



ارزش تشخیصی آزمون اوره‌آز سریع در مقایسه با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری

زهرا پاکباز^۱، محمدحسن شیرازی^{۱*}، محمدرضا پورمند^۱، حسین اژدرکش^۲،

زیبا ویسی ملک‌شاهی^۳، داوود افشار^۱، سارا حاجی‌خانی^۱، نادیا مردانی^۱

^۱ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲ گروه آموزش داخلی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه شاهد

(دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۱۰ - پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۴)

چکیده

زمینه: روش‌های رایج تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) شامل آزمون اوره‌آز سریع (RUT)، آزمون اوره تنفسی، هیستولوژی، کشت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) می‌باشد. روش‌ها RUT به‌علت آسانی، سریع بودن و دقت بالا شایع‌ترین روش مورد استفاده برای تشخیص این باکتری می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی روش تشخیصی RUT در مقایسه با PCR جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ۹۴ بیمار دچار اختلالات گوارشی مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان فیروزگر شهر تهران وارد مطالعه شدند. از هر بیمار گوارشی ۲ نمونه بیوپسی از قسمت انتروم معده برای آزمون اوره‌آز سریع و PCR تهیه شد. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ وارد و حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی RUT نسبت به PCR محاسبه گردید. آزمون استاندارد طلایی برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری در این مطالعه، PCR در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها: با توجه به نتایج آزمون، میزان حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی آزمون اوره‌آز سریع به ترتیب ۹۷/۲ درصد، ۸۹/۲ درصد، ۸۱/۴ درصد و ۹۸ درصد بود.

نتیجه‌گیری: چنانچه ملاحظه می‌شود آزمون اوره‌آز سریع از حساسیت و اختصاصیت بالایی برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری برخوردار است.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، آزمون اوره‌آز سریع، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، بیوپسی

* تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری^۱، باکتری خمیده شکل و گرم منفی است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ جداسازی شد. این باکتری مهم‌ترین علت بیماری‌های معده‌ای روده‌ای از جمله گاستریت، زخم اثنی‌عشر و سرطان معده است (۱). شیوع عفونت با این باکتری بالاست و به‌طور کلی نیمی از مردم جهان به این باکتری آلوده‌اند (۲).

با این‌حال شیوع عفونت ناشی از این باکتری در کشورهای جهان سوم بیشتر است و میزان شیوع آن در کشور ایران ۹۰ درصد گزارش شده است (۳).

شناسایی هلیکوباکتر پیلوری به‌عنوان یکی از عوامل اصلی بیماری‌های گوارشی، در پیش‌آگهی و درمان اهمیت فراوانی دارد. روش‌های تشخیصی هلیکوباکتر پیلوری عمدتاً به دو دسته‌ی تهاجمی و غیرتهاجمی تقسیم‌بندی می‌شوند. در روش‌های تهاجمی از بیوپسی معده برای آزمون‌های هیستولوژی، کشت، آزمون اوره‌آز سریع (RUT) و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) استفاده می‌شود. روش‌های غیرتهاجمی شامل آزمون اوره‌آز تنفسی و سرولوژی می‌باشد که در این روش‌ها از نمونه‌های خون، بازدم، مدفوع، ادرار یا بزاق جهت تشخیص باکتری استفاده می‌شود (۴ و ۵).

یکی از خصوصیات مهم هلیکوباکتر پیلوری این است که اگر چه باکتری اسیدوفیل نیست، اما می‌تواند در محیط اسیدی معده زنده مانده و مستقر شود. علت اصلی مقاومت این باکتری به اسید، آنزیم اوره‌آز است که اوره را به آمونیاک و بی‌کربنات هیدرولیز می‌کند.

بی‌کربنات تولید شده به یک مولکول آمونیاک دیگر و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود. آمونیاک تولید شده به سرعت pH را در اطراف سلول باکتری افزایش می‌دهد

(۶). استفاده از آنزیم اوره‌آز به‌عنوان روشی جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری اولین بار توسط مک‌نلتی (McNulty) در سال ۱۹۸۵ ابداع شد. اساس این آزمون متکی بر وجود اوره‌آز از قبل تولید شده توسط باکتری در نمونه‌های بیوپسی می‌باشد (۷). در آزمون اوره‌آز سریع، آنزیم اوره‌آز باکتری، اوره موجود در محیط را هیدرولیز کرده و با تولید آمونیاک یک pH قلیایی ایجاد کرده که باعث تغییر رنگ مارکر pH می‌شود. این آزمون معمولاً در طی یک ساعت مثبت می‌شود ولی خواندن جواب مثبت تا ۲۴ ساعت توصیه شده است. تمام ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای آنزیم اوره‌آز هستند ولی میزان فعالیت آن در سویه‌های مختلف بسته به شرایط رشد باکتری متفاوت است (۸).

کلینتون (Clayton) و همکاران سیستم PCR را برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری راه‌اندازی نمودند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس را می‌توان با استفاده از هدف‌های ژنی متعدد برای تشخیص ژن‌های متعدد هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی یا کشت، نمونه بزاق، شیر معده و مدفوع استفاده کرد. از پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری، پرایمرهای مربوط به ژن اوره‌آز، ژن ۱۶S rRNA و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. با استفاده از این تکنیک می‌توان مقادیر خیلی کم DNA باکتری را شناسایی نمود. خصوصیت مهم این روش حساسیت زیاد آن می‌باشد (۹).

با توجه به اینکه استفاده از آزمون اوره‌آز سریع یک روش پر کاربرد در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد و انجام آزمون PCR جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری معمول نمی‌باشد، بنابراین در این مطالعه حساسیت و ویژگی آزمون اوره‌آز در مقایسه با

¹Helicobacter pylori

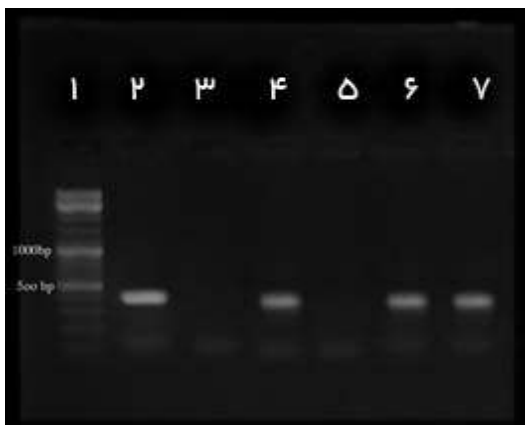
آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در طی سال ۱۳۹۰ بر روی بیماران با علائم گوارشی مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان فیروزگر تهران و بیماران بستری در بخش داخلی (گوارش) این بیمارستان که بنا به تشخیص پزشک متخصص تحت اندوسکوپی قرار گرفته بودند انجام گرفت. جامعه مورد مطالعه تعداد ۹۴ بیمار بدون محدودیت سنی و جنسی بود. در بین بیماران تحت مطالعه، بیمارانی که اخیراً داروهای حاوی بیسموت، آنتی‌بیوتیک و مهار کننده‌های پمپ پروتون دریافت کرده بودند از مطالعه حذف شدند. بعد از اخذ رضایت‌نامه، از هر بیمار، دو نمونه بیوپسی از قسمت انتروم معده گرفته شد. یکی از نمونه‌ها جهت بررسی آزمون اوره‌آز، در دمای محیط در میکروتیوپ حاوی اوره ۱۰ درصد + فنل قرار گرفت. در صورتی که نمونه مورد نظر بلافاصله بعد از قرارگیری در محیط اوره تا ۴ ساعت بعد از آن، باعث تغییر رنگ محیط اوره (از رنگ زرد به ارغوانی) می‌شد به‌عنوان نمونه اوره‌آز مثبت تلقی می‌گردید.

نمونه دیگر جهت بررسی ملکولی در میکروتیوپ حاوی نرمال سالین استریل قرار گرفت که بعد از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد. استخراج DNA نمونه‌های ذخیره شده، برای انجام آزمون PCR با استفاده از DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) انجام گرفت. جهت تکثیر بخشی از ژن *ureA*، پرایمر پیشرو *ureAF5'-CCCAATGGTAAATTAGTT-3'* و پرایمر

که *ureAR5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'* در مطالعه قبلی طراحی شده بود (۱۰) مورد استفاده قرار گرفت. این پرایمرها طوری طراحی شده‌اند که قادرند قطعه‌ای با اندازه ۴۱۱ جفت باز (bp) را تکثیر نمایند (شکل ۱).



شکل ۱) تصویر الکتروفورز محصولات PCR ژن *ureA* به ترتیب: چاهک ۱: مارکر DNA چاهک ۲ و ۳: کنترل مثبت و منفی، چاهک ۴ و ۷ نمونه‌های دارای ژن *ureA*، چاهک ۵: نمونه فاقد ژن *ureA*

جهت تکثیر قطعه مورد نظر از ژن *ureA*، در یک حجم ۵۰ میکرولیتری از ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲۵ میکرولیتر HotStarTaq Master Mix Kit، ۴ میکرولیتر پرایمر (۴۰۰ng) (Forward and Reverse primer) و ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده استفاده گردید.

برنامه مورد استفاده برای تکثیر این ژن عبارت بود از: یک دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه اولیه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی شامل: سیکل ۹۵ درجه برای ۱ دقیقه، ۴۵ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه و در نهایت یک دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه. سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR، در ژل ۲ درصد آگاروز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و سپس با استفاده از UV ترانسلومیناتور در حضور یک مارکر DNA (fermentas, ۱۰۰bp) باندها مشاهده و

بحث

اساس آزمون اوره‌آز سریع، بررسی فعالیت آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری است که این آنزیم اوره را به یک ملکول دی‌اکسیدکربن و دو ملکول آمونیاک تبدیل کرده و آمونیاک آزاد شده منجر به افزایش pH می‌شود (۱۱).

RUT نسبت به سایر آزمون‌های تشخیصی هلیکوباکتر پیلوری بیشترین کاربرد را دارد و علت آن آسانی، کم‌هزینه بودن و پاسخ سریع آن نسبت به سایر آزمون‌های تشخیصی این باکتری است (۱۲).

حساسیت آزمون بستگی به تعداد باکتری‌های موجود در نمونه بیوپسی دارد. به‌طور کلی تعداد ۱۰۴ باکتری برای ایجاد پاسخ مثبت لازم می‌باشد. مصرف داروهای حاوی بیسموت، آنتی بیوتیک و مهارکننده‌های پمپ پروتون حساسیت آزمون را کاهش می‌دهد و منجر به ایجاد پاسخ منفی کاذب می‌گردد (۱۳). مواردی که می‌توانند منجر به ایجاد پاسخ مثبت کاذب این آزمون شوند آلودگی باکتریایی با ارگانسیم‌هایی مانند پروتئوس یا سودوموناس (هر چند به میزان کم) است (۱۴). مورد دیگری که می‌تواند منجر به ایجاد پاسخ مثبت کاذب آزمون اوره‌آز سریع گردد احتمال وجود هلیکوباکتر هلمانی (*Helicobacter heilmannii*) می‌باشد. هلیکوباکتر هلمانی در معده حدود ۲ درصد از بیمارانی که تحت اندوسکوپی قرار می‌گیرند وجود دارد و به میزان کمی فعالیت اوره‌آزی دارد که می‌تواند منجر به ایجاد پاسخ مثبت کاذب شود (۱۷-۱۵).

حساسیت و ویژگی RUT تحت تأثیر عوامل مختلف قرار می‌گیرد به‌طوری که اگر بیش از یک قطعه بیوپسی در ویال حاوی محیط اوره قرار داده شود، حساسیت آزمون افزایش می‌یابد ولی بر اختصاصیت آزمون اثری ندارد (۱۸) یا در صورتی که جواب آزمایش در کمتر از ۱ ساعت بررسی شود، ویژگی

با مارکر مقایسه گردید. داده‌ها در نرم‌افزار SPSS (USA, Il.Chicago.SPSS Inc) ویرایش ۱۹ وارد گردید و جهت بررسی میزان توافق دو آزمون کیفی از روش کاپا استفاده شد.

یافته‌ها

جمعیت مورد مطالعه تعداد ۹۴ بیمار (۵۸ مرد و ۳۶ زن) دارای علائم گوارشی با محدوده سنی ۱۷ تا ۷۶ سال و میانگین سنی ۴۶ سال بود. از مجموع ۹۴ بیمار، آزمون اوره‌آز سریع برای ۴۳ (۴۵/۷ درصد) بیمار مثبت و برای ۵۱ (۵۴/۲ درصد) بیمار منفی گزارش گردید. آزمایش PCR برای ۳۶ (۳۸/۳) بیمار مثبت و ۵۸ (۶۱/۷ درصد) بیمار منفی شد (جدول ۱).

جدول ۱) نتایج حاصل از PCR و RUT در بیماران

گوارشی در بیمارستان فیروزگر تهران در سال ۱۳۹۰

	مثبت	منفی	جمع
آزمون اوره‌آز	۴۳	۵۱	۹۴
PCR	۳۶	۵۸	۹۴

با توجه به اینکه در این مطالعه روش PCR به‌عنوان روش استاندارد طلایی در نظر گرفته شده است بنابراین ویژگی و حساسیت RUT نسبت به PCR محاسبه گردید و نتایج به‌صورت زیر به‌دست آمد. با توجه به مقدار آزمون کاپا (۰/۸۳) دو آزمون PCR و RUT میزان توافق بالایی دارند.

جدول ۲) نتایج آزمون اوره‌آز در مقایسه با PCR جهت

تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران گوارشی

استاندارد	آزمون اوره‌آز	حساسیت	ویژگی	PPV	NPV	کاپا
PCR	اوره‌آز	۹۷/۲	۸۹/۲	۸۱/۴	۹۸	۰/۸۳

PPV: ارزش اخباری مثبت (positive predictive value)
NPV: ارزش اخباری منفی (negative predictive value)

سریع و PCR را در مقایسه با مطالعه کارگر و همکاران نشان می‌دهد.

مطالعه حاضر به علت حذف بیمارانی که سابقه مصرف داروهای حاوی بیسموت، آنتی‌بیوتیک و مهار کننده‌های پمپ پروتون داشتند حساسیت بیشتری داشت. در کل مطالعه تعداد ۸ مورد مثبت کاذب و ۱ مورد منفی کاذب مشاهده شد.

متأسفانه در ایران، در بسیاری از مراکز اندوسکوپی تنها از آزمون اوره‌آز جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری استفاده می‌شود. در صورتی که به پزشکان توصیه شده است تنها از RUT به‌عنوان تنها آزمون تشخیصی عفونت این باکتری استفاده نشود بلکه باید برای تأیید حضور هلیکوباکتر پیلوری از حداقل ۲ آزمون از بین آزمون‌های RUT، کشت باکتریایی، PCR، UBT (آزمون اوره تنفسی) و هیستولوژی استفاده شود تا بتوان وجود یا عدم وجود عفونت هلیکوباکتر پیلوری را با قطعیت بیشتری گزارش داد.

سپاس و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران می‌باشد. بدین‌وسیله از پزشکان و پرستاران محترم بخش اندوسکوپی بیمارستان فیروزگر تهران جهت همکاری در تهیه نمونه سپاس و قدردانی می‌گردد.

References:

- Sanders MK, Peura DA. Helicobacter pylori-Associated Diseases. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4: 448-54.
- Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, et al. Distinctiveness of genotypes of Helicobacter pylori in Calcutta, India. *J Bacteriol* 2000; 182: 3219-27.
- Dabiri H, Maleknejad P, Yamaoka Y, et al. Distribution of Helicobacter pylori cagA, cagE, oipA, and vacA in different major ethnic groups in Tehran, Iran. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1380-6.
- Vaira D, Malfertheiner P, Mègraud F, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group. *Lancet* 1999; 354: 30-3.
- Mostaghni A, Eghbali S, Afarid M.

- Evaluation of brushing cytology in the diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis. *ISMJ* 2008; 10: 136-42.
6. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* 2000; 2: 55-60.
 7. McNulty CA, Wise R. Rapid diagnosis of *Campylobacter*-associated gastritis. *Lancet* 1985; 1: 1443-4.
 8. Bijlsma JJ, Lie-A-Ling M, Nootenboom IC, et al. Identification of loci essential for the growth of *Helicobacter pylori* under acidic conditions. *J Infect Dis* 2000; 182: 1566-9.
 9. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, et al. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 192-200.
 10. Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A, et al. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 83-8.
 11. Salvir SA, Whitt DD, editors. *Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach*. 2nd ed. Washington D.C: ASM press; 2002: p. 510-42.
 12. Said RM, Cheah PL, Chin SC, et al. Evaluation of a new biopsy urease test: Pronto Dry, for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 195-9.
 13. Dickey W, Kenny BD, McConnell JB. Effect of proton pump inhibitors on the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 289-93.
 14. Katelaris PH, Lowe DG, Norbu P, et al. Field evaluation of a rapid, simple and inexpensive urease test for the detection of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7: 569-71.
 15. Heilmann KL, Borchard F. Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut* 1991; 32: 137-40.
 16. Peutz T, Vakil N, Phadnis S, et al. The PyloriTek test and the CLO test: accuracy and incremental cost analysis. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 254-7.
 17. Jhala D, Lopez I, Atkinson BF, et al. *Gastrospirillum hominis*: the association with peptic ulcer disease and modes of detection. *Gastroenterology* 1996; 110: A143.
 18. Lam SK, Talley NJ. Report of the 1997 Asia Pacific Consensus Conference on the management of *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 1-12.
 19. Megraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 215: 57-62.
 20. Ogata SK, Kawakami E, Patrício FR, et al. Evaluation of invasive and non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in symptomatic children and adolescents. *Sao Paulo Med J* 2001; 119: 67-71.
 21. Gottaslou R, Kazemi B, Megraud F, et al. Value of Urease Test in the detection of *Helicobacter pylori* infections. *J Jahrom Univ Med Sci* 2005; 2: 5-11.
 22. Kargar M, Razavizadegan SH, Eshraghian K, et al. Role of Rapid Urease test in comparison with PCR for *Helicobacter Pylori* infection diagnosis. *J Microbiol World* 2009; 2: 31-6.

Original Article

Evaluation of Rapid Urease Test Compared with Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of *Helicobacter pylori*

Z. Pakbaz¹, MH. Shirazi^{1*}, MR. Pourmand¹, H. Azhdarkosh², Z. Vaise Malekshahi³, D. Afshar¹, S. Hajikhani¹, N. Mardani¹

¹ Department of Pathobiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

² Department of Internal Training, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN

³ Department of Biotechnology, School of Sciences, Shahed University, Tehran, IRAN

(Received 31Dec, 2011 Accepted 23Feb, 2012)

Abstract

Background: Current diagnostic methods for detecting *Helicobacter pylori* infection include rapid urease test (RUT), urea breath test (UBT), histology, culture, and polymerase chain reaction (PCR). RUT is the most commonly method to diagnose *Helicobacter pylori* infection because of its simple, rapid and accurate characters. The aim of this study is evaluation of rapid urease test compared with PCR for diagnosis of *Helicobacter pylori*.

Material and Methods: In this study 94 patients with dyspeptic symptoms attending the endoscopy suite of gastroenterology section of the Firouzgar University Hospital, Tehran, Iran, were enrolled. Patient's antrum biopsy specimens were collected at endoscopy for the rapid urease test and PCR. Data was recorded on a data sheet and analyzed using SPSS version 19.0. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of RUT was compared against PCR. The gold standard test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection was PCR.

Results: Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of RUT respectively were 97.2%, 89.2%, 81.4% and 98%.

Conclusion: RUT has high sensitivity and specificity for detection of *Helicobacter pylori* infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, rapid urease test, PCR, biopsy

*Address for correspondence: Department of Microbiology, School of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: mhshirazi@tums.ac.ir