مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره چهارم (پیاپی ۲۹) زمستان ۱۳۹۵
صفحات ۳۴۵-۳۳۷

Short Communication

ارزیابی میزان بقای فرم های غیر قابل کشت *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های آب

پرستو چمن رخ*[۱]، محمدحسن شاه حسینی[۲]، مهناز مظاهری اسدی[۳]، طاهر نژاد ستاری[۴]، داوود اسماعیلی[۵]

[۱] دکتری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، [۲] دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، [۳] استاد، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، گروه بیوتکنولوژی محیط زیست، [۴] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، [۵] استادیار، دانشگاه بقیه الله، دانشکده علوم پزشکی، گروه میکروب شناسی.

چکیده

هلیکوباکتر پیلوری عامل مهمی در ایجاد زخم های پپتیک و سرطان معده در انسان است. هنگامی که این باکتری در درون آب قرار می گیرد به فرم زنده اما غیرقابل کشت کوکوئید در می آید. این امر می تواند یکی از عوامل مهم انتقال آلودگی محسوب گردد. این مطالعه با هدف ارزیابی میزان بقای فرم های کوکوئید *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های آب توسط روش های کشت و PCR انجام شد. این پژوهش به صورت تجربی بر روی ۱۰ سویه *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از نمونه های بالینی انجام گرفت. سویه های جدا شده به آب اضافه و در دماهای ٤، ۲۲ و ۳۷ درجه سلسیوس و به فواصل زمانی ۱ و ۲ ماه گرماگذاری شدند. در هر بار، نمونه ها بر روی محیط بروسلا بلاد آگار کشت داده شدند. پس از استخراج DNA، به منظور تکثیر ژن *glmM* از روش PCR استفاده گردید. همچنین حساسیت و اختصاصیت روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر با استفاده از روش کشت در دمای ٤ °C در ماه اول هیچ فرم کوکوئیدی از باکتری در محیط کشت مشاهده نشد. اما درصد شناسایی باکتری در دمای ۲۲ °C و ۳۷ °C برابر با ۱۰٪ و ۲۰٪ بود. در ماه دوم نتیجه مثبتی تشخیص داده نشد. با استفاده از روش PCR مشخص گردید که این روش با حساسیت بیشتر نسبت به کشت در ماه اول و در دماهای ٤ °C، ۲۲ °C و ۳۷ °C به ترتیب قادر به شناسایی فرم های کوکوئید در ۱۰٪، ۳۰٪ و ٤۰٪ موارد *هلیکوباکتر پیلوری* بود. این گزارش در ماه دوم به صورت ۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ بود. یافته های این مطالعه نشان می دهد که فرم های کوکوئید غیرقابل کشت *هلیکوباکترپیلوری* در آب، توسط روش های حساس، دقیق و اختصاصی مانند PCR قابل شناسایی می باشند.

واژگان کلیدی: *هلیکوباکترپیلوری*، کوکوئید، ژن *glmM*، واکنش زنجیره ای پلی مراز، کشت.

دریافت مقاله: دی ماه ۹٤ پذیرش برای چاپ: اسفندماه ۹٤

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) باسیل گرم منفی، میکروائروفیلیک، مارپیچی و متحرک است که اولین بار در سال ۱۹۸٤ شناسایی شد. باکتری عامل گاستریت، زخم های پپتیک، سرطان معده و لنفوم سلول های نوع B مرتبط با مخاط معده می باشد. انسان مخزن اصلی این باکتری است و توانایی استقرار در بدن را برای تمام عمر دارد. مگر اینکه فرد تحت درمان اختصاصی قرار گیرد (۱ و ۲). حالت اولیه انتقال *هلیکوباکتر پیلوری*، به عنوان یک عامل بیماری زای انسانی که نیمی از انسان‌های جهان حامل آن هستند، هنوز مشخص نمی باشد. انتقال این ارگانیسم معمولاً از طریق مدفوعی-دهانی صورت می گیرد. بنابراین آب یکی از ناقلین باکتری محسوب می گردد. *هلیکوباکتر پیلوری* بیشتر از ۹٦ ساعت توانایی زنده ماندن در آب (رودخانه، چاه و...) و حفظ ویژگی عفونت زایی را دارد (۵-۳).

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی.
تلفن: ۰۹۳۷۲۷۲۷٦۷۹ پست الکترونیک: p.chamanrokh@gmail.com

شیـوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در میان و داخل جمعیت‌های مختلف، متفاوت است و به طور معکوس در ارتباط با استانداردهای زندگی و عملکردهای بهداشتی می‌باشد.

این باکتری در شرایط محیطی پرفشار مانند قرار گیری در معرض اکسیژن، pH قلیایی، دمای بالا، کمبود مواد غذایی، کشت های طولانی مدت و درمان با بازدارنده های پمپ پروتونی یا آنتی بیوتیک ها می تواند به فرم کوکوئیدی تغییر شکل دهد (٦).

هلیکوباکترپیلوری در فرم کوکوئید وارد یک وضعیت فیزیولوژیکی زنده اما غیرقابـل کشت می شود. این حالت معمولاً به دلیل عـدم توانایی در تشکیل کلنـی بر روی محیط کشت جامد صورت می‌گیرد. فـرم های کوکوئید *هلیکوباکترپیلوری* حـاوی پلی‌فسفات به عنـوان منبـع انرژی می‌باشنـد که انرژی لازم برای سطـح معینـی از متـابولیسـم درون سلولی جهت حفـظ DNA و RNA و نیـز اجزای ساختاری مانند دیواره سلولی و غشـاء سلولی را حداقل برای ۳ مـاه فراهم می‌سازد. فرم کوکوئیدی غیر قابل کشت اما زنده بوده و با القا دوباره می تواند به فرم مارپیچی بیماریزا در درون بدن تبدیل شود (۹-۷).

با این‌که بیماری زایی کوکوئیدهای القایی توسط آب، نسبت به اشکال مارپیچی کاهش یافتـه، امّا آن‌ها هنـوز هم دارای فعالیت اوره‌آز و چسبندگی به سلول‌های اپی‌تلیـال می‌باشند. همچنین تاژک که یکی از اجزای مسئول برای تحریک و عفونت‌زایی باکتری محسوب می‌شود، هنـوز هم به عنوان یک ساختار سلولی در فرم‌های کوکوئیدی در زیر میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده می‌باشنـد و قادر به کلنیـزاسیون در موکوس معده بوده و باعث التهاب معده می‌گردد (۱۰). بنابراین شناسایی *هلیکوباکتر پیلوری* به دلیل تغییـر شکل ایـن میکروارگانیسم از فـرم باسیلـی به کوکوئیدی که با روش کشت قابـل شناسایی نیستنـد، بسیـار ضروری می‌باشـد (۱۱).

از آنجایی که اساس مبارزه با عوامل عفونی تشخیص سریع بیماری و به دنبال آن درمان کامل بیماران است، تاکید عمده بر روی دستیابی به روش های هر چه سریع تر و دقیق تر تشخیصی برای این بیماران می باشد. امروزه به منظور غلبه بر محدودیت های مربوط به کشت، روش های مولکولی مانند واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) توسعه یافته و برای تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های بالینی و محیطی مورد استفاده قرار می گیرند. از مزایای روش های مبتنی بر DNA شناسایی سریع تر و امکان تشخیص مقدار کم DNA باکتری در نمونه های استفاده شده می باشد (۱۵-۱۲). برای تشخیص مولکولی *هلیکوباکتر پیلوری* عموماً از ژن های هدف مانند *16S rRNA*، توالی های تصادفی کروموزوم، antigen kDa specific-species-26 (*SSA*)، urease A (*ureA*)، urease C (*ureC*) با نام جدید فسفوگلوکوموتـاز (*glmM*) استفاده می گردد. مطالعات نشان می دهد که در روش های مولکولی شناسایی ژن *glmM* مطمئن ترین راه تشخیص *هلیکوباکترپیلوری* می باشد (۱۲ و ۱۵).

هدف از این پژوهش، ارزیابی بقای کوکوئید *هلیکوباکتر* القا شده در آب در دماهای متفاوت، با روش های کشت و PCR بر اساس ژن *glmM* بـود.

مواد و روش ها

الف) تهیه سویه هلیکوباکتر پیلوری استاندارد و روش کشت: در این مطالعه سویه استاندارد *هلیکوباکتر پیلوری* با شماره N:oC30 از مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید و در محیط بروسلا بلاد آگار غنی شده کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط میکرو آئروفیلک با گاز پک (Anaerocult، مرک، آلمان) به مدت ۵ تا ۷ روز در انکوباتور ۳۷ °C گرماگذاری شدند (١٦).

ب) استخراج DNA از سویه استاندارد: برای این منظور DNA کلنی های حاصل با روش DNG Plus و با استفاده از کیت DNP (سیناژن، ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.

ج) بهینه نمودن روش PCR: به منظور تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* از پرایمرهای اختصاصی ژن *glmM* با توالی های H.P-F: 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' و H.P-

R: 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' استفاده گردید (۱۳و ۱٤). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X، ۰/۷۵میکرولیتر از $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP Mix (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میکرومولار)، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیمTaq DNA Polymerase، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱٤ میکرولیتر از آب مقطر استریل انجام شد.

واکنش PCR در دستگاه مستر سایکلر گرادیانت ساخت شرکت اپندرف آلمان و با شرایط دمایی ۱ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۳ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۳ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی سایبر گرین در بافر TBE 0.5X الکتروفورز گردیدند (۱٤).

د) کلونینگ محصول PCR به عنوان کنترل مثبت: محصول PCR پس از خالص‌سازی، با استفاده از کیت T/A cloning Thermo scientific در وکتور pTZ57R کلون گردید. به منظور استخراج پلاسمیدهای حاصل، از کیت Plasmid Mini Extraction Kit شرکت بیونیر، کره جنوبی استفاده شد. در ادامه پلاسمیدهای حاوی محصول PCR، به کمک روش PCR تائید گردیدند. از این پلاسمیدها به عنوان کنترل مثبت در روش PCR استفاده شد.

ه) تعیین حساسیت روش PCR: برای این منظور، سوسپانسیونی از کشت تازه *هلیکوباکترپیلوری* با غلظت $۰/۹\times۱۰^{۹}$ CFU/ml در چگالی نوری برابر با ٦۰۰ نانومتر تهیه گردید. به منظور استخراج DNA از روش DNG plus استفاده شد. DNA استخراج شده با روش رقیق سازی تا ۱ کپی، رقیق گردید.

و) تعیین ویژگی روش PCR: برای این منظور، نمونه هایDNA انسان، موش، *ساکارومیسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *مایکوپلاسما نمونیه* (*Mycoplasma pneumoniae*)، *هرپس سیمپلکس ویروس* (*Herpes Simplex Virus*) و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis*) استخراج و با روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ز) تهیه فرم کوکوئید از نمونه های بالینی اضافه شده به آب: در این مطالعه، به منظور القای فرم های کوکوئیدی، تعداد ۱۰ سویه متفاوت جدا سازی شده از بافت بیوپسی معده (H_1-H_{10}) هر کدام به میزان $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml در ۳ میلی لیتر آب در درون ۳۰ لوله فالکون ریخته شد. سپس این نمونه ها به ۳ گروه ۱۰ تایی تقسیم و در ۳ دمای متفاوت ٤ درجه ، ۲۲ درجه و ۳۷ درجه سلیسیوس قرار داده شدند.

پس از آن، در دو زمان متفاوت از آب ها نمونه برداری صورت گرفت. اولین نمونه برداری از آب های آلوده شده پس از گذشت مدت زمان یک ماه و دومین نمونه برداری در ماه دوم انجام گردید. در هر بار نمونه برداری، مقدار ۱٤۰۰ µl از هر نمونه به صورت مجزا به داخل لوله های اپندورف ۱/۵ سی سی منتقل گردید. نمونه ها در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه روماند دور ریخته شد و رسوب به وسیله ی ورتکس در مقدار ۲۰۰ میکرولیتر آب حل گردید. محلول حاصل به دو قسمت مساوی تقسیم گردید.

۱- *کشت:* مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل تهیه شده از نمونه های آب آلوده شده دستی، بر روی پلیت های حاوی محیط کشت بروسلا بلاد آگار کشت داده شدند و به مدت ۷ روز در شرایط میکروآئروفیلیک در دمای دمای ۳۷ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. پس از گذشت این مدت، از لحاظ رشد بر روی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- *استخراج DNA و انجام PCR:* مقدار ۱۰۰ میکرولیتر دیگر از محلول یاد شده به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. سپس لوله ها بادور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، از رسوب جدا گردید. در نهایت به منظور شناسایی فرم های کوکوئید از پرایمرهای اختصاصی ژن *glmM* و روش PCR مانند آنچه در قسمت ج بیان شد استفاده گردید (۱۳ و ۱٤).

یافته ها

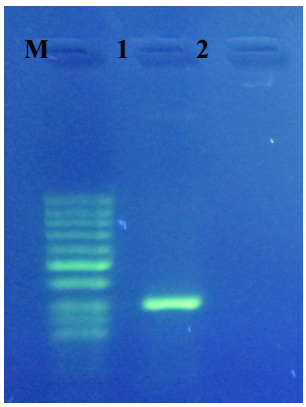
الف) بهینه سازی روش PCR: در این مطالعه نتایج الکتروفورز محصولات قطعه ۲۹٤ جفت بازی نشان دهنده تکثیر صحیح ژن *glmM* در *هلیکوباکتر پیلوری* بود (شکل ۱).

ب) تعیین حساسیت روش PCR: پس تهیه رقت های متوالی از DNA *هلیکوباکترپیلوری*، نتایج نشان داد که با وجود تنها ۱۰ نسخه از DNA، تکثیر انجام می شود. اما در تیترهای کمتر از ۱۰ نسخه از DNA باندی مشاهده نگردید. این امر نشان دهنده حساسیت بالای روش مورد استفاده می باشد (شکل ۲).

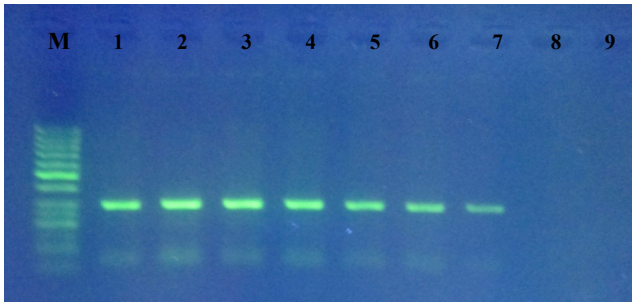
ج) تعیین ویژگی روش PCR: پس از انجام PCR بر روی DNA موجودات مختلف، هیچ محصول و باند ناخواسته ای مشاهده نگردید. بنابراین مشخص شد که روش PCR دارای ویژگی بسیار بالایی می باشد. به طوری که تنها با DNA *هلیکوباکتر پیلوری* واکنش نشان می دهد (شکل ۳).

د) نتایج کشت و PCR نمونه های آب آلوده شده دستی: در کشت ۳۰ و ٦۰ روزه در دمای ٤ درجه سلیسیوس، پس از گذشت ۷ شبانه روز، هیچ رشدی مبنی بر تشکیل کلنی بر روی محیط کشت مشاهده نگردید. اما ۱۰ درصد از نمونه ها در ماه اول با روش PCR مثبت شناخته شدند. اما در ماه دوم در با این روش نیز باندی مشاهده نگردید.

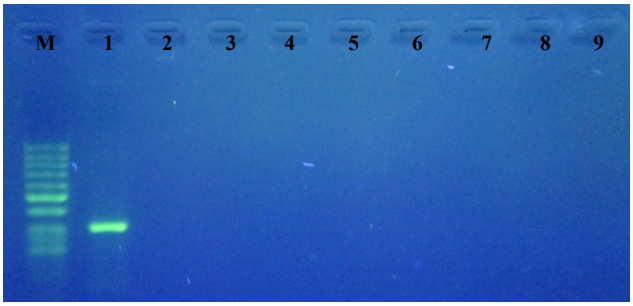
در کشت ۳۰ و ٦۰ روزه در دمای ۲۲ درجه سلیسیوس، پس از ۷ شبانه روز، تنها ۱۰ درصد از نمونه های ماه اول دارای رشد بر روی محیط بروسلا بلاد آگار بودند. در حالی که در هیچ یک از نمونه های ماه دوم، رشدی مبنی بر تشکیل کلنی بر روی محیط کشت مشاهده نگردید. در میان نمونه های ماه اول، ۳۰ درصد و نمونه های ماه دوم نیز ۲۰ درصد از آنها با روش PCR مثبت شناخته شدند. در کشت ۳۰ و ٦۰ روزه در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، پس از ۷ شبانه روز، ۲۰ درصد از نمونه های ماه اول، دارای نتایج مثبت در کشت بودند. در حالی که هیچ یک از نمونه های ماه دوم بر روی محیط کشت رشدی نداشتند. در میان نمونه های ماه اول ٤۰ درصد و نمونه های ماه دوم ۳۰ درصد با روش PCR مثبت شناخته شدند.



شکل ۱: نتایج حاصل از تکثیر ژن *glmM* در *هلیکوباکتر پیلوری*. M) مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱) باند ۲۹٤ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *glmM*، ستون ۲) کنترل منفی.



شکل ۲: ارزیابی حساسیت PCR با استفاده از رقت های متوالی DNA *هلیکوباکتر پیلوری*. M) مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱) کنترل مثبت، ستون ۲) تعداد 10^6عدد DNA، ستون ۳) تعداد 10^5 عدد DNA، ستون ٤) تعداد 10^4 عدد DNA، ستون ۵) تعداد 10^3 عدد DNA، ستون ٦) تعداد 10^2 عدد DNA، ستون ۷) تعداد ۱۰ عدد DNA، ستون ۸) تعداد ۱ عدد DNA، ستون ۹) کنترل منفی.



شکل ۳: تعیین اختصاصیت روش PCR *هلیکوباکترپیلوری*. M) مارکر ۵۰ جفت بازی، ستون ۱) کنترل مثبت، ستون ۲) DNA انسان، ستون ۳) DNA موش، ستون ٤) DNA *ساکارومیسس سرویزیه*، ستون ۵) DNA *اشریشیاکلی*، ستون ٦) DNA *مایکوپلاسما نمونیه*، ستون ۷) DNA هرپس سیمپلکس ویروس، ستون ۸) DNA *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، ستون ۹) کنترل منفی.

بحث

هلیکوباکتر پیلوری در محیط به فرم کوکوئید غیرقابل کشت در می آید، که گاهی موجب عدم موفقیت در تشخیص این باکتری در نمونه های محیطی با استفاده از روش متداول کشت می‌شود. برای غلبه بر محدودیت‌های مربوط به کشت، روش‌های مولکولی مانند PCR برای تشخیص *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه‌های بالینی و محیطی مورد استفاده قرار می گیرند (۱۵).

در مطالعه حاضر ۱۰ سویه *هلیکوباکتر پیلوری* از نمونه های بالینی جداسازی گردید و میزان بقای فرم های کوکوئید *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های آب با روش های کشت و PCR ارزیابی گردید. لو (Lu) و همکاران در سال ۱۹۹۸ با انجام PCR بر روی ۵ ژن متفاوت از *هلیکوباکتر پیلوری* شامل ژن های *16 S rRNA*، توالی های تصادفی ژنی، ژن *SSA*، ژن *ureA* و ژن *ureC* (*glmM*) و مقایسه آنها با یکدیگر دریافتند که ژن *glmM* با اختصاصیت ۹۶ درصد و حساسیت ۱۰۰ درصد مناسب ترین ژن مورد استفاده در شناسایی مولکولی *هلیکوباکتر پیلوری* محسوب می گردد (۱۷).

اسمیت (Smith) و همکاران در سال ۲۰۰۴ با مقایسه سه روش PCR نشان دادند که PCR ژن *ureC* به منظور تکثیر یک قطعه ۲۹۴ جفت بازی اختصاصی ترین و حساس ترین روش می باشد (۱۸). کاهش دوام فرم‌های کوکوئیدی و نیز امکان احیای این فرم به فرم‌های باسیلی توسط پاساژ حیوانی اولین بار در سال ۱۹۸۶ مطرح گردید. اگر سلول‌های کوکوئیدی می‌توانند در حیوانات ایجاد عفونت کنند، بنابراین می توانند سلامتی انسان را نیز تحت تأثیر قرار داده و در آلودگی محیط زیست نقش داشته باشند. مطالعات بسیاری بر روی تعیین وضعیت فیزیولوژیکی و نیز قابلیت عفونت‌زایی اشکال کوکوئیدی انجام شده است (۱۸ و ۱۹). بررسی ها نشان می دهد که ۹۴ و ۵۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان معده و زخم معده دارای اشکال کوکوئیدی *هلیکوباکترپیلوری* در معده خود می باشند (۲۰). روش کشت روشی استاندارد برای شناسایی *هلیکوباکترپیلوری* می‌باشد. زیرا اجازه انتخاب کلنی توسط درمان ضدمیکروبی در محیط کشت را می‌دهد. اما این روش زمانبر، گران و مشکل است (۲۱).

از آن‌جایی‌که *هلیکوباکترپیلوری* یک ارگانیسم سخت رشد می‌باشد و در شرایط محیطی و محیط‌های آبی به فرم کوکوئیدی تبدیل می‌شود، بنابراین روش کشت نمی‌تواند روش مناسبی برای شناسایی در برخی موارد باشد (۲۲).

حساسیت پایین روش کشت در مقایسه با دیگر روش‌ها، توسط عواملی مانند تعداد کم میکروارگانیسم‌ها و یا از دست رفتن حیات میکروارگانیسم‌ها در طی انتقال و یا تغییر شکل میکروارگانیسم‌ها به فرم‌کوکوئیدی قابل بیان می باشد (۲۳ و ۲۴). از سوی دیگر *هلیکوباکترپیلوری* یکی از شایع‌ترین عوامل عفونی گوارشی زخم های معده و دوازدهه در دهه های اخیر بوده که تا کنون ریشه کنی قطعی برای آن به دست نیامده و تنها راه کنترل بیماری پیشگیری از طریق شناسایی منابع آلودگی مانند منابع آب آشامیدنی و رعایت بهداشت فردی و اجتماعی در مواجهه با آن می باشد.

از آنجایی که تشخیص سریع بیماری می‌تواند عامل مهمی در جلوگیری از انتشار بیماری به حساب آید در نتیجه یک روش تشخیصی سریع که قادر به شناسایی عامل بیماری زا در مراحل اولیه بیماری باشد و همچنین امکان استفاده از آن در تمامی مراکز تشخیصی وجود داشته باشد الزامی است. مطالعات مختلفی جهت شناسایی *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های مختلف آب صورت گرفته است. پارک (Park) و همکاران در سال ۲۰۰۰ در کشور انگلستان، شیوع بیوفیلم گونه های مختلف *هلیکوباکتر* از جمله *هلیکوباکتر پیلوری* را در نمونه های آب سیستم لوله کشی شهری بررسی نمودند. یافته های آنها نشان داد که امکان وجود بیوفیلم گونه های *هلیکوباکتر* از جمله *پیلوری* در آب دارای توزیعی جهانی می باشد (۳).

در بررسی صورت گرفته توسط بنسون (Benson) و همکاران در ایالات متحده امریکا، باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های آب محیطی با استفاده از روش PCR شناسایی گردید. حساسیت این روش به میزان ۹۵ درصد گزارش شد (۱۱). واتسون (Watson) و همکاران نیز به شناسایی

هلیکوباکتر پیلوری و بیوفیلم آن با روش PCR در نمونه های آب آشامیدنی در سیستم توزیعی انگلستان پرداختند. نتایج آنها حاکی از عدم وجود باکتری زنده در ۱۵۱ نمونه اخذ شده بود (۲۵).

جانسون (Janzon) و همکاران وجود DNA *هلیکوباکتر پیلوری* در نمونه های آب آشامیدنی و محیطی بنگلادش را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه با وجود حساسیت بالای روش Real-Time PCR هیچ نشانی از DNA *هلیکوباکتر پیلوری* به دست نیامد (۲۶).

در مطالعه حاضر با استفاده از روش کشت در دمای ٤ °C در ماه اول هیچ شکل کوکوئیدی از باکتری در محیط کشت مشاهده نشد. اما حضور باکتری در دمای ۲۲ °C و ۳۷ °C برابر در ۱۰٪ و ۲۰٪ نمونه ها مثبت گزارش گردید. با این وجود در ماه دوم هیچ نمونه مثبتی تشخیص داده نشد. با استفاده از روش PCR مشخص گردید که این روش با حساسیت بیشتر نسبت به کشت در ماه اول و در دماهای ٤ °C، ۲۲ °C، ۳۷ °C به ترتیب قادر به شناسایی فرم های کوکوئید در ۱۰٪ ، ۳۰٪ و ٤۰٪ موارد *هلیکوباکتر پیلوری* بود. این گزارش در ماه دوم به صورت ۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ بود. این امر می تواند به دلیل از بین رفتن این فرم ها و مرگ سلولی باشد. با مقایسه میان دماهای مورد بررسی مشخص گردید که دمای ۳۷ درجه سلسیوس که دمای مناسب رشد *هلیکوباکتر پیلوری* می باشد، بالاترین میزان شناسایی فرم های کوکوئید را نسبت به دو دمای دیگر دارا می باشد. همچنین در این پژوهش حساسیت روش PCR برابر با ۱۰ CFU بود. به عبارت دیگر کمترین میزان میکروارگانیسم به کمک این روش قابل شناسایی بود. این امر نشان دهنده حساسیت بالای روش PCR می باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه با مقایسه نتایج به دست آمده از دو روش کشت و PCR مشخص گردید که روش PCR دارای حساسیت، اختصاصیت، دقت و سرعت بالایی نسبت به روش کشت می باشد. به طوری که به وسیله این روش می توان فرم های کوکوئید غیر قابل کشت *هلیکوباکترپیلوری* را نیز تشخیص داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از و پرسنل محترم موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناور، آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله و مرکز تحقیقات بیماری های کبد و گوارش دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Steven L, Thomas P. Transmission of *Helicobacter pylori* and the role of water and biofilms. J Water Health. 2009; 7: 469-477.

2. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Bordovsky M, Rappuoli R, Covacci A. cag a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(25): 14648-14653.

3. Park SR, Mackay WG, Reid DC. *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilms sampled from a water distribution system. Pergamon. 2001; 35(6): 1624-1626.

4. Massoudian SH, Ghane M, Golijanimoghadam R, Ghorbanimoein F. Absence of *Helicobacter pylori* in the river waters in the north of Iran. Afr J Microbiol. 2012; 6(8):1790-1795 .

5. Azevedo NF, Almeida C, Fernandes I, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW. Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp in water implications for transmission. Appl Environ

Microbiol. 2008; 74(6): 1805-1811.

6. Chen TSH. Is the coccoid form of *Helicobacter pylori* viable and transmissible? Med Assoc. 2004; 67: 547-548.

7. Catrenich CE, Makin KM. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. Scand J Gastroenterol. 1991; 26(181): 58-64.

8. Cellini L, Allocati N, Angelucci D, lezzi T, Campli ED, Marzio L, Dainelli B. Coccoid *Helicobacter pylori* not cultivable in vitro reverts in mice. Microbiol Immunol. 1994; 38: 843-850.

9. Bode G, Mauch F, Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. Epidemiol Infect. 1993; 111: 483-490.

10. Fei-Fei Sh, Jian-Yin L, Jun-Yan L, Cheng H, Dong-Hui S. Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice. World J Gastroenterol. 2003; 9(3): 516-520.

11. Benson JA, Fode-Vaughan KA, Collins MLP. Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR. Letters Appl Microbiol. 2004; 39: 221-225.

12. 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. Letters Appl Microbiol. 2002; 34: 450-454.

13. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed I, Tiwari SK, Habeeb A, Ahi JD, Abid Z, Ahmed N, Habibullah CM. Impact of household hygiene and water source on the prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*: a South Indian perspective. Singapore Med J. 2007; 48(6): 543-549.

14. Guadalupe Co´rdova Espinoza M, Gonza´lez Vazquez R, Morales Mendez I, Ruelas Vargas C, Giono Cerezo S. Detection of the *glmM* gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. J Clin Microbiol. 2011; 49(4): 1650-1652.

15. Shahamat M , Alavi M, Watts JEM, Gonzalez M, Sowers KR, Maeder DW, Robb FT. Development of two PCR-based techniques for detection helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 2004; 42(8): 3613-3619.

16. Esmaeili D, Mohabati Mobarez A, Hatef Salmanian A, Zavaran HA. Optimization of *Helicobacter pylori* culture in order to prepare favorable antigens. J Bacteriol Research. 2009; 1(9): 101-104.

17. Jang-jih L, Cherng-lih P, Rong-yaun SH, Chi-hsiang CH, Qinyuan L, Sonny KF, Chong, Chao-hung Lee. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol. 1999; 37(3): 772.

18. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO. Comparison of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. World J Gastroenterol. 2004; 10: 1958-1960.

18. Moran AP, Upton ME. Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. J Appl Bacteriol. 1987; 62: 527-537.

19. Hazeleger W, Arkesteijn C, Toorop-Bouma A, Beumer RR. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol. 1994; 24: 273-281.

20. Chan WY, Hui PK, Leung KM, Chow J, Kwok F, Ng CS. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach. Am J Clin Pathol. 1994; 102: 503-507.

21. Krogfelt KA, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2005; 10(1): 5-13.

22. Khanolkar-Gaitone SS, Reubish GK, Lee CK. Isolation of bacteria other than *Helicobacter pylori* from stomachs of squirrel monkeys (*Saimiri* spp) with gastritis. Dig Dis Sci. 2000; 45: 272-280.

23. Kisa O, Albay A, Mas MR. The evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 43: 251-255.

24. Brooks HJ, Ahmed D, McConnell MA, Barbezat GO. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by polymerase chain reaction: is it worth it? Diagn Microbiol Infect Dis. 2004; 50: 1-5.

25. Watson CL, Owen RJ, Said B, Lai S, Lee JV, Surman-Lee S, Nichols G. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. J Appl Microbiol. 2004; 97: 690-698.

26. Janzon A1, Sjöling 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(10): 3039-3044.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 4, January 2017

Short Communication

Assessment of the survival rate of non-cultivable forms of *Helicobacter pylori* in water samples

Parastoo Chamanrokh[1], Mohammad hassan Shahhosseiny[2], Mahnaz Mazaheri Assadi[3], Taher Nejadsattari[4], Davood Esmaili[5]

[1] Ph.D., Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2] Associate Professor, Department of Microbiology, Qods branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3] Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran. [4] Associate Professor, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [5] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Baqyatollah, Tehran, Iran.

Abstract

H. Pylori is an important cause of human peptic ulcers and stomach cancers. Once the bacterium is placed in the water, it changes into a viable, but non-cultivable coccoid form, which is considered as an important factor to spread out the infection. The aim of this study was to evaluate the survival rate of coccoid forms of *H. pylori* in water samples, using PCR and culture methods. This experimental study was performed on 10 strains of *H. pylori* isolated from clinical specimens. Isolates were added to water at the temperatures of 4°C, 22°C, and 37°C and incubated at intervals of 1 and 2 months. Each time, the samples were cultured on Brucella blood Agar medium. Following DNA extraction, the presence of *glmM* gene was confirmed using PCR method. Furthermore, the sensitivity and specificity of PCR method were evaluated. While culturing in first month at 4°C showed no *H. pylori* coccoid growth on medium, some positive results (growth rate of 10% and 20%, respectively) were detected at 22°C and 37°C during the same month. No positive result was obtained during the second month. Performing PCR, with more sensitivity as compared to culturing method, identified *H. pylori* coccoid growth of 10%, 30%, and 40%, for the first month, and 0%, 20%, and 30% for the second month at 4°C, 22°C, and 37°C, respectively. The results of this study showed that the non-cultivable cocoid forms of *H. pylori* in water can be detected by non-culturing methods such as PCR which is sensitive, specific, and accurate.

Keywords: *Helicobacter pylori,* Coccoid, *glmM* gene, PCR, Culture.

Correspondence to: Parastoo Chamanrokh

Tel: +98 9372727679

E-mail: p.chamanrokh@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 9(4): 337-345.