جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸
صفحات ۱۵۴-۱۴۹

راه‌اندازی روش real-time PCR به منظور شناسایی مستقیم حساسیت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری

صادق قربانی دالینی[1*]، دکتر محمد کارگر[2]، دکتر عباس دوستی[3]، پژمان عباسی[2]، نگار صعود[1]

[1]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان،
[2]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی،
[3]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به کلاریترومایسین تا حد قابل توجهی باعث کاهش اثرات درمانی داروی مذکور گردیده است. هدف از این پژوهش ارزیابی روش مستقیم real-time PCR و مقایسه آن با روش دیسک دیفیوژن برای شناسایی مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت تجربی برروی ۴۵ نمونه بیوپسی تهیه شده از بیماران دارای اختلالات گوارشی انجام شد. در تمامی نمونه‌های مورد بررسی وجود هلیکوباکتر پیلوری با کشت، RUT و PCR معمولی تایید گردید. همچنین مقاومت به کلاریترومایسین با استفاده از روش CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) و real-time PCR با استفاده از پروب اختصاصی ناحیه پپتیدیل ترانسفراز ژن *23S rRNA* هلیکوباکتر پیلوری انجام شد.

یافته‌ها: با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، ۲۰ نمونه حساس (۴۴/۴۴٪) و ۲۵ نمونه مقاوم (۵۵/۵۶٪) به کلاریترومایسین شناسایی گردید. اما با استفاده از روش real-time PCR در ۲۰ نمونه ژنوتیپ مقاوم (۴۴/۴۴٪)، ۵ نمونه ژنوتیپ مخلوط (۱۱/۱۱٪) و در ۲۰ نمونه ژنوتیپ حساس (۴۴/۴۴٪) به کلاریترومایسین شناسایی گردید. همچنین نتایج نشان داد که حساسیت این تکنیک برابر ۴۰ باکتری یا ۸۰ کپی از ژن *23S rRNA* می باشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که روش real-time PCR دارای حساسیت و دقت مناسبی برای شناسایی مقاومت به کلاریترومایسین در کمترین زمان ممکن است.

واژه‌گان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، کلاریترومایسین، Real-time PCR

دریافت مقاله: مرداد ۸۸ پذیرش برای چاپ: شهریور ۸۸

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باکتری است که منجر به بیماری‌های مزمن معده در نیمی از مردم دنیا می‌شود. عفونت غالبا در دوران کودکی کسب شده و به صورت مزمن در طول زندگی فرد بدون ایجاد علائم باقی می‌ماند. اما در تعداد معنی‌داری از افراد آلوده (بیش از ۲۰٪)، بیماری‌های شدید معده مشاهده می‌گردد. این باکتری عامل اصلی التهاب معده، زخم‌های معده و دوازدهه و مرتبط با سرطان معده می‌باشد. در حال حاضر ۷ روز درمان ۳ دارویی به عنوان خط اول درمان آن استفاده می‌شود. این درمان شامل امپرازول، کلاریترومایسین و آموکسی‌سیلین یا مترونیدازول می‌باشد. با این

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان
تلفن: ۰۹۱۷۳۱۳۱۵۳۶
پست الکترونیک: gorbanidalini@jia.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

وجود، این درمان به دلیل افزایش درمان‌های ناموفق در اثر شیوع سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری مقاوم به کلاریترومایسین تحت تاثیر قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که بین ۰ تا ۵۰٪ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری مقاوم به کلاریترومایسین می‌باشند که این امر منجر به افزایش مدت استفاده از این دارو در درمان ۳ دارویی می‌گردد. استفاده بی‌رویه و نابجا از ماکرولیدها به ویژه کلاریترومایسین و اریترومایسین منجر به پدید آمدن و گسترش مقاومت به این دارو شده است (۳-۱). کلاریترومایسین یک آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک متعلق به گروه ماکرولیدها می‌باشد که به ناحیه پپتیدیل ترانسفراز دومین V از ژن *23S rRNA* متصل می‌گردد. این اتصال باعث تداخل در فرآیند طویل شدن پروتئین می‌گردد، بنابراین به طور موثری از طویل شدن پروتئین در باکتری‌ها ممانعت به عمل می‌آورد. فعالیت ضدباکتریایی کلاریترومایسین مشابه سایر ماکرولیدها است، اما به دلیل جذب بهتر و پایداری بیشتر در شرایط اسیدی معده، آنتی‌بیوتیک مناسبی برای درمان هلیکوباکتر پیلوری محسوب می‌شود. مقاومت به کلاریترومایسین زمانی ایجاد می‌شود که یک جابه‌جایی در نوکلئوتیدهای نزدیک به جایگاه اتصال آن در ریبوزوم ایجاد شود که این امر منجر به ممانعت از اتصال آن و غیرفعال شدن این آنتی‌بیوتیک می‌گردد. برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری روش‌های گوناگونی مانند کشت، بافت شناسی، آزمون اوره‌آز سریع، تست تنفسی اوره، روش‌های سرولوژی، تست آنتی‌ژنی مدفوع و روش‌های مولکولی برپایه DNA معرفی شده است (۶-۴).

هدف از این پژوهش بررسی شیوع سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری مقاوم به کلاریترومایسین در استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) جمع آوری نمونه: این مطالعه به صورت تجربی بر روی ۴۵ نمونه هلیکوباکتر پیلوری تهیه شده از بیماران دارای اختلالات گوارشی انجام شد. در ابتدا رضایت‌نامه از تمامی بیماران اخذ و با استفاده از پرسشنامه اطلاعات بالینی و اندوسکوپی بیماران جمع‌آوری گردید. سپس نمونه‌های بیوپسی از بیماران اخذ و با استفاده از آزمون اوره‌آز سریع نمونه‌های مثبت تعیین گردید. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده DNA از نمونه‌ها استخراج گردید.

ب) کشت و آنتی بیوگرام: نمونه‌های جمع‌آوری شده در شرایط استریل بر روی محیط بروسلا آگار حاوی ۱۰٪ خون گوسفند و واحد آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B، وانکومایسین و تری متوپریم کشت و به مدت ۷ روز در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکرو آئروفیل گرماگذاری گردیدند (۷).

آنتی‌بیوگرام برای آنتی‌بیوتیک کلاریترومایسین (۱۵μg) با استفاده از روش انتشار دیسک و براساس دستورالعمل CLSI انجام گردید.

ج) *PCR*: به منظور تایید وجود هلیکوباکتر پیلوری آزمون PCR برروی ژن *16S rRNA* هلیکوباکتر پیلوری انجام گردید. بدین منظور واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی مولار، ۰/۲ میکرومول dNTPs، ۰/۲ میلی مول از هرکدام از پرایمرهای HP-1: 5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3' و HP-2: 5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3' و ۱ واحد DNA پلی‌مراز (تمامی واکنشگرهای فوق ساخت شرکت سیناژن) انجام گردید. شرایط دمایی PCR شامل ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵°C و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵°C، اتصال در دمای ۵۸°C و گسترش در دمای ۷۲°C هرکدام به مدت ۱ دقیقه و نهایتا ۵ دقیقه در دمای ۷۲°C جهت گسترش نهایی انجام گردید. نهایتا قطعه تکثیر یافته با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مشاهده گردید(۸).

د) آزمون real-time PCR: از توالی ژن *23S rRNA* (شماره دسترسی: U27270) به منظور طراحی پرایمرها و پروب استفاده شد با توجه به اینکه جهش‌های مقاومت به کلاریترومایسین بیشتر در ناحیه نوکلئوتیدهای ۲۱۴۱ تا ۲۱۴۴ وجود دارد، پروب نوع TaqMan به گونه‌ای طراحی شد که تمامی این نواحی را پوشش داده و تنها در حضور توالی وحشی سیگنال فلورسانس قابل مشاهده گردد. نهایتا آزمون real-time PCR در دستگاه rotorgene 6000 (Corbett Research, Austria) و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۲۰۰ میلی‌مول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

dNTPs ۰/۱ میلی‌مول، $MgCl_2$ ۱/۵ واحد DNA پلی مراز، ۰/۲ میلی‌مول از هر کدام از پرایمرهای HP23S-1: 5'-CCACAGCGATGTGGTCTCAG-3' و HP23S-2: 5'-CTCCATAAGAGCCAAAGCCC-3' و پروب Pwt: 5'-Cy5-GGGGTCTTTCCGTCT-BHQ2-3'، با غلظت ۰/۱ میلی‌مول انجام گردید. این واکنش با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۴۵ چرخه شامل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۵۸°C به مدت ۴۰ ثانیه انجام گردید. تمامی واکنش‌ها ۳ بار تکرار و در هر بار آزمایش کنترل مثبت و کنترل منفی نیز استفاده شد. به منظور ثبت و بررسی اطلاعات، از نرم افزار rotor-gene 6000 نسخه ۱/۷ استفاده شد. با استفاده از نتایج حاصل مقادیر C_T نیز به عنوان چرخه‌ای که مقدار فلورسانس از مقدار زمینه بالاتر می‌رود محاسبه گردید.

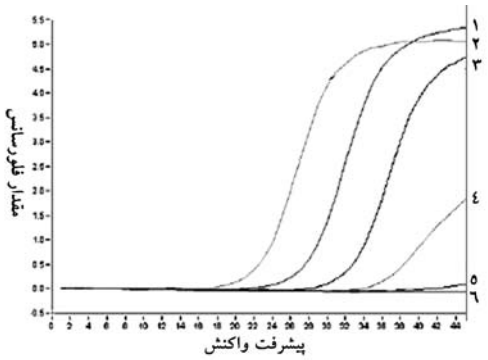
ه) حساسیت تکنیک: برای بدست آوردن حساسیت تکنیک از DNA بدست آمده از کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری استفاده شد و خطی بودن نمودار استاندارد با استفاده از رقت‌های متوالی مورد استفاده در دستگاه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

الف) شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی: نمونه‌های DNA استخراج شده از نمونه‌های بیوپسی هلیکوباکتر پیلوری مثبت، با آزمون PCR برای ژن *16S rRNA* نیز مثبت شدند و در تمامی آن‌ها (۱۰۰٪) یک باند ۱۰۹ جفت بازی مشاهده شد.

ب) تعیین C_T: تغییرات مقدار فلورسانس در طی ۴۵ چرخه با استفاده از کانال قرمز دستگاه rotor-gene مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر C_T ثبت شده در این پژوهش بین ۲۱/۴ تا ۴۳/۶ بود که مقادیر C_T کمتر از ۳۵ نشان دهنده نمونه‌های خالص حساس، مقادیر C_T بین ۳۵ تا ۴۰ نشان دهنده نمونه‌های مخلوط و مقادیر C_T بیش از ۴۰ نشان دهنده مثبت کاذب بودند (تصویر ۱).

ج) حساسیت به کلاریترومایسین: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی ۲۰ نمونه (۴۴/۴۴٪) حساس و ۲۵ نمونه (۵۵/۵۶٪) مقاوم به کلایترومایسن در تست دیسک دیفیوژن شد اما نتایج آزمون real-time PCR نشان داد که در ۲۰ نمونه (۴۴/۴۴٪) ژنوتیپ حساس، ۵ نمونه (۱۱/۱۱٪) ژنوتیپ مخلوط و در ۲۰ نمونه



شکل ۱: نمودار حاصل از آزمون real-time PCR جهت بررسی حساسیت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری. نمونه‌های ۱ و ۲ نمونه‌های مثبت، نمونه ۳ کنترل مثبت، نمونه ۴ نمونه مخلوط، نمونه ۵ نمونه منفی و نمونه ۶ کنترل منفی.

(۴۴/۴۴٪) ژنوتیپ مقاوم به کلاریترومایسین وجود دارد.

د) حساسیت تکنیک: نتایج نشان داد که حساسیت تکنیک معادل ۴۰ باکتری می‌باشد که با توجه به این‌که هلیکوباکتر پیلوری دارای دو کپی از ژن *23S rRNA* در ژنوم خود می‌باشد این حساسیت معادل ۸۰ کپی از ژن هدف می‌باشد.

بحث

ماکرولیدها از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که پس از ۴۰ سال استفاده در درمان هنوز در درمان آنتی‌بیوتیکی پیشتاز می‌باشند. کلاریترومایسین، چهاردهمین عضو خانواده ماکرولیدهای مقاوم به اسید محسوب می‌شوند. این آنتی‌بیوتیک طیف اثر گسترده‌ای بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و بعضی از بی‌هوازی‌ها و گروهی از پاتوژن‌های غیرمعمول دارند. در بسیاری از موارد تاثیر آن‌ها بیشتر از اریترومایسین می‌باشد (۹).

با وجود اهمیت بالینی کلاریترومایسین، اما متاسفانه شیوع مقاومت نسبت به آن در حال افزایش است. روش متداول برای تعیین مقاومت به کلاریترومایسین در هلیکوباکتر پیلوری بر پایه کشت سویه‌ها و استفاده از روش انتشار دیسک، انتشار در آگار یا E-test است. روش‌های یاد شده زمان‌بر بوده و همیشه نیز قابل تکرار نیستند. اما اغلب روش‌های تشخیصی بر پایه DNA برای آزمایش تعیین حساسیت سریع و قابل اطمینان هستند. گذشته از این، استفاده از روش‌های مولکولی می‌تواند بدون نیاز به کشت باکتری هلیکوباکتر پیلوری را در نمونه‌های بیوپسی معده تشخیص دهد (۱۰).

جدول ۱: مقایسه شیوع مقاومت به کلاریترومایسین و روش‌های گوناگون در کشورهای مختلف در سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۹ (۱۲).

کشور	سال	تکنیک مورد استفاده	تعداد نمونه	مقاومت به کلاریترومایسین
استرالیا	۲۰۰٤	Real-time PCR	۹۲	٪۲٤
فرانسه	۱۹۹٤-۱۹۹۹	E-test	۱۵۰	٪۲۱
فرانسه	۱۹۹۸	هیبرید سازی در فاز مایع	٤۱	٪۵٦
فرانسه	۱۹۹۹	PCR-DNA EI	٦۱	٪۳۷/۷
فرانسه	۲۰۰۰	E-test	٦۱	٪۱۸
فرانسه	۲۰۰۲	Real-time PCR	۲۰۰	٪٦۷
فرانسه	۲۰۰۳	Real-time PCR	۱۹٦	٪۱۸/۵
آلمان	۲۰۰۱	FISH	۱۰۹	٪۳۱/۲
هلند	۲۰۰۱	RAPD-PCR	۹۷٦	٪۵/۲
ایتالیا	۲۰۰۳	PCR-RFLP	۲۸۳	٪۱/٦
ایتالیا	۲۰۰۳	PCR-RFLP و E-test	۲۳۰	٪۱٤
ایرلند	۲۰۰۱	LiPA	۵۰	٪۲٦
برزیل	۲۰۰۱	Agar dilution	۲۰۲	٪۹/۸۵
برزیل	۲۰۰۳	Agar dilution	۱۵۵	٪۱٦
مکزیک	۱۹۹۵-۱۹۹۷	E-test	۱۵۹	٪۲٤
پرو	۱۹۹۵	Egg Yolk Agar	۱۸	٪۵۰
آرژانتین	۲۰۰۰	RFLP	۹٦	٪۲۳/۹
آمریکا	۱۹۹٦	PCR-OLA	۷۲	٪۵۵
چین	۲۰۰۱	Primer mismatch	۹٦	٪۵
چین	۲۰۰۳	PCR-RFLP	۷۷۰	٪۱٤/۲
ژاپن	۱۹۹۸	Agar dilution	۳۸۸	٪۱۲/۹
ژاپن	۱۹۹۸	Seminested PCR	۸۵	٪۹
ژاپن	۱۹۹۹	PCR-RFLP	۷۹	٪٦/۳
ژاپن	۲۰۰۰	PCR-PHFA	٤۱۲	٪۲۲
ژاپن	۲۰۰۱	Real-time PCR	۱۸٦	٪۲۱/۲
ژاپن	۲۰۰۱	PCR-RFLP	۵۱	٪۲۹
اندنزی	۲۰۰٦	Disk diffusion	۱۲٦	٪۲۷/۸
کره	۲۰۰٤	PCR-RFLP	۱۱٤	٪۲۰/۲
ایران	۲۰۰۷	PCR-RFLP	۲٦۳	٪۲۲/٦
ایران (این مطالعه)	۲۰۰۹	Real-time PCR	۲۰۰	٪۳۵/۹۸

Van-Der-Ende و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیان کردند که استفاده از تنها یک کلنی از جمعیت‌های اولیه برای تست‌های حساسیت سنجی می‌تواند به دلیل وجود هم‌زمان سویه‌های حساس و مقاوم، موجب تفسیر اشتباه نتایج گردد (۱۱). از این رو استفاده از یک روش که توانایی شناسایی هم‌زمان سویه‌های حساس، مقاوم یا مخلوط آن‌ها را به صورت مستقیم بر روی نمونه های بیوپسی داشته باشد می‌تواند اهمیت کاربردی داشته باشد. با توجه به اینکه روش real-time PCR و تکنیک پروب اختصاصی ارائه شده در این پژوهش قادر است تا با هزینه کمی به این هدف نائل شود، این تکنیک می‌تواند برای دستیابی به نتایج دقیق با حساسیت بالا به‌کار برده شود.

گزارش‌های متعددی در مورد آمار شیوع مقاومت به کلاریترومایسین در سویه های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد. مهم‌ترین دلیل تفاوت این آمار، پژوهش در مناطق جغرافیایی و سال های مختلف و همچنین استفاده از روش‌های گوناگون می‌باشد.

بیشترین دقت در یافتن مقاومت به کلاریترومایسین مربوط به تکنیک‌های مولکولی با استفاده از پروب‌های اختصاصی می‌باشد به گونه‌ای که real-time PCR و PCR-OLA بیشترین دقت را در شناسایی مقاومت به کلاریترومایسین در اروپا و آمریکا را داشته‌اند (۱۲ و ۱۳). مقایسه نتایج معرفی شده در جدول ۱ و همچنین پژوهش‌های قبلی ما در سال ۱۳۸۶ با استفاده از روش PCR-RFLP (۱۴) می‌تواند نشان دهنده شناسایی بیشتر و همچنین افتراق دقیق‌تر سویه‌های حساس و مقاوم توسط تکنیک real-time PCR باشد.

نتیجه گیری

تکنیک TaqMan real-time PCR یک روش سریع و دقیق است که بلافاصله پس از برداشت نمونه بیوپسی و استخراج DNA قادر به شناسایی هم‌زمان هلیکوباکتر پیلوری و ارزیابی مقاومت آن به کلاریترومایسین است. با این روش با استفاده از پروب Pwt قادر به ارزیابی حساسیت و مقاومت به کلاریترومایسین هستیم. اما از آنجا که مطالعات گذشته نشان داده اند که هرکدام از جهش‌های نقطه‌ای مقاومت به کلاریترومایسین در ارتباط با سطح خاصی از مقاومت به این آنتی‌بیوتیک هستند، با طراحی و به کاربردن سایر پروب‌های اختصاصی می‌توان با هزینه پایینی مقدار مقاومت این باکتری به کلاریترومایسین را ارزیابی نمود. در این حالت هم رژیم درمانی مناسی تجویز می‌گردد و هم از پرداخت هزینه‌های اضافی توسط بیماران جلوگیری می‌گردد. از این‌رو این تکنیک کاندید مناسبی برای شناسایی سریع و دقیق هم‌زمان هلیکوباکتر پیلوری و مقاومت آن به کلاریترومایسین در آزمایشگاه‌هایی است که از کشت استفاده نمی‌کنند.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, and Saverymuttu S. PCR-Based Diagnosis of Helicobacter pylori Infection and Real-Time Determination of Clarithromycin Resistance Directly from Human Gastric Biopsy Samples. J ClinMicrobiol, 2001; 39(4): 1217-1220.
2. Liu Z, Shen J, Zhang L, Shen L, Li Q, Zhang B, Zhou J, Gu L, Feng G, Ma J, You WC and Deng D. Prevalence of A2143G mutation of H. pylori-23S rRNAin Chinese subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiology,2008; 8(81):(available at: http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/81)
3. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, and Russmann H. Evaluation of the Novel Helicobacter pylori ClariRes Real-Time PCR Assay for Detection and Clarithromycin Susceptibility Testing of H. pylori in Stool Specimens from Symptomatic Children. J ClinMicrobiol,2007; 45(6): 1718-1722.
4. Lascols C, Lamarque D, Costa J.M, Copie-Bergman C, Glaunec J.M.L, Deforges L, Soussy

C.J, Petit J.C, Delchier J.C, and Tankovic J. 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 ClinMicrobiol. 2003; 41(10): 4573-4577.

5. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, and Me´graud F. Real-Time PCR Assay for Rapid and Accurate Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin in Helicobacter pylori. J ClinMicrobiol, 2003; 41(1): 397-402.
6. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl A.M, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kova´ch Z, Rotter M, Makristathis A. Novel Real-Time PCR Assay for Detection of Helicobacter pylori Infection and Simultaneous Clarithromycin Susceptibility Testing of Stool and Biopsy Specimens. J ClinMicrobiol, 2004; 42(10): 4512-4518.
7. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A.Evaluation of metronidazole resistance Helicobacterpylori strains isolated from Shahrekord. Medical Journal of Islamic Azad University Tehran Medical Branch,2009; 19(3): 193-196.
8. Kargar M. Ghorbani-Dalini S. Doosti A. Souod N, Real-Time PCR Assay Using Allele-Specific TaqMan probe for Detection of Clarithromycin Resistance and Its Point Mutations in Helicobacter Pylori. Journal of Isfahan Medical School. 2011; 29(126): 1-9.
9. Matsumura M, Hikiba Y, Ogura K, Togo G, Tsukud I, Ushikawa K, Shiratori Y, Omata M. Rapid Detection of Mutations in the 23S rRNA Gene of Helicobacter pylori That Confers Resistance to Clarithromycin Treatment to the Bacterium. J ClinMicrobiol, 2001; 39(2): 691-695.
10. Huang J. Q, Sridhar S, and Hunt R.H. Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. Lancet, 2002; 359:14-22.
11. Ernst, P.B, Gold B.D. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu. Rev. Microbiol, 2000; 54:615-640.
12. Ghorbani-Dalini S, Kargar M, Doosti A, 2010, Direct Detection and Identification of Clarithromycin Resistance Point Mutations in Helicobacter pylori Strains Isolated from Biopsy Specimens by Real-Time PCR Assay, Scool of biology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran.
13. Fontana C, Favaro M, Pietroiusti A, Pistoia ES, Galante A, Favalli C. Detection of Clarithromycin-Resistant Helicobacter pylori in Stool Samples. J ClinMicrobiol, 2003; 41(8): 3636-3640.
14. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Prevalence of A2143G, A2142G and A2142C mutations in producing Helicobacter pylori strains resistance to clarithromycin in Charmahal and Bakhtiari Province. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2010; 14(54):72-78.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 3, 2009

Optimization of Real-time PCR Method to Assess the Direct Sensitivity of Clarithromycin in *Helicobacter pylori*

Sadegh Ghorbani Dalini[1], Mohammad Kargar[2], Abbas Doosti[3], Pejman Abbasi[4], Negar Souod[1]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Clube, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3]Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
[4]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background and Objectives: The increasing rate of clarithromycin resistance in *H. pylori* is recognized as a significant contributing factor for treatment failure. The aim of this study was to representing a real-time PCR assay in comparison with disk diffusion method for detection of clarithromycin resistance in *H. pylori.*

Materials and Methods: This Experimental study was performed on 45 *H. pylori* specimens isolated from gastrointestinal disorders patients. In all samples, presence of *H. pylori* was confirmed by using culture, rapid urease test and conventional PCR. Also, clarithromycin resistance were assessed by using CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) protocol and real-time PCR using specific primers and probe for *H. pylori* peptidylteransferas region of *23S rRNA* gene.

Results: Disk diffusion method identified 20 (44.44%) samples as susceptible and 25 (55.56%) samples as resistance to clarithromycin. But, real time PCR were identified samples as 20 (44.44%) with susceptible genotype, 5 (11.11%) with mix genotype and 20 (44.44%) as resistance to clarithromycin genotype. Also results showed that sensitivity of this assay was equal to 40 bacteria or 80 copy number of *23S rRNA* gene.

Conclusion: Results showed that Real-time PCR assay has high accuracy for identifying clarithromycin resistance in short time.

Keywords: Helicobacter pylori, Clarithromycin, Real-time PCR

Correspondence to: Sadegh Ghorbani-Dalini
Tel: (+98)917-3131536
E-mail: gorbanidalini@jia.ac.ir
Journal of Microbial World 2009, 2(3), 149-154