Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 5, Dec. – Jan. 2016, Pages: 70-75

Original Article

Comparison Three Methods, PCR Method, Cultyre and Rapid Urease Test to Detect Helicobacter *pylori* in the Gastric Biopsy Tissue Samples

Mohammad reza Nafisi[1], Mohammad Alipour Shadbad[2*], Gorban ali Rahimian[3], Ali Karimi[1]

[1]Research Center of Cell & Molecular Science, Sharekord University of Medical Science, Sharekord, Iran
[2]Research Center of Molecular Science, Baqiatallah University of Medical Science, Tehran, Iran
[3]Department of Internal Disease, Sharekord University of Medical Science, Sharekord, Iran

Received: 20 Apr, 2014 Accepted: 12 June, 2014

Abstract

Background & Objectives: *Helicobacter pylori* prevalence is high in developing countries. This microorganism is accepted as the most important agent of gastritis and as a risk factor for peptic ulcer disease and gastric adenocarcinoma. Currently many diagnostic methods exist for detecting *H. pylori*, however they all have limitations. The aim of this descriptive study was to evaluate diagnostic methods, such as rapid urease test, culture and polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods: For identification of *Helicobacter pylori* 100 patients (46 women and 54 men) who were suffering from digestive complaints and referred to the endoscopy department of Hajar Hospital in Sharkord were participated in the study. Gastric biopsy samples were collected from each patient, then polymerase chain reaction, culture and rapid urease test were performed. DNA extraction was followed by PCR was used for diagnosis of *ureC* gene.

Results: Biopsy samples from100 patients were evaluated. *H. pylori* was positively identified by PCR in 78/100 (78%) of the patients, while positive samples were found in 52 (52%) and 48 (48%) of the patients by RUT and culture methods, respectively. In results of the culture, there was an agreement of 100% with PCR.

Conclusion: Three different methods for the detection of *Helicobacter pylori* were evaluated. Given that the PCR test has higher sensitivity and specificity to detect *H.pylori* comparing rapid urea as test, therefore this method could be used to detect *H.pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Rapid Urease Test, Culture, *Ure C*(gene), PCR

***Corresponding author:**
E-mail: shadbad_m@yahoo.com

Citation: Nafisi M R, Alipour Shadbad M, Rahimian G A, Karimi A. Comparison Three Methods, PCR Method, Cultyre and Rapid Urease Test to Detect Helicobacter pylori in the Gastric Biopsy Tissue Samples. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(5):70-75.

مقاله پژوهشی

مقایسه سه روش PCR، کشت و اوره آز سریع در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری از نمونه بیوپسی معده

محمدرضا نفیسی[۱]، محمد علیپور شادباد[۲*]، قربانعلی رحیمیان[۳]، علی کریمی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، تهران، ایران
[۳]گروه بیماریهای داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد ایران

دریافت: ۹۳/۱/۳۱ پذیرش: ۹۳/۳/۲۲

چکیده

زمینه و اهداف: با توجه به شیوع بالای هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای جهان سوم و این که این میکروارگانیسم به عنوان عامل اصلی گاستریت و فاکتور مستعد کننده برای زخم پپتیک و آدنوکارسینومای معده شناخته شده است، روشهای مختلفی برای شناسایی هلیکوباکترپیلوری ابداع شده است که هر کدام از آنها با محدودیتهایی مواجه هستند. هدف این مطالعه مقایسه روشهای مختلف تشخیصی هلیکوباکتر پیلوری مثل کشت، تست اوره آز سریع و واکنش زنجیره ای پلی مراز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه توصیفی برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری از ۱۰۰ بیمار (۵۴ مرد و ۴۶ زن) مبتلا به ناراحتیهای گوارشی مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد نمونه بیوپسی گرفته شد و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، کشت و تست اوره آز سریع انجام شد. برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری بعد از استخراج DNA از پرایمرهای طراحی شده، برای ure C(glmM) استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه برای PCR از ژن ure C(glmM) استفاده شد. نمونه بیوپسی ۱۰۰ بیمار بررسی شد که ۷۸ مورد مثبت با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ۵۲ نمونه بیوپسی از نظر تست اوره آز سریع مثبت شدند و ۴۸ مورد از نمونه‌های بیوپسی با کشت مثبت بودند که نتایج کشت ۱۰۰٪ با PCR همخوانی داشتند.

نتیجه‌گیری: سه روش مختلف برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری بررسی شد. با توجه به اینکه آزمون PCR در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه بافت بیوپسی دارای دقت، حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به تست اوره آز سریع و کشت می‌باشد، بنابراین از این روش می‌توان به منظور شناسایی H.pylori استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، تست اوره آز سریع، کشت، ureC(glmM)، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR).

*ایمیل نویسنده رابط: shadbad_m@yahoo.com

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری پاتوژن اختصاصی انسان بوده (۱) و مخاط معده بیش از ۵۰ درصد مردم دنیا را آلوده می‌کند (۲). این باکتری عامل اتیولوژیک گاستریت مزمن فعال، زخم دئودنال (۳و۱) است و با سرطان معده (۲) و لمفوم MALT (۴) در ارتباط می‌باشد. هلیکوباکتر پیلوری از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان کارسینوژن کلاس ۱ طبقه‌بندی شده است (۵). سرطان معده دومین عامل مرگ و میر در بین سرطان‌ها است (۶). با توجه به اهمیت پاتولوژیک هلیکوباکتر پیلوری تشخیص صحیح باکتری برای ریشه‌کنی و پیگیری درمان ضروری است (۹-۷). چندین تست برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری، بر پایه علایم بالینی استفاده می‌شوند. تستهایی که برای انجامشان نیاز به انجام آندوسکوپی و اخذ بیوپسی از قسمت فوقانی دستگاه گوارش هست (مثل روشهای کشت، هیستولوژی، تست اوره آز سریع، روشهای مولکولی) به عنوان تستهایی تهاجمی نامیده می‌شوند. این روشها حساسیت و ویژگی بالایی دارند. در کودکان و کسانی که نمی‌توانند آندوسکوپی را تحمل کنند و در بررسی‌های اپیدمیولوژیک روشهای غیر تهاجمی مانند سرولوژی، تست اوره براث، کاربرد دارند (۱۰-۸). کشت روش اختصاصی است و می‌توان با آن حساسیت به آنتی بیوتیکها را نیز بررسی کرد. این باکتری بسیار مشکل‌پسند است و مواد تغذیه ای و شرایط اتمسفریک پیچیده‌ای نیاز دارد، کند رشد است و پس از ۳ تا ۵ روز کلنی‌های ریز به قطر یک میلیمتر ایجاد می‌کند و در زیر میکروسکوپ بصورت باکتریهای گرم منفی خمیده‌ای S یا U شکل دیده می‌شوند (۱۵-۱۱). تست اوره آز سریع بر اساس سنجش کیفی فعالیت آنزیم اوره آز باکتری در بیوپسی مخاط معده است به علت دسترسی آسان و سادگی کاربرد زیادی دارد و جواب معتبری می‌دهد (۱۶).

برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از توالی srRNA۱۶، آنتی‌ژن ۲۶ کیلودالتونی اختصاصی گونه، ژن اوره آز A، ژن urec(glmM) کاربرد دارند (۱). ژن اوره آز C فسفوگلوکزآمین را کد می‌کند این ژن با ژن اوره آز ارتباطی ندارد بنابراین به glmM تغییر نام داده شد. این ژن در سنتز دیواره نقش دارد (۱۱و۱). هدف این مطالعه تشخیص هلیکوباکتر پیلوری با روش PCR و مقایسه آن با روشهای کشت و اوره آز سریع بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی ۱۰۰ نفر که از ناراحتیهای دستگاه گوارشی رنج می‌بردند و پس از معاینه توسط پزشک متخصص انجام آندوسکوپی ضروری تشخیص داده شده بود به بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه نمودند. از این تعداد ۵۴ نفر (۵۴٪) مرد و ۴۶ نفر (۴۶٪) زن با دامنه سنی ۱۵تا ۸۵ سال با میانگین سنی ۴۹/۰۳ سال وارد مطالعه شدند. ابتدا با اخذ رضایتنامه از مراجعه‌کنندگان، در پرسشنامه سه قسمتی طراحی شده در یک قسمت مشخصات دموگرافیک از قبیل سن، جنس، محل زندگی، میزان تحصیلات، سابقه بیماری و درمان و داروهای مورد استفاده و در قسمت دوم تشخیص نوع عارضه گوارشی با توجه به آندوسکوپی توسط پزشک و قسمت سوم پس از انجام آزمایشات تکمیل می‌گردید. از هر فرد ۴-۳ نمونه‌ی بیوپسی از ناحیه آنتروم توسط فوق تخصص گوارش با دستگاه اپتیک فیبر ژاپنی اخذ می گردید. یک قطعه حاصل از بیوپسی در لوله حاوی اوره برای تشخیص اوره آز سریع انداخته می شد. بقیه نمونه‌های بیوپسی معده برای آزمایشات میکروب شناسی در ویال‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل در کمترین زمان به آزمایشگاههای مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انتقال داده شدند. یک قطعه از نمونه‌های بیوپسی توسط لبه‌های دو لام استریل درون یک پلیت استریل تکه تکه گردیده، تا سوسپانسیون یکنواختی به دست آید. مقداری از سوسپانسیون مزبور به محیط کشت اوره کریستنسن تلقیح گردید و پس از ۲۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت تا نتیجه مثبت به صورت تغییر رنگ از زرد به قرمز، ملاحظه و ثبت گردد. مقداری از سوسپانسیون حاصل توسط لوپ استریل سرد به محیط کشت BHA غنی شده با ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند و انتخابی شده با آنتی‌بیوتیکهای تری متوپریم (۵٪)، ونکومایسین ۱۰ میلی‌گرمی و پلی میکسین B ۲۵۰۰ واحدی، تلقیح شد. به علت حساسیت باکتری به اکسیژن در کوتاهترین زمان ممکن تلقیح انجام شد. محیط‌های کشت باید تازه تهیه شده باشند. بهترین شرایط برای رشد باکتری اتمسفر حاوی ۱۰ ٪ گاز کربنیک، رطوبت در حد اشباع و درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد هست. این شرایط در جار بی‌هوازی فاقد پالادیوم و بکار گیری گاز پک C و پنبه آغشته به آب فراهم گردید. نمونه‌ها به مدت ۵-۳ روز انکوبه شدند. بعد از طی این مدت کلنی‌های ریزی به قطر ۰/۵تا ۱ میلی‌متر، صاف، شفاف، محدب ظاهر شدند که با رنگ‌آمیزی گرم و انجام تست های اوره آز، کاتالاز و اکسیداز تعیین هویت گردیدند (۸). برای بررسی فعالیت اوره آز سریع، کیت فعالیت اوره آز سریع بهار افشان مورد استفاده قرار گرفت بدین صورت که ویال شفاف و درپوش دار همراه با کیت را به میزان تقریبی نصف حجم با محلول اوره آز 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 شد. اوره آز باکتری، اوره موجود در محیط را هیدرولیز کرده و در نتیجه تولید آمونیاک می کند و باعث افزایش PH می‌شود. جواب مثبت (تغییر رنگ از زرد به قرمز) بعد از حداقل ۳۰ دقیقه قابل رویت می‌شود (۱۶). برای انجام آزمایش لازم است DNA از نمونه های مورد آزمایش استخراج شود. یکی از روش‌های استخراج DNA استفاده از کیتهای تجاری می‌باشد (۷). نمونه‌های مورد بررسی شامل بافت‌های بیوپسی تهیه شده از معده بیماران بودند. که استخراج طبق دستورالعمل مکتوب در کاتولوگ کیت دیاتوم ساخت ایران انجام گردید. و از DNA حاصل از کلنی‌های اشیرشیا کولی به عنوان کنترل منفی استفاده شد. به منظور تشخیص ژن urec(glmM)، در آزمایش PCR از پرایمرهای مربوطه استفاده شد (جدول ۱).

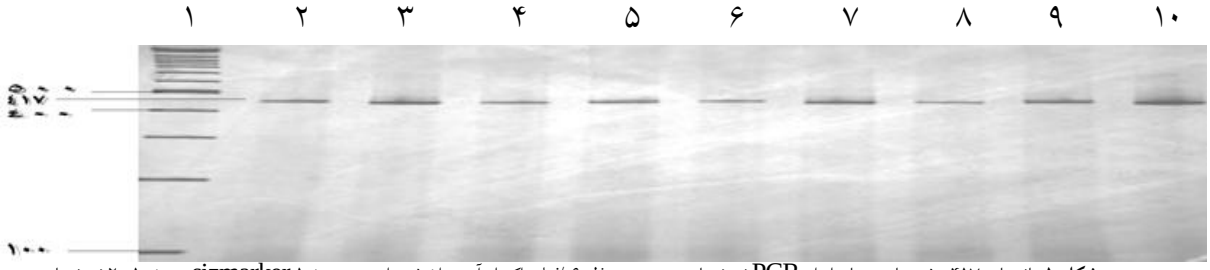
جدول ۱: توالی پرایمرهای مربوط به ژن urec(glmM)

پرایمر	توالی	رفرانس	ژن هدف	محصول PCR
Fward	EHC-U5`- CCC TCA CGC CAT CAG TCC CAA AAA-3	۱۷	urec(glmM)	۴۱۷
Reverse	EHC-L 5`- AAG AAG TCA AAA ACG CCC CAA AAC-3`	۱۷	urec(glmM)	۴۱۷

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با DNAی استخراج شده (هدف) به میزان ۲ میکرو لیتر (۱۵۰-۲۰۰ نانوگرم)، تک DNA پلیمراز (سیناژن ایران) به میزان ۰/۲ میکرولیتر بافر X۱۰ (سیناژن ایران) ۲/۵ میکرولیتر mgcl2 ۵۰ میلی‌مولار به میزان ۱/۵ میکرولیتر، dNTPs ۲/۵ میلی‌مولار به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرهای ۱۰ میلی مولار هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر و DDW به میزان ۱۵/۸ در دستگاه ترموسایکلر (BioRad آمریکا) با برنامه ۹۵ به مدت ۲ دقیقه ۳۰ چرخه ۹۵ به مدت ۱ دقیقه ۶۳ به مدت ۱ دقیقه ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید ۶٪ در جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز شدند (شکل ۱) (۸و۱) نتایج حاصل از انجام تست‌ها به صورت نیمه کور در فرمهای طراحی شده ثبت گردیدند.

یافته‌ها

نمونه بیوپسی از ۱۰۰ مراجعه‌کننده با مشکلات گوارشی گرفته شد. نوع بیماری گوارشی مراجعه‌کنندگان مورد مطالعه در جدول شماره ۲ مشخص شده است. به منظور تشخیص ureC با طول ۴۱۷ جفت باز، از پرایمرهای طراحی شده آقای لی استفاده شد (جدول ۱) پرایمرهای فوق ۴۱۷ جفت باز را تکثیر می‌دهند (شکل ۱) نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Spss آنالیز شدند.



شکل ۱: باندهای ۴۱۷ جفت بازی حاصل از PCR نمونه‌های بیوپسی در ژل ۶ ٪ پلی اکریل آمید ران شده است. ستون ۱ sizmarker ستون ۱۰- ۲ نمونه‌ها

جدول ۲: تعداد مبتلایان به نارسایی‌های مختلف به تفکیک تشخیص آندوسکوپی

نوع بیماری	گاستریت	زخم دئودنوم	زخم معده	فاقد علائم	ازوفاژیت	آدنوکارسینوما
تعداد مبتلایان	۴۶	۱۶	۱۲	۱۲	۸	۶

با انجام کشت نمونه‌های بیوپسی جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در محیط BHA، ۴۸ مورد (۴۸٪) از ۱۰۰ نمونه بیوپسی مورد بررسی، پس از ۵-۳ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ایجاد کلنی‌های ریزی به قطر ۱- ۰/۵ میلی‌متر با خصوصیات ظاهری صاف، شفاف، محدب و خاکستری پس از تعیین هویت اوره آز، کاتالاز و اکسیداز به عنوان نمونه مثبت در نظر گرفته شدند. همچنین با استفاده از تست اوره آز سریع ۵۲ مورد مثبت (۵۲٪) از ۱۰۰ با تغییر رنگ محیط از زرد به قرمز شناسایی شد. با استفاده از روش PCR، ۷۸ مورد (۷۸٪) از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی از لحاظ هلیکوباکتر پیلوری مثبت گردید. از ۴۸ مورد مثبت (۴۸٪) در کشت از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی همه این نمونه‌ها با روش PCR نیز نتیجه مثبت داشتند ولی ۳۰ نمونه با PCR جواب مثبت داشتند ولی نتیجه کشت منفی داشتند. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی روش کشت در مقایسه با روش PCR تعیین گردید. حساسیت و ویژگی روش کشت به ترتیب ۶۱/۵ ٪ و ۱۰۰ ٪ می‌باشد که نشان دهنده ویژگی بالای کشت در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری است. برای روش کشت ارزش اخباری مثبت و منفی به ترتیب ۱۰۰ و ۴۲/۳ درصد تعیین گردید. با استفاده از تست اوره آز سریع ۵۲ مورد مثبت (۵۲٪) از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی شناسایی شد که ۴۹ مورد از این ۵۲ مورد، جزو موارد مثبت تست PCR بودند ولی ۳ مورد که با تست اوره آز سریع نتیجه مثبت داشتند، در تست PCR نتیجه منفی داشتند. در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی اوره آز سریع ۸۳/۶٪ و ارزش اخباری مثبت و منفی این روش به ترتیب ۹۴/۲ و ۵۰ درصد در مقایسه با روش PCR تعیین گردید. نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده توسط آقای لی و همکاران ۷۸ مورد مثبت از ۱۰۰ نمونه بیوپسی را شناسایی نمود که باندهای حاصل ۴۱۷ جفت بازی بودند (شکل ۱).

بحث

مطالعه حاضر با هدف شناسایی باکتری در نمونه‌های بیوپسی با استفاده از پرایمر طراحی شده برای ژن اوره آز ureC (glmM) با روش مولکولی PCR و کشت و اوره آزسریع انجام گردید. با توجه به شیوع زیاد آلودگی و اهمیت پاتولوژیک هلیکوباکتر پیلوری تشخیص صحیح باکتری برای ریشه‌کنی و پی‌گیری درمان ضروری است (۸و۷). چندین تست برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری بر پایه علایم کلینیکی استفاده می‌شوند (۹و۸). در این پژوهش سعی بر مقایسه آزمون‌های مختلف و تعیین حساسیت و ویژگی تستهای تهاجمی کشت و اوره آز سریع در مقایسه با تست PCR گردید. M.shahamat و همکاران در سال ۲۰۰۴ به این نتیجه رسید که بهترین هدف برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری از نمونه های کلینیکی و آب پرایمر طراحی شده برای ژن (ureC (glmM می‌باشد. در این مطالعه از چندین سویه مثل ۸ سویه کمپیلو باکترژوژنی و ۲۱ سویه مختلف از سایر گونه‌های باکتری و ۶ گونه دیگر هلیکو باکتر استفاده شد که انتخابی بودن ژن ureC (glmM) برای جنس هلیکوباکتر اثبات گردید. در این مطالعه برای تشخیص جنس هلیکوباکتر از srRNA۱۶ و پرایمر ureA استفاده گردید که مشخص شد این دو الگو نمی‌توانند برخی از گونه‌های هلیکوباکتر را شناسایی کنند نتایج با آزمایش بر طیف وسیعی از باکتریها غیر از هلیکوباکتر انتخابی بودن ژن ureC (glmM) را اثبات نمود (۱۸). Jang-Jihla پنج پرایمر مختلف برای شناسایی H.pylori با استفاده از تکنیک PCR طراحی کرد. اهدافی که برای PCR انتخاب گردیدند عبارت بودند از srRNA۱۶، قسمتی از توالی کروموزوم به صورت تصادفی، یک آنتی ژن ۲۶ کیلودالتونی اختصاصی گونه (SSA)، اوره آز (ureA A) و اوره آز C (ureC). حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۶٪ با پرایمر طراحی شده برای ژن ureC در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری نمونه‌های بیوپسی دستگاه گوارش مشخص گردید (۱۹). برای شناسایی باکتری در پلاکهای دندانی و بزاق Goosen. C غلظت کم باکتری ۰.۱ pgr معادل ۵×۱۰^{۲} باکتری را با استفاده از روش PCR شناسایی نمود. در تست‌های مولکولی بر پایه بررسی DNA باید توالی DNA انتخاب شده اختصاصی سویه مورد نظر باشد که ژن ureC دارای چنین خاصیتی است و در ۶۰ نمونه که قبلاً بررسی گردیده در همه ایزوله‌ها وجود داشت و این ژن برای رشد باکتری ضروری است (۲۰). در مطالعه حاضر با استفاده از کشت ۴۸ مورد (۶۱/۵ ٪) از ۷۸ نمونه مثبت با PCR شناسایی گردید. حساسیت و ویژگی کشت در تشخیص هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب ۶۱/۵٪ و ۱۰۰٪ و ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب ۱۰۰٪ و ۴۲/۳٪ تعیین گردید. بنابراین اگر فردی با استفاده از کشت مبتلا تشخیص داده شد، ۱۰۰ درصد آلوده است. در مطالعه‌ی Figenozcay که در کشور ترکیه بر روی ۱۰۲ نمونه بیوپسی معده انجام گرفت، حساسیت کشت ۵۴/۹٪

گزارش گردیده است (۲۱). با بررسی ۳ مطالعه توسط Javier حساسیت و ویژگی کشت جهت شناسایی هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب ۴۵٪ (۵۱-۳۹٪) و۹۸٪ (۱۰۰-۹۲٪) تعیین گردید (۲۲). D.varia و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۰۲ انتخاب روش کشت را برای تعیین رژیم درمانی مناسب تشخیص دادند (۲۳). کشت باکتری از بیوپسی با مشکلات زیادی همراه است که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: آماده ساختن محیط کشت مخصوص، فراهم نمودن شرایط نگهداری و جلوگیری از آلودگی محیط کشت با سایر میکروارگانیسم‌ها که می‌توانند مانع رشد *هلیکوباکتر پیلوری* گردند، نیاز به چندین روز زمان و شرایط اختصاصی برای ظهور کلنی دارد. همچنین ایجاد فرم کوکوئید باکتری که می‌تواند حاصل از شرایط فیزیولوژیک خاص in vivo باشد، قابلیت کشت و جداسازی ندارند. حساسیت بدست آمده در این مطالعه از هر دوی مطالعات صورت گرفته بهتر بود. که علت آن تازه بودن محیط‌های کشت و رساندن سریع نمونه‌ها برای کشت و تبحر نمونه‌گیر که اکثر نمونه‌ها را از ناحیه آنتروم و در موارد سرطانی از جایی غیر از توده توموری نمونه‌گیری می‌کرد، اشاره نمود. تعداد ۳۰ موردی که با PCR نتیجه مثبت داشتند با کشت نتیجه منفی داشتند که از علل آن می‌توان به از دست دادن سریع قدرت حیات باکتری در محیط، مشکل بودن کشت و جداسازی اولیه باکتری به علت نیازهای تغذیه‌ای و شرایط انکوباسیون خاص باکتری، دخالت عواملی از قبیل توزیع باکتری در مخاط معده، آلودگیهای فورسپس و بکار بردن بی‌حس کننده‌های موضعی را ذکر کرد. همچنین می‌توان به تغییر فرم باکتری از مارپیچی به کوکوئیدی به علت تغییرات فیزیولوژیک و متابولیک اشاره نمود. فرم کوکوئید قابلیت کشت ضعیفی دارد. کشت با وجود ویژگی بالا از حساسیت قابل قبولی برای تشخیص دارا نمی باشد. در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی تست اوره آز سریع در مقایسه با PCR به عنوان استاندارد طلایی به ترتیب۳ /۸۶ ٪ و ۸۶/۳٪ و ارزش اخباری مثبت و منفی آن به ترتیب ۹۴/۲٪ و ۵۰ ٪ تعیین گردید. Figenozcay طی مطالعه‌ای بر روی ۱۰۲ نمونه بیوپسی معده، حساسیت تست اوره آز سریع ۸۹/۲٪ گزارش کرد (۲۱). با بررسی ۱۶ مطالعه توسط Javier P حساسیت و ویژگی تست اوره آز سریع جهت شناسایی هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب ۶۷ ٪ (۷۰-۶۴٪) و ۹۳٪ (۹۶-۹۰٪) تعیین گردید (۲۲). با توجه به نتایج حاصل تست اوره آز سریع به علت دسترسی آسان و حساسیت و ویژگی قابل قبول و ارزش اخباری ۹۴/۲٪ و این که جواب سریعتری می‌دهد از این تست می‌توان برای غربالگری استفاده نمود. ولی نتایج منفی این تست باید توسط سایر روش‌ها تایید گردد. مطالعات نشان می دهد که حساسیت این تست به وجود تعداد باکتری وابسته است؛ بنابراین برخی محققین استفاده از ۲ قطعه بیوپسی را پیشنهاد می‌کنند. در بررسی چمن رخ و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی نمونه‌های بافت بیوپسی معده چنین نتیجه‌گیری شد که با توجه به اینکه منفی شدن آزمون اوره آز سریع به معنی عدم آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری نمی‌باشد و مثبت شدن هم به علت حضور قطعی این باکتری نمی‌باشد و ممکن است به علت آلودگی با دیگر باکتری‌های اوره آز مثبت باشد، بنابراین می‌توان از تست PCR به عنوان یک روش مناسب و قابل اعتماد و با حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص ژن Urec در نمونه‌های بافت بیوپسی استفاده نمود. در این مطالعه آزمون PCR با تعداد جواب مثبت قطعی بیشتری نسبت به روش اوره آز سریع و حساسیتی بالاتر از روش فوق بدست آمد (۱۶). دکتر کارگر و همکاران در سال ۲۰۱۰ اعلام نمودند که روش PCR در مقابل اوره آز سریع و کشت از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار است و از این روش می‌توان به منظور تایید نهایی در شناسایی هلیکوباکتر پیلوری استفاده نمود (۲۴). با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر که درصد بیشتری از نمونه‌های مورد بررسی را در مقایسه با کشت و تست اوره آز سریع مثبت تشخیص داد، می‌توان استنباط کرد که پرایمر طراحی شده برای ureC(lglmM) از حساسیت و ویژگی خوبی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری برخوردار می‌باشد. علت این امر عدم نیاز به باکتری زنده و امکان تشخیص میزان کم باکتری با روش PCR می‌باشد. از فواید این تست امکان عود پیگیری درمان است.

نتیجه‌گیری

اگرچه هنوز کشت به عنوان یکی از روشهای قطعی برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد ولی پیچیده بوده و هزینه بالایی دارد. تست اوره آز سریع به علت دسترسی آسان و سادگی کاربرد زیادی دارد. و جواب معتبری می‌دهد ولی در افرادی که داروهای بلوکه کننده پمپ پروتون استفاده کرده‌اند فاقد ارزش است چون این داروها ممکن است آنزیم اوره آز باکتری را مهار سازند. تکنیک‌های مولکولی یک بستر اختصاصی با حساسیت بالا در تشخیص پاتوژنهای میکروبی ایجاد کرده است. در این روش از پروب اختصاصی ژن ureC برای تشخیص *H.pylori* در نمونه‌های بیوپسی معده استفاده می‌شود. این روش حتی در تشخیص فرم های کوکوئیدال غیر قابل کشت و وجود کم آلودگی را ممکن می‌سازد. تشخیص سریعتر و مطمئن‌تر می باشد. با توجه به سخت رشد بودن باکتری و همچنین پیچیده و هزینه بر بودن کشت تکنیک بیولوژی مولکولی توصیه می‌شود که در مورد هلیکوباکتر پیلوری پرایمرهای اختصاصی این ژن به علت House keeping بودن مفید می‌باشد. حساسیت و ویژگی تست PCR وابسته به پرایمری است که بکار برده می‌شود. در این تحقیق ما از پرایمر طراحی شده برای ژن ureC استفاده کردیم. تحقیقات دیگران نشان می‌دهد که پرایمرهایی که برای ژن ureC طراحی شده‌اند جواب معتبری عاید می‌سازند. با عنایت به این که ژن ureC دارای اندازه‌ای حدود ۱۳۳۵ جفت باز است بنابراین ممکن است اکثر پرایمرهای طراحی گردیده همپوشانی داشته باشند.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد است و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی آن دانشگاه به انجام رسیده است. که لازم است از زحمات بی شائبه شان که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند، صمیمانه قدردانی و تشکر نمائیم.

References

1. Guadalupe Cordova Espinoza M, Gonzalez Vazque R, Morales Mendez I, Ruelas Vargas C, Giono Cerezo S. Detection of the glmM Gene in Helicobacter pylori Isolateswith a Novel Primer by PCR. *Journal of clinical microbiology* 2011; **49**(4): 1650-1652.
2. Ferreira RM, Machado J, Letley D, Atherton JC, Pardo ML, Gonzalez C. A Novel Method for Genotyping the *Helicobacter pylori vacA* Intermediate Region Directly in Gastric Biopsy Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; **50**(12): 3983-3989.
3. Secka O, Antonio M, Tapgun M, Berg DE, Bottomley C, Thomas V, et.al. PCR-based genotyping of Helicobacter pylori of Gambian children and adults directly from biopsy specimens and bacterial cultures. *Gut Pathogens* 2011; **3**: 5.
4. Akanda MR, Rahman AN. Comparative Study of Different Methods for Detection of Helicobacter Pylori in Gastric Biopsies. *Dinajpur Med Col J* 2011; **4**(1): 1-6.
5. Talebi Bezmin Abadi A, Rafiei A, Ajami A, Hosseini V, Taghvaei T, Jones KR, et.al. Helicobacter pylori homB, but Not cagA, Is Associated with Gastric Cancer in Iran. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; **8**: 3191-3197.
6. Miernyk K, Morris J, Bruden D, McMahon B, Hurlburt D, Sacco F, et.al. Characterization of Helicobacter pylori cagA and vacA Genotypes among Alaskans and Their Correlation with Clinical Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; **12**: 3114-3121.
7. Okimoto T, Murakami K, Sato R, Miyajima H, Nasu M, Kagawa J, et.al. Is the Recurrence of *Helicobacter pylori* Infection after Eradication Therapy Resultant from Recrudescence or Reinfection, in Japan. *Helicobacter* 2003; **8**: 186-191.
8. Nafisi M.R, Alipour Shadbad M, Karimi A, Rahimian G. A, [PCR and RFLP of ureC (glmM) gene for identification and typing of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens of gastric patients]. *Kowsar Medical Journal* 2009; **14**(3): 143-148.
9. Attallah A, Ismail H, Ibrahim G, Abdel-Raouf M, El-Waseef A, Abdel-Wahab M. Use of a Novel Enzyme Immunoassay Based on Detection of circulating Antigen in Serum for Diagnosis of *Helicobacterpylori* Infection. *Clin Diagn Lab Immunology* 2004; **11**(4): 775-779.
10. Andrews J, Marsden B, Brown D, Wong VS, Wood E, Kelsey M. Comparison of three stool antigen tests for detection Helicobacter pylori. *J Clin Pathol* 2003; **56**: 769-771.
11. Reuse De, Labigne A, Mengin-Lecreulx D. The Helicobacter pylori ureC gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol* 1997; **179**: 3488-3493.
12. Moore RA, Kureish A, Wong S, Bryan LE. Categorization of clinical isolates of Helicobacter pylori on the basis of restriction digest analyses of polymerase chain reaction-amplified ureC genes J. *Clin Microbiol* 1993; **31**: 1334-1335
13. Jiang X, Doyl P. Growth supplements for Helicobacter pylori. *JCM May* 2000; **12**: 1984-1987.
14. yuen B, Zbinden R, Fried M, Bauerfeind P, Bernardi M. Cultural recovery and determination of antimicrobial susceptibility in Helicobacter pylori by using commercial transport and isolation media. *Infection* 2005; **33**: 77-81.
15. Paula Ortiz Godoy A, Lima Ribeiro M, Helena Borges Benvengo Y, Vitiello L, de Carvalho Bueno Miranda M, Mendonça S, et.al .Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in Helicobacter pylori clinical isolates. *BMC Gastroenterology* 2003; **3**: 20.
16. Chamanrokh P, Shahhosseiny MH, Mazaheri Assadi M, Nejadsattari T, Esmaili D. Comparison PCR method and Rapid Urease Test to detect Helicobacter Pylori in the gastric biopsy tissue samples. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2013; **3**(2): 104-110.
17. Li C, Musich PR, Ha T, Ferguson DA, Patel NR , Chi DS, et.al. High prevalence of Helicobacter pylori in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J clin pathol* 1995; **48**: 662-666.
18. Shahamat M, Alavi M, Watts J.E, Gonzalez J.M, Sowers K.R, Maeder D.W, et.al. Development of Two PCR-Based Techniques for Detecting Helical and Coccid Forms of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(8): 3613-3619.
19. Ihlu J, Perng C, Shyu R, Chen C, Lou Q, Chong S, Lee C. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacterpylori* DNA in Gastric Tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; **37**(3): 772-774.
20. Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree F, Olckers A, Botha S.J, et.al. Evaluation of a Novel Hemi nested PCR Assay Based on the Phosphoglucosamine Mutase Gene for Detection of *Helicobacter pylori* in Saliva and Dental Plaque. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**: 205-209.
21. ozçay F, Koçak N, Saltik Temizel, Hulya Demir, Hasan ozen, Aysel Yuce, et.al. *Helicobacter pylori* Infection in Turkish Children: Comparison of Diagnostic Tests, Evaluation of Eradication Rate, and Changes in Symptoms after Eradication. *Helicobacter* 2004; **9**: 242-248.
22. Gisbert JP, Abraira V. Accuracy of *Helicobacter pylori* Diagnostic Tests in Patients with Bleeding Peptic Ulcer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2006; **101**: 848-863.
23. Varia D, Gatta L, Ricci C, MIelioli M. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; **16** suppl.1: 16-23.
24. 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.