

## بررسی وجود هلیکوباکتری پیلوری در پلاک دندانی مبتلایان به مشکلات گوارشی

دکتر شهین جعفری\* - دکتر ناصر ابراهیمی دریانی\*\* - دکتر سیروس زینلی\*\*\* - دکتر مینا مطلب نژاد\*\*\*\*

\*دانشیار گروه آموزشی بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

\*\*دانشیار بخش گوارش بیمارستان امام خمینی، ره دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

\*\*\*استادیار بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور

\*\*\*\*استادیار گروه آموزشی بیماریهای دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی بابل

**Title:** A Study of helicobacter pylori presence in patients with gastrointestinal disorder

**Authors:** Jafari Sh. Associate Professor\*, Ebrahimi-e- Daryani N. Associate Professor\*\*, Zeinali S. Assistant Professor\*\*\*, Motalleb Nejad M. Assistant Professor\*\*\*\*

**Address:** \* Dept. of Oral Medicine. Faculty of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences

\*\* Dept. of Gastroenterology. Imam Khomeini Hospital. Tehran University of Medical Sciences

\*\*\* Dept. of Biotechnology. Institute Pastor

\*\*\*\* Dept. of Oral Medicine. Faculty of Dentistry. Babol University of Medical Sciences

**Abstract:** Helicobacter pylori infection causes gastric and duodenal ulcer. However recurrence of infection after eradication would suggest the existence of other reinfecting sources in the gastrointestinal tract (GI). The aim of this study was to assess the existence of helicobacter pylori in dental plaques of patients harboring helicobacter pylori in their GI tract. Antral biopsies were taken from 40 patients with GI problems and cultured. Samples were also taken from dental plaques of patients with positive helicobacter pylori culture under microaerophilic conditions and evaluated by polymerase chain reaction (PCR) reamplification. The mean age of patients was 40 years; 24 (60%) male and 16 (40%) female. The results obtained from dental plaque cultures, which analysed by PCR were all negative, however 7 (17.5%) cases were found positive by PCR reamplification. The results showed that helicobacter pylori could exist in dental plaque and PCR reamplification could be used for its detection as a more sensitive technique. More research should be conducted to examine any relation between the existence of helicobacter pylori in dental plaques and recurrent GI disorders.

**Key words:** Helicobacter pylori- Dental plaque- PCR

*Journal of Dentistry. Tehran University of Medical Sciences (Vol. 14, No: 2, 2001)*

### چکیده :

هلیکوباکتری پیلوری عامل ایجاد زخم معده و اثنی عشر می باشد و به دلیل وجود عودهای مکرری که به دنبال ریشه کنی این باکتری از معده گزارش شده است، احتمال وجود منبع آلوده کننده ای در دستگاه گوارش مطرح می گردد. هدف از این مطالعه، بررسی وجود هلیکوباکتری پیلوری در پلاک دندانی بیمارانی است که معده آنها آلوده به این باکتری بوده است. با در نظر گرفتن این موضوع از پلاک دندانی ۴۰ بیمار با آلودگی معده به هلیکوباکتری پیلوری نمونه گیری انجام شد که نمونه ها توسط کشت و Polymerase Chain Reaction (PCR) بررسی شدند. نمونه گیری از پلاک دندانی زیر لثه ای به عمل آمد.

کشت در محیط بروسلا آگار انجام و PCR با روش PCR Reamplification صورت گرفت. سن متوسط بیماران ۴۰ سال شامل ۲۴ نفر مرد (۶۰٪) و ۱۶ نفر زن (۴۰٪) بود. نتیجه کشت و PCR مرحله اول منفی و نتیجه PCR Reamplification در ۷ مورد (۱۷/۵٪) مثبت بود. هلیکوباکتری پیلوری را می‌توان در پلاک دندان یافت و روش PCR Reamplification می‌تواند به عنوان روش حساس تری برای تشخیص آن در پلاک دندان بکار رود. مطالعات بیشتر برای اثبات ارتباط بین وجود هلیکوباکتری پیلوری در پلاک دندان و عود بیماریهای گوارشی لازم می‌باشد.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری - پلاک دندان - PCR

مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران (دوره ۱۴، شماره ۲، سال ۱۳۸۰)

## مقدمه :

روشهای مختلفی برای بررسی وجود هلیکوباکتری پیلوری در پلاک دندان بکار رفته و نتایج مختلفی ارائه گردیده است. Krajde و همکاران، Shames، Majmudar و همکاران و Hardo این ارگانسیم را با روشهایی از جمله کشت میکروبی و PCR در پلاک دندان یافته‌اند (۷،۶،۵،۴) ولی Cheng و Asikainen معتقدند که پلاک دندان محیط مناسبی برای جایگزینی این باکتری نمی‌باشد (۹،۸)؛ لذا با توجه به تناقضات موجود و مسائل مطرح شده فوق، این بررسی با هدف یافتن هلیکوباکتری پیلوری در پلاک دندان زیر لثه‌ای توسط کشت و PCR صورت گرفت.

## روش بررسی :

در این مطالعه توصیفی، ۴۵ بیمار که با مشکلات گوارشی به کلینیک تخصصی خصوصی گوارش مراجعه کرده بودند، بطور تصادفی انتخاب شدند. شرایط انتخاب بیمار داشتن دندان و عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک طی یک هفته گذشته (در زمان مراجعه بیمار) بود. برای تمام بیماران پرسشنامه‌ای مشتمل بر مشخصات بیمار، تاریخچه بیماری و علائم و سوابق درمانی بیماری گوارشی تکمیل گردید؛ سپس سه ناحیه در فک بالا و سه ناحیه در فک پایین (یک ناحیه قدام، یک ناحیه خلف سمت چپ و یک ناحیه خلف سمت راست) توسط گاز استریل از پلاک فوق

اولین بار Marshall و Robin در سال ۱۹۸۲ هلیکوباکتری پیلوری را در معده افراد مبتلا به زخم یافتند و این باکتری را به عنوان عامل زخم پپتیک معرفی کردند (۱). این باکتری در ۹۵ تا ۱۰۰٪ افراد دارای زخم اثنی عشر و ۷۵ تا ۸۵٪ افراد دارای زخم معده یافت شده است؛ لذا با توجه به اتیولوژی میکروبی زخمهای پپتیک، درمان این موارد توسط آنتی‌بیوتیک‌ها صورت می‌گیرد ولی در مواردی ممکن است پس از یک درمان موفق، عود مشاهده شود (۲)؛ لذا احتمال دارد یک منبع آلوده‌کننده مقاوم به درمان سیستمیک در دستگاه گوارش وجود داشته باشد که مجدداً باعث آلودگی معده بیمار گردد. چون این باکتری میکروآئروفیل است لذا پلاک دندان زیرلثه‌ای محیط مناسبی برای مخفی ماندن این باکتری به نظر می‌رسد.

در صورتی که هلیکوباکتری پیلوری در پلاک دندان یافت شود، چند نکته اپیدمیولوژیک مطرح می‌گردد که باید مورد توجه قرار گیرد:

◀ احتمال انتقال Fecal-Oral به دلیل وجود این باکتری در مدفوع (۳)

◀ احتمال آلودگی دندانپزشکان با این ارگانسیم

◀ احتمال انتقال این باکتری از فرد ناقل به سالم

بخصوص بین افراد یک خانواده

پرایمر بر اساس فرمول زیر به اندازه ۲۰ (bp) ساخته شد:  
 Heli 1= (5, CAT AGA GGG ATTGG-3,)  
 Heli 2- (5, TAA CAA ACC GAT AAT GGC  
 GC-3,)  
 در هر واکنش ۰/۱۴۸ میلی‌گرم از هر یک از پرایمرها  
 بکار رفت.

برنامه استفاده شده عبارت است از ۹۳ Denaturing به  
 مدت دو دقیقه، ۵۰ Annealing به مدت یک دقیقه و  
 ۷۲ Extension به مدت یک دقیقه به اندازه ۳۵ سیکل.  
 روش دوم PCR انجام شده روش PCR  
 Reamplification بود که مشخصات آن به شرح زیر  
 می‌باشد:

ابتدا با برنامه فوق‌الذکر ۲۰ سیکل PCR انجام شد؛  
 سپس از محلول PCR چهار رقت  $\frac{1}{1}$  و  $\frac{1}{5}$  و  $\frac{1}{10}$  و  $\frac{1}{100}$   
 تهیه گردید و مجدداً ۳۵ سیکل در تیوپ‌های جدید PCR  
 انجام گردید. حساسیت روش اخیر در حد کمتری از ۱۰  
 رشته DNA در هر نمونه می‌باشد (۱۲).

### یافته‌ها :

پلاک دندانی ۴۰ بیمار که کشت معده آنها از نظر  
 هلیکوباکتریلوری مثبت بود با روش کشت و PCR بررسی  
 شد. ۲۴ بیمار مرد (۶۰٪) و ۱۶ بیمار زن (۴۰٪) بودند. دامنه  
 سنی آنها بین ۲۳ تا ۵۸ سال با متوسط ۴۰ سال بود.

۴۷/۵٪ آنان سابقه آندوسکوپی قبلی و ۵۷/۵٪ آنان  
 بیماری گوارشی به همراه زخم داشتند و بقیه مبتلا به  
 Functional Dyspepsia بودند.

نتیجه کشت و PCR (روش اول) تمام نمونه‌های پلاک  
 منفی بود. علل منفی‌شدن نمونه‌ها در روش PCR از نظر  
 وجود ممانعت‌کننده PCR با استفاده از ژن گلوبین انسانی و  
 کنترل داخلی بررسی شد که نتایج نمایانگر عدم وجود

لته‌ای پاک شد و با کورت پرپودنتال استریل از عمق شیار  
 لته‌ای یا پاکت پرپودنتال، پلاک دندانی جمع‌آوری گردید. در  
 مجموع از شش ناحیه فوق یک نمونه در محیط ترانسپورت  
 برای انجام کشت و یک نمونه در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری  
 حاوی سرم فیزیولوژی برای انجام PCR جمع‌آوری و به  
 آزمایشگاه برده شد. کشت در محیط بروسلا آگار + ۱٪  
 نشاسته + ۱۰-۷٪ خون گوسفندی + آنتی‌بیوتیک‌ها  
 (ونکومايسين + پلی‌میکسین و تری‌متوپریم) و در حرارت  
 ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و فشار CO<sub>2</sub> ۵٪ در  
 آنکوباتور CO<sub>2</sub> قرار داده شد. پس از گذشت ۳ تا ۷ روز در  
 نمونه‌هایی که کلنی‌های ته‌سنجاقی ۰/۵ تا ۲ میلی‌متری  
 شبیه قطرات شبنم تشکیل شده بود، تست‌های بیوشیمیایی  
 از جمله تست اوره آز، نیترات، اکسیداز و کاتالاز انجام شد و  
 مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید و حساسیت به  
 سفالوتین نیز بررسی گردید. دیدن کلنی‌های فوق و  
 مثبت‌شدن هر یک از تست‌های مذکور و مقاومت باکتری به  
 نالیدیکسیک اسید و حساسیت نسبت به سفالوتین به عنوان  
 نتیجه مثبت تلقی می‌گردد. در صورتی که کشت نمونه  
 بیوپسی‌شده از معده هر یک از بیماران منفی گزارش می‌شد،  
 این فرد از مطالعه حذف می‌گردید (۱)؛ در نهایت پلاک  
 دندانی ۴۰ بیمار که کشت معده آنها مثبت بود، مورد بررسی  
 قرار گرفت (۵ بیمار دیگر، به علت منفی‌بودن کشت معده از  
 مطالعه حذف شدند).

DNA نمونه‌های پلاک جمع‌آوری‌شده، برای PCR نیز  
 پس از شستشو با آب مقطر توسط روش  
 Phenol DNA Extraction استخراج گردید (۱۰) و در  
 نهایت DNA تخلیص‌شده در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل  
 شد. اساس روش PCR بکار رفته و فرمول توالی پرایمرها و  
 درجه Annealing و اندازه محلول PCR بر اساس مقاله  
 Valentine می‌باشد (۱۱)؛ به منظور انجام PCR یک‌جفت

هیچ یک از ۴۰ بیمار مورد بررسی در این مطالعه قابل توجه است؛ حتی در مواردی که PCR مثبت شده بود. در مطالعه Hardo (۱۹۹۵) کشت تمام نمونه‌ها منفی بود (۷)؛ همچنین Krajden (۱۹۸۹) یک مورد از ۷۱ مورد مثبت و Cheng (۱۹۹۶) فقط یک مورد از ۱۲۲ مورد مثبت بدست آورد (۹،۴). Majmudar در هند ادعا کرد که از کشت پلاک‌های دندانی مربوط به ۴۰ فرد سالم توانسته است هلیکوباکتر را جدا نماید (۶). Aggarwal روشهای تشخیصی Majmudar را برای هلیکوباکتر کافی و اختصاصی ندانست (۱۶). Mapstone و همکاران نیز پلاک دندانی را منبع مهمی از هلیکوباکتریلوری به حساب آورده‌اند (۱۷).

PCR روشی بسیار دقیق برای تشخیص هلیکوباکتر بخصوص در پلاک دندانی است؛ زیرا قادر است تعداد بسیار کم باکتری را نیز در جمعیت و تنوع زیاد باکتری‌های دیگر و مواد مختلف متشکله پلاک مشخص نماید؛ ولی تکنیک‌ها و پرایمرهای مختلفی که در این روش بکار رفته، نتایج مختلفی را به همراه داشته است. Banatvala (۱۹۹۳) PCR خود را بر مبنای تکثیر ژن اوره از انجام داد (۱۸) ولی ژن مذکور غیر از هلیکوباکتریلوری در نوعی کمپیلوباکتر نیز وجود دارد؛ بنابراین ویژگی این تست پایین است و موارد مثبت کاذب خواهد داشت، همان‌طور که در بررسی Banatvala مشاهده شد. دقیق‌ترین روش PCR که تاکنون در مورد پلاک دندانی بکار رفته، تکنیک RT-PCR است (۲۰، ۱۹) که حساسیت آن حدود یک یا دو باکتری در نمونه می‌باشد و Nguyen (۱۹۹۳) با استفاده از این روش ۳۹٪ پاسخ مثبت بدست آورد (۱۳).

Hardo (۱۹۹۵) و Mapstone نیز بر اساس تکثیر ژن 16SRNA ریوزومی به ترتیب ۳٪ و ۳۶٪ پاسخ مثبت بدست آوردند (۱۷، ۷).

ممانعت‌کننده بود و چون دقت این تست در حد ۱۰۰ باکتری می‌باشد، بنابراین از روش حساس‌تری به نام PCR Reamplification استفاده شد که با روش اخیر ۷ مورد (۱۷/۵٪) مثبت بدست آمد.

به دلیل تعداد کم نمونه‌های مثبت بررسی ارتباط وجود هلیکوباکتریلوری در پلاک دندانی با سن و جنس بیمار و نوع بیماری گوارشی و سابقه آندوسکوپی میسر نبود.

### بحث :

در مطالعه حاضر ۴۰ بیمار مورد بررسی قرار گرفتند که پلاک‌های دندانی زیر لثه آنان جهت انجام کشت و PCR بررسی شد. چون به عقیده Nguyen هلیکوباکتر در تمام دهان بطور یکنواخت پراکنده نمی‌باشد، لذا نمونه‌های پلاک دندانی از نواحی مختلف دهان جمع آوری شد (۱۳).

روشهای تشخیصی مختلفی در مورد عفونت هلیکو باکتریلوری در معده وجود دارد ولی کاربرد این روشها در پلاک دندانی محدود است. تست اوره در دهان بر خلاف معده ارزش تشخیصی ندارد؛ زیرا در پلاک دندانی میکروب‌های دیگر اوره از مثبت نیز وجود دارد. Desai در سال ۱۹۹۱، ۹۸٪ پلاک‌های دندانی را اوره از مثبت بدست آورد و نتیجه‌گیری کرد که در این تعداد پلاک دندانی هلیکوباکتر وجود دارد (۱۴) که این نتیجه گیری قابل قبول نمی‌باشد. در بررسی حاضر تست اوره از پلاک دندانی انجام نشد.

کشت هلیکوباکتریلوری نیز در پلاک دندانی مناسب نمی‌باشد. به عقیده Bhatia شواهدی وجود دارد که لاکتوباسیل اسیدوفیلوس، با آزادسازی موادی از رشد هلیکوباکتر ممانعت می‌کند (۱۵)؛ همچنین تنوع زیاد باکتری‌های پلاک دندانی، مانع رشد هلیکوباکتر می‌شوند؛ بنابراین به دست نیاوردن کشت مثبت در پلاک دندانی

در این محل به اندازه‌ای کم است که باید روشهای حساس را در مورد تشخیص آن بکار برد؛ بین روشهای بکار رفته در این بررسی PCR Reamplification که دقیق‌ترین آنها می‌باشد، بهترین پاسخ را داد.

چون دندانپزشکان و بهداشتکاران دهان و دندان افرادی هستند که بطور مستقیم با پلاک دندانی بیماران در تماس هستند، باید از احتمال آلوده شدن خود یا آلوده کردن دیگر افراد بخوبی آگاه باشند. مقاوم بودن هلیکوباکتریلوری به آنتی‌بیوتیک‌ها (زمانی که در پلاک مستقر می‌باشد) نیز نیاز به بررسی پلاک دندانی پس از تجویز آنتی‌بیوتیک دارد؛ همچنین انتقال این باکتری از راه دهان به افراد دیگر و اثبات ارتباط بین وجود هلیکوباکتریلوری در پلاک دندانی و عود بیماریهای گوارشی نیاز به بررسیهای بیشتری دارد.

در بررسی حاضر دو روش PCR بکار رفته است. روش اول بر اساس مقاله Valentin (۱۹۹۱) بود (۱۱)؛ وی این روش را بسیار دقیق و با حساسیت ۱۰۰ باکتری در نمونه معرفی کرد. با این روش هیچ یک از نمونه‌های پلاک دندانی مثبت نشد. روش دیگر PCR Reamplification می‌باشد که مراحل آن شرح داده شد. اختلاف نتایج بدست آمده در مورد وجود هلیکوباکتریلوری در پلاک دندانی با روش PCR به علت اختلاف در حساسیت روشهای انجام شده یا حساسیت پرایمرها است و این مطلب گویای این نکته است که تعداد باکتری در پلاک دندانی بسیار کم می‌باشد و روشهایی که حساسیت کمتری دارند، قادر به تشخیص این تعداد باکتری در نمونه نیستند. بر اساس اطلاعات بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که هلیکوباکتریلوری در پلاک دندانی وجود دارد؛ ولی تعداد آن

#### منابع:

- 1- Alcoma IE. Fundamental of Microbiology. (Chap 8). 5<sup>th</sup> ed. Benjamin Comings; 1997.
- 2- Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DI, et al. Helicobacter Infections. Harrison's Principles of Internal Medicine. Vol. 1. 14<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw Hill; 1998.
- 3- Brown LM. Helicobacter Pylori: Epidemiology and Routes. Transimission Epidemiol Rev 2000; 22(2), 283-97.
- 4- Krajden Faska M, Kempston AJ, Boccia AJ, Babidac PC. Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for campylobacter pylori J Clin Microbiol 1989; 27(6): 1397-98.
- 5- Shames B. Evidence for the occurrence of the same strain of campylobacter pylori in the stomach and dental plaque. J Clin Microbiol 1989; 27(12): 2849-50.
- 6- Majmudar P, Shah SM, Dhunjibhoy KR, Desai HG. Solation of helicobacter pylori from dental plaques in healthy volunteers. Indian J Gastroenterol 1990 Oct; 9(4): 271-72.
- 7- Hardo PG, Tugnait A, Hassan F, Lynch DA, West AP, Mapstone NP, Quirke P, Chalmers DM, Kowolik MJ, Axon AT. Helicobacter pylori infection and dental care. Gut 1995 Jul; 37(1): 44-46.
- 8- Asikainen S. Absence of helicobacter pylori in sub gingival samples determined by polymerase chain reaction. Oral Microbiol Immunol 1994; (5): 318-20.
- 9- Cheng LH. Helicobacter pylori dental plaque and gastric mucosa. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1996; 81: 421-23.
- 10- Manitis Molecular Cloning. A Laboratory. Manual 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1689; E3-E11, 9.8-6.13
- 11- Valentin JL, Arthur RP, Mobley HL, Dick JD. Detection of helicobacter pylori by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(4): 689-95.
- 12- Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR methods. J Appl Bacteriol 1995; 4(5): 185-94.
- 13- Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, el Zaatari-FA. Dectection of helicobacter pylori in dental

plaque by revers transcription polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31(4): 783-87.

14- Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Mehta PR, Prabhu SR. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scand J Gastroenterol* 1991 Nov; 26(11): 1205-208.

15- Bhatia SJ, Rochar N, Abraham P, Nair NG. *Lactobacillus acidophilus* inhibits: *campylobacter pylori* in-vitro. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2328-30.

16- Aggarwal R. Are they *H pylori* in dental plaques? *Indian J Gastroenterol* 1991 Jan; 10(1): 33-34.

17- Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA, Axon AT, Tompkins DS, Dixon MF, Quirke P. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol* 1993 Jun; 46(6): 540-43.

18- Banatvala N, Lopez CR, Dwen R, Abdi Y, Davies G. *Helicobacter pylori* in dental plaque? *Lancet* 1993; 341 (2): 380.

19- Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD. Sensitive detection of *helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction *J Clin Microbiol* 1992; 30(1): 192-200.

20- Engstrand L, Nguyen AM, Graham DY. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of RNA for detection of *helicobacter* species. *J Clin Microbiol* 1992; 30(4): 2295-301.

\* \* \* \* \*