

Guinea Pig as an Appropriate Model for Colonization of *Helicobacter pylori*

Parastoo Saniee¹, Farideh Siavoshi², Abdolfattah Sarrafnejad³, Maryam Kadivar⁴,
Sadegh Massarrat⁵

¹Researcher, Microbiology Department, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

²Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

³Professor, Department of Pathology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Associate Professor, Department of Pathology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵Professor, Digestive Disease Research Institute, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background :

Animal models have been proven useful in elucidating the details of interaction between pathogenic bacteria and their human hosts, in addition to assessing the efficacy of therapeutic compounds and vaccines. In this study, we investigate the colonization of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in experimentally-infected guinea pigs over a six-month period.

Materials and Methods:

A bacterial suspension was prepared by mixing four *H. pylori* isolates obtained from patients diagnosed with gastric ulcer. Within a one week period, five female guinea pigs were dosed orally with bacterial suspension for a total of three times. One control animal was gavaged with normal saline. Stool samples were collected at two-week intervals for six months. We used PCR, the stool antigen test, and indirect immunofluorescence assay (IFA) to assess samples for the presence of *H. pylori*. Stomachs obtained from two chloroform-killed animals, at 8 and 24 weeks, were investigated for histopathologic changes.

Results:

H. pylori 16S rDNA was amplified from the stool samples of five guinea pigs. The stool antigen test was also positive in all five animals. IFA demonstrated the presence of *H. pylori* antigens in the stools from all five animals. PCR, stool antigen test and IFA results showed no *H. pylori* in the stool of the control animal. We observed infiltration of mature lymphocytes and plasma cells in the stomachs of animals killed at 8 and 24 weeks.

Conclusion:

The occurrence of *H. pylori* 16S rDNA and antigens in stool samples of guinea pigs demonstrated persistent colonization of *H. pylori* in the stomachs of guinea pigs. Histopathological findings have confirmed mild-severe gastritis induced by the bacterial infection. The stomach of a guinea pig is similar to the human stomach, in that it is sterile, lined by glandular epithelium, lacks a vitamin C synthesizing system and produces the cytokine interleukin-8. Accordingly, the guinea pig can be considered an appropriate animal model for long-term experiments to follow the process of *H. pylori* pathogenesis or to assess the efficacy of antibiotics or vaccines.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Guinea pig; Colonization

please cite this paper as:

Saniee P, Siavoshi F, Sarrafnejad A, Kadivar M, Massarrat S. Guinea Pig as an Appropriate Model for Colonization of *Helicobacter pylori*. *Govaresh* 2013;17:236-44.

Corresponding author:

Farideh Siavoshi, MD

Microbiology Department, Faculty of Sciences,

University of Tehran, Tehran, 14155-6455 Iran

Tel: +98 451 5513915

Fax: +98 451 5514701

E-mail: Siavoshi@khayam.ut.ac.ir

Received: 05 Aug. 2012

Edited: 10 Nov. 2012

Accepted: 11 Nov. 2012

خوکچه هندی - یک مدل حیوانی مناسب برای مطالعه استقرار هلیکوباکتر پیلوری در معده

پرستو صنیعی^۱، فریده سیاوشی^۲، عبدالفتاح صراف نژاد^۳، مریم کدیور^۴، صادق مسرت^۵

^۱ پژوهشگر، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۲ دانشیار، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
^۳ استاد، گروه پاتوبیولوژی، بخش ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۴ دانشیار، بخش پاتوبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۵ استاد، پژوهشکده بیماری های گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

مدل های حیوانی ابزار مناسبی برای بررسی اندرکنش باکتریهای بیماریزا با میزبان انسانی و همچنین مطالعه اثر ترکیبات درمانی و واکسن ها هستند. در این مطالعه استقرار هلیکوباکتر پیلوری (*H.pylori*) در معده خوکچه هندی در طول مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی:

سوسپانسیون مخلوط از چهار سویه *H.pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده تهیه و سه بار در طول یک هفته به پنج خوکچه هندی ماده خوراندند. به یک خوکچه هندی به عنوان شاهد تنها سرم فیزیولوژی خوراندند. نمونه مدفوع حیوانات به فواصل دو هفته و به مدت شش ماه جمع آوری شد. حضور *H.pylori* در نمونه های مدفوع به روش PCR، تست آنتی ژن مدفوع و رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس غیر مستقیم بررسی شد. دو حیوان در هفته ۸ و ۲۴ به وسیله کلروفرم کشته شدند و معده آنها از نظر بافت شناسی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها:

ژن *rDNA* ۱۶S مربوط به *H.pylori* از نمونه مدفوع هر پنج حیوان تکثیر شد. تست آنتی ژن مدفوع در هر پنج حیوان مثبت شد. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس غیر مستقیم حضور آنتی ژن های *H.pylori* را در نمونه های مدفوع نشان داد. ارتشاح سلول های لنفوسیتی بالغ و پلاسماسل ها در معده دو حیوان کشته شده مشاهده شد.

نتیجه گیری:

حضور ژن *rDNA* ۱۶S و آنتی ژن های مربوط به *H.pylori* در نمونه های مدفوع نشان دهنده استقرار پایدار *H.pylori* در معده خوکچه های هندی بود. بررسی بافت شناسی وجود التهاب متوسط تا شدید را در معده حیوانات کشته شده نشان داد. معده خوکچه هندی از نظر استریل بودن، داشتن بافت اپی تلیوم غده ای، فقدان سیستم سنتز ویتامین C و تولید سیتوکین اینترلوکین-۸ با معده انسان شباهت دارد. بنابراین، خوکچه هندی می تواند مدل مناسبی جهت مطالعات دراز مدت عفونت *H.pylori* و همچنین بررسی اثر آنتی بیوتیک ها و واکسن ها باشد. **کلید واژه:** هلیکوباکتر پیلوری، خوکچه هندی، استقرار، آنتی ژن مدفوع، ایمونوفلورسنس، PCR

گوارش/ دوره ۱۷، شماره ۴/ زمستان ۱۳۹۱/ ۲۴۴-۲۳۶

نویسنده مسئول: فریده سیاوشی

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، بخش

میکروبیولوژی، کد پستی: ۱۴۱۷۶۱۴۴۱۱

تلفن: ۰۲۱-۶۶۱۱۲۴۶۰

نمابر: ۰۲۱-۶۶۴۹۲۹۹۲

پست الکترونیک: Siavoshi@khayam.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۵

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۱/۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۱

زمینه و هدف:

هلیکوباکتر پیلوری (*H.pylori*) یک باکتری گوارشی بیماریزا است که به طور طبیعی تنها در معده انسان مستقر شده و با التهاب مزمن معده، زخم های معده و دوازدهه، سرطان معده و لنفومای مالت در ارتباط است. (۱) نوع و شدت تظاهرات بالینی عفونت *H.pylori* در افراد مختلف متفاوت بوده و به فاکتورهای بیماریزایی باکتری، پلی مورفیسم ژنی میزبان و عوامل محیطی وابسته است. (۲، ۳) با اینکه در مورد اندرکنش باکتری با میزبان انسانی مطالعات گسترده ای انجام شده ولی بسیاری

می‌کند. (۲۰) به نظر می‌رسد که اینترلوکین - ۸ نقش مهمی در ایجاد گاستریت دارد. (۲۱)

دانشمندان به دنبال راهکارهایی هستند که بتوان مدل حیوانی آلوده را به مدت طولانی مورد مطالعه قرار داد و در فواصل زمانی معین بدون نیاز به کشتن از حیوان نمونه تهیه کرد. همچنین با دنبال کردن سیر عفونت، به چگونگی بیماریزایی باکتری در انسان پی برد. مهمترین امتیاز این روش زنده نگه داشتن حیوان و مطالعه آن در زمان طولانی است. با این روش نه تنها می‌توان مراحل استقرار و بیماریزایی باکتری را بررسی کرد، بلکه ارزیابی کارایی داروها و واکسن‌ها نیز امکان پذیر خواهد بود. در این مطالعه امکان استقرار *H.pylori* در معده خوکچه هندی برای مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از روش‌های غیر تهاجمی PCR بر روی نمونه مدفوع، تست آنتی ژن مدفوع و رنگ آمیزی ایمونوفلورسینس غیرمستقیم مدفوع استفاده شد.

روش بررسی:

جداسازی و تعیین هویت اولیه سویه های *H.pylori*

چهار نمونه بیوپسی از بیماران مبتلا به زخم معده که به بخش آندوسکوپی پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند گرفته شد. بیوپسی‌ها بر روی محیط پروسلا آگار حاوی ۵٪ خون دفیبرینه گوسفند و آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین (۱۰ mg/l)، تری متوپریم (۵ mg/l) و پلی میکسین B (۵۰ µg/l) کشت داده شدند. پس از ۳-۵ روز گرمخانه گذاری در شرایط کم هوایی، کلنی‌های براق و ریز به قطر ۱-۲ میلی متر جداسازی و خالص شدند. هویت باکتری‌های به دست آمده بر اساس رنگ آمیزی گرم و شکل میکروسکوپی باکتری و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اوره آز و اکسیداز تایید شد. سویه‌های به دست آمده از ۴-۱ نامگذاری شدند.

تایید هویت سویه های *H.pylori* با روش PCR

باکتری‌ها به محلول بافر فسفات نمکی (X1) منتقل شدند و استخراج DNA ژنومی آنها با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی AccuPrep® (بیونیر، کره) انجام شد. سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HP-R: 5'-GCAATCAGCGTCAGTAATGTTTC-3' و HP-R: 5'-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3' تکثیر ژن *rDNA* ۱۶S مربوط به *H.pylori* در این سویه‌ها بررسی شد. برنامه دمایی و زمانی PCR طی ۴۵ سیکل به این صورت بود: سه دقیقه واسرشتی اولیه در C ۹۴، یک دقیقه واسرشتی در C ۹۴، یک دقیقه اتصال پرایمرها در C ۵۶، یک دقیقه مرحله تکثیر در C ۷۲ و ۱۰ دقیقه تکثیر نهایی در C ۷۲. محصولات PCR با استفاده از آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. از یک سویه *H.pylori* که قبلاً ژن *rDNA* ۱۶S آن تعیین ترادف شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

از جزئیات مهم در این ارتباط همچنان ناشناخته باقی مانده است. یکی از روش‌هایی که به پیشبرد این مطالعات کمک می‌کند استفاده از مدل‌های حیوانی است. امروزه استفاده از مدل‌های حیوانی به منظور مطالعه چگونگی استقرار و بیماریزایی باکتری‌ها و همچنین بررسی اثر آنتی بیوتیک‌های جدید برای درمان عفونت‌های میکروبی اهمیت قابل توجهی پیدا کرده است. (۴) یک حیوان زمانی مدل مناسبی برای مطالعه بیماریزایی باکتری به شمار می‌رود که بتوان عوارض ناشی از پاسخ ایمنی میزبان نسبت به عفونت را شبیه آنچه در انسان اتفاق می‌افتد مشاهده کرد. همچنین باید امکان جداسازی باکتری از حیوان و مقایسه بیان فاکتورهای بیماریزای آن در مراحل مختلف عفونت وجود داشته باشد. (۵)

موش یکی از رایج‌ترین مدل‌های حیوانی برای مطالعه سیر عفونت زایی *H.pylori* و سایر باکتری‌ها می‌باشد. نشان داده شده در صورتی که موش تحت تأثیر رژیم غذایی پر نمک یا ترکیبات سرطان‌زای شیمیایی قرار گیرد مستعد ابتلا به سرطان معده شده و عفونت *H.pylori* تشکیل این سرطان را تسریع می‌کند. (۶) با این وجود استفاده از موش دارای محدودیت‌هایی است. عفونت *H.pylori* در موش‌ها اغلب منجر به التهاب معده می‌شود و به زخم و یا سرطان معده پیشروی نمی‌کند. (۷-۹)، همچنین معده موش برخلاف معده انسان استریل نیست و ممکن است وجود باکتری‌های دیگر نتیجه عفونت *H.pylori* را تحت تأثیر قرار دهند. در سال ۱۹۹۱ اولین گزارش مبنی بر استقرار *H.pylori* در مخاط معده جربیل (Mongolian gerbil) منتشر شد. (۱۰) در جربیل پیشرفت عفونت *H.pylori* به آتروفی و متاپلازیای روده ای نیز مشاهده شده است. (۱۱ و ۱۲) از جربیل جهت شناسایی فاکتورهای بیماریزای چگونگی استقرار *H.pylori* و همچنین بررسی کارایی آنتی بیوتیک‌ها و واکسن‌ها استفاده‌های زیادی شده است. (۹ و ۱۳).

در اواخر دهه ۹۰، خوکچه هندی برای اولین بار به عنوان مدل حیوانی برای مطالعه عفونت *H.pylori* مطرح شد. (۱۴ و ۱۵) از میان حیوانات کوچک آزمایشگاهی، خوکچه هندی دارای معده مشابه انسان است. معده این حیوان فاقد فلور میکروبی بوده و دارای بافت اپی‌تلیوم غده ای است و بنابراین معده خوکچه هندی نسبت به موش و سایر جوندگان، شباهت بیشتری به معده انسان دارد. (۱۵) خوکچه هندی، تنها حیوان آزمایشگاهی است که مانند انسان فاقد آنزیم گلوکونلاکتون اکسیداز بوده و در نتیجه قادر به سنتز ویتامین C نیست. بنابراین در دستگاه گوارش خوکچه هندی مانند انسان سیستم انتقال ویتامین C وجود دارد که این سیستم در حیوانات دیگر وجود ندارد. (۱۶ و ۱۷) مشخص شده است که در انسان ابتلا به عفونت *H.pylori* رابطه مستقیم با کمبود ویتامین C دارد. (۱۸) همچنین از لحاظ پاسخ ایمنی شباهت قابل توجهی بین انسان و خوکچه هندی وجود دارد. خوکچه هندی مانند انسان قادر به تولید و ترشح اینترلوکین - ۸ است. (۱۹) اینترلوکین - ۸ در پاسخ به عفونت از بافت معده ترشح شده و به عنوان یک کموکین برای فراخوان نوتروفیل‌ها به محل عفونت عمل

انتخاب حیوانات

شش خوکچه هندی ماده با وزن حدود ۳۰۰ تا ۴۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری و برای انجام آزمایش ها به حیوانخانه دانشکده داروسازی دانشگاه تهران منتقل شدند. شماره گذاری حیوانات ۵-۱ و ۶ به عنوان شاهد بدون تلقیح انجام شد. هر کدام از حیوانات در قفس های جداگانه قرار گرفتند. انتخاب حیوان ماده به این علت بود که پاسخ ایمنی در جنس نر خوکچه هندی قوی تر از جنس ماده است و استقرار *H.pylori* در معده خوکچه ماده ساده تر صورت می گیرد. به منظور اطمینان از عدم آلودگی قبلی با *H.pylori*، مدفوع تازه حیوانات جمع آوری و DNA با استفاده از کیت استخراج DNA مدفوع (بیونیر، کره) استخراج شد. سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *16S rDNA* مربوط به *H.pylori* به روش گفته شده، انجام گرفت. از کشت خالص *H.pylori* که قبلاً تعیین هویت شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تلقیح سوسپانسیون مخلوط باکتریها به حیوانات

جهت آلوده سازی حیوانات از مخلوط چهار سویه *H.pylori* استفاده شد. برای افزایش شانس استقرار باکتری در معده حیوانات، تغذیه آنها ۲۴ ساعت پیش از انجام تلقیح قطع شد. یک سوسپانسیون از چهار سویه *H.pylori* در سرم فیزیولوژی تهیه شد و کدورت آن مطابق با استاندارد مک فارلند شماره ۲ (معادل 6×10^8 سلول در هر میلی لیتر) تنظیم شد. حجم های یک میلی لیتری از این سوسپانسیون به وسیله لوله مخصوص پلی اتیلنی به صورت مستقیم درون معده هر پنج خوکچه هندی (خوکچه ۵-۱) ریخته شد. این عمل سه بار در طول یک هفته و با فاصله های زمانی هر دو روز یکبار تکرار شد. به خوکچه هندی باقی مانده (شماره ۶) به عنوان شاهد تنها سرم فیزیولوژی خوراندند. پس از آخرین تلقیح تغذیه حیوانات به صورت معمول شروع شد.

جمع آوری و نگه داری مدفوع حیوانات

نمونه مدفوع تازه همه حیوانات ۲، ۴ و ۸ هفته پس از انجام آخرین تلقیح جمع آوری و در فریزر -20°C نگه داری شد. پس از این که حیوان شماره ۵ در هفته هشتم برای بررسی بافت معده کشته شد، نمونه گیری مدفوع از حیوانات ۴-۱ و ۶ در هفته های ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ ادامه یافت.

بررسی مدفوع حیوانات به روش CR

جهت انجام PCR، DNA ژنومی از نمونه های مدفوع نگه داری شده در 20°C استخراج شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز نمونه ها در ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد. سپس تکثیر ژن اختصاصی *16S rDNA* مربوط به *H.pylori* در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

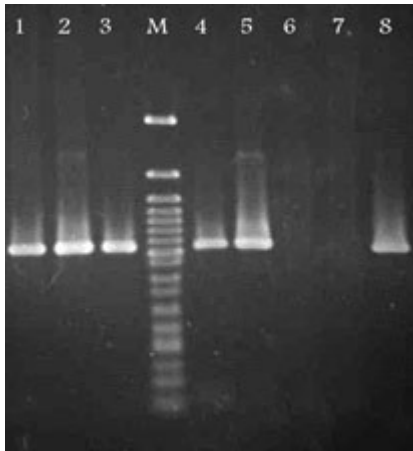
تست آنتی ژن مدفوع

تست آنتی ژن مدفوع بر روی خوکچه های ۶-۱ در هفته هشتم و در مورد خوکچه های ۴-۱ و ۶ در هفته ۲۴ با استفاده از کیت الایزا (آسترا، ایتالیا) و مطابق دستور العمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت آماده سازی نمونه ها یک گرم از نمونه مدفوع در یک ویال ریخته شد و سپس ۸۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده به آنها اضافه شد. نمونه ها ورتکس و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی نمونه ها به همراه نمونه های کنترل منفی و مثبت موجود در کیت، به گوده هایی که محتوی آنتی بادی اول (پلی کلونال آنتی بادی علیه *H.pylori* در بافر پروتئینی) بودند، اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای 37°C ، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با آنزیم Horseradish peroxidase به گوده ها اضافه شد و گرماگذاری برای مدت یک ساعت تکرار شد. گوده های میکروپلیت با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شستشوی نمکی حاوی Thimerosal (IX) و ماده سورفاکتانت، شسته شدند. این کار شش بار تکرار شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترا (بافر حاوی تترامتیل بنزیدین) به گوده ها اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در 37°C قرار گرفت. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش (اسید سولفوریک ۰/۳ مولار) افزوده شد. جذب میزان رنگ ایجاد شده در طول موج $450/630\text{ nm}$ توسط دستگاه ELISA reader خوانده شد. در این تست میزان جذب نور مورد قبول در طول موج $450/630\text{ nm}$ برای نمونه منفی کمتر از ۰/۱۵۰ و برای نمونه مثبت بیشتر از ۰/۲۵۰ در نظر گرفته شد.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس غیر مستقیم *H.pylori* در نمونه های

مدفوع

ابتدا ۱۰۰ میلی گرم نمونه مدفوع در بافر فسفات نمکی به صورت سوسپانسیون در آمد و در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. از مایع رویی با استفاده از بافر فسفات نمکی رقت ۱/۴ تهیه شد و ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی لام قرار گرفت. لام ها در دمای اتاق خشک شدند. سپس رقت ۱/۳۲ آنتی بادی مونوکلونال ضد *H.pylori* موشی از نوع IgG۱ (یو-اس بیولوژیکال، آمریکا) به عنوان آنتی بادی اولیه و رقت ۱/۳۲ آنتی بادی ضد IgG موشی تهیه شده در بز و کونژوگه شده با فلورسئین ایزو تیوسیانات (سیگما، آمریکا) به عنوان آنتی بادی ثانویه در مراحل رنگ آمیزی استفاده شدند. رنگ Evans blue (سیگما، آمریکا) نیز به منظور افزایش کیفیت تصویر استفاده شد. این رنگ در طول موج 490 nm ، رنگ فلورسنت قرمزی ایجاد می کند که به تباین رنگ سبز تصاویر کمک می کند. نمونه مدفوع حیوان شماره ۶ (بدون تلقیح) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. اسلایدها با میکروسکوپ فلورسنت و در طول موج 490 nm بررسی شدند.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR ژن ۱۶S rDNA تکثیر شده از نمونه های مدفوع حیوانات ۸ هفته پس از تلقیح *H.pylori*. ستون های ۱-۳ و ۴ و ۵: مدفوع حیوانات ۱-۵، ستون ۶: مدفوع حیوان ۶ (بدون تلقیح)، ستون ۷: کنترل منفی (بدون DNA)، ستون ۸: کنترل مثبت، M: مارکر DNA ۵۰ جفت بازی

PCR، پیش از دو هفته نشان دهنده عفونت نبوده و ممکن است باکتری بدون استقرار و تنها به صورت گذرا از دستگاه گوارش دفع شود. تکثیر ژن ۱۶S rDNA از مدفوع حیوانات در هفته های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ پس از تلقیح، وجود *H.pylori* را در مدفوع حیوانات تأیید کرد. نتیجه PCR مدفوع حیوان شماره ۶ (بدون تلقیح) منفی بود (شکل ۲).

تست آنتی ژن مدفوع

در هفته هشتم میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰/۶۳۰ nm در مدفوع حیوانات ۱-۵ آلوده شده بالاتر از ۰/۲۵۰ بود و در هفته ۲۴ جذب نور خوانده شده در حیوانات ۱-۴ به طور واضحی افزایش نشان داد. در هر دو مرحله، میزان جذب نور در مدفوع حیوان ۶ (بدون تلقیح) کمتر از ۰/۱۵۰ بود (شکل ۳).

رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس غیر مستقیم *H.pylori* در نمونه های مدفوع

در بررسی اسلایدها با میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۴۹۰ nm، نقاطی که آنتی بادی اولیه و ثانویه به آنها متصل شده بودند، به رنگ فلورسنت مشاهده شد که مربوط به فلورسئین ایزوتیوسیانات در آنتی بادی ثانویه است. در رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس *H.pylori* به عنوان کنترل مثبت اشکال مارپیچی باکتری به رنگ سبز فلورسنت مشاهده شدند (شکل ۴-الف). اتصال اختصاصی آنتی بادی به آنتی ژن در نمونه مدفوع همه حیوانات آلوده دیده شد (شکل ۴-ب). رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس غیرمستقیم نمونه مدفوع در حیوان ۶ (بدون تلقیح) منفی بود (شکل ۴-ج).

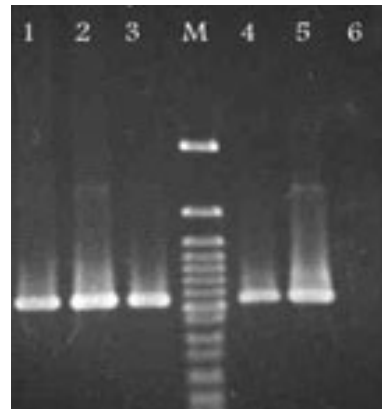
بافت شناسی معده جهت مطالعه التهاب

بررسی بافت شناسی در مورد دو حیوان به صورت تصادفی انجام شد. معده حیوانات شماره ۵ و ۴ به ترتیب پس از ۸ و ۲۴ هفته بعد از آخرین تلقیح مورد بررسی قرار گرفت. بعد از کشتن حیوانات به وسیله کلروفورم معده آنها برداشته شد و از منطقه خم بزرگ برش خورد. پس از تخلیه محتویات معده، کل بافت معده در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه بافت شناسی، معده حیوانات در پارافین قرار داده و جهت مطالعه بافت شناسی برش های پنج میکرومتری از آن تهیه شد. اسلایدها با رنگ های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

یافته ها:

هویت باکتریها

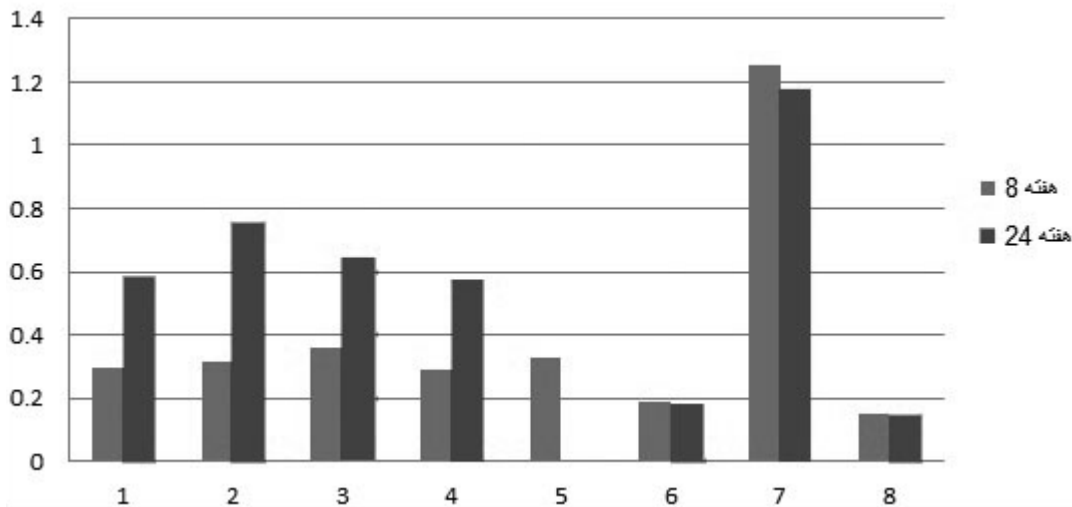
اشکال مارپیچی *H.pylori* جدا شده از بیوپسی های معده که به روش گرم رنگ آمیزی شده بودند با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. تست های کاتالاز، اکسیداز و اوره آز در مورد هر چهار سویه *H.pylori* مثبت بود. الکتروفورز محصولات PCR تکثیر قطعه ۵۱۹ جفت بازی اختصاصی ژن ۱۶S rDNA مربوط به *H.pylori* را در این سویه ها نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن ۱۶S rDNA مربوط به *H.pylori*. ستون های ۱-۳ و ۴: سویه های *H.pylori* (۱-۴)، ستون ۵: کنترل مثبت، ستون ۶: کنترل منفی (بدون DNA)، M: مارکر DNA ۵۰ جفت بازی

بررسی وجود *H.pylori* در مدفوع حیوانات به روش PCR

عدم تکثیر قطعه اختصاصی ۵۱۹ جفت بازی در مدفوع حیوانات پیش از تلقیح باکتری نشان داد که هیچ کدام از حیوانات به صورت طبیعی به *H.pylori* آلوده نبوده اند. اولین PCR نمونه مدفوع، دو هفته پس از آخرین تلقیح باکتری به حیوانات انجام شد. علت این امر آن است که جواب مثبت



	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
هفته ۸	۰/۲۹۸	۰/۳۱۴	۰/۳۵۷	۰/۲۸۸	۰/۳۲۵	۰/۱۸۸	۱/۲۵۳	۰/۱۵۰
هفته ۲۴	۰/۵۸۴	۰/۷۵۲	۰/۶۴۲	۰/۵۷۴	-	۰/۱۸۰	۱/۱۷۷	۰/۱۴۵

شکل ۳: مقادیر جذب خوانده شده در طول موج ۴۵۰/۶۳۰nm در نمونه‌های مدفوع حیوانات. نمودارهای ۵-۱ مربوط به جذب مدفوع حیوانات ۱-۵، نمودار ۶: مربوط به جذب نمونه مدفوع حیوان ۶ (بدون تلقیح)، نمودار ۷: کنترل مثبت، نمودار ۸: کنترل منفی. خط قرمز در این نمودار نشان دهنده ۰/۲۵۰ می‌باشد و نمونه‌هایی که مثبت هستند، در بالای این خط قرار دارند.

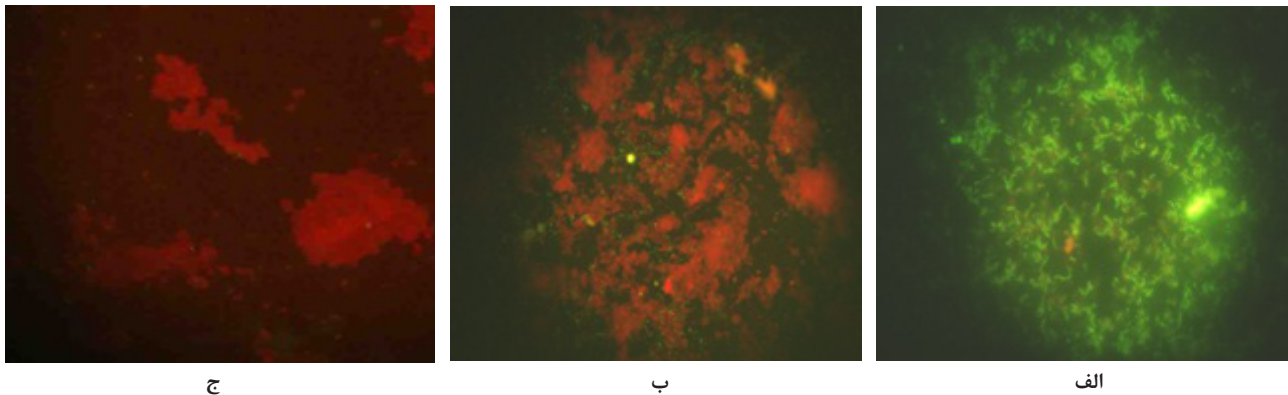
یافت‌شناسی

برش‌های رنگ شده از بخش آنتروم معده حیوانات ۵ و ۴ که به ترتیب پس از ۸ و ۲۴ هفته پس از تلقیح باکتری کشته شده بودند با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. تجمع سلول‌های لنفوسیتی بالغ و پلازما سل‌ها در مخاط این ناحیه وجود التهاب متوسط تا شدید در معده این حیوانات نشان داد (شکل ۵-الف). در برش‌ها زخم، گاستریت آتروفیک و یا متاپلازیای روده ای مشاهده نشد. هیچ کدام از این تغییرات در تنه معده دو حیوان مشاهده نشد (شکل ۵-ب).

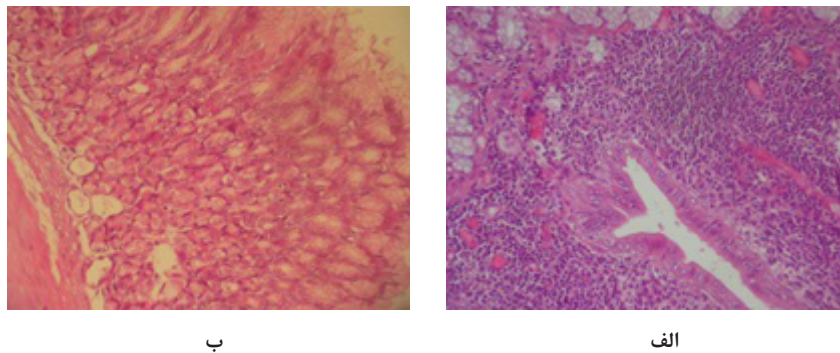
بحث :

در سال ۱۹۹۴ در پی اثبات ارتباط مستقیم بین عفونت *H.pylori* و سرطان معده، *H.pylori* به عنوان یکی از عوامل مهم ایجاد سرطان معده شناخته شد و در گروه سرطان‌های درجه I قرار گرفت. (۲۲) بدین ترتیب بررسی مکانیسم اثر این باکتری و چگونگی ایجاد سرطان اهمیت زیادی پیدا کرد. از آنجا که *H.pylori* به صورت طبیعی تنها در معده انسان مستقر می‌شود، برای بررسی جوانب مختلف واکنش باکتری و میزبان نیاز به یک مدل حیوانی است که عوارض گوارشی ناشی از عفونت در آن تا حد ممکن شبیه انسان باشد. (۴) تاکنون انواع مختلفی از مدل‌های حیوانی برای

مطالعه *H.pylori* مطرح شده‌اند. عفونت این باکتری به صورت کوتاه مدت در سگ، میمون، خوک، موش سفید و گربه ایجاد شده ولی در هیچکدام متاپلازی و سرطان دیده نشده است. (۸ و ۲۳ و ۲۴) امروزه اکثریت قریب به اتفاق مطالعات بر روی جربیل انجام می‌گیرد. این حیوان مانند موش دارای اندازه کوچک بوده و نگهداری از آن آسان می‌باشد. در جربیل نه تنها از ماه اول پس از استقرار عفونت در معده، ارتشاح سلول‌های التهابی و گاستریت دیده شده بلکه پس از گذشت ۱۲-۶ ماه، پیشرفت به سوی ایجاد آتروفی و متاپلازیای روده ای هم مشاهده شده است. (۱۱ و ۱۲) از آنجا که جربیل حیوان بومی ایران نیست، در این تحقیق به منظور طراحی مدل حیوانی برای مطالعه استقرار *H.pylori* از خوکچه هندی استفاده شد. علت این بود که معده خوکچه هندی شباهت‌های ساختاری زیادی با معده انسان دارد. علاوه بر این تولید اینترلوکین-۸ و عدم سنتز ویتامین C در خوکچه هندی خصوصیتی هستند که باعث برتری خوکچه هندی نسبت به سایر جوندگان به عنوان مدل حیوانی *H.pylori* می‌شوند. به نظر می‌رسد افزایش تولید اینترلوکین-۸ و کاهش میزان ویتامین C نقش مهمی در تشدید عوارض ناشی از عفونت *H.pylori* بازی می‌کنند. (۱۷ و ۱۹ و ۲۵) تاکنون از خوکچه هندی در بررسی اثر واکسن‌ها، مطالعه اثر انواع ویتامین‌ها از جمله ویتامین C و فلاونوئیدها بر عفونت *H.pylori* استفاده شده است. (۲۸-۲۶)



شکل ۴: رنگ آمیزی ایمونوفلورسینس غیر مستقیم نمونه های مدفوع حیوانات. الف: اشکال مارپیچی *H.pylori* (کنترل مثبت). ب: نمونه مدفوع حیوان آلوده. در محل اتصال اختصاصی آنتی بادی به آنتی ژن رنگ سبز فلورسنت دیده می شود (پیکان). ج: در نمونه مدفوع حیوان بدون تلقیح رنگ سبز فلورسنت مشاهده نشد. (بزرگنمایی ۱۲۵X)



شکل ۵: الف: تصویر میکروسکوپی برش های تهیه شده از مخاط معده خوکچه هندی شماره پنج، ۸ هفته پس از تلقیح باکتری. الف: در مخاط ناحیه آنتروم سلول های لنفوسیتی بالغ و پلاسماسل ها مشاهده شد. ب: در مخاط تنه معده التهابی مشاهده نشد. (بزرگ نمایی ۵۰X)

هضم باکتری در دستگاه گوارش خوکچه هندی و شکستن DNA و آنتی ژن های *H.pylori* در هنگام گذشتن از روده ذکر شده است. (۳۲) در رنگ آمیزی فلورسنت انجام گرفته بر روی مدفوع حیوانات، اتصال اختصاصی آنتی بادی مونوکلونال با آنتی ژنهای *H.pylori* در طول موج ۴۹۰nm با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شد. تا کنون از روش رنگ آمیزی ایمونوفلورسینس غیرمستقیم جهت شناسایی *H.pylori* در بیوپسی های معده انسان استفاده شده است. (۳۳) البته نمی توان انتظار داشت که باکتری در مدفوع به شکل مارپیچی و سالم ظاهر شود. گفته می شود باکتری هنگام گذاشتن از دستگاه گوارش تحت اثر نمک های صفراوی و آنزیم های مختلف قرار می گیرد. شاید به همین علت کشت *H.pylori* از نمونه مدفوع تاکنون موفقیت آمیز نبوده است. (۳۴)

بررسی های بافت شناسی تجمع لنفوسیت های بالغ و پلاسماسل ها را در مخاط ناحیه آنتروم نشان داد. این شواهد نشان دهنده وجود التهاب متوسط تا شدید در مخاط معده حیوانات مورد مطالعه بود. گزارش ها نشان داده که

برای بررسی استقرار *H.pylori* در معده خوکچه هندی از سه روش PCR بر روی نمونه مدفوع، تست آنتی ژن مدفوع و رنگ آمیزی ایمونوفلورسینس غیرمستقیم مدفوع استفاده شد. PCR نمونه های مدفوع جمع آوری شده در هفته های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ وجود DNA باکتری را در مدفوع حیوانات نشان داد. PCR روش حساس و دقیقی است و امکان ردیابی کمترین میزان از قطعه DNA هدف به وسیله آن وجود دارد و در نتیجه یک روش معتبر در تشخیص است. از روش PCR بر روی نمونه مدفوع برای ردیابی *H.pylori* در انسان (۲۹) و یا جربیل (۳۰) استفاده شده است. تست آنتی ژن مدفوع بر روی هر شش حیوان در هفته هشتم و در مورد پنج حیوان در هفته ۲۴ مثبت بود. این آزمایش در مورد حیوان کنترل (بدون تلقیح) منفی شد. تست آنتی ژن مدفوع در مطالعات مختلف بر روی مدفوع انسان انجام شده و حساسیت بالایی را نشان داده است. (۳۱) در یک مطالعه مشابه که بر روی خوکچه هندی انجام گرفت مشخص شد که امکان ردیابی آنتی ژن در مدفوع خوکچه هندی وجود ندارد که علت آن

بافتی به شکل گاستریت متوسط تا شدید را ایجاد کند. از آنجا که باکتری ممکن است در نقاط مختلف معده با میزان متفاوت مستقر گردد، بنابراین نتایج منفی پاتولوژی نمی تواند همیشه بیانگر عدم استقرار باکتری در معده باشد. در این موارد کشت باکتری نیز ممکن است موفقیت آمیز نباشد. امروزه روش هایی ملکولی و ایمونولوژیک نتایج قابل استنادی را ارائه داده اند که مستقل از کشت بوده و در عین حال نیاز به کشتن حیوان و تهیه نمونه های بافت شناسی نمی باشد. در این مطالعه با استفاده از روش های ذکر شده استقرار *H.pylori* در معده خوکی هندی در دراز مدت نشان داده شد. از آنجا که در مورد استقرار طولانی مدت *H.pylori* در خوکی هندی مطالعات زیادی صورت نگرفته، شاید بتوان از این حیوان به عنوان یک مدل جایگزین جربیل برای مطالعه *H.pylori* با اهداف مختلف و در دوره های طولانی تر استفاده کرد.

استقرار طولانی و پایدار *H.pylori* در خوکی هندی، تنها باعث ایجاد گاستریت شده و تاکنون پیشرفت بیماری به زخم، لنفوما و آدنوکارسینوما معده در این حیوان گزارش نشده است. (۴) در مطالعه دیگری که جهت بررسی گاستریت ناشی از *H.pylori* در خوکی هندی انجام شد، با وجود تکثیر شدن ژن اختصاصی *H.pylori* از بافت معده، مطالعات بافت شناسی التهاب و گاستریت را نشان نداد. گفته می شود گاستریت در صورتی در خوکی هندی گزارش می شود که تعداد باکتری های استقرار یافته در معده بیشتر از 10^5 باکتری به ازای یک گرم بافت معده باشد. بنابراین مشاهده نشدن گاستریت شاید به دلیل پایین بودن تعداد باکتری های مستقر در معده خوکی هندی است. (۱۵)

نتیجه گیری:

نتایج به دست آمده در این مطالعه استقرار *H.pylori* را به مدت شش ماه در معده خوکی هندی نشان داد. به نظر می رسد که *H.pylori* می تواند در نقاط مختلف معده حیوان به خصوص آنتروم مستقر شده، تغییرات

REFERENCES

1. Peek Jr RM, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:29-37.
2. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1998;115:58-66.
3. El Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KEL, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398-402.
4. Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:449-90.
5. Newell DG. Animal models of Campylobacter jejuni colonization and disease and the lessons to be learned from similar Helicobacter pylori models. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2001;90:57S-67S.
6. Fox JG, Rogers AB, Ihrig M, Taylor NS, Whary MT, Dockray G, et al. Helicobacter pylori-associated gastric cancer in INS-GAS mice is gender specific. *Cancer Res* 2003;63:942-50.
7. O'Rourke JL, Lee A. Animal models of Helicobacter pylori infection and disease. *Microbes Infect* 2003;5:741-8.
8. Kodama M, Murakami K, Nishizono A, Fujioka T. Animal models for the study of Helicobacter-induced gastric carcinoma. *J Infect Chemother* 2004;10:316-25.
9. Pritchard DM, Przemec SMC. How useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:841-59.
10. Yokota K, Kurebayashi Y, Takayama Y, Hayashi S, Isogai H, Isogai E, et al. Colonization of Helicobacter pylori in the gastric mucosa of Mongolian gerbils. *Microbiol Immunol* 1991;35:475-80.
11. Hirayama F, Takagi S, Kusuhara H, Iwao E, Yokoyama Y, Ikeda Y. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. *J Gastroenterol* 1996;31:755-7.
12. Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Gotoh T, Nishizono A, Nasu M. Gastric ulcer, atrophic gastritis, and intestinal metaplasia caused by Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:454-60.
13. Jeremy AHT, Du Y, Dixon MF, Robinson PA, Crabtree JE. Protection against Helicobacter pylori infection in the Mongolian gerbil after prophylactic vaccination. *Microbes Infect* 2006;8:340-6.
14. Sturegard E, Sjunnesson H, Ho B, Willen R, Aleljung P, Ng HC, et al. Severe gastritis in guinea pigs infected with Helicobacter pylori. *J Med Microbiol* 1998;47:1123-9.
15. Shomer NH, Dangler CA, Whary MT, Fox JG. Experimental Helicobacter pylori infection induces antral gastritis and gastric mucosa-associated lymphoid tissue in guinea pigs. *Infect Immun* 1998;66:2614-2618.
16. Stevenson NR. Active transport of L-ascorbic acid in the human ileum. *Gastroenterology* 1974;67:952-6.
17. Stevenson NR, Brush MK. Existence and characteristics of Na positive-dependent active transport of ascorbic acid in guinea pig. *Am J Clin Nutr* 1969;22:318-26.
18. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, et al. Acute Helicobacter pylori infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* 1991;32:1415-8.

19. Yoshimura T, Johnson DG. cDNA cloning and expression of guinea pig neutrophil attractant protein-1 (NAP-1). NAP-1 is highly conserved in guinea pig. *J Immunol* 1993;151:6225-36.
20. Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol* 1995;17:103-8.
21. Figura N. Helicobacter pylori exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10:79-96.
22. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994;61:1-241.
23. Krakowka S, Eaton KA, Rings DM. Occurrence of gastric ulcers in gnotobiotic piglets colonized by Helicobacter pylori. *Infect Immun* 1995;63:2352-5.
24. Fox JG, Batchelder M, Marini R, Yan L, Handt L, Li X, et al. Helicobacter pylori-induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immun* 1995;63:2674-81.
25. Basso D, Scrigner M, Toma A, Navaglia F, Di Mario F, Rugge M, et al. Helicobacter pylori infection enhances mucosal interleukin-1, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2. *Int J Clin Lab Res* 1996;26:207-10.
26. Durrani Z, Rijpkema S. Orogastric vaccination of guinea pigs with Helicobacter pylori sonicate and a high dose of cholera toxin lowers the burden of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;36:169-73.
27. Sjunnesson H, Sturegard E, Willen R, Wadstrom T. High Intake of Selenium, Carotene, and Vitamins A, C, and E Reduces Growth of Helicobacter pylori in the Guinea Pig. *Comp Med* 2001;51:418-23.
28. Gonzalez-Segovia R, Quintanar JL, Salinas E, Ceballos-Salazar R, Aviles-Jimenez F, Torres-Lopez J. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by Helicobacter pylori in gastric mucosa of guinea pig. *J Gastroenterol* 2008;43:441-7.
29. 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. *J Microbiol Methods* 2001;45:89-94.
30. Nakagawa S, Osaki T, Fujioka Y, Yamaguchi H, Kamiya S. Long-term infection of Mongolian gerbils with Helicobacter pylori: microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:347-53.
31. Gisbert JP, Pajares JM. Stool antigen test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection: a systematic review. *Helicobacter* 2004;9:347-68.
32. Sjunnesson H, Sturegard E, Hynes S, Willen R, Feinstein R, Wadstrom T. Five month persistence of Helicobacter pylori infection in guinea pigs. *APMIS* 2003;111:634-42.
33. Rivera E, Lopez-Vidal Y, Luqueno V, Ruiz-Palacios GM. Indirect immunofluorescence assay for detection of Helicobacter pylori in human gastric mucosal biopsies. *J Clin Microbiol* 1991;29:1748-51.
34. Kabir S. Detection of Helicobacter pylori in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol* 2001;50:1021-9.