راه اندازی و استاندارد کردن روش ELISA در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری

دکتر عبدالفتاح صراف نژاد، استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر الهه هوده ای، دکترای علوم آزمایشگاهی
دکتر فریده سیاوشی، استادیار گروه میکروب شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تهران
دکتر صادق مسرت، استاد گاستروانترولوژیست بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر زهره جلالی، عضو هیات علمی گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
طاهره شهرستانی، کارشناس آزمایشگاه ایمونولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Standardization and In-House ELISA Setup for Helicobacter Pylori Serologic Diagnosis

Abstract

Helicobacter pylori (H. pylori) is the most prominent causative agent of gastroduodenal diseases all over the world. Other manifestations such as urticaria and coronary heart diseases, also are suspected to be induced by H. pylori. Non invasive methods are prefered for diagnosis; and ELISA, because of its reliability, speed, sensitivity and specificity is widely prefered as diagnostic tool. Previously we have used IFA, and here, we report an Indirect ELISA technique for H. pylori diagnosis.

First, 9 strains, of H. pylori isolated from biopsies, were cultured, and the soluble crude antigen was used to coat ELISA plates. Antigen concentration and conjugated antiserum dilution were optimised using checker board method. In this study the gold standard was: rapid urease test, culture and direct smear. Patient serum dillution and the cut-off value was determind, using 22 Negative and 30 positive confirmed samples according to ROC curve and the results were compared with a commercial kit.

The sensitivity and specificity of this method were 93.2 percent and 95.4 percent respectively. A commercial ELISA Kit, was used and compared simultaneoulsy. The sensitivity and specificity were 87.8 percent and 73 percent respectively.

Therefore, regarding the acceptable sensitivity and specificity, ease of work of ELISA, being economical and non-invasive, it can be employed in diagnosis of H.Pylori infection and also in epidemiological studies.

Key words: *Helicobacter pylori, ELISA, serologic diagnosis*

چکیده

آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماریهای دستگاه گوارش فوقانی در سراسر دنیا می باشد و اخیراً شواهدی مبنی بر دخالت مستقیم و یا غیر مستقیم این باکتری در ایجاد بیماریهای خارج از دستگاه گوارش نیز بدست آمده، بنابراین روشهای تشخیصی آسان و سریع و غیر تهاجمی و قابل اعتماد که نیاز به انجام عمل آندوسکوپی ندارند، در تشخیص این عفونت چه در بیماران مبتلا به ناراحتی های گوارشی و چه در سایر بیماران یا مطالعات سرواپیدمیولوژی میتواند بسیار کمک کننده باشد. از بین این روشها ، آزمون ELISA بیش از سایر روشها مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، روش ELISA به منظور اندازه گیری IgG اختصاصی ضد هلیکوباکتر پیلوری در داخل کشور راه اندازی و استاندارد شده است

برای راه اندازی و استاندارد کردن روش ELISA ۹ سویه هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران را انتخاب و پس از خرد کردن آن با امواج صوتی (Sonication) آنتی ژن خام محلول

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

تهیه و با کمک روش شیطرنجی بهترین غلظت آنتی ژن و بهترین تیتر کونژوگه تعیین شد و سپس با استفاده از ٥٢ نمونه سرم از افرادیکه آلودگی یا عدم آلودگی آنها با روشهای مرجع (gold standard) شامل کشت از بیوپسی، اوره آز سریع و بررسی لام مستقیم اثبات شده بود و با استفاده از منحنی های Roc، تیتر مناسب سرم و مرز تشخیصی(cut-off) تعیین شد. ضمناً نمونه های فوق با استفاده از یک کیت تجارتی نیز مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج با یکدیگر مقایسه شدند.

حساسیت و ویژگی در روش ELISA استاندارد شده در آزمایشگاه به ترتیب ٩٣/٢٪ و ٩٥/٤٪ و در روش ELISA تجارتی ٨٧/٨٪ و ٧٣٪ بدست آمد.

درمجموع با توجه به حساسیت و ویژگی قابل قبول، سهولت کار، مقرون به صرفه بودن و غیر تهاجمی بودن این روش، میتوان از آن در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری و همچنین مطالعات اپیدمیولوژی استفاده کرد.

مقدمه

عفونت هلیکوباکتر پیلوری دومین عفونت باکتریایی شایع در جهان بعد از استرپتوکوکوس مونانس (عامل پوسیدگی دندان) می باشد (١) نقش این باکتری گرم منفی، مارپیچی و میکروآئروفیل، در ایجاد زخمهای پپتیک و گاستریت مزمن فعال و سرطانهای معده اثبات شده است (٢). علاوه بر آن شواهدی مبنی بر دخالت آن در ایجاد بیماریهای غیر گوارشی در بزرگسالان و کودکان (٩-٣) وجود دارد. بنابراین، تشخیص صحیح و به موقع و ساده آن از اهمیت زیادی برخوردار است.

بطور کلی، روشهای تشخیصی به دو دسته تهاجمی (وابسته به آندوسکوپی) و غیر تهاجمی (بدون نیاز به آندوسکوپی) تقسیم می شوند. روشهای تهاجمی با اینکه به دلیل داشتن ویژگی بالا معمولاً بعنوان روشهای مرجع شناخته می شوند و شامل روشهای میکروبشناسی و اوره آز سریع و بررسی لام پاتولوژی یا گستره مستقیم می باشند، گذشته از مشکلات تشخیصی و اجرائی هر یک از آنها، که به کاهش حساسیت آنها منجر شده است، به علت وابستگی به عمل آندسکوپی، مشکلات و خطراتی را برای بیمار به همراه دارد و از طرفی به دلیل نیاز به وسایل و افراد متخصص، مشکلاتی را برای شبکه درمانی جامعه ایجاد می کنند و این روشها بخصوص در بررسی نقش این باکتری در بیماریهای خارج از دستگاه گوارش کاربرد ندارند (١).

رایج ترین روش های غیر تهاجمی آزمون اوره تنفسی Urea Breath Test (UBT) و روشهای سرولوژی است. UBT نیز با وجود حساسیت و ویژگی بالا، به دلیل نیاز به تجهیزات گرانقیمت و همچنین خطر برخورد با پرتوهای رادیواکتیو (در صورت استفاده از کربن ١٤) در آزمایشات بالینی روزمره کاربرد کمتری دارد (١٠). امروزه روشهای مختلف سرولوژی برای شناسائی آنتی بادیهای ضد هلیکوباکترپیلوری مطرح شده است که از بین آنها روش (Sorben Assay Enzyme-Linked Immuno) یا ELIZA به دلیل سادگی، سرعت ، تکرارپذیری و در دسترس بودن مواد و وسایل مورد نیاز آن، بیش از بقیه روشها مورد توجه قرار گرفته است (١١).

در حال حاضر، انواع کیتهای تجارتی که از آنتی ژنهای مختلف تهیه شده اند، در دسترس می باشد. اما صحت و حساسیت و ویژگی بدست آمده در مناطق مختلف دنیا با یکدیگر متفاوت است و تنها راه تعیین صحت روشهای سرولوژی ارزیابی آنها با استفاده از سرم بیمارانی است که به دقت آلودگی یا عدم آلودگی آنها اثبات شده باشد (١٢) و همچنین توصیه می شود که بطور کلی هر آزمون سرولوژی باید طبق شرایط موجود در هر منطقه استاندارد شود (١٠).

در این مطالعه، با توجه به شیوع بالای این عفونت و کاربرد بالای روش ELISA در تشخیص آن، اندازه گیری میزان IgG اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری با این روش و با استفاده از آنتی ژن تهیه شده از پیکره خرد شده باکتری با امواج صوتی Whole-cell Sonicated Antigens راه اندازی و استاندارد شد و حساسیت و ویژگی آن محاسبه و با یکی از کیت های تجارتی در بیماران ایرانی مبتلا به ناراحتی های معده و دوازدهه مقایسه گردید. همچنین احتمال وجود واکنش متقاطع هلیکوباکترپیلوری با کمپیلوباکترژژونی، اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژنوزا و پروتئوس میرابیلیس با استفاده از حذف آنتی بادیهای غیر اختصاصی بررسی شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

مواد و روشها

بیماران : در این تحقیق از بین بیماران بزرگسال با علائم ناراحتی معده و دوازدهه که برای انجام عمل آندوسکوپی به بیمارستانهای آیت ا.. طالقانی و دکتر علی شریعتی تهران مراجعه کرده بودند، استفاده به عمل آمد. از سرم ٥٢ بیمار شامل ٢٥ نفر (٤٨ درصد) مونث و ٢٧ نفر (٥٢ درصد) مذکر و با گستره سنی ٧٢-١٨ و میانگین سنی ٤٠/٨ (انحراف معیار ١٥/٧)، که آلودگی یا عدم آلودگی آنها به هلیکوباکترپیلوری به اثبات رسیده بود، استفاده شد. در سابقه هیچ یک از بیماران مصرف داروهای مهار کننده پمپ پروتون یا آنتی بیوتیک ها در سه ماه اخیر و یا سابقه درمان هلیکوباکترپیلوری در طی سال قبل، که باعث مهار رشد باکتری و ایجاد اشکال در اثبات وجود یا عدم وجود باکتری در فرد می شود (١٠)، ذکر نشده بود. از هر بیمار، با عمل آندوسکوپی، دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم معده یکی برای انجام آزمون اوره آز سریع و دیگری برای انجام آزمایشات باکتری شناسی (کشت و تهیه لام مستقیم با رنگ آمیزی گرم) گرفته شد. همچنین از هر بیمار ٥ میلی لیتر خون گرفته و سرم آن تا زمان آزمایش در C ° ٢٠- نگهداری شد. بیمارانی که حداقل یکی از سه آزمون مرجع آنها (کشت، اوره آز سریع و لام مستقیم با رنگ آمیزی گرم) مثبت بود بعنوان شاهد مثبت (فرد آلوده) و بیمارانی که هر سه آزمون مرجع آنها منفی بود به عنوان شاهد منفی (فرد غیر آلوده) در نظر گرفته شدند.

آزمون اوره آز سریع : یک قطعه بیوپسی در معرف اوره قرار داده، تغییر رنگ از زرد به صورتی در مدت چند دقیقه تا یک ساعت، بعنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته می شود.

جداسازی و کشت باکتری : بعد از اینکه نمونه بیوپسی در محیط انتقالی نیمه جامد تایوگلیکولات به آزمایشگاه انتقال داده شد، باید سریعاً بر روی محیط کشت انتخابی شامل محیط کشت بروسلاآگار همراه با نشاسته (١ w/v٪) و ١٠ درصد خون تازه گوسفند کشت داده شود. این محیط باید حاوی وانکومایسین (١٠mg/lit)، پلی میکسین B(٠/٢٥mg/lit) و تری متوپریم (٥mg/lit)، نیز باشد. محیط کشت را در گرمخانه C ° ٣٧ حاوی CO2 و در شرایط میکروآئروفیل قرار داده و هر نمونه ١٤ روز، روزانه از نظر رشد مورد بررسی قرار می گیرد.

بررسی لام مستقیم: قسمتی از بیوپسی را روی لام تمیز کشیده و سپس با روش گرم رنگ آمیزی کرده و از نظر حضور باکتری بررسی می شود.

انجام آزمون ELISA : مواد لازم جهت آزمون ELISA : آنتی هیومن(Anti IgG) آماده شده در خرگوش و کونژوگه شده با هورس ردیش پراکسیداز (HRP) DAKO (cod No. P0212 آلبومین سرم گاو (BSA)، توئین ٢٠، ارتوفنیلن دی آمین (Biogen) (cat.collo11 ، هیدروژن پراکسید، اسید سولفوریک، بافر کربنات/بی کربنات ٠/٥M با pH=٩/٥، بافر PBS، ٠/١M با pH=٧/٢، بافر سیترات/فسفات ٠/١M با pH = ٥ و بالاخره میکروپلیت ٩٦ چاهکی ته صاف (NUNC)

تهیه آنتی ژن برای آزمون ELISA : ٩ سویه جدا شده از بیماران بصورت انبوه روی محیط کشت اختصاصی کشت داده و بعد از ٧٢ ساعت، سوسپانسیون بسیار غلیظی از آنها در PBS pH=٧/٢ و ٠/١ درصد سدیم آزاید تهیه شد. سپس باکتریهای سوسپانسیون فوق را بوسیله دستگاه سونیکاتور (Soniprep 150 MSE) در دامنه ١٠μm و فرکانس متوسط در سه دوره ٢٠ S/ml خرد و سوسپانسیون بدست آمده با سانتریفوژ یخچال دار با دور ١٢٠٠٠g سانتریفوژ شد و پروتئین مایع رویی آن با روش Bradford اندازه گیری و در C ° ٧٠- تا زمان استفاده نگهداری شد.

انجام آزمون ELISA :

الف : تعیین مناسب ترین رقت آنتی بادی کنژوگه و غلظت آنتی ژن:

برای این منظور از روش شطرنجی (chess board) برای تعیین هر یک از عوامل بالا استفاده شد و بر این اساس رقت مناسب آنتی بادی کونژوگه $\frac{1}{2000}$ و غلظت مناسب آنتی ژن٠/٧٥ μg/ml تعیین شد.

ب: مراحل انجام آزمایش:

آنتی ژن با غلظت ٠/٧٥ μg/ml در بافر پوشاننده oating buffer (بافر کربنات / بی کربنات) تهیه و ١٠٠ μl از آن در همه چاهکها بجز چاهک های ستون های ١٢ و ٩ و ٦ و ٣ ریخته و به این ستونها، برای بررسی واکنش های غیر اختصاصی سرمها فقط بافر پوشاننده اضافه شد. سپس پلیت ها در C ° ٤ در طی شب قرار داده شد و روز بعد سه بار با بافر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

شستشو (PBS pH=٧/٢ و ٠/٥ درصد توئین ٢٠) شستشو شد. در مرحله بعد ٢٠٠µl بافر مسدود کننده blocking buffer (PBS pH=٧/٢ و ٢ درصد BSA) اضافه کرده به مدت ٢ ساعت در ٣٧° C قرار داده و بعد از مدت مذکور، سه بار شستشو انجام گرفت. سپس از سرم بیماران که آلودگی یا عدم آلودگی آنها اثبات شده است، رقتهای $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{200}$ و $\frac{1}{400}$ در بافر مسدود کننده تهیه و ١٠٠µl از هر رقت بصورت دوتایی Duplicate در چاهکهای حاوی آنتی ژن و یک چاهک بدون آنتی ژن به عنوان کنترل سرم اضافه شد و پلیت ها به مدت ٩٠ دقیقه در ٣٧° C قرار داده شد و بعد از این مدت، مرحله شستشو تکرار گردید. کونژوگه را با بافر مسدود کننده به نسبت $\frac{1}{2000}$ رقیق کرده و ١٠٠µl محلول سوبسترا-محلول رنگزا (٤٠mg/dl OPD در بافرسیترات/فسفات به اضافه v/v ٠/٠٠٤ درصد H_2O_2) افزوده پس از گذشت ١٠ دقیقه در دمای اتاق ١٠٠µl محلول متوقف کننده واکنش (اسید سولفوریک ١M) اضافه کرده و جذب نوری رنگ ایجاد شده در چاهکها در طول موج ٤٩٢ nm با دستگاه ELISA Reader Organon Teknika 210 اندازه گیری و ثبت شد.

کیت تجارتی ELISA :

به منظور مقایسه نتایج بدست آمده از ELISA استاندارد شده در آزمایشگاه با کیت های تجارتی موجود، در این تحقیق از کیت تجارتی Helicobacter pylori IgG EIA (cat.Nr: 3010) محصول کشور هلند، بسته بندی شده در بخش تولید فرآورده های تشخیصی بخش دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد و مراحل انجام آزمایش و تفسیر نتایج بر طبق دستور العمل ذکر شده در کیت انجام گرفت.

جذب آنتی بادیهای غیر اختصاصی جهت حذف واکنش متقاطع (Cross reaction) :

با توجه به اینکه احتمال وجود واکنش متقاطع IgG اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری با آنتی ژن باکتریهای آنتروپاتوژن و سودوموناس مطرح شده است (١٤ و ١٣) با استفاده از روش جذب آنتی بادیهای غیر اختصاصی توسط ٤ باکتری گرم منفی شامل کمپیلوباکترژژونی، سودوموناس آئروژینوزا، پروتئوس میرابیلیس و اشریشیاکلی این واکنش بررسی شد. ابتدا ٤ سری سرم که هر یک مخلوطی از ٦ سرم که آلودگی یا عدم آلودگی آنها اثبات و میزان آنتی بادی آنها براساس آزمایش ELISA استاندارد شده در آزمایشگاه تعیین شده بود، تهیه شد. این ٤ سری عبارت بودند از نمونه شماره ١ شامل سرم های مثبت قوی (OD >١/٥)، نمونه شماره ٢ سرمهای مثبت ضعیف (OD حدود ١/٠)، نمونه شماره ٣ سرمهای منفی (OD آنها بین ٠/٧٥-٠/٦)، نمونه شماره ٤ سرمهای منفی (OD <٠/٥).

براساس روشهای توصیه شده توسط آندرسن و همکاران (١٥) سرمهای فوق را در مجاورت سوسپانسیون سلول کامل باکتریهای مذکور و هلیکوباکترپیلوری به مدت ٤٥ دقیقه در ٣٧° C قرار داده و سپس با سانتریفوژ یخچال دار و در ٤ ° C به مدت ١٠ دقیقه با دور ١٠٠٠٠g سانتریفوژ کرده و محلول رویی را برداشته و برروی آن مثل یک نمونه بیمار دو آزمایش سرولوژی انجام شد. به منظور کنترل مراحل مختلف، یک نمونه از سرمهای جذب نشده نیز در تمام مراحل در کنار سایر نمونه ها قرار داده شد.

منحنی ROC

(Receiver Operating Characteristic curve):

منحنی ROC یا منحنی ویژگی عملی گیرنده برای نمایش ارتباط بین ویژگی و حساسیت آزمایشهایی که مقادیر نتیجه آنها از نوع پیوسته باشد بکار می رود (١٦). این منحنی نموداری است که از نسبت حساسیت (میزان مثبت واقعی) به میزان مثبت کاذب در هر نقطه به دست می آید و با کمک این منحنی می توان بهترین نقطه مرزی که حساسیت و ویژگی مناسبی دارد، انتخاب کرد (١٧).

همچنین منحنی های راک شامل روشهای نموداری مفیدی برای مقایسه دو روش تشخیصی می باشد و در این روش مساحت زیر هر منحنی راک را تعیین و با استفاده از روش اصلاح شده حاصل جمع رتبه ای ویلکاکسون، با یکدیگر مقایسه کرد (١٨).

آزمونهای آماری: آزمونهای آماری شامل χ^2 و T-test و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و رسم منحنی های ROC با استفاده از نرم افزار SPSS9.05 انجام گرفت.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

نتایج

آلودگی در بیماران : از ٥٢ بیمار مورد بررسی، ٢٢ نفر آنها از نظر هر سه آزمون اوره آز سریع، کشت و بررسی لام مستقیم منفی بودندکه بعنوان نمونه منفی استفاده شدند. و در ٣٠ نفر از آنها حداقل یکی از این آزمونها مثبت بود، که بعنوان نمونه های مثبت اثبات شده در نظر گرفته شدند.

تعیین مناسب ترین رقت سرم : برای استاندارد کردن روش ELISA سه عامل اصلی یعنی مناسب ترین رقت کونژوگه، مناسب ترین غلظت آنتی ژن و مناسب ترین رقت سرم بیمار بر طبق شرایط آزمایشگاه باید تعیین شود. دو عامل اصلی اول را می توان با روش شطرنجی به راحتی تعیین نمود. اما در تعیین مناسب ترین رقت سرم، عوامل مداخله گر بیشتری وجود دارد و ممکن است در سرم افراد مختلف تفاوت هایی دیده شود و رقت زیاد یا کم به ترتیب باعث کاهش حساسیت یا ویژگی آزمایش شود. بنابراین در این پژوهش ترجیح داده شد که برای تمام بیماران سه رقت $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{200}$ و $\frac{1}{400}$ مورد بررسی قرار گیرد. همچنین میزان واکنش غیر اختصاصی سرم در رقتهای مختلف در چاهک بدون آنتی ژن مورد بررسی قرار گرفت (سرم بلانک) در نهایت برای هر سه رقت بطور مستقیم و بعد از کم کردن جذب نوری بدست آمده از سرم بلانک هر رقت از جذب نوری بدست آمده از رقت مربوطه، منحنی ROC رسم و با یکدیگر مقایسه شدند. مقایسه این منحنی ها نشان داد که بین سه رقت تفاوت معنی داری از نظر حساسیت و ویژگی وجود ندارد اما در رقت $\frac{1}{400}$ بعد از کاستن جذب نوری بلانک سرم از آزمایش تفاوت معنی داری ایجاد شد که نشان دهنده اثر عوامل مداخله گر در این رقت است. بنابراین رقت $\frac{1}{200}$ به عنوان رقت مناسب سرم برای محاسبات حساسیت و ویژگی انتخاب شد.

طبق نتایج بدست آمده میانگین جذب نوری سرم افراد آلوده ٠/٤ ± ١/٤ و افراد غیر آلوده ٠/٢ ± ٠/٥ می باشد که اختلاف آماری معنی داری بین این دو گروه وجود دارد $P<$ ٠/٠٠٥ و درجه اطمینان ٩٩/٥ درصد (T-test) می باشد

تعیین مرز تشخیصی cut-off point :

برای تعیین مرز تشخیصی نیز از منحنی ROC مربوط به رقت $\frac{1}{200}$ استفاده شد با کمک این منحنی می توان حساسیت و ویژگی را براساس مرزهای مختلف تعیین و بهترین آنها را انتخاب نمود. بر این اساس، با انتخاب جذب نوری برابر ٠/٧٥ به عنوان مرز تشخیص، حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ٩٣/٢ درصد و ٩٥/٤ درصد بدست آمد.

نتایج آزمون ELISA تجارتی : در این آزمایش مطابق پیشنهاد کارخانه سازنده، نتایج به دست آمده کمتر از ١٥Au/ml (Arbitrary unit) منفی و بین ٢٠-١٥Au/ml مشکوک و بالاتر از ٢٠Au/ml مثبت در نظر گرفته شد. با در نظر گرفتن نتایج مشکوک به عنوان نتایج نادرست، حساسیت و ویژگی این کیت به ترتیب ٨٧ درصد و ٧٣ درصد بدست آمد. در جدول ٢ نتایج بدست آمده از کیت تجارتی **ELISA** و روش **ELISA** استاندارد شده در آزمایشگاه آمده است و نمودار ١ مقایسه حساسیت و ویژگی آنها را نشان میدهد.

نتایج جذب و حذف آنتی بادیهای غیراختصاصی:

برای بررسی احتمال وجود واکنش متقاطع هلیکوباکتر پیلوری، از چهار سرم مخلوط که طرز آماده سازی آنها قبلاً ذکر شده است، استفاده به عمل آمد و آزمایش با هردو روش سرولوژی تکرار شد. نتایج بدست آمده در روشهای مختلف به شرح زیر است:

در روش ELIZA استاندارد شده در آزمایشگاه، جذب نوری ٢/٣٢٣ برای نمونه شماره ١ و جذب نوری ١/٠٠٧ برای نمونه شماره ٣ و جذب نوری ٠/٣٦٦ برای سرم شماره ٤ بدست آمد. بعد از جذب با هلیکوباکترپیلوری، کاهش شدید جذب نوری در هر چهار سرم دیده شد، اما بعد از جذب با سایر باکتریها، کاهش شدید جذب نوری در همه سرمها در حدود

٠/٣ – ٠/٢ ایجاد شد که نشان دهنده کم بودن واکنش متقاطع بین این باکتریها و هلیکوباکترپیلوری میباشد. این مقدار در سرمهای مثبت قوی از اهمیت زیادی برخوردار نیست اما در مواردی که نتایج بدست آمده در اطراف نقطه مرزی قرار دارد میتواند حائز اهمیت باشد.

در روش ELIZA تجارتی نیز در سه سرم شماره های ١ و ٢و ٤ تداخل قابل توجهی دیده نشد اما نتیجه سرم شماره ٣ که مخلوطی از سرم افراد غیر آلوده اثبات شده بود مثبت کاذب

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

جدول ١- میانگین آنتی بادی در بیماران آلوده و غیر آلوده

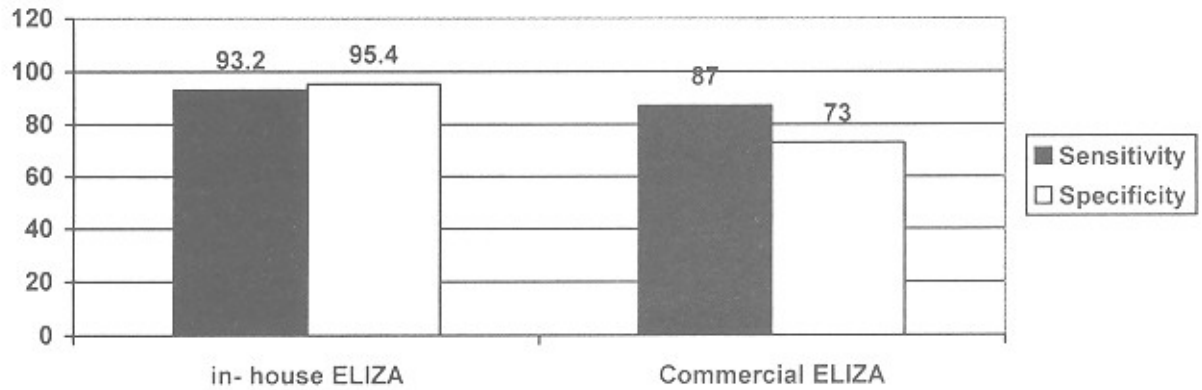
وضعیت آلودگی	تعداد No.	میانگین جذب نوری (X)	انحراف معیار (SD)
آلوده	٣٠	١/٤	٠/٤
غیر آلوده	٢٢	٠/٥	٠/٢

درجه اطمینان ٩٩/٥ درصد و P < ٠/٠٠٥ و T-test

جدول ٢ – مقایسه نتایج آزمونهای ELISA تجارتی و استاندارد شده در آزمایشگاه

آزمونهای سرولوژی / آزمونهای مرجع	ELISA استاندارد شده در آزمایشگاه		ELISA تجارتی		
	مثبت	منفی	مثبت	مشکوک	منفی
مثبت(تعداد)	٢٨	٢	٢٧	٣	١
منفی(تعداد)	١	٢١	٣	٣	١٦
جمع	٢٩	٢٣	٣٠	٥	١٧

نمودار ١ – مقایسه حساسیت و ویژگی دو نوع روش ELISA



[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

بدست آمد (Au/ml ٢٧). اما بعد از جذب با باکتریهای گرم منفی کاهش قابل توجهی پیدا کرد (بعد از جذب با سودوموناس آئروژینوزا Au/ml ١٤ جذب با پروتئوس میرابیلیس Au/ml ١٥ و جذب با اشریشیا کلی Au/ml ٨ و کمپیلوباکتر ژژونی Au/ml ١٣) که نشان دهنده امکان وجود کثبت کاذب در اطراف مرز تشخیصی میباشد.

بحث

همانطور که در ابتدا اشاره شد، هلیکوباکترپیلوری، یکی از شایعترین عفونتهای باکتریایی در دنیاست (١) که علاوه بر نقش اثبات شده آن در ایجاد بیماریهای مختلف معده و دوازدهه که از شیوع و اهمیت بالایی برخوردار است (٢) به نظر می رسد که بطور مستقیم یا غیر مستقیم زمینه ساز بیماریهای مهمی در خارج از دستگاه گوارش مثل ناراحتی های عروق کرونر (٣ و ٤ و ٥) و ایجاد کهیر مزمن ایدوپاتیک (٦ و ٧)، کم خونی وخیم (٨) و عوارضی مثل آنمی فقر آهن و کوتاهی قد در کودکان (٩) باشد که تمام این بیماریها از مسائل و مشکلات مهم بهداشتی و درمانی جوامع محسوب می شود.

روشهای تشخیصی این باکتری به دو دسته تهاجمی (وابسته به آندوسکوپی) که باکتری را بطور مستقیم شناسائی می کنند و روشهای غیر تهاجمی (غیر وابسته به آندوسکوپی) که حضور باکتری را بطور غیر مستقیم نشان می دهند، تقسیم می شوند. آزمایشهای دسته اول بر روی نمونه بیوپسی که در زمان انجام آندسکوپی تهیه می شود، انجام می گیرد و شامل آزمایشهای میکروبشناسی مثل کشت، اوره آز سریع و بررسی لام پاتولوژی یا لام مستقیم می باشد. این آزمونها، از روشهای مرجع شناسائی هلیکوباکترپیلوری محسوب می شوند و چون همراه با آندوسکوپی می باشند و امکان بررسی نوع و شدت ضایعه موجود در دستگاه گوارش فوقانی را فراهم می کنند، در تشخیص و انتخاب درمان مناسب برای بیمار مبتلا به ناراحتی دستگاه گوارش کمک کننده می باشند (١٩) اما در این آزمونها به علت خطای نمونه گیری بدلیل پخش غیر یکنواخت باکتری در سطح مخاط آنتروم و یا ایجاد منفی کاذب بعلت مصرف آنتی بیوتیک ها و داروهای مهار کننده پمپ پروتون که باعث کاهش تعداد و مهار رشد باکتری به طور موقت می شود و برخی دلایل دیگر که خارج از این بحث است، حساسیت کاهش می یابد (١٠ و ٩). از طرفی انجام عمل آندوسکوپی برای بیماران مشکلاتی را چه از نظر خطر انتقال بیماریهای عفونی مثل هپاتیت و ایدز و حتی خود هلیکوباکترپیلوری، چه از نظر صرف وقت و هزینه به همراه دارد و بخصوص این روشها برای بررسی آلودگی در بیماریهای خارج از دستگاه گوارش و یا بررسیهای اپیدمیولوژیک، مناسب و قابل اجرا نمی باشد (١٠).

از بین روشهای غیر تهاجمی، UBT نیز بعلت حساسیت و ویژگی بالا جزء روشهای مرجع محسوب می شود. اما به دلیل نیاز به دستگاهها و تجهیزات، کاربرد محدودی دارد (٢٠).اما آزمونهای سرولوژی، پاسخ سیستم ایمنی افراد را بر علیه هلیکوباکترپیلوری مورد سنجش قرار داده و بطور غیر مستقیم حضور باکتری را مشخص می نمایند. بنابراین احتمال خطای نمونه گیری از بین می رود. در ضمن این روشها غیر تهاجمی بوده و برای بیمار عوارض و مشکلاتی در پی ندارد. روشهای مختلف سرولوژی مثل ELISA ، ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم Indirect mmunofluorescence Assay (IFA) ، ایمونوبلاتینگ، ایمونوکروماتوگرافی و ... برای شناسائی آنتی بادیهای ضد هلیکوباکترپیلوری معرفی شده است که بین آنها روش ELISA به دلیل سادگی آزمایش، سرعت و تکرارپذیری و در دسترس بودن امکانات آن، بیشتر از بقیه روشها مورد توجه قرار گرفته است (١١).

امروزه کیت های تجارتی گوناگون ELISA در دسترس میباشد. اما تفاوت در اعتبار و دقت این روشها، استفاده از این روش را به عنوان یک وسیله تشخیصی با مشکل مواجه کرده است. این تفاوتها بطور عمده به دلیل استفاده از روشهای مختلف برای اثبات حضور هلیکوباکترپیلوری، تفاوت در نوع آنتی ژن بکار رفته و جمعیت ها و مناطق جغرافیایی مختلفی که آزمایش در آنها انجام گرفته، می باشد (٢٠).

انتخاب روشهای مرجع مناسب و اثبات حضور یا عدم حضور باکتری در تعیین ویژگی آزمایش از اهمیت زیادی برخوردار است و با توجه به اینکه اغلب روشهای مرجع به تنهایی از حساسیت کافی برای اثبات حضور باکتری برخوردار نیستند، بهتر است از چند آزمون بطور همزمان برای یک بیمار استفاده نمود (١١). نکته، دیگر حذف افراد تحت درمان با داروهای مهار کننده رشد باکتری مثل آنتی بیوتیک ها و داروهای مهار کننده پمپ پروتون است که باعث کاهش تعداد و مهار رشد

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

باکتری بطور موقت می گردد، در این افراد آنتی بادی اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری وجود دارد و قابل شناسائی است، اما با توجه به کاهش شدید تعداد باکتری، روشهای مرجع باکتریولوژیک و UBT قادر به اثبات حضور باکتری نمی باشد و باعث کاهش ویژگی آزمون سرولوژی می شود (١١).

در زمان حاضر انواع مختلفی آنتی ژن تهیه و به کار گرفته می شود، در مواردی از آنتی ژن خام crude Antigen بدست آمده از پیکره کامل یا کمی خالص شده مثل آنتی ژنهای استخراج شده توسط اسید- گلایسین Acid-Glycin Extract Antigen استفاده می شود که این نوع آنتی ژنها حاوی انواع آنتی ژنهای مختلف باکتری می باشند (٢١). در برخی موارد دیگر آنتی ژنهای خالص تر مثل اوره آز، پروتئین فلاژل و پروتئین های وابسته به پیکره باکتری با وزن مولکولی بالا **High Molecular Weight Cell Protein Associated** (HM-CAP) که با روشهای مختلفی مثل (FPLC) *Fast Protein Liquid Chromatograph* تهیه می شوند، بکار برده می شوند (١١). اما نتایج بدست آمده از هر یک از آنتی ژنهای فوق متفاوت است (١١). نکته ای که باید به آن توجه کرد آن است که همانطور که در ایمونوبلاتینگ دیده می شود، پاسخ ایمنی افراد نسبت به آنتی ژنهای مختلف هلیکوباکترپیلوری یکسان نیست و هر بیمار به برخی از این آنتی ژنها پاسخ می دهد و در نتیجه تفاوت در آنتی ژنهای بکار رفته در روشهای گوناگون موجب بدست آوردن نتایج مختلفی می شود (١٠). بنابراین استفاده از یک گروه خاص آنتی ژن حساسیت را کاهش می دهد و از طرفی استفاده از آنتی ژنهای خام و خالص نشده احتمال واکنش متقاطع و کاهش ویژگی را بالا می برد و هنوز در مورد انتخاب بهترین نوع آنتی ژن توافق کاملی بین گروههای مختلف پژوهشگران حاصل نشده است (٢٢). اما در مجموع گروهی از محققین معتقدند که برای تشخیص آلودگی، در صورت استفاده از روشهای مرجع مناسب و دقیق و شرایط استاندارد مناسب، آنتی ژن خام حاصل از باکتری خرد شده یا آنتی ژنهای سطحی، محصول مناسبی برای استفاده در روشهای سرولوژی می باشند و نیاز به خالص سازی بیشتر نیست (١٩ و ٢٤ و ٢٣). در پژوهش حاضر نیز از آنتی ژن حاصل از باکتری کامل خرد شده برای اندازه گیری IgG ضد هلیکوباکترپیلوری با روش ELISA استفاده شد و حساسیت و ویژگی خوبی بدست آمد که نتایج آن با بسیاری از نتایج گزارش شده با همین آنتی ژن تطابق دارد (٢٣ و ٢٤ و ٢٥ و ١٣ و ١٢).

نکته قابل توجه دیگر گروه سنی جمعیت مورد مطالعه است. در کودکان پاسخ ایمنی کمتر از بالغین است به همین دلیل مرز تشخیصی در کودکان پائین تر از بالغین می باشد و در هنگام تفسیر آزمایش باید به این نکته توجه داشت و در هر روش مرز تشخیصی در کودکان را نیز تعیین نمود (٢٦). همچنین برخی معتقدند که در گروه افراد بالغ، حساسیت و ویژگی روش، در بیماران جوان نسبت به افراد مسن بهتر است و حضور آنتی بادی در افراد مسن نشان دهنده عفونت قبلی می باشد و یا به علت شیوع گاستریت آتروفیک در افراد مسن، جدا کردن باکتری و اثبات حضور آن مشکل بوده، بنابراین ویژگی در آنها کاهش می یابد (٢٢). اما در این تحقیق تفاوتی در بین دو گروه سنی بالای ٥٠ سال و کمتر از ٥٠ سال مشاهده نشد که این شاید به علت شیوع کمتر گاستریت آتروفیک در ایران باشد (٢٧). اگر چه بهتر است که با استفاده از تعداد بیشتر نمونه این مسئله مورد بررسی قرار گیرد. همچنین در این تحقیق فقط از افراد بالای ١٨ سال (بیماران بزرگسال) نمونه گیری انجام شد و برای تعیین آلودگی در کودکان باید مرز تشخیصی دیگری برای این گروه سنی تعیین شود.

نکته دیگری که در هنگام استاندارد کردن روش و به خصوص استفاده از هر گونه کیت توصیه می شود اینست که هر کیت باید قبل از استفاده طبق شرایط محلی استاندارد شده و مرز تشخیصی آن تعیین گردد. زیرا شیوع سویه های خاصی از هلیکوباکترپیلوری و سایر باکتریهایی که امکان تشابه آنتی ژنی با آنرا دارند و سایر عواملی که ممکن است در تعیین مرز تشخیصی دخالت داشته باشند، در نقاط مختلف با یکدیگر متفاوت است (٢٤ و ١٠). کیت تجارتی مورد استفاده در این تحقیق محصول کشور هلند بود که مرز تشخیصی آن در ایران توسط بخش تولید فرآورده های تشخیصی بخش دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تعیین شده بود و همانطور که در جدول ٢ مشاهده می شود نتایج این دو روش نزدیک به یکدیگر است و بیشتر موارد اختلاف در اطراف مرز تشخیصی در روش استاندارد شده در آزمایشگاه و منطقه مشکوک معرفی شده توسط تولید کنندگان کیت تجارتی است که این اختلاف

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

می تواند ناشی از تفاوت آنتی ژنهای موجود و تفاوت پاسخ بیماران به آنها باشد (۱۰).

در بررسی واکنش متقاطع با سایر باکتریهای گرم منفی مشاهده شد که در روش ELISA تشابه کمی بین هلیکوباکتر پیلوری و باکتریهای گرم منفی وجود دارد که فقط در مواردی که نتایج در اطراف مرز تشخیصی است می تواند ایجاد اشکال نماید همچنین این تشابه بیشتر مربوط به آنتی ژنهای مشترک باکتریهای گرم منفی می باشد تا واکنش با کمپیلوباکترژژونی، زیرا کاهش آنتی بادی در هر چهار باکتری مشابه بود.

در نهایت در این پژوهش نشان داده شد، که اندازه گیری IgG اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری با روش ELISA استاندارد شده در آزمایشگاه به دلیل دارا بودن حساسیت و ویژگی قابل قبول، قابلیت تکرارپذیری سهولت کار و غیر تهاجمی بودن نمونه گیری و مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی روشی مناسب برای تشخیص افراد آلوده و استفاده در مطالعات سرواپیدمیولوژی می باشد و نتایج بدست آمده از آن کاملاً قابل مقایسه با کیت تجارتی است.

با توجه به اینکه بعد از اندازه گیری IgG ضد هلیکوباکترپیلوری، اندازه گیری IgA ارزش تشخیصی دارد، بخصوص اینکه در گزارشهایی ذکر شده است که ۲/۷-۲ درصد افراد آلوده علامت دار IgA مثبت و IgG منفی هستند (۲۸) و همچنین در مواردی که IgG در حد بینابینی قرار دارد و میزان IgA می تواند در تشخیص نهایی مفید باشد (۱۵)، استاندارد کردن روش ELISA برای اندازه گیری IgA اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری و بررسی ارزش اندازه گیری IgG و IgA اختصاصی ضد این باکتری در پیگیری درمان توصیه می شود.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری و زحمات همکاران محترم بخش آندوسکوپی بیمارستانهای دکتر علی شریعتی و آیت ا... طالقانی تشکر و قدردانی میشود.

منابع

1 – Telford J L. Immunology of Helicobacter pylori Infection. Current opinion in immunology 1997; 9(4):498-503.

2 – Calam J. Clinicians Guide to Helicobacter pylori. London Weinhelm Chapman & Hall Medical press 1997; chap 1

3 – Ellis R W. Infection and Coronary Heart Disease. J Med Microbiology 1997;46(7):535-41.

4 – Kusters J G & Kaipers E J. Helicobacter and Atherosclerosis. Am Heart J 1999; 138(5pt2) :5523-41.

5-Strachan D P. Non-gastrointestinal consequences of Helicobacter pylori infection. British Medical Bulletin 1998;54(1):87-93.

6 – Farhoudi M , et all. Is peptic ulcer Helicobacter pylori infection the cause of chronic Urticarias. Iranian J of Allergy, Asthema and immunology 2000;1(1):17-19.

7 – Valsecchi R & Pigatto P. Chronic Urticaria and Helicobacter pylori. Acta Derm Venerol (stochen) 1998;78:440-42.

8 – Stopec A. Links betweenHelicobacter pylori infection cobalamin deficiency and pernicious anemia. Arch Inter Med 2000;160(8):1229-30.

9 – Malfertheiner P. et al. Helicobacter pylori: An atlas. London Science press 1996; chap 1, 2, 3, 4, 5.

10 – Glupczynski Y. Microbiological and serological dignosis tests for Helicobacter pylori: An overview. British Medical Bulletin 1998; 45(1):175-186.

11- Williams C L. Helicobacter pylori; Bacteriology and laboratory diagnosis. J Infection 1997;34:1-5.

12 – Kim S Y, et al. Serodiagnosis of Helicobacter pylori infection in Korean patients using ELIZA. J of Immunology 1998;19(4):251-270.

13 – Mitchel H M, et al. The use of serology of diagnosis active Campylobacter pylori infection. Med J Asstralia 1988; 149(19):604 – 609.

14 – Goodwin C s. ELIZA for Campylobacter pyloridis: correlation with presence of Campylobacter pyloridis in gastric mucosa. J infection 1987;155(3):488-494.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]

15 – Anderson L P, et al. Prevalence of antibodies against heat-stable antigens from Helicobacter pylori in patient with Dyspeptic syndroms ans normal persons. AMPIS 1992;100 :779-89.

16 – Sonea R, Zweing M H. Use of receiver operating characteristic curves to evaluate the clinical performance of analytical system. Clin chem 1981;27(9):1569-74.

17 – Anes J,et al. Epidemiology, biostatistics and preventive medicine. London Philadelphia Sanders press 1996;Chap 7:93-95.

18 – Hanley J A & Meneil B. A method of comparing the areas under Receiver Operating Characteristic curve drived from the same cases. Radiology 1983;148:839-843.

19 – Wang J T. Antibody to Helicobacter pylori species specific antigen in patients with adenocarcinoma of the stomach. Biophysical research communication 1998; 244(2):360-63.

20 – Marchildon P A, et al. Evaluation of three commerical Enzyme Immunoassay compared with the UREA Breath Test for detection of Helicobacter pylori infection. J clinical microbiology 1996;34(5):1147-52.

21 – newell D G,et al. An ELIZA for the serodiagnosis of campylobacter pylori associated gasteritis. Scand J Gastroentrol 1988:83 (suppl.142):53-57.

22 – Boer W A D E. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Scand J Gastroentrol 1997; 32(supp 223)35-42.

23 – Talley N J, et al. Serodiagnosis of ELIZA J clinical microbiology 1991;26(8):1635-39.

24 – Over H L A, et al. Usefulness of a new serological test (Bio – Rad) to diagnosis associated gasteritis. J clinical microbiology 1991; 29(2):283-6.

25 – Perez-Perez G I, et al. Campylobacter pylori antibody in human. Ann Inter Med 1988; 109:11-17.

26 – Hirschl A M & Rotter M L. Serological tests for monitoring helicobacter pylori eradication treatment. J Gastroentrology 1996;31 (suppl.IX) :33-36.

27 – Massarrat S & et al. Peptic ulcer disease, irritable bowel syndrome and constipation in two population in Iran. Eur J Gastroentrol & Hepatol 1995.7(5):427-433.

28 – Jaskowski J D,et al. Iga antibody to Helicobacter pylori J Clin Microbiology 1997;35(11):2999-3000.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-26]