مقاله پژوهشی

مطالعه سرولوژیکی عفونت هلیکو باکترپیلوری به روش الیزا (Elisa) جهت آنتی بادی‌های IgA, IgG, IgM در مراجعه کننده‌گان دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

شهره افشار یاوری[1]، محمد حسن خادم انصاری[2]، زهرا یکتا[3]

تاریخ دریافت مقاله: 85/9/18 **تاریخ پذیرش مقاله**: 85/11/21

فصلنامه دانشکده پرستاری و مامایی
سال چهارم، شماره دوم، تابستان 1385

چکیده

مقدمه: هلیکو باکترپیلوری یک نوع باکتری گرم منفی بوده و در ایجاد گاستریت نقش بسزایی دارد و به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های التهابی و بدخیمی‌های دستگاه گوارش به ویژه گاستریت مزمن زخم معده، آدنوکاسنیوم و لنفوم معده شناخته شده است .روش‌های مختلف تهاجمی و غیر تهاجمی برای تشخیص این عفونت وجود دارد و در بین روش‌های غیر تهاجمی تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی به روش الیزا یکی از بهترین متدها می‌باشد. در این مطالعه نیز آنتی بادی‌های هلیکو باکترپیلوری به روش الیز ا جهت IgM , IgG , IgA مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: از 131 بیمار مراجعه کننده بعد از جدا سازی سرم با روش الیزا آنتی بادی‌های IgM, IgG و IgA اندازه‌گیری شد. IgG کمتر از 34 واحد EIU منفی و بالا تر از 42 واحد مثبت و بین 34-42 مشکوک در نظر گرفته شد. جهت IgM و IgA کمتر از واحد U/ml منفی و بالاتر از 12 واحد مثبت و بین 8-12 مشکوک محاسبه گردید.

یافته‌ها: از 131 بیمار (78 زن و53 مرد) 27/48% IgM ،42% IgG و 25/19% IgA مثبت بودند. گروه‌های سنی 20-40 ساله برای آنتی بادی‌های IgM ،IgG و IgA به ترتیب 23/3% ،28/3% و 16/7% مثبت بودند و در گروه‌های سنی 41-80 به ترتیب 31% 53/5% و 32/4% برای آنتی بادی‌های IgM، IgG و IgA مثبت بودند که نشان دهنده آنست که عفونت در سنین بالا بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری: روش‌های نسبتا ساده بر اساس جستجوی آنتی بادی‌ها به صورت تجارتی با حساسیت بالا به آسانی در دسترس است مزیت روش الیزا آن است که علاوه بر حساسیت و ویژگی بالا، نوع کلاس آنتی بادی‌ها را نیز مشخص می‌کند و با این روش می‌توان نوع کلاس آنتی بادی‌ها IgM، IgG و IgA را تشخیص داد. IgG ارزش تشخیصی و پیش آگهی بیشتری را دارد و IgA نیز بعد از IgG در تشخیص بیماری نقش مهمی را بازی می‌کند. IgM برای عفونت و تشخیص مراحل حاد بیماری بهتر است. روش الیزا به خاطر حساسیت و ویژگی قابل قبول، قابلیت تکرارپذیری، سهولت کار و غیر تهاجمی بودن نمونه‌گیری و مقرون به صرفه بودن روشی مناسب برای تشخیص افراد آلوده می‌باشد و در صورت مثبت بودن در افراد مشکوک آندوسکوپی می‌تواند انجام شود.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، آنتی بادی، الیزا

فصلنامه دانشکده پرستاری و مامایی ارومیه، سال چهارم، شماره دوم، ص 58-53، تابستان 1385

آدرس مکاتبه: ارومیه، جاده نازلو، پردیس نازلو، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، تلفن :2770047
E-Mail: Shafsharyavari@yahoo.com

[1] کارشناس ارشد میکروبیولوژی گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده بهداشت وپیرایزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)
[2] دانشیاربیوشیمی، گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی ارومیه
[3] دانشیار گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی ارومیه

مقدمه

در سال 1983 برای نخستین بار توسط مارشال ووارن و به طور همزمان توسط موریس و نیکلسون یک نوع باکتری گرم منفی، مارپیچی و متحرک از مخاط معده انسان جدا و شناسایی شد که در ابتدا کامپیلوباکتر پیلوری و در سال‌های اخیر هلیکوباکترپیلوری نام گرفت (1,2). این کشف موجب شد تا نقش این باکتری در ایجاد گاستریت بیشتر بررسی گردد. حدود نیمی از جمعیت جهان نیز به این عفونت آلوده می‌باشند (3). بنابراین تشخیص عفونت هلیکو باکتر پیلوری اهمیت زیادی پیدا کرده است. این باکتری به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های التهابی و بدخیمی‌های دستگاه گوارش به ویژه گاستریت مزمن فعال (تیپ ب)، زخم معده و دوازدهه، آدنوکارسینوم، و لنفوم معده شناخته شده است (1و2و3). آزمایشات مختلفی برای تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری وجود دارد و در برخی از آزمایشات از قبیل هیستولوژی بافت معده، کشت میکروبی، تست سریع اوره آز و پی،سی،آر[1] اگرچه تست‌هایی قابل اعتماد می‌باشند ولی نیاز به بیوپسی معده و در نتیجه احتیاج به اندوسکوپی می‌باشد که یک تست تهاجمی است. متدهای دیگر غیر تهاجمی جهت تشخیص بهتر هلیکوباکتر پیلوری که نیاز به آندوسکوپی ندارند، بکارگیری متدهایی چون تست تنفسی اوره و تستهای سرولوژیکی برای یافتن آنتی بادی‌های هلیکوباکتر پیلوری به روش‌های مختلف مانند آنزیم ایمونواسی[2] و یا روش الیزا[3] می‌باشد (7,8).

روش‌های تنفسی اوره با وجود حساسیت و ویژگی بالا، به دلیل نیاز به تجهیزات گرانقیمت و هم چنین خطر برخورد با پرتوهای رادیواکتیو در آزمایشات بالینی روزمره کاربرد کمتری دارد ولی روش‌های سرولوژیکی به واسطه سادگی و سهولت در انجام آن و سرعت در پاسخدهی، تکرارپذیری و در دسترس بودن مواد و وسایل مورد نیاز آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (9). دراین مطالعه نیز روش‌های سرولوژیکی الیزا جهت تشخیص آنتی بادی‌ها IgM , IgG وIgA هلیکوباکتر پیلوری در بیماران با ناراحتی‌های گوارشی معده که در نیمه اول سال 85 به مراکز بهداشتی درمانی اورمیه مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

از تعداد 131 بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های آموزشی درمانی ارومیه در مدت 6 ماه که دارای ناراحتی‌های گوارشی معده بودند جهت بررسی عفونت‌های هلیکوباکترپیلوری با میانگین سنی 80-20 سال مقدار 3 میلی‌لیتر خون بصورت ناشتا در شرایط

[1] Polymerase chain reaction (PCR)

[2] Enzyme immunoassay (EIA)
[3] Enzyme-linked immunosorbent assay (Eliza)

استریل گرفته و20 دقیقه در حرارت اطاق (25 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس سرم توسط سانتریفوژ جدا و در 40- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایشات بمدت 2 ماه محافظت گردید. قبل از شروع آزمایش نمونه‌ها سانتریفوژ شده و از محلول رویی جهت تعیین آنتی بادی‌ها استفاده گردید. برای اندازه‌گیری آنتی بادی‌های IgG از کیت بیوهیت پی ال سی فنلاند[1] با روش ایمونواسی استفاده گردید. در این تست باکتری خالص شده هلیکوباکترپیلوری که در داخل چاهک‌های مخصوص چسبیده شده و با استفاده از آنتی بادی نشان‌دار قابل اندازه‌گیری است مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر بدست آمده با واحد ای،آی،یو[2] نشان داده شده است .جهت ارزشیابی، مقادیر کمتر از 34 واحد EIU تست منفی، بین 42- 34 تست مشکوک و بالای 42 واحد EIU مثبت تلقی می‌شود. در ضمن موارد مشکوک IgG 3 مورد بود که از مطالعه حذف و به گروه سروژپازتیو اضافه گردید.

جهت اندازه‌گیری آنتی بادی IgM و IgA از روش الیزا باکیت ایمونوبیولوژیکی جی،بی،آی آلمان[3] استفاده گردید. در این آزمایش روش الیزا کمی جهت آنتی بادی بر علیه IgM و IgA بصورت فاز جامد با روش ساندویچ انجام گرفت.

چاهک‌های کیت الیزا با آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری پوشش یافته و به آنتی بادی‌های اختصاصی وصل شده و سپس با آنزیم گونژوگه به آنتی بادی دوم برای IgA و IgM انسانی قابل شناسایی بوده و با مقایسه با مقادیر استانداردهای بکار برده شده بصورت کمی اندازه‌گیری می‌شود. هر دو آنتی بادی به صورت یونیت در میلی لیتر اندازه‌گیری و 8> واحد منفی و بین 12-8 واحد مشکوک و بالای 12 واحد مثبت تلقی می‌شود. در مورد آنتی بادی‌های A M , موارد مشکوک دیده نشد. از آزمون کای اسکوئر جهت بررسی ارتباط آنتی بادی مثبت بر حسب سن و جنس استفاده شد.

یافته‌ها

این مطالعه برروی 131 بیمار مراجعه کننده به مراکز آموزشی درمانی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه که شامل 78 زن و 53 مرد بین سنین 20 الی 80 سال بودند، انجام گرفت. نتایج آزمایش‌ها شناسایی هلیکوباکترپیلوری جهت تشخیص آنتی بادی‌های IgM و IgG و IgA به روش الیزا به این ترتیب بدست آمده است. (27/48%) 36 مورد IgM مثبت، (42%) 55 مورد IgG مثبت و (25/19%)33 مورد IgA مثبت بودند. و همچنین از 36 بیمار IgM مثبت (25/6%) 20 زن و (30/2%)16 مرد و از 55

[1] Biohit plc finland
[2] Enzyme immune unite (EIU)
[3] GbI Immunobiological laboratory Germany

بیمار IgG مثبت (41%)32 زن، (43/4%)23 مرد و از 33 بیمار IgA مثبت (21/8%) 17 زن و (30/2%)16 مرد بودند و بین جنس افراد و سطح آنتی بادی مثبت در هر سه مورد ارتباط وجود نداشت.

عفونت هلیکوباکترپیلوری برای آنتی بادی‌ها IgM، IgGوIgA برحسب گروه‌های سنی نیز مطالعه گردید.گروه‌های سنی 40-20 سال به ترتیب 23/3%، 28/3%، 16/7% برای آنتی بادی‌های گروه IgM، IgG و IgA مثبت بودند. گروه‌های سنی 80-41 سال به ترتیب 31%، 53/5%، 32/4%، برای آنتی بادی‌های گروه IgM ، IgG و IgA مثبت بودند. که نشان می‌دهد موارد مثبت در گروه سنی 80-41 سال بیشتر است و این ارتباط در مورد سطح IgA (k=4.26,p=0.039) و IgG (k=8.4,p=0.04) بر حسب گروه‌های سنی معنی‌دار بود (جداول 1و2).

جدول شماره 1): توزیع فراوانی آلودگی به هلیکو باکتر پیلوری بر حسب سن

Seropesitivity / سن	IgM(درصد) تعداد	IgG(درصد) تعداد	IgA(درصد) تعداد
20-40	14(23/3%)	17(28/3%)	10(16/7%)
41-80	22(31%)	38(53/5%)	23(32/4%)

جدول شماره 2): توزیع فراوانی آلودگی به هلیکو باکتر پیلوری بر حسب جنس

Seropesitivity / جنس	IgM(درصد) تعداد	IgG(درصد) تعداد	IgA(درصد) تعداد
زن	20(25/6%)	32(41%)	17(21/8%)
مرد	16(30/2%)	23(43/4%)	16(30/2%)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های هلیکوباکترپیلوری را با آنتی بادی‌های ضد باکتری در سرم و ترشحات بیولوژیک بیماران مبتلا نیز می‌توان تشخیص داد (3،7،8). و روش‌های نسبتا ساده براساس جستجوی این آنتی بادی‌ها معرفی شده است که کیت‌های مربوط به آنها به صورت تجارتی و با حساسیت بالا به آسانی در دسترس قرار می‌گیرد. آگلوتیناسیون، تثبیت کمپلمان، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم الیزا و وسترن بلات[1] روش‌های سرولوژی تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری بوده و در بین اینها مزیت روش الیزا آنست که علاوه بر حساسیت و ویژگی بالا می‌توان نوع کلاس آنتی بادی را نیز مشخص کرد و در بیماران مبتلا کلاس‌های IgM ، IgGوIgA برای تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری تعیین می‌گردد. در بدن بیماران آلوده به هلیکوباکترپیلوری یک پاسخ آنتی بادی از نوع IgM ایجاد می‌شود، سپس IgG و IgA تولید شده و تیتراین آنتی بادی‌ها هم به صورت سیستمیک و هم در داخل موکوس در اشخاص مبتلا به بیماری مزمن بالا باقی می‌ماند (14). برخی عقیده دارند IgG اختصاصی ارزش تشخیص و پیش آگهی دهنده بیشتری دارد و IgM برای عفونت کودکان و تشخیص مرحله حاد بیماری بهتر است (3) بعد از

[1] **Western Blot**

اندازه‌گیری IgG ضد هلیکوباکترپیلوری، اندازه‌گیری IgA ارزش تشخیصی دارد.

کریستر گرنبری[1] و همکاران در تحقیق خود در سال 1993 نشان دادند که بین عفونت هلیکوباکترپیلوری و گاستریت مزمن فعال ارتباط وجود دارد و از 104 بیمار گاستریت که کشت و رنگ آمیزی از بیوپسی معده آنها مثبت بود (93%) 97 مورد IgG مثبت و (81%) 84 مورد IgA مثبت گزارش نمودند (7).

رهنما و همکاران در سال 1381 در تبریز دو روش تشخیصی اوره آز سریع و تست الیزا را جهت تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری در بیماران مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی فوقانی را با یکدیگر مقایسه نمودند و پیشنهاد کردند که به علت غیر تهاجمی بودن و حساسیت بالای تست الیزا (97%) نسبت به اوره از سریع (89%) و همچنین با توجه به ارزش پیشگویی وجود و عدم وجود هلیکوباکترپیلوری توسط الیزا (89% و 92/6%)، بهتر است تست الیزا ابتدا در افراد مشکوک به هلیکوباکترپیلوری مورد استفاده قرار گرفته و سپس در صورت مثبت بودن تست با توجه به علائم بالینی آندوسکوپی انجام گیرد (9).

در این مطالعه با توجه به توصیه‌های مکرر در مورد انجام تست‌های الیزا برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری، آنتی بادی‌های IgM و IgG و IgA از 131 بیمار با ناراحتی‌های گوارشی معده مورد بررسی قرار گرفت و مقدار آنتی بادی‌های IgM وIgG و IgA بدست آمده از بیماران به ترتیب 27/7%، 41/53%، 24/62% بوده که نشان دهنده آلودگی به این باکتری می‌باشد.

در مطالعاتی که در ساری و کرمان صورت گرفته است نشان داده‌اند که با افزایش سن، میزان آلودگی به هلیکوباکترپیلوری افزایش می‌یابد و این موضوع با یافته‌های ما نیز مطابقت دارد. افزایش تیتر آنتی بادی در سنین بالا می‌تواند به خاطر ایجاد آلودگی با مقادیر بیشتر باکتری، حاد بودن ایجاد آلودگی، پاسخ قوی تری سیستم ایمنی باشد(11و10).

در مطالعاتی که دکتر نادر علی‌پورقربانی در سال 1378 انجام داده‌اند کارایی ایمونوفلورسانس غیر مستقیم در تشخیص ناراحتی‌های گوارشی را با روش رنگ آمیزی گیمسا و اوره آز مقایسه نمودند و حساسیت و ویژگی و دقت ایمونوفلورسانس غیر مستقیم را به ترتیب 94%، 86%،90% محاسبه نمودند و این روش را یک روش غیر تهاجمی با ارزش حساس و سریع و مناسب در تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری گزارش نمودند.

بر اساس نتایج این مطالعه از میان 131 مورد که بعلت علائم دستگاه گوارشی فوقانی مراجعه نموده بودند 54 بیمار IgG مثبت گزارش گردید

[1] Christer granbery

(41/53%) این میزان با برخی از نتایج همخوانی دارد و با برخی متفاوت است. باکا و همکارانش شیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری را در لیبی 82% گزارش کردند (12).

مطالعاتی که در کشور یونان انجام گرفته است نشان می‌دهد که شیوع این میکروارگانیسم در بیماران دیابتیک 37/3% و در غیر دیابتیک 35/2% می‌باشد. (13) در مطالعاتی که توسط Takeuchlk و همکاران در سال 2003 صورت گرفته است شیوع آلودگی به هلیکوباکترپیلوری در مبتلایان به سرطان معده 90/5% و در سایر بیماران دستگاه گوارشی فوقانی 68/5% گزارش شده است (13).

به طور کلی به نظر می‌رسد که در این مطالعه عفونت هلیکوباکترپیلوری نسبت به برخی مطالعات کمتر باشد. این امر می‌تواند دلیل آلودگی کمتر در جمعیت عادی این منطقه باشد و پیشنهاد می‌شود از متد ایمونولوژی الیزا برای تعیین شیوع هلیکوباکترپیلوری در جمعیت عمومی این شهر جهت غربالگری استفاده گردد.

منابع

1. غفوری، ع. هلیکو باکتر پیلوری (مقاله بازآموزی)، طب و تزکیه، تابستان 1379، شماره 37، ص80-73.
2. **Laheij R.J.F, Straatman H. Evaluation of commercially available Helicobacter Pylori Serology kits: a Review. J of clin Microbiol, oct. 1998, vol.36, No.10, p. 2803-2809.**
3. برادران، ح. ارزش تشخیصی IgA , IgG اختصاصی ضد H. Pylori به روش الیزا در گاستریت مزمن. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به شماره 64 ، سال 42 ، تابستان 1378 ص 18-22
4. **Xue-Jun C, Jie Y, Yue-fang S. Dominate cagA/vacA genotye and confection frequency of H.polori in peptic ulcer or chronic gastric patients in Zhejiang province and correlation among genotypes, confection and severity of the diseases. Chine med j 2005, 118(5): 460-467.**
5. **Zhou l, Sung J.J, lin S. A five year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after H.pylori eradication. Chine med j 2003,116:11-14**
6. **Granstrom N. Tindbery Y, Blennow M. Seroepidemiology of helicobacter pylori infection in chohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. J. clin. Microbial 1997, 35: 468-470.**
7. **Granberg C, Mansikk A. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by using pyloriset EIA-G and EIA-A for detection of serum Immune globulin G (IgG), and IgA antibodies. J of clin microbial, June 1993, p.1450-1453.**
8. **Shao Li, Ai-ping Lu. Anti – Helicobacter pylori immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of H. pylori infection in-patient with precancerous lesions. World J Gastro 2003, 9(4): 755-758.**
9. راهنما ب: مقایسه دو روش تشخیص اوره آز سریع و تست الیزا جهت تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری در بیماران مبتلا به ناراحتیهای گوارشی فوقانی مجله پزشکی دانشگاه تبریز، بهار 1381-35، ص 23-19.
10. بابا محمودی ف. بررسی سرواپیدمیولوژیک آلودگی هلیکو باکتر پیلوری شهرستان ساری در سال 1380 مجله علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، سال 14، شماره 43، تابستان 1383، ص 48-39.
11. زاهدی مج. فراوانی نسبی آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در مراجعین به مراکز بهداشتی-درمانی شهر کرمان در سال 1379 مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره نهم، شماره 3، سال 1381، ص 145-140.
12. **Baka As, zl-Gariani AB.Frequency of helicobacter pylori infection in dyspeptic patients libya. Saudi med J 2002, 23(10): 126-125.**
13. **Takeuchi K,ohnoY. Helicobacter pylori infection and early gastric cancer. J.clin Gastroenterol, 2003, 36(4): 321-324.**
14. **Jawetz E, Melnick J.L, adelberg E.A. Med Microbiol 2001-22th ed.p. 240**