

Comparison PCR and Culture Methods for Detect Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*

Somayeh Allahkarami¹, Mohammad hassan Shahhosseiny², Nasim Hayati Roodbari³, Davood Esmaili⁴

¹ M.Sc. of Microbiology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Baqyatollah

ABSTRACT

Background:

Helicobacter pylori (*Pylori*) was the most common cause of chronic gastritis and was linked to peptic ulcer disease and gastric cancer. Environmental factors such as water a reservoir of *H.pylori* which infect human. a Non-culture bacteria in coccoid forms widespread in aquatic environments. The objective of this study was elevating the diagnostic value of PCR and culture methods for for diagnosis coccoid forms of *H.pylori*.

Materials and Methods:

To induce coccoid forms, ten different strains of *H.pylori* (H1-H10) were inoculated into 30 drinking water samples. Then, the samples were incubated at three different temperatures of 4°C, 22°C and 37°C for the durations of 30 and 60 days. The samples were cultured on brucella blood agar and DNA was also extracted also from them and PCR performed on samples.

Results:

percentage of *H.pylori* cells detected at specified temperatures by the culture were 0%, 10% and 0% in the first month and were 0%, 10%, 30% in the second month whereas by the PCR molecular method were 30%, 80%, and 30% in the first month and were 20%, 20%, and 40% in the second month, respectively.

Conclusion:

finding show PCR methodis more capable than culture fordetect the coccoid forms of *H.pylori*, therefore this method could be used to detect non- culture forms.

Keywords: *Helicobacter pylori*, coccoid, PCR, Culture

please cite this paper as:

Allahkarami S, Shahhosseiny MH, Hayati Roodbari N, Esmaili D. Comparison PCR and Culture methods for detect Coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Govaresh* 2014;19:175-81.

Corresponding author:

Somayeh Allahkarami, MSC
Department of Biology, Science and Research
Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Tel: + 98 21 44844946
Fax: + 98 21 44861889
E-mail: skarami77@yahoo.com
Received: 14 Apr. 2014
Edited: 01 Jul. 2014
Accepted: 02 Jul. 2014

مقایسه دو روش PCR و کشت برای شناسایی اشکال کوکوئید هلیکوباکتریپیلوری

سمیه اله کرمی^۱، محمدحسن شاه حسینی^۲، نسیم حیاتی رودباری^۳، داوود اسماعیلی^۴

^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران
^۳ استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
^۴ استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه بقیه الله، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف:

هلیکوباکتریپیلوری (*H.pylori*) شایع ترین علت گاستریت مزمن بوده و با بیماری زخم معده و سرطان معده مرتبط است. فاکتورهای محیطی از قبیل آب به عنوان مخزنی برای هلیکوباکتریپیلوری می باشد که در انسان ایجاد عفونت می کند. باکتریهای زنده اما غیرقابل کشت به صورت اشکال کوکوئیدی در محیط های آبی گسترده هستند. هدف از این مطالعه، ارزیابی ارزش تشخیصی PCR در مقایسه با روش کشت جهت شناسایی فرم های کوکوئید هلیکوباکتریپیلوری می باشد.

روش بررسی:

جهت القای فرم های کوکوئید، ۱۰ سویه هلیکوباکتریپیلوری (H1-H10) درون ۳۰ نمونه آب آشامیدنی تلقیح شدند. سپس نمونه ها در سه دمای متفاوت شامل ۴°C، ۲۲°C و ۳۷°C برای مدت زمان های ۳۰ و ۶۰ روز انکوبه شدند. نمونه ها در محیط بروسلا بلاداآگار کشت داده شدند و DNA نیز از آنها استخراج شد و تست PCR با هدف ژن glmM هلیکوباکتریپیلوری بر روی نمونه ها انجام گرفت.

یافته ها:

درصد سلول های شناسایی شده در دماهای تعیین شده توسط کشت به ترتیب ۰٪، ۱۰٪ و ۰٪ در ماه اول و ۱۰٪، ۳۰٪ و ۳۰٪ در ماه دوم بودند در حالی که توسط روش ملکولی PCR، ۳۰٪، ۸۰٪ و ۳۰٪ در ماه اول و ۲۰٪، ۲۰٪ و ۴۰٪ در ماه دوم بودند.

نتیجه گیری:

با توجه به این که تست PCR قابلیت بیشتری نسبت به روش کشت در شناسایی فرم های کوکوئیدی هلیکوباکتریپیلوری را داراست، بنابراین این روش می تواند در تشخیص این فرم های سخت رشد و غیرقابل کشت استفاده شود.

کلید واژه: هلیکوباکتریپیلوری، کوکوئید، PCR، کشت

گوارش / دوره ۱۹، شماره ۳ / پاییز ۱۳۹۳ / ۱۷۵-۱۸۱

زمینه و هدف:

هلیکوباکتریپیلوری (*H.pylori*) *Helicobacter pylori* باسیل گرم منفی و میکروآئروفیلی است که به عنوان عامل عمده خطر زخم های

نویسنده مسئول: سیمیه اله کرمی

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست

شناسی، تهران، ایران

تلفن: ۴۴۸۴۴۹۴۶-۰۲۱

نمابر: ۴۴۸۶۱۸۸۹-۰۲۱

پست الکترونیک: skarami77@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۳

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۳/۴/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۱

معده و دوازدهه و سرطان معده شناخته شده است. (۱) مطالعات انجام شده در کشورهای در حال توسعه با وضعیت اجتماعی و اقتصادی پایین و مدیریت ضعیف آب آشامیدنی نشان می دهد که عوامل محیطی در انتقال عفونت *H.pylori* دخیل و مهم می باشند. به این ترتیب، آب احتمالاً به عنوان مخزنی برای *H.pylori* محسوب می گردد. شواهدی وجود دارد که ارتباط میان مصرف آب آشامیدنی و عفونت با هلیکوباکتریپیلوری را در برخی کشورها نشان می دهد. (۱۴-۲) در حال حاضر نزدیک به ۹۰ درصد از جمعیت جوان در ایران مبتلا به عفونت هلیکوباکتریپیلوری هستند (۱۵) که تقریباً ۵۰٪ از آنها قبل از سن ۱۵ سالگی آلوده می شوند. (۱۶) نرخ پایین ریشه کنی (۱۷) و میزان بالای عود عفونت (۱۸) بر اهمیت کنترل هلیکوباکتریپیلوری به عنوان یک مشکل بهداشتی در ایران می افزاید. *H.pylori* در آب و مواجهه با برخی شوک های محیطی

استخراج DNA از سوش استاندارد: DNA از کلنی های حاصل با روش DNG plus با استفاده از کیت DNP استخراج گردید. **بهینه نمودن تست PCR برای تشخیص هلیکوباکتری پیلوری:** پرایمرهای مورد استفاده برای آزمون PCR بر پایه ژن glmM که با استفاده از نرم افزار Primer explorer طراحی شدند در جدول ۱ آمده است. مخلوط PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: DDW: ۱۴ میکرولیتر، بافر ۲/۵:۱۰X میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰ mM) (۰/۷۵:۱ میکرولیتر، dNTP Mix (۱۰ mM) (۰/۵:۱ میکرولیتر، پرایمر (۱۰ μM) Forward (۱۰ μM) میکرولیتر، پرایمر (۱۰ μM) Reverse (۱۰ μM) میکرولیتر، آنزیم Taq Polymerase (۵ u/μ) (۰/۳:۱ میکرولیتر، DNA الگو (DNA استخراجی از سوش استاندارد) تهیه گردید. پروفایل حرارتی بهینه شده برای تکثیر ژن هدف شامل: ۳۰ ثانیه واسرشتگی در ۹۳ درجه سانتی گراد، ۲۰ ثانیه اتصال در ۵۴ درجه سانتی گراد و ۲۰ ثانیه مرحله طولی سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد می باشد که این روند به تعداد ۳۵ سیکل جهت تکثیر انجام شد و محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ حاوی سایبرگرین در بافر TBE 0.5 در کنار سایز مارکر ۵۰ جفت بازی فرمنتاس الکتروفورز گردید.

کلونینگ محصول PCR: عمل کلون کردن محصول PCR پس از خالص سازی این محصول با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمنتاس (cat:K1214) و در وکتور pTZ57R این کیت انجام شد. پلاسمیدهای حاصل توسط Plasmid Mini Extraction Kit کمپانی Bioneer استخراج واز آنها جهت تعیین سکانس نوکلئوتیدی و نیز کنترل مثبت قابل اطمینان در تست های PCR استفاده شد.

تعیین حساسیت پرایمرها: جهت تعیین حساسیت، سوسپانسیون های کشت تازه هلیکوباکتری پیلوری تهیه شد و سپس DNA با روش DNG plus از آن استخراج و غلظت و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. DNA استخراجی به روش رقیق سازی از ۱۰۰۰۰۰ تا ۱ کپی رقیق شد.

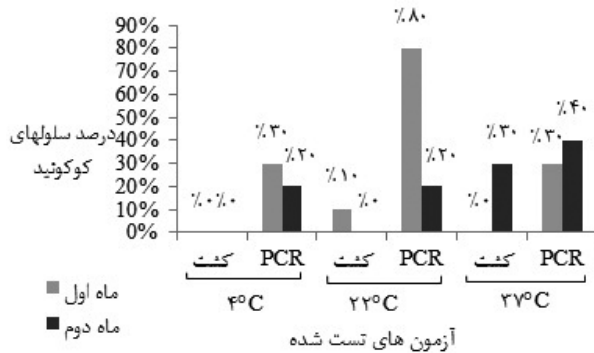
تعیین اختصاصیت پرایمرها: بدین منظور، پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر انواع مختلف DNA های انسانی (Human)، موش (Mouse)، ساکارومیسیس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)، اشرشیا کولی (Escherichia coli)، استرپتوکوکوس پنومونیه (Streptococcus pneumoniae) و سودوموناس آئروژینوزا (Pseudomonas aeruginosa) بکار گرفته شد و سپس مورد تست PCR قرار گرفتند.

تهیه نمونه: در این مطالعه، جهت القای فرم های کوکوئیدی، تعداد ۳۰ نمونه آب آشامیدنی هرکدام به مقدار ۴۰۰۰ میکرولیتر توسط ۱۰ سوبه هلیکوباکتری پیلوری (H1-H10) بدست آمده از نمونه های بالینی به صورت دستی آلوده شدند. مقدار اولیه باکتری تلقیح شده 10^5 cells/ml بود.

مانند کمبود شدید مواد غذایی، انکوباسیون در حرارتی متفاوت از طیف دمایی نرمال رشد باکتری، غلظت افزایش یافته اسموتیک (مثلا آب دریا)، غلظت بالای اکسیژن و قرار گرفتن در معرض نور سفید، کشت های کهنه و شرایط سخت محیطی از فرم باسیلی و خمیده خود به فرم کوکوئید مبدل می شود که در این حالت قابل کشت دادن نیست. این حالت نهفته باکتری اصطلاحاً فرم Viable but non-culturable (زنده اما غیر قابل کشت) نامیده می شود که از لحاظ عفونت زایی اهمیت قابل توجهی دارد. (۱۹) فرم کوکوئید هلیکوباکتری پیلوری در مقابل آنتی بیوتیک هایی که معمولاً در موارد زخم معده تجویز می شوند کاملاً مقاوم است (۲۰) و تا زمانی که وارد بدن یک میزبان مناسب شود و موفق به ایجاد دور کامل عفونت گردد، حالت نهفته خود را حفظ کرده و در محیط باقی می ماند. (۲۱) باکتری ها در فرم VBNC قادر به رشد روی محیط های روتین باکتریولوژیک و تشکیل کلنی نمی باشند، اما در عین حال زنده هستند و درجات خفیف فعالیت های متابولیک در آنها دیده می شود. چه باکتری ها در فرم VBNC قادر به ایجاد عفونت کامل در انسان باشند یا نه، این وضعیت فیزیولوژیک اهمیت فراوانی دارد، زیرا باکتری در این حالت قادر به آغاز مراحل ابتدایی عفونت در میزبان خود است. (۲۲) بر اساس بیانیه اخیر سازمان بهداشت جهانی، مبنی بر اهمیت وجود فرم VBNC باکتری ها در غذا، باید با باکتری در این فرم مانند باکتری ویرولان برخورد کرد. مطالعات صورت گرفته بر روی *H. pylori* حاکی از وجود DNA این باکتری در آب رودخانه، آب چاه، فاضلاب و آب زیر زمینی بوده و گمان بر این است که ارگانسیم مزبور قابلیت انتقال از طریق آب به فرم دهانی-مدفوعی را داراست. (۲۳) این باکتری زمانی که با محیط آبی مواجه می شود به فرم کوکوئید فرو می رود که تا ۴۸ ساعت نیز قادر به تولید رونوشت های DNA می باشد و این وضعیت ارتباط مستقیمی با دمای محیط دارد. (۲۴) این تغییرات در لوله های آب در آزمایشگاه ما و توسط سایر محققان مشاهده شده است. (۲۵-۲۷) شناسایی باکتری در وضعیت VBNC توسط روش های معمول از قبیل کشت دشوار می باشد. برای غلبه بر این مشکل، یک سری از روش های مستقل از کشت از قبیل روش های مبتنی بر PCR برای شناسایی *H. pylori* در نمونه های محیطی مورد بررسی قرار گرفته اند. هدف از این پژوهش، شناسایی فرم های کوکوئید هلیکوباکتری پیلوری در آب توسط روش PCR با هدف ژنی glmM (UreC) و مقایسه آن با روش کشت در شناسایی این فرم ها می باشد.

روش بررسی:

تهیه سوش هلیکوباکتری پیلوری استاندارد و روش کشت: سوش استاندارد *H. pylori* به شماره N:oc30 از مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید و در محیط بروسلا بلاگ آگار کشت داده شد. پلیت ها در شرایط میکروآئروفیلک با گاز یک به مدت ۵-۷ روز در انکوباتور $37^{\circ}C$ انکوبه شدند.



نمودار ۱: مقایسه نتایج حاصل از کشت و PCR نمونه های کلوئید ۳۰ و ۶۰ روزه در دماهای ۴°C، ۲۲°C و ۳۷°C

بیوپسی معده به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مرز براساس ژن های ureA و ureC و ۱۶SrRNA و روش کشت و تست اوره آز سریع در بیماران مشکوک به عفونت های ناشی از هلیکوباکتریلوری پرداختند. در این مطالعه روش PCR مبتنی ژن اوره آز C از حساسیت و اختصاصیت بالایی نسبت به سایر روشها برخوردار بود. (۳۴) شهامت و همکاران در سال ۲۰۰۴ با تلقیح سلولهای هلیکوباکتریلوری در آب و انکوباسیون آنها در دما و زمان های متفاوت و کشت آنها در محیط بلاد آگار و شمارش زنده (viable count) مشاهده کردند که ۹۹٪ از سلول های موجود به اشکال کلوئیدی تغییر یافتند. آن ها سلول های کلوئیدی و مارپیچی موجود در نمونه ها را توسط PCR با هدف ژنی glmM با حساسیت ۰/۱pg از DNA این باکتری شناسایی کردند. (۳۵ و ۲۶) هلیکوباکتریلوری در محیط های آبی به صورت فرم های کلوئیدی گسترده می باشد. تماس با منابع محیطی بالقوه آلوده از قبیل آب آشامیدنی محلی، شناکردن در رودخانه و مصرف سبزیجات آلوده به مدفوع نیز به عنوان عوامل خطر برای کسب عفونت *H. pylori* گزارش شده اند. (۱۰) در مطالعه ای که توسط الوندی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی شیوع هلیکوباکتریلوری در نمونه های آب آشامیدنی در کرمانشاه صورت گرفت، DNA هلیکوباکتریلوری توسط PCR با هدف ژنی ureC در ۳۵٪ از نمونه های آب شیر و ۸۷٪ از نمونه های آب چاه یافت شد. در این آزمایش تعداد ۶ کپی از DNA شناسایی شد که حساسیتی بیش از آزمایش مارا بدست داده. وی شیوع بالای هلیکوباکتریلوری در نمونه های آب آشامیدنی را شاهدی قوی از انتقال این باکتری از طریق آب دانست. (۳۶) شیعی^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی بیماریزایی و عفونت هلیکوباکتریلوری تغییر شکل یافته از فرم مارپیچی به کلوئیدی پرداختند. آنها با تلقیح کلوئیدهای القا شده در آب شیر استریل به موش های آزمایشگاهی مشاهده کردند که پس از ۲۸ روز تمامی آنها از بین رفتند. آنها با مشاهدات خود توسط میکروسکوپ الکترونی نتیجه گرفتند با این که ویروالانس کلوئیدهای القایی توسط آب نسبت به اشکال مارپیچی کاهش یافته اما آن ها هنوز هم دارای فعالیت اوره آز و چسبندگی به سلول های اپی تلیال را دارا می باشند (۳۷). بناسا^۴ و همکاران با ارزیابی های کدورت سنجی سلول های هلیکوباکتریلوری تلقیح شده در محیط مایع مشاهده کردند که توده باکتریایی تا روز پنجم

3. She
4. Benaissa

مربوط به ۳۰ نمونه که به روش boiling استخراج شدند، طبق شرایط بهینه شده مورد تست PCR قرار گرفتند که تعداد ۲۲ نمونه نتیجه مثبت نشان دادند، بدین صورت که پس از لودکردن نمونه ها بر روی ژل آگارز ۲٪ و انجام الکتروفورز، نمونه هایی که دارای ژن glmM هلیکوباکتریلوری بودند دقیقاً مطابق با باند کنترل مثبت مربوط به سویه استاندارد، اندازه ۲۰۱ جفت باز سائز مارکر فرمنتاس را نشان دادند.

با توجه به نمودار ۱، در ماه اول تنها ۱ نمونه در دمای ۲۲°C در محیط کشت دارای رشد بوده و این در حالی است که ۳ نمونه در دمای ۴°C، ۸ نمونه در دمای ۲۲°C و ۳ نمونه در دمای ۳۷°C توسط PCR دارای جواب های مثبت گشتند. در ماه دوم تنها ۳ نمونه در دمای ۳۷°C در محیط کشت رشد نشان دادند اما در دماهای ۴°C، ۲۲°C و ۳۷°C به ترتیب ۲، ۴ و ۲ نمونه در این ماه توسط PCR دارای جواب های مثبت شدند. این نتایج نشان دهنده دقت و قابلیت بالای روش PCR نسبت به روش کشت در تشخیص سلول های کلوئیدی می باشد.

بحث:

با وجود تفاوت در حساسیت و اختصاصیت تست های تشخیصی جهت شناسایی هلیکوباکتریلوری، نشان داده شده که حساسیت روش هایی از قبیل کشت میکروبی، تست اوره آز سریع (RUT)، بافت شناسی و تست های آنتی ژن مدفوعی، زمانی که تعداد باکتری های موجود در نمونه اندک باشند غیر قابل اعتماد می باشند. (۲۸) با این حال، روش کشت روش استاندارد برای شناسایی هلیکوباکتریلوری می باشد اما این باکتری یک میکروارگانیسم سخت رشد می باشد و در شرایط محیطی و محیط های آبی به فرم کلوئیدی تبدیل می شود. (۲۹) حساسیت پایین روش کشت توسط فاکتورهایی نظیر تعداد کم میکروارگانیسم ها و یا از دست رفتن حیات میکروارگانیسم ها در طی انتقال و یا تغییر شکل باکتری به فرم کلوئیدی قابل بیان می باشد. (۳۰) اشکال کلوئیدی توسط روش های کشت، RUT و هم چنین بافت شناسی قابل تشخیص نبوده و به همین علت تست های مولکولی از قبیل PCR جهت شناسایی آنها در نمونه ها، آب ها و سایر منابع زیستی، آزمون بسیار کارآمد می باشد. (۳۱) زویت^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۳ یک ارزیابی مقایسه ای بین حساسیت روش کشت و PCR برای شناسایی عفونت هلیکوباکتریلوری در ۲۲ نمونه بیوپسی معده انجام دادند. در این آزمایش ۲۳ نمونه از لحاظ وجود DNA هلیکوباکتریلوری در آنها توسط PCR مثبت و تنها ۱ نمونه توسط کشت شناسایی شد. در آزمایشی دیگر در ۲۰ نفر از افراد مبتلا به زخم معده، ۱۷ نمونه دارای پاسخ های مثبت کشت و PCR بودند. وی بیان داشت در صورت رساندن به موقع نمونه ها به آزمایشگاه به دلیل عدم تشکیل فرم های کلوئیدی، حساسیت روش کشت می تواند به اندازه ی PCR باشد در غیر این صورت روش PCR دارای ارزش تشخیصی در شناسایی عفونت می باشد. (۳۲) در آزمایشی که در سال ۱۹۹۹ توسط فابره^۲ و همکاران جهت شناسایی هلیکوباکتریلوری بر روی نمونه ها صورت گرفت، عنوان کردند که تست PCR دارای اختصاصیت و حساسیت بالاتری نسبت به روش های دیگر از جمله کشت می باشد. (۳۳) شقاقی^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی حضور هلیکوباکتریلوری در ۱۱۷ نمونه بافت

1. Zwet
2. Fabre

PCR تشخیص داده شد که ماه اول دارای بیشترین تعداد سلول شناسایی شده توسط PCR را داراست و این نشان می‌دهد که سلول‌ها در دمای محیط دارای قابلیت ماندگاری بالایی در مدت زمان کوتاهی را در شکل کوکوئید دارا می‌باشند و با توجه به این که تنها ۱ نمونه در ماه اول دارای رشد بر روی محیط کشت بود می‌توان گفت در این دما با کاهش دمای بهینه‌ی رشد، متابولیسم سلول‌های باکتری نیز کاهش یافته و سلول‌ها به تدریج به فاز مرگ پیش رفته و از تعداد آنها در ماه دوم کاسته شده. با بررسی میزان رشد و بقا در دمای ۴°C هیچ نتیجه مثبتی از کشت باکتری‌ها مشاهده نشد اما ۳ نمونه در ماه اول و ۲ نمونه در ماه دوم توسط PCR شناسایی شدند که این نتایج با توجه به توقف رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها در دمای ۴°C و کمترین میزان PCR نسبت به دو دمای دیگر قابل بیان است.

نتیجه‌گیری:

با توجه به این که منفی شدن نتیجه کشت هلیکوباکتر پیلوری به معنی عدم آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری نیست و نیز تغییر مورفولوژیک این باکتری به فرم‌های کوکوئید در آب که یکی از اصلی‌ترین مشکلات در راه شناسایی این باکتری محسوب می‌گردد و از سویی با در نظر گرفتن نواقص روش‌های کشت در تشخیص فرم‌های کوکوئید، بنابراین می‌توان از تست PCR به عنوان یک روش مناسب و قابل اعتماد و با حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص ژن اوره از C در آب‌های آشامیدنی و فاضلاب‌های شهری که منابع بالقوه آلودگی محسوب می‌گردند استفاده کرد. در این مطالعه آزمون PCR با تعداد جواب مثبت قطعی بیشتر نسبت به روش کشت، حساسیتی بیش از کشت را نشان داده است.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از کمک‌های موسسه ایرانیان ژن فناوری (IGF) و پرسنل آن به ویژه مشاوره‌ی خانم دکتر الهام مسلمی و هم‌چنین آزمایشگاه میکروبی شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله و مرکز تحقیقات بیماری‌های کبد و گوارش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی در این زمینه، قدردانی می‌شود.

به طور تصاعدی افزایش یافته اما از روز هفتم قابل شناسایی نبود. آنها با کشت سلول‌های موجود هیچ گونه رشدی در محیط کشت مشاهده نکردند. این شواهد نشان‌دهنده‌ی تغییر شکل باکتری‌ها به اشکال کوکوئیدی بود که قادر به تقسیم تحت شرایط کشت نیستند. آنها عنوان کردند که کوکوئیدهای سه‌ماهه هنوز قادر به حفظ برخی متابولیسم‌های خود می‌باشند که برای حفاظت ساختارهای سلولی نظیر DNA ضروری هستند. آنها توانستند سلول‌های هلیکوباکتر پیلوری را که در محیط کشت قادر به رشد نبودند، را توسط PCR شناسایی کنند. (۳۸) سولامی^۱ در سال ۲۰۱۰ روش کشت و PCR را برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در آب‌های آشامیدنی استان بصره‌ی عراق مورد مقایسه قرار داد که از میان ۱۰۰ نمونه با نتایج منفی کشت، تعداد ۴ نمونه توسط PCR شناسایی شدند. در آزمایشی دیگر با کشت تعداد ۲۶۶ نمونه از آب‌های آشامیدنی در محیط کلمبیا اگر اصلاح شده (MCUA) تعداد ۷۸ نمونه با تکیه بر اوره آز مثبت بودن در این محیط شناسایی شدند. وی اظهار داشت ترکیبی از نتایج PCR با کشت در نمونه‌های آب می‌تواند تصویر دقیق‌تری از شناسایی هلیکوباکتر پیلوری را ارائه دهد. (۳۹)

حساسیت تست PCR در مطالعه حاضر برابر با ۱۰ ملکول DNA بود که به این ترتیب کمترین میزان میکروارگانیسم با کمک این تست قابل شناسایی بودند. در این بررسی از ۳۰ نمونه آب آلوده شده توسط سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری ۱۴ نمونه در ماه اول و ۸ نمونه در ماه دوم با روش PCR با هدف ژنی glmM از لحاظ وجود DNA هلیکوباکتر پیلوری در آنها شناسایی شدند در حالی که از این تعداد تنها ۱ نمونه در ماه اول و ۳ نمونه در ماه دوم توسط روش کشت دارای نتایج مثبت بودند. در این مطالعه ۳ مورد از نمونه‌ها با نتیجه منفی در کشت ماه اول در دمای ۳۷°C دارای نتیجه مثبت در کشت ماه دوم بودند که این به علت تغییرات مورفولوژیکی و انکوباسیون در دمای بهینه رشد باکتری می‌باشد که باعث شده به فرم قابل کشت مبدل شده و قادر به تشکیل کلنی در محیط گردد. هم‌چنین در این دما میزان نمونه‌های شناسایی شده در ماه دوم بیش از ماه اول با روش PCR بوده که نشان می‌دهد هلیکوباکتر پیلوری در دمای ۳۷°C میزان بالایی از رشد را داراست. در دمای محیط (Room temperature) که ۲۲°C می‌باشد، در ماه‌های اول و دوم به ترتیب تعداد ۸ و ۲ نمونه توسط

1. Sulami

REFERENCES

- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-75.
- Bunn JE, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life. *Lett Appl Microbiol* 2002;34:450-4.
- Janzon A, Sjoling A, Lothigius A, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm AM. Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3039-44.
- Hegarty JP, Dowd M, Baker KH. Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United States. *Appl Microbiol* 1999;87:697-701.
- Azevedo NF, Pinto AR, Reis NM, Vieira MJ, Keevil CW. Shear stress, temperature, and inoculation concentration influence the adhesion of water-stressed *Helicobacter pylori* to stainless steel 304 and polypropylene. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:2936-41.
- Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1996;110: 1031-35.
- Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiol Immunol* 2001;45:515-9.
- Johnson CH, Rice EW, Reasoner DJ. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4969-70.

9. Cellini L, Di Campli E, Grande R, Di Bartolomeo S, Prenna M, Pasquantonio MS, Pane L. Detection of *Helicobacter pylori* associated with zooplankton. *Aquat Microb Ecol* 2005;40:115-20.
10. Fujimura S, Kato S, Kawamura T. *Helicobacter pylori* in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. *Lett Appl Microbiol* 2004;38: 517-21.
11. Queralt N, Bartolome R, Araujo R. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *Appl Microbiol* 2005;98:889-95.
12. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb A, Ahi JD, et al. Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a South Indian perspective. *Singapore Med J* 2007;48:543-9.
13. Sen K, Schable NA, Lye DJ. Development of an internal control for evaluation and standardization of a quantitative PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 2007;73: 7380-7.
14. Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y, Calva JJ. *Helicobacter pylori* in water systems for human use in Mexico City. *Water Sci Technol* 2001;43:93-8.
15. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. *J Clin Pathol* 2004;57:37-42.
16. Mikaeli J, Malekzadeh R, Ziad-Alizadeh B, Nasserimogaddam S, Valizadeh M, Khoncheh R, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in two Iranian provinces with high and low incidence of gastric carcinoma. *Arch Iranian Med* 2000;3:6-9.
17. Fakheri H, Malekzadeh R, Merat S, Khatibian M, Fazal A, Alizadeh BZ, et al. Clarithromycin vs. furazolidone in quadruple therapy regimens for the treatment of *Helicobacter pylori* in a population with a high metronidazole resistance rate. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:411-6.
18. Zendejdel N, Nasserimogaddam S, Malekzadeh R, Massarrat S, Sotoudeh M, Siavoshi F. *Helicobacter pylori* reinfection rate 3 years after successful eradication. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:401-4.
19. Ozcakir O, Akyon Y. Hypermutation and treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2006;11:304.
20. Hua J, Ho B. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable? *Microbios* 1996;87:103-12.
21. Ren XD, Kiesses WB, Schwartz MA. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the and cytoskeleton. *EMBO J* 1999;18: 578-85.
22. Cellini L, Allocati D, Angelucci T, Iezzi E, Campli Di, Marzio L, et al. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice. *Microbiol Immunol* 1994;38:843-50.
23. Percival S, Thomas J. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. *J Water Health* 2009;7:469-77.
24. Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L, Battistelli M, Falcieri E, Baffone W. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol* 2004;27:353-60.
25. Mai UEH, Shahamat M, Colwell RR. Survival of *Helicobacter pylori* in the environment in a dormant but viable stage. *Rev Esp Enferm Dig* 1990;78 Suppl 1:17.
26. Shahamat M, Mai U, Paszko-Kolva C, Kessel M, Colwell RR. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1231-5.
27. Velazquez M, Feirtag JM. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Int J Food Microbiol* 1999;53:95-104.
28. Vaira D, Holton J, Menegatti M, Landi F, Ricci C, Ali' A, et al. Blood tests in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998;43 Suppl 1: 39-46.
29. Khanolkar-Gaitone S, Reubish G, Lee C, Stadtländer CT. Isolation of bacteria other than *Helicobacter pylori* from stomachs of squirrel monkeys (*Saimiri* spp) with gastritis. *Dig Dis Sci* 2000;45:272-80.
30. Goldstein NS. Chronic inactive gastritis and coccoid *Helicobacter pylori* in patient treated for gastroesophageal reflux disease or with *H.pylori* eradication therapy. *Am J Clin Pathol* 2002;118:719-26.
31. Shahosseiny M, Tehrani M. Polymerase Chain Reaction (PCR). 1st ed. Iran: Islamic Azad University publishers; 2005.
32. Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, Schirm J, Snijder JA. Sensitivity of culture compared with that of polymerase chain reaction for detection of *Helicobacter pylori* from antral biopsy samples. *J Clin Microbiol* 1993;31: 1918-20.
33. Fabre R, Sobhani I, Laurent-Puig P, Hedef N, Yazigi N, Vissuzaine C, et al. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. *Gut* 1994;35:905-8.
34. Sheghaghi B, Dorani S, Behzadiyan nejad GH. *H.pylori* Molecular diagnosis in biopsy specimens of patients suspected to have *H.pylori* infection. 4th Congress of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University 2001; 84246.
35. Shahamat M, Alavi M, Watts J, Gonzalez J, Sowers K, Maeder D, et al. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2004;42:3613-9.
36. Alvandi AH, Abiri R, Aryan E, Rezaei M, Bagherabadi S. High frequency of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Kermanshah, Iran, during June–November 2012. *Water and Health* 2013;10:2150-56. (In Press)
37. She FF, Lin JY, Liu JY, Huang C, Su DH. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:516-20.
38. Benaissa M, Babin P, Quillard N, Pezennec L, Cenatiempo Y, Fauchere JL. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect Immun* 1996;64: 2331-5.
39. Al-Sulami AA, Al-Tae AM, Juma'a MG. Isolation and identification of *Helicobacter pylori* from drinking water in Basra governorate, Iraq. *East Mediterr Health J* 2010;16: 920-5.