جدا سازی هلیکوباکتر پیلوری به روشPCR از آفت های دهانی بیماران مبتلا به آفت های راجعه دهانی در سال ۱۳۸۱ در شهر رشت

دکتر فریبرز منصور قناعی* ـ دکتر مهدی آسمارـ دکتر نور امیر مظفری*** ـ دکتر عباس افراه**** ـ دکتر سیامک گرانمایه***** ـ**

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

***استادیار 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

آفت‌های راجعه دهانیRecurrent Aphthous Stomatitis (RAS) اختلالی است که در بیماران ،به صورت زخم‌هایی که به مخاط دهان محدود می گردد مشخص می‌شود. 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 دندانپزشکی، RAS را به عنوان یک بیماری منفرد نمی شناسند چون چندین عامل پاتولوژیک با تظاهرات کلینیکی مشابه در این مورد وجود دارد، اختلالات ایمونولوژیک، نقص هماتولوژیک، آلرژی و یا غیرطبیعی بودن حالت فیزیولوژیک، در ایجاد RAS دخالت دارند. آفت‌های راجعه دهانی را طبق مشخصات کلینیکی به سه دسته تقسیم می‌نمایند: زخم‌های مینور، زخم های ماژور، و زخم‌های هرپتی فرم(۱).

به دلیل شباهت‌های بافت شناسی بین زخم پپتیک و آفت‌های راجعه دهانی و به دلیل نقش مهم هلیکو باکترپیلوری در ایجاد زخم پپتیک درمقالات مختلف برای هلیکوباکترپیلوری در ایجاد آفت های راجعه دهانی یک نقش احتمالی پیشنهاد شده است(۲).

هلیکوباکترپیلوری، باکتری گرم منفی خمیده یا اسپیرال است، که دارای تاژک های متعدد بوده و در محیط بی‌هوازی و یا نیمه هوازی رشد می کند، این میکروب با ترشح اوره‌آز و پروتئین های دیگر، فرصت می یابد که در سطح مخاط معده و در فواصل پرزهای آن در لابلای غشای مخاطی رشد وتکثیر نماید(۳و٤).

این میکروب اولین بار در سال ۱۹۸۳ از یک نمونه بیوپسی معدهٔ انسان جدا شد. این باکتری به خوبی در محیط اسیدی معدهٔ میزبان زندگی می‌کند و در آنجا کلونی تشکیل می‌دهد و سبب گاستریت مـزمن فـعال و گاستریت حاد، زخم پپتیک، زخـم اثنی عشر می‌شود. همچنین با کارسینوم معده و لنفوم اولیهٔ معده از نوع سلولهای β در ارتباط می باشد(۵و٦).

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

در سال ۱۹۹۷ ، Porter و همکارانش تحقیقاتی را در زمینهٔ آنتی بادی(IgG)سرمی برای هلیکوباکترپیلوری در بیماران‌دارای‌آفت‌های‌راجعهٔ دهانی‌وسایر اختلالات دهانی، درلندن‌انجام دادند. درسال ۱۹۹۸،Chapman و همکارانش ارتباط بین زخم‌های آفتی و هلیکوباکترپیلوری را با تست تشخیصی CLO (Campylobacter- Like 0rganisms) بررسی کردند.(۷و۸)

در سال ۱۹۹۹ Birek و همکارانش در ایتالیا تحقیقاتی را در زمینهٔ جداسازی هلیکوباکترپیلوری در زخم های آفتی دهان به روشPolymerase chain reaction (PCR) انجام دادند(۲).

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

با توجه به این نکته که بعضی از محققان، برای هلیکوباکترپیلوری در توسعهٔ آفت های راجعهٔ دهانی نقشی پیشنهاد کرده‌اند و گروهـی هم تحقیقاتی بـرای جـداسازی هلیکوباکترپیلوری از آفت‌های راجعه دهانی انجام داده که نتایج ضد و نقیضی را در برداشته است و از طرفی تحقیقی در زمینهٔ بررسی وجودهلیکوباکترپیلوری در آفت‌های 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 هلیکوباکترپیلوری در نمونه های زخم‌های راجعه دهانی می‌باشد(۳)، برای انجام این مطالعه از این روش مولکولی استفاده شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه ۵۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند حداقل سن بیماران ۱۸ سال و حداکثر سن آنان ٦۰ سال بود این بیماران دارای آفت های راجعه دهانی بودند که اطراف زخم آفتی آنان را هالهٔ قرمز رنگی احاطه کرده بود. این بیماران از سوی دندانپزشکان، کلینیک پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان رازی رشت، با اعلام آمادگی قبلی برای فرستادن بیمار به آزمایشگاه معرفی شده بودند وبه آزمایشگاه دکتر افراه در رشت فرستاده می شدند. قبل ازآزمایش طی پرسشنامه ای سابقهٔ آفت، تعداد آفت و محل آن، وجود یا عدم وجود جرم دندانی، وجود اختلالات گوارشی شامل: سوء هاضمه، ترش کردن، سنگینی معده و سردل، سابقهٔ 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 هفتهٔ اخیر هیچ آنتی‌بیوتیکی مصرف نکرده باشند همچنین از داروهای استروئیدی نیز استفاده ننموده باشند و سابقهٔ قبلی ابتلا به آفت نیز داشته باشند. در این صورت از آفت فعال بیمار با برس دندانی نمونـه برداری شده وبـر روی آن آزمایش PCR انجام می‌گرفت، PCR یک روش پیچیدهٔ مولکولی است که جهت تشخیص وجود DNA هلیکوباکترپیلوری از نمونه‌های معده حساسیتی برابر ۹۵ درصد و ویژگی حدود ۱۰۰ در صد دارد(۱۰).

هرچند PCR روش بسیار دقیق برای تشخیص هلیکوباکترپیلوری در دهان و پلاک های دندانی نیز می‌باشد(۲) ولی تکنیک‌ها و پرایمرهای مختلفی که در این روش به کار می‌رود نتایج مختلفی را در بر داشته‌اند، ما در این مطالعه جهت بررسی بیشتر نمونه‌های خود ازعفونت هلیکو باکتر پیلوری، از یک تست سرولوژی با دقت بالا مانند ELISA (۱۰) استفاده نمودیم.

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

نتایج

از ۵۰ بیمار مورد مطالعه ۲۶ نفر مرد و ۲۴ نفر زن بودند و میانگین سنی آنها ۱۱/۳۰±۳۲/۳۸ سال بوده، ۴۲ بیمار (۸۴ درصد) از نظر جرم دندانی 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 تیتر IgG بالاتر از ۳۰u/ml بودند یعنی از نظر آنتی بادی(IgG) ضد هلیکوباکتورپیلوری مثبت بودند و ۱۰ نفر (۲۰ درصد) با وجود عدم اختلالات گوارشی دارای تیتر IgG مثبت بودند همچنین ۱۱ نفر (۲۲درصد)ازافرادی‌که از نظر سرولوژی هلیکوباکترپیلوری منفی بودند اختلال گوارشی داشتند از نتایج آزمایش PCR فقط یک‌نمونه‌مثبت از نظر وجود DNA هلیکوباکترپیلوری به دست آمد. البته به طور ضمنی عنوان می شود در نمونه های فوق بین وجود اختلال گوارشی و نیز بین جنسیت و هلیکوباکترپیلوری اهمیت اتیولوژیکی درایجاد RAS داشته باشد و علت این نتیجه را بر این اساس بیان نمودند که فرکانس Seropositivity ضد هلیکوباکترپیلوری به طور عمده در آزمایشاتشان در بیماران با آفت های راجعهٔ 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 هلیکوباکترپیلوری نیز که یکی از اهداف زمینه‌ای این طرح بود، به دست نیامد که شاید به علت کم بودن (۵۰ مورد) تعداد مثبت شدن پاسخ سرولوژی، ارتباط معنی دار آماری وجود نداشت (Chi square test) (جدول شمارهٔ ۱).

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

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

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به روش مولکولی PCR انجام گرفته در این تحقیق، تنها یک نمونه از ۵۰ نمونه مورد مطالعه، از نظر هلیکوباکترپیلوری مثبت تشخیص داده شده که نشان می‌دهد با وجود شباهت‌های بافت شناسی موجود بین زخم معده و زخم آفت راجعه دهان، احتمال دارد هلیکوباکترپیلوری 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 نتیجهٔ 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 نتیجهٔ 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 هلیکوباکترپیلوری 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 هلیکوباکترپیلوری را در ۱۱ درصد نمونه های مورد نظر خود جدا نمایند و بیان کردند که نتایج به دست آمده از

تحقیقاتشان نمی تواند نقش اتیولوژیکی قوی را برای هلیکوباکترپیلوری 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 وهمکارانش‌با انجام تست PCR بر روی نمونه‌های آفت دهان به روش سوآپ توانستند، DNA هلیکوباکتر پیلوری را ازآفت‌دهان به میزان۷۱/۹درصدجداسازی نمایند و نتایج خود را بدین صورت بیان نمودند که هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند غالباً با RAS ارتباطی داشته باشد.(۲)

در این تحقیق، ما نتوانستیم از آفت های راجعهٔ بیمارانمان به جز یک مورد، هلیکوباکترپیلوری را جدا نماییم علل احتمالی که برای این نتیجه می توان در نظر گرفت :

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

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

۳. در نمونه‌های موردبررسی واقعاً این باکتری درآفت‌های دهانی بیماران وجود نداشته است.

در نهایت امر در مطالعهٔ ما بین RAS و هلیکوباکترپیلوری ارتباطی‌دیده نشد لذا مطالعهٔ دیگری با حجم نمونه و دقت بالاترجهت‌اثبات‌عدم‌وجوداین‌ارتباط ازنظرماتوصیه‌می‌شود.

تقدیروتشکر: بدین‌وسیله‌اززحمات 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.

منابع

1.Greenberg MS, Glick M. Burket's oral Medicine: Diagnosis and Treatment. 10 th ed. Reven press. Philadelphia: 2003: 63-65.

2.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.

3.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.

7.Chapman MS, Cimis RJ, Baughman RD. Lack of Association Between Aphthous Ulcers and Helicobacter Pylori. Arch Dermatol 1998: 134.(12): 1634-5.

8. Porter SR, Barker GR, Scully C, et al. Serum IgG Antibodies to Helicobacter Pylori in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis and Other Oral

4.Greenwood D, Slack RC, Peeatherer JF. Medical Microbilog. 6 th ed. BC Decker Inc. TORONTO: 2002: 291-295.

5.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.

6. Piccolomini R,Di Bonaventura G,Catamo G, et al. Comparative Evaluation of E Test, Ager Dilution and Broth Microdilution for Testing

Disorders. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997: 83(3):325-8.

9.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.

10.Reeves G. Helicobacter pylori screening .In: Immunology HAPS. January 2000, Available at: http://www.haps.nsw.gov.au/edrsrch/edinfo/hpylscrn.htm