

## استفاده از روش Real-time PCR و پروب‌های اختصاصی آلل TaqMan به منظور شناسایی جهش‌های نقطه‌ای مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری

دکتر محمد کارگر<sup>۱</sup>، صادق قربانی دالینی<sup>۲</sup>، دکتر عباس دوستی<sup>۳</sup>، نگار صعودی<sup>۲</sup>

### خلاصه

**مقدمه:** هلیکوباکتر پیلوری یک ارگانسیم مشکل پسند و کند رشد است که انجام تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن به ۱۰ تا ۱۴ روز زمان نیاز دارد. استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند جایگزین دقیق و مناسبی برای شناسایی هم‌زمان جهش‌های نقطه‌ای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی مقاومت به کلاریترومایسین و جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با آن با استفاده از روش Real-time PCR بود.

**روش‌ها:** این مطالعه به صورت مقطعی - توصیفی بر روی ۲۰۰ نمونه بی‌بویسی تهیه شده از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد. در ابتدا با استفاده از روش‌های اوره‌آز سریع (RUT) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) وجود هلیکوباکتر پیلوری تشخیص داده شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از روش Real-time PCR، مقاومت به کلاریترومایسین و جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با آن با استفاده از پروب‌های اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، در ۱۶۴ نمونه (۸۲ درصد) هلیکوباکتر پیلوری شناسایی گردید که ۱۰۵ نمونه (۶۴/۲ درصد) حساس و ۵۹ نمونه (۳۵/۹۸ درصد) آن مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلاریترومایسین بودند. در بین سوش‌های مقاوم شناسایی شده، موتاسیون‌های نقطه‌ای A2144G، A2143G، A2143C و A2142G به ترتیب فراوانی ۲/۴۴ درصد، ۱۵/۸۵ درصد، ۹/۱۵ و ۱۲/۱۹ را داشتند. اما در ۵ نمونه‌ی (۸/۴۷ درصد) مقاوم، هیچ کدام از این ژنوتیپ‌ها شناسایی نشد. در بین سویه‌های دارای مقاومت، ۳۸ نمونه (۲۳/۱۷ درصد) تنها دارای یک ژنوتیپ و ۱۶ نمونه (۹/۷۶ درصد) دارای مخلوطی از ژنوتیپ‌ها بودند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که تکنیک Real-time PCR به صورت مستقیم توانایی شناسایی هم‌زمان هلیکوباکتر پیلوری و انواع مقاومت به کلاریترومایسین را در کمترین زمان در نمونه‌های بی‌بویسی دارد.

**واژگان کلیدی:** هلیکوباکتر پیلوری، کلاریترومایسین، جهش‌های نقطه‌ای، Real-time PCR.

### مقدمه

( B-cell mucosa-associated lymphoid tissue )  
(Lymphoma) است (۲-۳).

در حال حاضر اولین خط درمان هلیکوباکترپیلوری، درمان ۳ دارویی به مدت ۷ روز است. به طور معمول برای درمان هلیکوباکتر پیلوری از یک ترکیب ضد اسید از دسته‌ی مهارکننده‌های پمپ پروتون (Proton Pump Inhibitors یا PPI) مانند امپرازول، لانزوپرازول و پنتوپرازول و یا دسته‌ی ممانعت کننده‌های H2 مانند سایمتیدین، رانیتیدین،

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی است که در معده‌ی انسان‌ها مستقر می‌شود و اهمیت آن در بیماری‌های دستگاه گوارش به دلیل نقش بالقوه‌ی آن در ایجاد بیماری‌های قسمت فوقانی مجرای گوارش است (۱). این باکتری عامل اصلی التهاب مزمن معده است و با توسعه‌ی زخم‌های معده و دوازدهه ارتباط دارد. به علاوه یکی از عوامل بروز آدنوکارسینومای معده و لنفوم سلول‌های B مخاطی وابسته به بافت لنفاوی

<sup>۱</sup> دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران.

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، جهرم، ایران.

<sup>۳</sup> استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر محمد کارگر

اصلی روش‌های یاد شده زمان‌بر بودن، وابستگی بیش از اندازه به شرایط آزمایشگاه و تکرارپذیر نبودن آن‌ها است. اما روش‌های مولکولی تکرارپذیرند و بدون نیاز به کشت باکتری امکان ارزیابی مستقیم نمونه‌های بیوپسی را دارند (۸). هدف از انجام این پژوهش، استفاده از روش Real-time PCR به منظور بررسی مقاومت به کلاریترومایسین و جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با آن بود.

### روش‌ها

این مطالعه‌ی مقطعی و توصیفی پس از کسب موافقت کمیته‌ی اخلاق پزشکی دانشگاه و رضایت‌نامه‌ی کتبی از بیماران، بر روی ۲۰۰ نمونه‌ی بیوپسی تهیه شده از بیمارانی که از خرداد تا آذر سال ۱۳۸۸ به مرکز اندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه کرده بودند، انجام شد.

در ابتدا آزمون اوره‌آز سریع، با استفاده از کیت Gastro urease ساخت شرکت بهارافشان، انجام گردید و نمونه‌ها به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد. استخراج DNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد.

آزمون PCR به منظور تکثیر یک قطعه‌ی ۱۰۹ جفت بازی ژن 16S rRNA برای تأیید حضور هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از جفت پرایمرهای HP-1 و HP-2 (جدول ۱) و با استفاده از دستگاه مسترسایکلر ساخت شرکت اپندورف، بر روی تمامی نمونه‌های بیوپسی انجام گردید. تکثیر قطعه‌ی هدف در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرومول dNTPs، ۰/۲ میلی‌مول از هرکدام از پرایمرها و ۱ واحد DNA

فوماتیدین و روکساتیدین همراه با یک یا دو آنتی‌بیوتیک (کلاریترومایسین، آموکسی‌سیلین و یا مترونیدازول) استفاده می‌شود (۴-۵). عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری تا سال ۲۰۰۱ با استفاده از رژیم سه دارویی رایج که یکی از آنتی‌بیوتیک‌های اصلی آن کلاریترومایسین محسوب می‌شد تا ۹۰ درصد قابل درمان بود (۳).

اما ظهور مقاومت هلیکوباکتر پیلوری نسبت به کلاریترومایسین موجب کاهش تأثیر درمانی و استفاده‌ی محدودتر از این دارو شد (۳). بسیاری از مطالعات نشان داده است که در بعضی از موارد تا ۵۰ درصد از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نسبت به کلاریترومایسین مقاوم هستند که این امر موجب طولانی شدن طول مدت درمان می‌شود (۶). امروزه مشخص شده است که استفاده‌ی اشتباه از ماکرولیدها، به ویژه اریترومایسین، منجر به ایجاد و افزایش مقاومت نسبت به کلاریترومایسین می‌شود (۶).

عامل اصلی مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری عدم اتصال ماکرولیدها به قسمت 23S rRNA ریبوزوم باکتریایی است. به این ترتیب که جایگاه هدف آنتی‌بیوتیک به وسیله‌ی متیلاسیون یا وقوع جهش‌های خود به خودی نقطه‌ای در ناحیه‌ی پپتیدیل ترانسفراز واقع در دومین V ژن 23S rRNA تغییر می‌کند (۴). جهش‌های نقطه‌ای A2142G، A2143G و A2142C شایع‌ترین جهش‌های گزارش شده هستند. همچنین جهش‌های دیگر مانند G2141A، A2115G و T2717C نیز به ندرت گزارش شده‌اند (۷).

در حال حاضر روش متداول برای تعیین مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به کلاریترومایسین بر مبنای استفاده از روش‌های انتشار در آگار و یا E-test است. مشکل

جدول ۱. توالی الیگونوکلوئیدهای مورد استفاده در این مطالعه

هدف	قطعه (5'→3')	پرایمر/پروب
16S rRNA	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	HP-1
	ATTACTGACGCTGATTGTGC	HP-2
23S rRNA	CCACAGCGATGTGGTCTCAG	HP23S-1
	CTCCATAAGAGCCAAAGCCC	HP23S-2
Wild type	Cy5-GGGGTCTTTCCGTCT-BHQ2	Pwt
A2144G	TAMRA-GGTCCTTCCGTCTTG-Dabcyl	P44G
A2143G	TET-GGTCTCTCCGTCTTG-Dabcyl	P43G
A2143C	HEX-GGTCTGTCCGTCTTG-Dabcyl	P43C
A2142G	FAM-GGTCTTCCCGTCTTG-Dabcyl	P42G

DNA پلی‌مراز Smar Taq، ۰/۲ میلی‌مول از هر کدام از پرایمرها و پروب‌های Pwt، P44G، P43G، P43C و P42G به ترتیب با غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۱ و ۰/۷۵ میلی‌مول انجام گردید. این واکنش در دستگاه (Corbett Research, Australia) Rotor-Gene 6000 و با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه، ۴۵ چرخه شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه انجام گردید. تمامی واکنش‌ها ۳ بار تکرار و در هر بار آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی نیز انجام شد. اطلاعات به دست آمده به وسیله‌ی نرم‌افزار rotor-gene 6000 نسخه‌ی ۱/۷ پردازش گردید. در نهایت با استفاده از نتایج به دست آمده، مقادیر CT (چرخه‌ای که مقدار فلورسانس از مقدار زمینه بالاتر می‌رود) محاسبه شد.

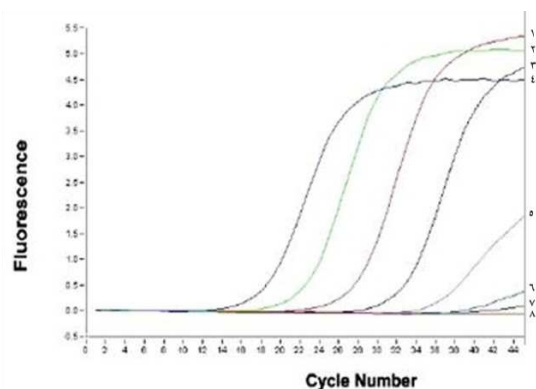
#### یافته‌ها

شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی: بر اساس آزمون اوره‌آز سریع، از ۲۰۰ نمونه‌ی مورد مطالعه، ۱۶۴ نمونه (۸۲ درصد) اوره‌آز مثبت بود. نتایج استخراج DNA نمونه‌های بیوپسی اوره‌آز مثبت و PCR ژن 16S rRNA در تمامی آن‌ها (۱۰۰ درصد) باندهای ۱۰۹ جفت‌بازی هلیکوباکتر پیلوری را نشان داد (شکل ۱).

پلی‌مراز Smar Taq (تمامی واکنش‌گرهای یاد شده ساخت شرکت سینازن) انجام گردید. شرایط دمایی PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در ادامه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و گسترش نهایی انجام گردید. سپس قطعه‌ی تکثیر یافته با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده گردید.

آزمون Real-time PCR با استفاده از جفت پرایمرهای HP23S-1 و HP-23S-2 و پروب‌های تغییر یافته‌ی Pwt، P44G، P43G و P43C گزارش شده توسط Pina و همکاران (۹) به منظور بررسی سویه‌های حساس و سویه‌های مقاوم دارای جهش‌های A2144G، A2143G و A2143C انجام شد. همچنین برای بررسی جهش A2142G، با استفاده از توالی ژن 23S rRNA (GenBank accession no. U27270)، پروب P42G طراحی گردید (جدول ۱).

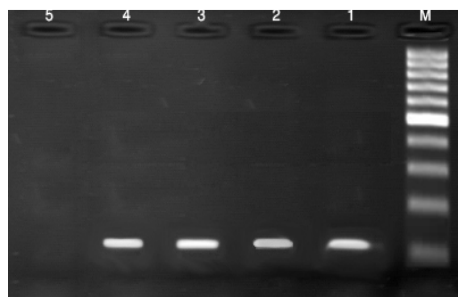
واکنش TaqMan real-time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میلی‌مول dNTP، ۰/۱ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub>، ۱/۵ واحد



شکل ۲. نمودار بررسی مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری با تعیین حد مرزی CT در آزمون Real-time PCR. CT کمتر از ۳۵ نشان دهنده‌ی نمونه‌های خالص و CT بین ۳۵ تا ۴۰ نشان دهنده‌ی نمونه‌های دارای چندین ژنوتیپ و CT بیشتر از ۴۰ نشان دهنده‌ی نتایج مثبت کاذب هستند.

این که دو نسخه از ژن rRNA 23S در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، این حساسیت معادل ۸۰ کپی از ژن هدف در نظر گرفته شد. همچنین نتایج به دست آمده از تعیین حساسیت تکنیک بر روی نمونه‌های بیوپسی نیز با نتایج کشت باکتری مشابه بود. مقاومت به کلاریترومایسین: نتایج Real-time PCR نشان داد که این تکنیک قادر به بررسی مقاومت به کلاریترومایسین در تمامی نمونه‌های بیوپسی (۱۰۰ درصد) است. همچنین پروب‌های مورد استفاده در این تکنیک قادر به شناسایی جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با مقاومت به کلاریترومایسین در ۱۵۹ نمونه از ۱۶۴ نمونه (۹۶/۹۵ درصد) بیوپسی بودند.

نتایج این بررسی نشان داد که از مجموع ۱۶۴ سویه‌ی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده، ۱۰۵ نمونه (۶۴/۰۲ درصد) ژنوتیپ حساس به صورت خالص داشتند. همچنین ۵۹ نمونه (۳۵/۹۷ درصد) دارای ژنوتیپ‌های مقاوم به کلاریترومایسین بودند که از این تعداد ۳۸ نمونه‌ی (۲۳/۱۷ درصد) آن‌ها تنها دارای یک ژنوتیپ مقاوم بودند. از مجموع نمونه‌های



شکل ۱. قطعه‌ی ۱۰۹ جفت بازی حاصل از PCR ژن S rRNA به منظور تأیید حضور هلیکوباکتر پیلوری. ردیف M سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱ کنترل مثبت، ردیف ۲-۴ نمونه‌های مثبت، ردیف ۵ کنترل منفی.

تعیین حد مرزی CT در آزمون Real-time PCR تغییرات مقدار فلورسانس در طی ۴۵ چرخه در کانال‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر Rotor-gene مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۱۶۴ نمونه‌ی مورد بررسی، در ۱۴۳ مورد (۸۷/۲ درصد) افزایش فلورسانس تنها در یکی از کانال‌ها مشاهده شد که نشان دهنده‌ی نمونه‌های خالص بود و به همین دلیل تنها یک CT برای آن‌ها ثبت شد. ۱۶ نمونه (۹/۸ درصد) ژنوتیپ مخلوط داشتند و بنابراین افزایش مقدار فلورسانس در بیش از یک کانال مشاهده و بیش از یک CT برای آن‌ها ثبت شد. در این پژوهش مقادیر CT بین ۲۱/۴ تا ۴۳/۶ ثبت گردید. مقادیر CT کمتر از ۳۵ به عنوان نمونه‌های واجد یک ژنوتیپ، مقادیر CT بین ۳۵ تا ۴۰ به عنوان نمونه‌های دارای چند ژنوتیپ و مقادیر CT بیش از ۴۰ به عنوان مثبت کاذب در نظر گرفته شد (شکل ۲).

حساسیت تکنیک TaqMan real-time PCR برای به دست آوردن حساسیت تکنیک از DNA به دست آمده از کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد و خطی بودن نمودار استاندارد با تهیه‌ی رقت‌های متوالی در دستگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حساسیت تکنیک معادل ۴۰ باکتری است. با توجه به

(۱۳)، Lascols و همکاران (۷)، Russmann و همکاران (۱۴)، van der Ende و همکاران (۱۵) و Fontana و همکاران (۱۶) در سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۴ در مناطق مختلف اروپا با استفاده از روش‌های مختلف شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهش‌ها مشخص نمود که بیشترین شیوع مقاومت به کلاریترومایسین در اروپا مربوط به کشور فرانسه است. همچنین نتایج مطالعه‌ی Fontana و همکاران نشان داد که بیشترین اختلاف شیوع در اروپا مربوط به نقاط شمالی و جنوب ایتالیا است. شیوع مقاومت در شمال ایتالیا ۱/۶ درصد و در جنوب آن ۱۴ درصد گزارش گردید. ضمن این که دقیق‌ترین روش شناسایی جهش‌های مقاومتی به کلاریترومایسین تکنیک Real-time PCR گزارش شد (۱۶).

Prazeres و همکاران (۱۷)، Godoy و همکاران (۱۸)، Torres و همکاران (۱۹)، Alarcon و همکاران (۲۰) و Stone و همکاران (۲۱) در سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۳ در کشورهای مختلف قاره‌ی آمریکا با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را ارزیابی نمودند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که کمترین دامنه‌ی شیوع مقاومت مربوط به برزیل (۹/۸ درصد) و بیشترین آن مربوط به ایالات متحده (۵۵ درصد) است.

در سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۶ در آسیای شرقی نیز Pan و همکاران (۲۲)، Liu و همکاران (۶)، Kato و همکاران (۲۳)، Rani و Kumala (۲۴) و Lee و همکاران (۵) با استفاده از روش‌های مختلف میزان شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را بین ۲۰ تا ۲۷ درصد گزارش نمودند. در ایران و در استان چهارمحال و بختیاری، کارگر و همکاران (۲۵) با استفاده از روش PCR-RFLP شیوع مقاومت به کلاریترومایسین را

مقاوم، ۳ نمونه (۱/۹۳ درصد) ژنوتیپ A2144G، ۱۳ نمونه (۷/۹۳ درصد) ژنوتیپ A2143G، ۷ نمونه (۴/۲۷ درصد) ژنوتیپ A2143C و ۱۵ نمونه (۹/۱۵ درصد) ژنوتیپ A2142G را داشتند. در این بررسی ۱۹ نمونه (۱۱/۵۸ درصد) نیز دارای ژنوتیپ‌های مخلوط بودند. اما پروب‌های مورد استفاده در این پژوهش در ۵ نمونه (۳/۰۵ درصد) قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم نبودند.

### بحث

مقاومت به کلاریترومایسین عامل اصلی شکست درمانی با این آنتی‌بیوتیک است. به دلیل مصرف روز افزون ماکرولیدها، نه تنها در درمان هلیکوباکتر پیلوری بلکه در درمان عفونت‌های دستگاه تنفسی نیز میزان شیوع سویه‌های مقاوم در حال افزایش هستند. به همین دلیل پایش سریع و دقیق سویه‌های مقاوم به کلاریترومایسین از نظر بالینی اهمیت قابل توجهی دارد. با روش ارائه شده در این پژوهش می‌توان سویه‌های مقاوم را در حداکثر ۲ تا ۳ ساعت شناسایی نمود. به این ترتیب ارزیابی وجود هلیکوباکتر پیلوری و مقاومت به کلاریترومایسین به سرعت پس از اندوسکوپي فراهم می‌شود. اما مدت این زمان در روش‌های فنوتیپی برای کشت، جداسازی باکتری و ارزیابی نتایج مقاومت حداقل به چند روز می‌رسد (۹-۱۰).

تا کنون گزارش‌های مختلفی در دنیا در مورد شیوع مقاومت به کلاریترومایسین ارائه شده است. اما به دلیل استفاده از روش‌های متفاوت آزمایشگاهی، ارزیابی در مناطق جغرافیایی گوناگون و زمان‌های مختلف، آمار دقیقی در مورد آن وجود ندارد.

به عنوان نمونه Schabereiter-Gurtner و همکاران (۱۱)، Kalach و همکاران (۱۲)، Oleastro و همکاران

A2142C به ترتیب با فراوانی ۱۵/۸ و ۱۰/۵ درصد است. اما نتایج ما در پژوهش حاضر نشان داد که بیشترین جهش شناسایی شده مربوط به جهش A2143G با فراوانی ۳۷/۱ درصد و سپس جهش‌های A2142G، A2143C و A2144G به ترتیب با فراوانی ۲۸/۶، ۲۱/۴ و ۵/۷ درصد است. به این ترتیب نتایج دو پژوهش یاد شده نشان می‌دهد که شیوع جهش‌های مقاومت به کلاریترومایسین در این منطقه به صورت A2143G □ A2142G □ A2143C □ A2144G است که به استثنای جهش A2144G، شیوع سایر جهش‌ها با سایر نقاط دنیا یکسان می‌باشد.

با استفاده از روش Real-time PCR می‌توان در ابتدا سویه‌های حساس، مقاوم و مخلوط را شناسایی و سپس نوع جهش را در نمونه‌های مقاوم و مخلوط شناسایی نمود. به این ترتیب امکان شناسایی دقیق سویه‌های حساس و مقاوم وجود دارد. به همین دلیل از این تکنیک می‌توان به منظور شناسایی سریع و مقرون به صرفه سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری و همچنین ارزیابی مستقیم مقاومت به کلاریترومایسین در نمونه‌های بیوپسی استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم و شهرکرد به دلیل حمایت‌های اجرایی اعلام می‌دارند.

### References

1. Goldman RC, Zakula D, Flamm R, Beyer J, Capobianco J. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(7): 1496-500.
2. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, Russmann H. Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClariRes real-time PCR assay for de-

۲۲/۶ درصد گزارش نمودند. اما نتایج ما در این پژوهش نشان داد که میزان مقاومت به کلاریترومایسین با استفاده از تکنیک Real-time PCR، ۳۵/۹۸ درصد است. این نتایج نشان می‌دهد که شیوع مقاومت در این منطقه از ایران از کشورهای واقع در آسیای شرقی بیشتر است.

همچنین گزارش‌های متعددی در دنیا در مورد میزان شیوع جهش‌های نقطه‌ای مرتبط با مقاومت به کلاریترومایسین در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری انجام شده است. Pina و همکاران (۹) و Marais و همکاران (۲۶) از فرانسه، Russmann و همکاران (۱۴) از آلمان، Alarcon و همکاران (۲۰) از آرژانتین، Pan و همکاران (۲۲) از چین، Maeda و همکاران (۲۷)، Matsuoka و همکاران (۲۸)، Kato و همکاران (۲۹) و Lee (۵) از کره در سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۴ و با استفاده از تکنیک‌های مختلف به بررسی شیوع این جهش‌ها پرداختند. به طور کلی در مناطق مختلف دنیا ترتیب فراوانی شیوع جهش‌های نقطه‌ای به صورت A2143C □ A2142C □ A2143G □ A2142G □ A2144G است. در سال ۲۰۰۷ نیز کارگر و همکاران (۲۵) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP شیوع جهش‌های نقطه‌ای کلاریترومایسین را در استان چهارمحال و بختیاری بررسی نمودند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین شیوع جهش مربوط به جهش A2143G با فراوانی ۶۸/۴ درصد و سپس جهش‌های A2142G و

tection and clarithromycin susceptibility testing of *H. pylori* in stool specimens from symptomatic children. *J Clin Microbiol* 2007; 45(6): 1718-22.

3. Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, Saverymuttu S. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4):



- 1217-20.
4. Taneike I, Suzuki K, Nakagawa S, Yamamoto T. Intrafamilial spread of the same clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection confirmed by molecular analysis. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3901-3.
  5. Lee JH, Shin JH, Roe IH, Sohn SG, Lee JH, Kang GH, et al. Impact of clarithromycin resistance on eradication of *Helicobacter pylori* in infected adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(4): 1600-3.
  6. Liu Z, Shen J, Zhang L, Shen L, Li Q, Zhang B, et al. Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori*-23S rRNA in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. *BMC Microbiol* 2008; 8: 81.
  7. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4573-7.
  8. van Doorn LJ, Glupczynski Y, Kusters JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, et al. Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(5): 1500-4.
  9. Pina M, Occhialini A, Monteiro L, Doermann HP, Megraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3285-90.
  10. Ribeiro ML, attos RG, endonca S, edrazzoli Jr J. Quantitative real-time PCR for the clinical detection of *Helicobacter pylori*. *Genetics and Molecular Biology* 2007; 30(2): 431-4.
  11. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovach Z, et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10): 4512-8.
  12. Kalach N, Benhamou PH, Campeotto F, Bergeret M, Dupont C, Raymond J. Clarithromycin resistance and eradication of *Helicobacter pylori* in children. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(7): 2134-5.
  13. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 397-402.
  14. Russmann H, Adler K, Haas R, Gebert B, Koltzko S, Heesemann J. Rapid and accurate de-termination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11): 4142-4.
  15. van der Ende A, van Doorn LJ, Rooijackers S, Feller M, Tytgat GN, Dankert J. Clarithromycin-susceptible and -resistant *Helicobacter pylori* isolates with identical randomly amplified polymorphic DNA-PCR genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2648-51.
  16. Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in stool samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8): 3636-40.
  17. Prazeres MP, De Magalhaes Queiroz DM, Campos Barbosa DV, Aguiar RG, Nogueira ME, Santos A, et al. *Helicobacter pylori* primary resistance to metronidazole and clarithromycin in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 2021-3.
  18. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L, Miranda MC, Mendonca S, et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 20.
  19. Torres J, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, Madrazo-De la Garza A, Dehesa M, Gonzalez-Valencia G, et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7): 2677-80.
  20. Alarcon T, Vega AE, Domingo D, Martinez MJ, Lopez-Brea M. Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: prevalence and study of mechanism of resistance by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 486-99.
  21. Stone GG, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm RK, Graham DY, et al. A PCR-oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 712-4.
  22. Pan ZJ, Su WW, Tytgat GN, Dankert J, van der Ende A. Assessment of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* among patients in Shanghai and Guangzhou, China, by primer-mismatch PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(1): 259-61.
  23. Kato M, Yamaoka Y, Kim JJ, Reddy R, Asaka M, Kashima K, et al. Regional differences in metronidazole resistance and increasing clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(8): 2214-6.
  24. Kumala W, Rani A. Patterns of *Helicobacter pylori* isolate resistance to fluoroquinolones,

- amoxicillin, clarithromycin and metronidazoles. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2006; 37(5): 970-4.
25. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Evaluating the prevalence of A2142G, A2143G, and A2142C mutations in clarithromycin resistance *Helicobacter pylori* in Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran. Journal of Kordestan University of Medical Sciences 2010; 14(4): 72-8.
26. Marais A, Monteiro L, Occhialini A, Pina M, Lamouliatte H, Megraud F. Direct detection of *Helicobacter pylori* resistance to macrolides by a polymerase chain reaction/DNA enzyme immunoassay in gastric biopsy specimens. Gut 1999; 44(4): 463-7.
27. Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Kanai F, Shirato ri Y, Omata M. *Helicobacter pylori* specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance. Gut 1998; 43(3): 317-21.
28. Matsuoka M, Yoshida Y, Hayakawa K, Fukuchi S, Sugano K. Simultaneous colonisation of *Helicobacter pylori* with and without mutations in the 23S rRNA gene in patients with no history of clarithromycin exposure. Gut 1999; 45(4): 503-7.
29. Matsumura M, Hikiba Y, Ogura K, Togo G, Tsukuda I, Ushikawa K, et al. Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 691-5.



## Real-Time PCR Assay Using Allele-Specific TaqMan probe for Detection of Clarithromycin Resistance and Its Point Mutations in Helicobacter Pylori

Mohammad Kargar PhD<sup>1</sup>, Sadegh Ghorbani-Dalini MSc<sup>2</sup>, Abbas Doosti PhD<sup>3</sup>,  
Negar Souod MSc<sup>2</sup>

### Abstract

**Background:** Helicobacter pylori is a fastidious microorganism and therefore standard phenotypic susceptibility tests can take at least 10-14 days. Molecular based diagnostic assays offer an alternative approach to obtain susceptibilities to antibiotics and detection of point mutations with greater accuracy. The aim of this study was the assessment of Clarithromycin resistance and its point mutations by using real-time PCR assay.

**Methods:** This cross-sectional descriptive study was performed on 200 gastric biopsy specimens obtained from patients undergoing upper gastrointestinal endoscopy at Hajar hospital in Shahrekord. Initially Helicobacter pylori were identified by rapid urease test (RUT) and polymerase chain reaction (PCR). Then clarithromycin resistance and its point mutations were evaluated by using specific probes and real-time PCR technique.

**Findings:** Of total samples, 164 (82%) were Helicobacter pylori positive. Overall, a clarithromycin susceptible strains were detected in 105 (64.02%) patients and resistance strains were detected in 59 (35.98%) which were identified as 4 (2.44%) A 2144G, 26 (15.85%) A2143G, 15 (9.15%) A2143C, and 20 (12.19%) A2142G point mutations. Genotype of 5 (8.47%) strains was not detected. Purely resistant strains were detected in 38 (23.17%), while heteroresistant were found in the remaining 16 cases (9.76%).

**Conclusion:** Results showed that real-time PCR assay has high accuracy to simultaneously identify Helicobacter pylori and clarithromycin resistance types directly in gastric biopsy specimens in short time.

**Keywords:** Helicobacter pylori, Clarithromycin, Point mutations, Real-time PCR.

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Clube, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

<sup>3</sup> Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

**Corresponding Author:** Mohammad Kargar PhD, Email: mkargar@jia.ac.ir