

## جداسازی هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR از آفت های دهانی بیماران مبتلا به

### آفت های راجعه دهانی در سال ۱۳۸۱ در شهر رشت

دکتر فریبرز منصور قناعی\* - دکتر مهدی آسمار\*\* - دکتر نور امیر مظفری\*\*\* - دکتر عباس افراه\*\*\*\* - دکتر سیامک گرانمایه\*\*\*\*\* -

دکتر امیر حسین باقرزاده\*\*\*\*\* - شبنم اکباتانی نژاد\*\*\*\*\*

\*دانشیار گروه داخلی - رئیس مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد - دانشگاه علوم پزشکی گیلان

\*\*استاد انگل شناسی انیستیتو پاستور ایران

\*\*\*استاد یار میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی ایران

\*\*\*\*متخصص علوم آزمایشگاهی بالینی

\*\*\*\*\*متخصص پاتولوژی

\*\*\*\*\*پزشک عمومی - کارشناس پژوهشی مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد - دانشگاه علوم پزشکی گیلان

\*\*\*\*\*دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

#### مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری در ایجاد آفت های راجعه دهانی یک نقش احتمالی پیشنهاد شده است (۲).

هلیکوباکتر پیلوری، باکتری گرم منفی خمیده یا اسپیرال است، که دارای تاژک های متعدد بوده و در محیط بی هوازی و یا نیمه هوازی رشد می کند، این میکروب با ترشح اوره آز و پروتئین های دیگر، فرصت می یابد که در سطح مخاط معده و در فواصل پرزهای آن در لابلای غشای مخاطی رشد و تکثیر نماید (۳و ۴).

این میکروب اولین بار در سال ۱۹۸۳ از یک نمونه بیوپسی معده انسان جدا شد. این باکتری به خوبی در محیط اسیدی معده میزبان زندگی می کند و در آنجا کلونی تشکیل می دهد و سبب گاستریت مزمن فعال و گاستریت حاد، زخم پپتیک، زخم اثنی عشر می شود. همچنین با کارسینوم معده و لنفوم اولیه معده از نوع سلولهای  $\beta$  در ارتباط می باشد (۵و ۶).

آفت های راجعه دهانی (Recurrent Aphthous Stomatitis) (RAS) اختلالی است که در بیماران، به صورت زخم هایی که به مخاط دهان محدود می گردد مشخص می شود. این مبتلایان در نوع عارضه دار این بیماری دچار مشکلاتی در صحبت کردن، خوردن مواد غذایی و زندگی عادی خود می باشند. بسیاری از محققان و متخصصان دندان پزشکی، RAS را به عنوان یک بیماری منفرد نمی شناسند چون چندین عامل پاتولوژیک با تظاهرات کلینیکی مشابه در این مورد وجود دارد، اختلالات ایمنولوژیک، نقص هماتولوژیک، آلرژی و یا غیرطبیعی بودن حالت فیزیولوژیک، در ایجاد RAS دخالت دارند. آفت های راجعه دهانی را طبق مشخصات کلینیکی به سه دسته تقسیم می نمایند: زخم های مینور، زخم های ماژور، و زخم های هرپتی فرم (۱).

به دلیل شباهت های بافت شناسی بین زخم پپتیک و آفت های راجعه دهانی و به دلیل نقش مهم هلیکو باکتر پیلوری در ایجاد زخم پپتیک در مقالات مختلف برای

### مواد و روش ها

در این مطالعه ۵۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند حداقل سن بیماران ۱۸ سال و حداکثر سن آنان ۶۰ سال بود این بیماران دارای آفت های راجعه دهانی بودند که اطراف زخم آفتی آنان را هاله قرمز رنگی احاطه کرده بود. این بیماران از سوی دندانپزشکان، کلینیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد بیمارستان رازی رشت، با اعلام آمادگی قبلی برای فرستادن بیمار به آزمایشگاه معرفی شده بودند و به آزمایشگاه دکتر افراه در رشت فرستاده می شدند. قبل از آزمایش طی پرسشنامه ای سابقه آفت، تعداد آفت و محل آن، وجود یا عدم وجود جرم دندانی، وجود اختلالات گوارشی شامل: سوء هاضمه، ترش کردن، سنگینی معده و سردل، سابقه زخم، پری معده، مورد ارزیابی قرار گرفت. ملاک اختلال گوارشی، مثبت بودن حداقل یکی از موارد فوق بود. از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه، افرادی مورد آزمایش قرار می گرفتند که در طی یک ماه یا سه هفته اخیر هیچ آنتی بیوتیکی مصرف نکرده باشند همچنین از داروهای استروئیدی نیز استفاده ننموده باشند و سابقه قبلی ابتلا به آفت نیز داشته باشند. در این صورت از آفت فعال بیمار با برس دندانی نمونه برداری شده و بر روی آن آزمایش PCR انجام می گرفت، PCR یک روش پیچیده مولکولی است که جهت تشخیص وجود DNA هلیکوباکتریلوری از نمونه های معده حساسیتی برابر ۹۵ درصد و ویژگی حدود ۱۰۰ در صد دارد (۱۰).

هرچند PCR روش بسیار دقیق برای تشخیص هلیکوباکتریلوری در دهان و پلاک های دندانی نیز می باشد (۲) ولی تکنیک ها و پرابمرهای مختلفی که در این روش به کار می رود نتایج مختلفی را در بر داشته اند، ما در این مطالعه جهت بررسی بیشتر نمونه های خود از عفونت هلیکو باکتر پیلوری، از یک تست سرولوژی با دقت بالا مانند ELISA (۱۰) استفاده نمودیم.

در سال ۱۹۸۹ این باکتری را از پلاک های دندانی جدا کردند و به همین دلیل حفره دهان را به عنوان مخزن ثانویه عفونت در نظر گرفتند (۵).

در سال ۱۹۹۷، Porter و همکارانش تحقیقاتی را در زمینه آنتی بادی (IgG) سرمی برای هلیکوباکتریلوری در بیماران دارای آفت های راجعه دهانی و سایر اختلالات دهانی، در لندن انجام دادند. در سال ۱۹۹۸، Chapman و همکارانش ارتباط بین زخم های آفتی و هلیکوباکتریلوری را با تست تشخیصی CLO (Campylobacter- Like Organisms) بررسی کردند. (۷ و ۸)

در سال ۱۹۹۹ Birek و همکارانش در ایتالیا تحقیقاتی را در زمینه جداسازی هلیکوباکتریلوری در زخم های آفتی دهان به روش Polymerase chain reaction (PCR) انجام دادند (۲).

در سال ۲۰۰۰ نیز مطالعه ای برای جداسازی DNA هلیکوباکتریلوری در بیماران مبتلا به RAS توسط Riggio و همکارانش با استفاده از تست PCR در شیکاگو صورت گرفت (۹). (نتایج حاصل از این مطالعات متعاقباً با نتایج مطالعه ما مقایسه خواهد شد).

با توجه به این نکته که بعضی از محققان، برای هلیکوباکتریلوری در توسعه آفت های راجعه دهانی نقشی پیشنهاد کرده اند و گروهی هم تحقیقاتی برای جداسازی هلیکوباکتریلوری از آفت های راجعه دهانی انجام داده که نتایج ضد و نقیضی را در برداشته است و از طرفی تحقیقی در زمینه بررسی وجود هلیکوباکتریلوری در آفت های راجعه دهانی در استان گیلان انجام نشده، لذا بر آن شدیم که چنین تحقیقی را در شهر رشت (مرکز گیلان) انجام دهیم از آنجایی که PCR یک روش حساس و سریع برای جداسازی هلیکوباکتریلوری در نمونه های زخم های راجعه دهانی می باشد (۳)، برای انجام این مطالعه از این روش مولکولی استفاده شده است.

مثبت شدن پاسخ سرولوژی، ارتباط معنی دار آماری وجود نداشت (Chi square test) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج تست ELISA و وجود اختلالات گوارشی در جنسهای مختلف در نمونه های مورد مطالعه

جمع	-		+		تست ELISA
	زن	مرد	زن	مرد	
۲۷	۶	۵	۵	۱۱	Positive
۲۳	۵	۸	۸	۲	Negative

### بحث و نتیجه گیری

با توجه به روش مولکولی PCR انجام گرفته در این تحقیق، تنها یک نمونه از ۵۰ نمونه مورد مطالعه، از نظر هلیکوباکتریپیلوری مثبت تشخیص داده شده که نشان می‌دهد با وجود شباهت‌های بافت شناسی موجود بین زخم معده و زخم آفت راجعه دهان، احتمال دارد هلیکوباکتریپیلوری در ایجاد آفت های راجعه دهانی تاثیری نداشته باشد.

این نتایج با نتایج تحقیقات Porter و همکارانش در سال ۱۹۹۷ و Chapman و همکارانش در سال ۱۹۹۸ همخوانی دارد. Porter و همکارانش نتیجه مطالعات خود را بدین صورت بیان کرده بودند که به نظر نمی‌رسد،

نمونه‌های مورد مطالعه باشد و یا به این علت که تنها با یک روش سرولوژی (اندازه گیری IgG) نتوان به نتیجه قاطع یا مطلوبی دست یافت.

Chapman و همکارانش با انجام تست CLO بر روی نمونه‌های بیوپسی شده از آفت دهان بیماران مورد مطالعه شان، بیان نمودند که هلیکوباکتریپیلوری در زخم های آفتی بیمارانشان وجود ندارد. (۷)

Riggio و همکارانش نیز با انجام تست PCR بر روی نمونه‌های بیوپسی شده از آفت دهان توانستند DNA هلیکوباکتریپیلوری را در ۱۱ درصد نمونه های مورد نظر خود جدا نمایند و بیان کردند که نتایج به دست آمده از

استخراج DNA در روش PCR بر اساس روش High Pure PCR Template Preparation Kit انجام شده و از Helicobacter Pylori PCR Detection Kit برای انجام PCR استفاده می‌شد و از طرفی از بیماران به منظور سنجش میزان آنتی بادی IgG ضد هلیکوباکتریپیلوری، نمونه خون گرفته شده که با روش ELISA (کیت شرکت RADIM) میزان آنتی بادی آنها گزارش می‌گردید.

### نتایج

از ۵۰ بیمار مورد مطالعه ۲۶ نفر مرد و ۲۴ نفر زن بودند و میانگین سنی آنها  $32/38 \pm 11/30$  سال بوده، ۴۲ بیمار (۸۴ درصد) از نظر جرم دندان مثبت بودند ۲۷ نفر (۵۴ درصد)، با توجه به پرسش نامه‌های پر شده از نظر اختلالات گوارشی مثبت گزارش شدند و ۲۶ نفر (۵۲ درصد) هم دارای تیتراژ IgG بالاتر از  $30 \text{ u/ml}$  بودند یعنی از نظر آنتی بادی (IgG) ضد هلیکوباکتریپیلوری مثبت بودند و ۱۰ نفر (۲۰ درصد) با وجود عدم اختلالات گوارشی دارای تیتراژ IgG مثبت بودند همچنین ۱۱ نفر (۲۲ درصد) از افرادی که از نظر سرولوژی هلیکوباکتریپیلوری منفی بودند اختلال گوارشی داشتند از نتایج آزمایش PCR فقط یک نمونه مثبت از نظر وجود DNA هلیکوباکتریپیلوری به دست آمد. البته به طور ضمنی عنوان می‌شود در نمونه های فوق بین وجود اختلال گوارشی و نیز بین جنسیت و هلیکوباکتریپیلوری اهمیت اتیولوژیکی در ایجاد RAS داشته باشد و علت این نتیجه را بر این اساس بیان نمودند که فرکانس Seropositivity ضد هلیکوباکتریپیلوری به طور عمده در آزمایشاتشان در بیماران با آفت های راجعه دهانی (۳۰/۶ درصد) مقایسه شده با بیماران دارای سایر لزیون های زخمی مخاط دهان (۳۳ درصد) و کنترل‌ها (۲۴ درصد)، اختلاف قابل توجهی را نشان نداده است (۸). با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، ارتباطی بین اختلالات گوارشی و میزان IgG ضد هلیکوباکتریپیلوری نیز که یکی از اهداف زمینه‌ای این طرح بود، به دست نیامد که شاید به علت کم بودن (۵۰ مورد) تعداد

۲. پرایمر های مورد استفاده از اختصاصیت خوبی برخوردار نبودند .

۳. در نمونه‌های مورد بررسی واقعاً این باکتری در آفت‌های دهانی بیماران وجود نداشته است.

در نهایت امر در مطالعه ما بین RAS و هلیکوباکتریلوری ارتباطی دیده نشد لذا مطالعه دیگری با حجم نمونه و دقت بالاتر جهت اثبات عدم وجود این ارتباط از نظر ما توصیه می‌شود.

**تقدیر و تشکر:** بدین وسیله از زحمات سرکار خانم دکتر مریم ربیعی، اعضای مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان رازی رشت و پرسنل آزمایشگاه دکتر افراه که با همکاری صمیمانه و بی‌دریغ آنها این طرح به انجام رسید تشکر می‌شود.

تحقیقاتشان نمی‌تواند نقش اتیولوژیکی قوی را برای هلیکوباکتریلوری در ایجاد RAS حمایت نماید(۹).

اما نتایج حاصل از مطالعه ما با نتایج تحقیقات Birek و همکارانش در سال ۱۹۹۹ مغایرت دارد(۲).

Birek و همکارانش با انجام تست PCR بر روی نمونه‌های آفت دهان به روش سوآپ توانستند، DNA هلیکوباکتریلوری را از آفت‌دهان به میزان ۷۱/۹ درصد جدا سازی نمایند و نتایج خود را بدین صورت بیان نمودند که هلیکوباکتریلوری می‌تواند غالباً با RAS ارتباطی داشته باشد.(۲)

در این تحقیق، ما نتوانستیم از آفت‌های راجعه بیمارانمان به جز یک مورد، هلیکوباکتریلوری را جدا نماییم علل احتمالی که برای این نتیجه می‌توان در نظر گرفت :

۱. روش استخراج DNA هلیکوباکتریلوری مورد استفاده از دقت بالایی برخوردار نبوده است.

#### منابع

- Greenberg MS, Glick M. Burket's oral Medicine: Diagnosis and Treatment. 10 th ed. Reven press. Philadelphia: 2003: 63-65.
- Birek C, Grandhi R, Mc Neill K, et al. Detection of Helicobacter Pylori in oral Aphthous Ulcers. J Oral Pathol Med 1999: 28(5): 197-203.
- Jordan RC, Diss TC, Millson C, et al. Absence of Helicobacter pylori DNA in Salivary Lymphoepithelial Lesions. J Oral Pathol Med 1997: 26 (10): 454-7.
- Susceptibilities of Helicobacter Pylori Strains to 20 Antimicrobial Agents. J Clin Microbiol 1997: 35(7)1842-46.
- Chapman MS, Cimis RJ, Baughman RD. Lack of Association Between Aphthous Ulcers and Helicobacter Pylori. Arch Dermatol 1998: 134.(12): 1634-5.
- Porter SR, Barker GR, Scully C, et al. Serum IgG Antibodies to Helicobacter Pylori in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis and Other Oral Disorders. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997: 83(3):325-8.
- Riggio MP, Lennon A, Wray D. Detection of Helicobacter pylori DNA in Recurrent Aphthous Stomatitis Tissue by PCR. J Oral Pathol Med 2000: 29 (10):507-13.
- Reeves G. Helicobacter pylori screening .In: Immunology HAPS. January 2000, Available at: <http://www.haps.nsw.gov.au/edrsrch/edinfo/hpylscrn.htm>
- Greenwood D, Slack RC, Peeatherer JF. Medical Microbiolog. 6 th ed. BC Decker Inc. TORONTO: 2002: 291-295.
- Thomas E, Jiang C, Chi DS, et al. The Role of Oral Cavity in Helicobacter Pylori Infection. Am J Gastroenterol 1997: 92 (12):2148-54.
- Piccolomini R, Di Bonaventura G, Catamo G, et al. Comparative Evaluation of E Test, Ager Dilution and Broth Microdilution for Testing

