشگاه شهید پزشکی تهیه گردید و سپس سوش هلیکوباکترپیلوری با استفاده از محیط بروسلا بلاد آگار تحت شرایط میکروآئروفیلیک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد پس از ۶ روز کشت گردید. سپس از سوش ذکر شده به روش DNG Plus استخراج DNA صورت گرفت .

استخراج DNA از نمونه های بیوپسی

بطور خلاصه به ۱۰۰µl از نمونه بافت بیوپسی معده مقدار ۵µl پروتئازK اضافه شد، سپس در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گشت. ۴۰۰ µl محلول لیز کننده DNG به آن اضافه شد و حدود ۵ ثانیه ورتکس گردید. ۳۵۰ µl الکل ایزوپروپانول به مخلوط فوق اضافه شد و۱۰ بار وارونه گردید و۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژگردید. پس از تخلیه کردن مایع رویی، به رسوب ۱۰۰۰µl الکل ۷۰٪ اضافه شد سپس ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ گشت. پس از تخلیه مایع رویی ، در Dry plate در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا کاملا الکل موجود در لوله از بین برود. پس از خشک شدن کامل، ۵۰µlآب دوبارتقطیراستریل دیونیزه اضافه گردید و برای بهتر حل شدن DNA در آب حدود ۵ دقیقه دوباره لوله در Dry plate در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محلول حاصل در فریزر در دمای ۲۰- درجه نگهداری گردید.

آغازگرها

آغازگرهای (Primers) مورد استفاده جهت بررسی حضور ژن *glmM* در سویه های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران در روش PCR، با استفاده از نرم افزار Primer explorer طراحی گردیدند.این آغازگرها باعث سنتز محصولی با طول ۲۰۱ جفت باز شدند.

جدول ۱: توالی آغازگرها

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول PCR
glmM	‘H.p-F:5’-acgccctttcttctcaag-3 ‘H.p-R:5’-cgcctgttttagcgtaat-3	201bp

PCR

در این مرحله با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در واکنش PCR، وجود وجود ژن *glmM* در نمونه ها بررسی شد. واکنش ها در حجم ۲۵ میکرولیترحاوی بافر PCR 1x ، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP ، ۰/۴ میکرولیتر DNA پلیمراز Taq (*Taq* DNA Polymerase) و ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر از آغازگرها ،۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیردیونیزه (DDW) انجام شد. پس از تهیه مخلوط اصلی (Master mix) و پوشاندن آن با روغن معدنی، فرایند در دستگاه Thermo-cycler با دماهای زیر انجام گرفت.الف- ۳۰ ثانیه واسرشتگی در ۹۳ درجه سانتی گراد ب- ۲۰ ثانیه اتصال در ۵۴ درجه سانتی گراد ج- ۲۰ ثانیه مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد. تعداد کل چرخه های حرارتی جهت تکثیر ۴۰ چرخه بود. سپس محصول PCR با استفاده از ژل آگارز دو درصد در کنار نشانگر (Marker) 50bp DNA ladder الکتروفورز شده و با سایبرگرین رنگ آمیزی و بررسی شد (شکل ۱)

کلون کردن

در مرحله بعد ، عمل کلون کردن قطعه ۲۰۱ جفت بازی بعد از خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیتT/A Cloning کمپانی فرمنتاس (Cat:k1214) و در وکتور pTZ57R این کیت،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

انجام گرفت.

تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده

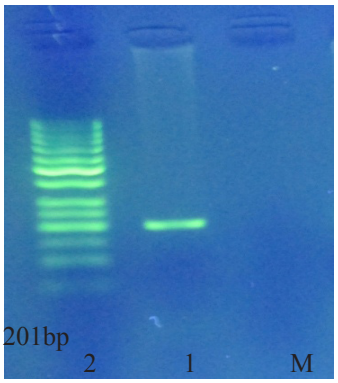
جهت تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده، سوسپانسیونی از کشت تازه هلیکوباکترپیلوری (N:oC30) که غلظت آن در OD=600nm با استفاده از لوله ۰/۵ مک فارلند $0.9\times/CFU^{9}10$ بود تهیه گردید. استخراج DNA از سوسپانسون حاصل صورت گرفت و از DNA استخراجی، به روش رقت های سریالی ml ، رقت های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه گردید و توسط PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده

اختصاصیت تست PCR بهینه شده ، به دو صورت مورد بررسی قرار گرفت که ابتدا بصورت تئوری از طریق بانک ژنی و فانکشن nBlast و سپس بصورت عملی در آزمایشگاه بود که پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر انواع مختلف DNA شامل انسان، موش، ساکارومیسس سرویزیه، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سالمونلا، استرپتوکوکوس پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا بکار گرفته شد و سپس توسط تست PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

تست PCR با استفاده از DNA استخراج شده از هلیکوباکترپیلوری (N:oC30) ، بهینه گردید. بدین منظور پس از استخراج DNA از باکتری، غلظت محلول حاوی DNA ژنومی سه مرتبه اندازه گیری شده و متوسط غلظت به عنوان غلظت واقعی در نظر گرفته شد. سپس این محلول با آب مقطر استریل رقیق شده تا غلظت نهایی ۱ ng/µl به دست آید. با پیدا کردن جایگاه اتصال پرایمرها بر روی توالی هدف *UreC* توسط شرکت ماکروژن کره ، مشخص شد که محصول PCR بدست آمده از این طریق باید ۲۰۱جفت باز طول داشته باشد. پس از انجام واکنش PCR برای اطمینان از انجام صحیح واکنش، محصول آن بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز گردید. قطعه DNA تکثیر شده حاصل از PCR با طول حدود ۲۰۱ جفت باز، در شکل ۱ قابل مشاهده می باشد.



شکل ۱ : نتیجه حاصل از PCR ژن *glmM* بر روی ژل آگارز ۲٪. ستون M، 50 bp DNA Ladder، ستون ۱ باند ۲۰۱ bp مربوط به تکثیر بخشی از ژن *glmM* ، ستون ۲ کنترل منفی را نشان می دهد.

در این مطالعه ، ۱۰۰ نمونه بیوپسی جدا شده از بیماران مبتلا به ناراحتی معده جهت تشخیص حضور هلیکوباکترپیلوری در آنها توسط تست اوره آز سریع (RUT) و PCR مورد ارزیابی های مقایسه ای قرار گرفتند . با توجه به نمودار ۱ ، از ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه ، ۶۳ نمونه براساس تست اوره آز سریع از نظر هلیکوباکترپیلوری مثبت شناخته شدند. در آزمایشات به عمل آمده ، از میان ۱۰۰ نمونه ، ۸۵ نمونه توسط تست PCR از لحاظ حضور هلیکوباکترپیلوری در آنها مثبت ارزیابی گردیدند. در این آزمایش ، ۲۳ نمونه ی با تست اوره آز منفی ، دارای جوابهای مثبت توسط آزمون PCR گشتند، این نتایج نشان داد که تست PCR از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به روش RUT در شناسایی هلیکوباکترپیلوری برخوردار می باشد.

نمودار ۱ : مقایسه نتایج حاصل از تست اوره آز سریع و آزمون PCR در شناسایی هلیکوباکترپیلوری برروی نمونه های بیوپسی

وضعیت میانگین PCR و RUT		
	PCR	RUT
فراوانیValid	۱۰۰	۱۰۰
میانگین	۱/۱۵	۱/۳۷

جدول ۲ : وضعیت میانگین PCR و RUT

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

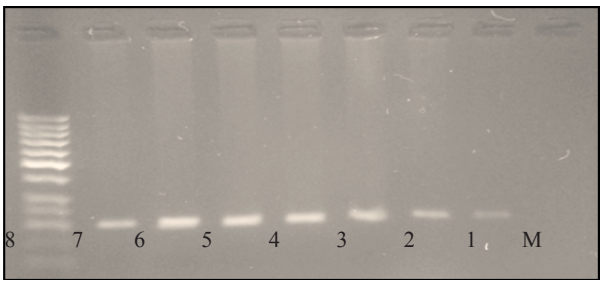
آزمون	تعداد	میانگین	انحراف معیار	میانگین خطای معیار
RUT	۱۰۰	۱/۳۷	۰/۴۸۵	۰/۰۴۹

جدول ۳ : مقایسه میانگین دو روش RUT و PCR

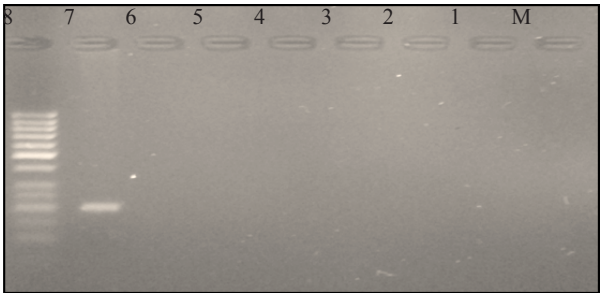
مقدار آزمون در جداول ۲ و ۳ که با استفاده آزمون T دو گروه مستقل نرم افزار SPSS بدست آمد ، نشان می دهد که با اطمینان ۹۹٪ و سطح خطای کوچکتر از ۰/۰۱ تفاوت آمار معنی داری بین دو میانگین واقعی(RUT) و مفروض(PCR) وجود دارد. ضمن آن که، بر اساس نتایج این جدول، مقدار میانگین واقعی(۱/۳۷) از مقدار میانگین مفروض(۱/۱۵) بالاتر است. بنابراین، تفاوت این دو میانگین مورد پذیرش قرار می گیرد و می توان نتیجه گرفت روش PCR دقیق تر از روش RUT است.

	Test value=1.15					
	T (آماره آزمون)	درجه آزادی	Sig. ((2-tailed	اختلاف میانگین	تفاوت نقطه‌ای با اطمینان ۹۵٪	
					حد پایین	حد بالا
RUT و PCR	۴/۵۳۴	۹۹	۰/۰۰۰	۰/۲۰۰	۰/۱۲	۰/۳۲

حساسیت تست PCR بهینه شده با استفاده از تهیه رقت های مختلف DNA از سوش استاندارد هلیکوباکترپیلوری (N:Oc30)، صورت گرفت. حساسیت تست PCR بهینه شده در این آزمایش ، به تعداد ۱۰ باکتری به دست آمد (شکل ۲). در تعیین اختصاصیت تست PCR ، این تست به درستی قادر به شناسایی هلیکوباکترپیلوری (N:oC30) بود و این در حالی بود که DNA مربوط به غیرهلیکوباکترپیلوری ، توسط پرایمرهای این تست قابل تکثیر نبودند (شکل ۳) .



شکل ۲ : تعیین حساسیت تست PCR . ستون M، 50 bp DNA Ladder، ستون ۱ کنترل مثبت ، ستون ۲ تا ۸ به ترتیب شامل 10^6، 10^5، 10^4، 10^3، 10^2، 10^1 ، ۱ عدد از DNA هلیکوباکترپیلوری (N:oC30) می باشد.



شکل ۳ : تعیین اختصاصیت تست PCR با پرایمر های اختصاصی هلیکوباکترپیلوری. ستون M، 50 bp DNA Ladder، ستون ۱ هلیکوباکترپیلوری ، ستون ۲ تا ۸ DNA های غیر هلیکوباکترپیلوری می باشد.

بحث

با توجه به اهمیت بالینی هلیکوباکترپیلوری و بیماری های مرتبط با آن، روش های مختلفی برای شناسایی این عفونت ارائه شده است . یکی از روشهای متداول جهت تشخیص هلیکوباکترپیلوری در نمونه های بیوپسی تست اوره آز سریع می باشد که نشان داده شـده که حساسیت این روش زمانیکه تعداد باکتریهای موجود در نمونه ، اندک باشند غیرقابل اعتماد میباشند(۱۸) به علاوه این تست ، برای ایجاد نتایج مثبت کاذب به علّت حضور سایر باکتریهای اورهآز مثبـت و یا نتایج منفـی کاذب در بیمارانی که بازدارندههای پمپ پرتون را مصرف میکنند بالقوه می باشد (۱۱،۲۴) . با توجه به اجتناب از مشکلات و محدودیت های تست های رایج از قبیل تست اوره آز سریع ، جستجوی توالی های

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

اختصاصی DNA ی هلیکوباکترپیلوری در نمونه های بیوپسی به عنوان یک آزمون تشخیصی از مزایای زیادی برخوردار بوده و در موارد متعددی بکار رفته است . با معرفی روش های مولکولی نه تنها بر ویژگی روش های تشخیصی افزوده شده بلکه به تدریج از مقدار نمونه مورد نیاز برای شناسایی ارگانیسم کاسته شده و حساسیت آزمو ن ها نیز افزایش یافته است (۲۷). یکی از روش های ملکولی شناخته شده آزمون PCR می باشد که در مطالعات گذشته و مطالعه حاضر برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری در نمونه های بالینی بیوپسی بکار گرفته شده است .

در سال ۱۹۹۸ Jang-jih lu با انجام آزمون PCR برروی ۵ ژن متفاوت از هلیکوباکترپیلوری و مقایسه آنها با یکدیگر، اختصاصیت ۹۶٪ و حساسیت ۱۰۰٪ را با هدف ژنی *glmM* که هدف مورد استفاده در آزمایشات ما می باشد را بدست آوردند(۱۹). حساسیت آزمون PCR در آزمایشات ما به تعداد ۱۰ باکتری در نمونه های بیوپسی با اختصاصیت ۱۰۰٪ بود . یکسال بعد، روش PCR با هدف ژنی *glmM* توسط Lu نیز به انجام رسید. این تست اختصاصیت بالایی برای هلیکوباکترپیلوری داشت و با هیچ یک از محصولات دیگری که بر روی گونههای دیگر انجام گردید، عملکردی نداشتـه است(۲۲). در تست های ما نیز اختصاصیت بالای روش PCR با استفاده ازPCR در ۷ نمونه DNA مختلف غیر هلیکوباکترپیلوری به اثبات رسید و هیچگونه تکثیری درDNA های غیر هلیکوباکترپیلوری مورد استفاده ، مشاهده نشد. در سال Valentine ۱۹۹۰ در نمونههای تازهی بیوپسی حساسیت روش کشت، رنگامیزی گیمسا و هیستولوژی را نسبت به PCR در شناسایی هلیکوباکترپیلوری مورد ارزیابی قرار داد و حساسیت ۱۰۰٪ با اختصاصیت ۹۸٪ را در روش PCR بدست آورد(۳۱). در آزمایشات ما نیز همانطور که نتایج نشان دادند ، روش PCR حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به تست اوره آز سریع دارا بود . Fabre آزمون PCR را با سه روش کشت، تست اورهآز سریع و هیستولوژی در شناسایی هلیکوباکترپیلوری در نمونههای بیوپسی معده در ۵۸ بیمار مورد مقایسه قرار داد که اختصاصیت تسـت PCR در این مطالعه ۱۰۰٪ و حساسیت آن ۹۵٪ بود (۱۰) که همانطور که از نتایج آزمایشات ما نیز بدست آمد اثبات شد که PCR حساس ترین و اختصاصیترین روش در مقایسه با سایر روشها می باشد.

دکتر شهامت نشان داد که ژن *glmM* به عنوان مطمئنترین هدف برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری بوسیلهی روش PCR است. او با استفاده از ترکیب دو روش حساس مبتنی بـر PCR که یکی ژن *glmM*و دیگری منطقهی متغیر فرا دسـت ژن *16SrRNA*را مورد هدف قرار می دهد به شناسایی هلیکوباکترپیلوری در نمونه ها پرداخت که از یکسو تکثیـر ژن *glmM* ، شناسایی اختصاصی هلیکوباکترپیلوری و سایر گونه های هلیکوباکتر را فراهم سازد واز سوی دیگر، منطقهی فرا دست *16SrRNA* حضور سایر گونه های غیر هلیکوباکتر را تأیید کند. ایـن روش ، شناسایی سریـع فرم های مارپیچی و کوکوئید هلیکوباکترپیلوری در جوامع میکروبی مخلوط با حساسیت pg ۰/۱را مهیا ساخت (۲۸). از آنجا که هدف مورد استفاده در آزمایشات ما نیز ژن *glmM* بود، باحساسیت بالایی گونه هلیکوباکترپیلوری به طور اختصاصی در نمونه ها شناسایی شد اما حساسیت برآورد شده در آزمایش دکتر شهامت به دلیل هدف قرار دادن دو ژن ، بالاتر از حساسیت بدست آمده در آزمایشات ما بود. Kisa و همکارانش در سـال ۲۰۰۰ در یک بررسی با روش Nested PCR با هدف ژن *UreA*، حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ را بدست آوردند (۲۱).این آزمایش با اسفاده از پرایمرهای آشیانه ای به انجام رسیده وحساسیتی بیش از حساسیت تست ما را به دست داده است. Weiss در سال ۲۰۰۸ نشان داد که تعداد قابل توجهی از عفونتهای هلیکوباکترپیلوری که توسط آنالیزهای ایمونوهیستـو شیمیایی و یا تستهای تنفسی قابل تشخیص نبودند، توسط PCR قابل شناسایی شدند (۳۲) که این نتیجه با نتایج ما در حساسیت PCR نسبت به سایر روشهای آزمایش شده برابری میکند. در بررسی که توسط Adel و همکارانش در سـال ۲۰۱۲ بر روی ۲۹۹ نفر از بیماران صورت گرفت ، عفونت هلیکوباکترپیلوری در ۴۱ بیمار توسط تست اورهآز تنفسی، مثبت ارزیابی گردید در حالی که توسط تست PCR بر روی نمونههای بیوپسی بدست آمده ، ۶۲ نمونه ، مثبت ارزیابی شدند. در این مطالعه۸۰٪ از نمونههای UBT مثبـت، دارای نتـایج PCR مثبت بودند(۱). در آزمایشات ما که برروی نمونه های بیوپسی صورت گرفت ، ۲۳ مورد از نمونه های با نتایج اوره آز منفی ، توسط آزمون

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

PCR مثبت شناسایی شدند که این نتایج ، دقت و حساسیت تست PCR نسبت به تست اوره آز را اثبات میکند. تست اوره آز سریع به دلیل حضور سایر باکتریهای اوره آز مثبت در نمونه های بیوپسی برای ایجاد نتایج مثبت کاذب و نیز به علت پایین بودن تعداد و تراکم سلولها در نمونه ها برای ایجاد نتایج منفی کاذب ، بالقوه می باشد. در مطالعه حاضر که تحقیقی لابراتواری می‌باشد جهت بررسی شیوع هلیکوباکترپیلوری در بیماران مبتلا به عفونتهای معده که از جمله گروه در معرض خطر ابتلا به زخم و سرطان معده هستند، از تکنیک PCR استفاده شد و دقت بالاتر آن را در مقایسه با تست اوره آزسریع به اثبات رسید. تست PCR به گونه‌ای بهینه گردید که در مدت زمان کمتر از ۳ ساعت به نتایج مورد نظر دست یافته شد و با این روش تشخیص مولکولی که دقت بالاتری در مقایسه با تست اوره آز سریع دارد بیماران مبتلا شناسایی شدند. در مطالعه حاضر در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری، ژن *glmM* انتخاب گردید که مناسب ترین ژن برای تشخیص باکتری در نمونه های بالینی در روش های مختلف PCR است . نمونه‌ها دراین بررسی به تعداد ۱۰۰ نمونه بافت بیوپسی معده از بیمارانی بود که تحت اندوسکوپی قرار گرفته بودند . نتایج بدست آمده توسط PCR نشان دهنده حساسیت بالای این آزمون نسبت به تست اوره آز سریع می باشد. بدین ترتیب تعداد ۶۳ نمونه توسط RUT و ۸۵ نمونه توسط آزمون PCR از لحاظ حضور هلیکوباکترپیلوری در آنها ، مورد شناسایی قرار گرفتند .در این مطالعه آزمون PCR با ۲۲ جواب مثبت بیشترنسبت به روش RUT ، حساسیتی بیش از RUT را نشان داده است . این نکته قابل توجه است که روش PCR امکان دسترسی به روشی ساده، تکرار پذیر (Re-producible) ، دارای حساسیت بالا و در موارد تعداد زیاد نمونه، را فراهم ساخته و روشی سریع است که احتیاج به آموزش اختصاصی و ویژه برای تعبیر و تفسیر نتایج نداشته و تحت تاثیر ذهنیات و تصورات مشاهده گر قرار نمی گیرد. تست‌های مولکولی همچون PCR که تکنیکی ساده و سریع که در مدت زمان کوتاهی قابل انجام است خطاهای تشخیصی را به میزان بسیار بیشتری پائین می آورد و حساسیت روشهای تشخیصی را بالا می برد(۲۷). تست PCR حساس‌ترین آزمایش تشخیصی در بیماران مبتلا به عفونت های معده شناخته شده که روشی دقیق و اختصاصی و سریع و در عین حال قابل انجام بودن در کلیه مراکز تشخیصی در سطح کشور، به منظور تشخیص زود هنگام هلیکوباکترپیلوری با هزینه پایین با توجه به بومی شدن این روش و ضمن سریع و ارزان بودن ، پرداختن به آن بسیارمهم است. لذا تکنیک فوق به عنوان یک تست مکمل و تاییدی برای روش‌های تشخیصی همچون تست اوره آز سریع جهت تشخیص و کنترل بیماری حائز اهمیت است. قابل ذکر است تست اوره آز سریع وسیع ترین و گسترده‌ترین تکنیک تهاجمی جهت تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری است که اثبات سریع عفونت وارزش اقتصادی، مزایای اصلی این روش می‌باشد، اما دارای معایبی نیز است از آن جمله اینکه در زمان کم بودن تعداد میکروارگانیسمها ازحساسیت پایینی برخوردار بوده و نیز ایجاد نتایج مثبت کاذب به علت حضور سایر میکروارگانیسم های اوره آز مثبت می باشد. از آنجا که تشخیص سریع بیماری می‌تواند عامل مهمی در جلوگیری از انتشار بیماری به حساب آید در نتیجه ابداع یک روش تشخیصی سریع که قادر به شناسایی عامل بیماری زا در مراحل اولیه بیماری باشد و همچنین امکان استفاده از آن در تمامی مراکز تشخیصی وجود داشته باشد ما را به سمت بررسی بیشتر این تکنیک سوق داد. در این بررسی روش مولکولی PCR به عنوان یک روش علمی و ارزشمند در استراتژی درمانی و بهداشتی پیشنهاد گردید.در این تحقیق اثبات شد تست PCR روشی حساس تر از اوره آز سریع و سایر روشهای متواتر جهت شناسایی هلیکوباکترپیلوری است که می تواند به عنوان روشی دقیق و سریع در شناسایی و پیشگیری به موقع و درمان مبتلایان به بیماری های معده بکار رود.

تشکر و قدردانی

از همکاری های موسسه ایرانیان ژن فناور (IGF) ، دانشگاه بقیه اله و پرسنل آن به جهت دراختیار نهادن امکانات آزمایشگاه و بویژه مشاوره ی خانم ها دکتر الهام مسلمی و دکتر پرستو چمن رخ در این زمینه کمال تشکررا دارم و از خداوند یکتا برای تمامی عزیزانم موفقیت و شادکامی روزافزون را خواستارم .

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

منابع

(1)Adel F, Mamdouh Z, Manal M, Ebrahem M, Mohamed F. Screening for Helicobacter pylori Infection among Patients with Otorhinolaryngological Diseases May Spare Need for Surgical Interference:A PCR Confirmed Study. Journal of American Science, 2012; 8(5): 83-88.
(2)Banatvala, N, Lopez CR, Owen RJ, Hurtado A, Abdi Y, Davies GR, Hardie JM, and Feldman RA. Use of the polymerase chain reaction to detect Helicobacter pylori in the dental plaque of healthy and symptomatic individuals. Microb. Ecol. Health Dis., 1994; 7:1–8.
(3)Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, and 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; 39:338–344.
(4)Blaser MJ. "Who are we? Indigenous microbes and the ecology of human diseases". EMBO Reports 7, 2006; 10: 956–960.
(5)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.
(6)Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, and Saverymuttu S. PCR based diagnosis of Helicobacter pylori infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. J Clin. Microbiol, 2001; 39:1217–1220.
(7)Cho SN. Current issues on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis. Yonsei medical journal, 2007; 48: 347-359.
(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): 165-168.
(9)Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. Helicobacter pylori. Clin Microbiol Rev, 1997; 10:720-41.
(10)Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, Rodde I, Potet F, Mignon M, and Etienne JP. 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; 35:905–908.
(11)Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, Blaser MJ, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Megraud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. Science, 2003; 299:1582–1585.
(12)Feldman RA, Deeks JJ, and Evans SJW. Multi-laboratory comparison of eight commercially available Helicobacter pylori serology kits. Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1995; 14:428–433.
(13)Gebara EC, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, and Lima LA. Prevalence of Helicobacter pylori detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. Oral Microbiol. Immunol, 2004; 19:277–280.
(14)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: 1127-1131.
(15)Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree FF, Olckers A, Botha SJ, Lastovica AJ, and van der Merwe SW. 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; 40:205–209.
(16)Hammar M, Tyszkiewicz T, Wadstrom T, and Toole PWO. Rapid detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin. Microbiol, 1992; 30:54–58.
(17)Hasler V, Owyang C, Approach to the patient with gastrointestinal disease, In: Braunwald E, Hauser S, Fauci A, Harrison's principles of internal medicine, 17th ed, New York, McGraw-Hill, 2008, 966-978.
(18)Ho S, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, Dixon MF, Wyatt JI, Tompkins DS, Taylor GR, and Quirke P. Direct polymerase chain reaction test for detection of Helicobacter pylori in humans and animals. J Clin. Microbiol, 1991; 29:2543-2549.
(19)Jang-Jih Lu, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong KF and Lee CH. Comparison of Five PCR Methods for Detection of Helicobacter pylori DNA in Gastric Tissues. J Clin. Microbiol., 1999; 37(3):772.
(20)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): 1671-1674.
(21)Kisa O, Albay A, Mas MR, et al. The evaluation of diagnostic methods for the -detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43: 251-5.
(22)Lu JJ, perng CL, Shyu RY, Chen CH, sonny KF, and Chao-hunglee. Comparison of Five PCR Methods for Detection of Helicobacter pylori DNA in Gastric Tissues. J Clin. Microbiol, 1999; 37(3):772-774.
(23)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.
(24)Mobley HL, Hu LT and Foxal PA Helicobacter pylori urease: Properties and role in pathogenesis. Scandinavian J Gastroenterol, 1991; 187:39-46.
(25)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, 89–94.
(26)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.
(27)Shahhosseiny MH, Tehrani R. Polymerase Chain Reaction (PCR) 165p, Publisher: Islamic Azad University, 2005, 45-68.
(28)Shahamat M, Alavi M, Watts JEM, Gonzalez JM, Sowers KR, Maeder DW, Robb FT. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of Helicobacter pylori. J Clin. Microbiol, 2004; 42: 3613–3619.
(29)Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT. Isolation of Helicobacter pylori from human faeces. Lancet, 1992; 340(8829): 1194-1195.
(30)Vaira D, Ricci C, Acciardi C, Gatti L, Berardi S, Miglioli M. The clinical role of stool test (HpSA) in noninvasive

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]

diagnosis of Helicobacter pylori infection. Turk J Gastroenterol, 2000; 11(2): 97-102.
(31)Valentine JL, Arthur RR, Mobley HL, Dick JD. Detection of Helicobacter pylori by using the polymerase chain reaction. J Clin. Microbiol, 1991; 29(4):689–695.
(32)Weiss J, Tsang TK, Meng X, Zhang H, Kilner E, Wang E, Watkin W. Detection of Helicobacter pylori gastritis by PCR: correlation with inflammation scores and immunohistochemical and CLO test findings. Am J Clin Pathol, 2008; 129(1):89-96.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.15.11.8]