

## تعیین ژنوتیپ سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده یا بدون زخم معده بر اساس الگوی RFLP-PCR ژنهای *ureAB*، *vacA* و *cagA*

دکتر شهره فرشاد\*، دکتر عزیز ژاپونی\*، دکتر عبدالوهاب البرزی\*\*، مهدی کلانی\*\*\*

دریافت: ۸۷/۱/۱۸ ، پذیرش: ۸۷/۹/۲۶

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** مطالعات نشان می دهند که دلایل تنوع پیامدهای کلینیکی عفونت ناشی از هلیکو باکتر پیلوری ممکن است که به فاکتورهای محیطی و میزبان و همچنین اختلاف در ژنوتیپ، شیوع یا بیان فاکتورهای بیماریزای وابسته به باکتری مرتبط باشند. بر این اساس هدف از این مطالعه تعیین پراکندگی ژنوتیپهای مختلف فاکتورهای اصلی بیماریزایی *ureAB*، *vacA*، *cagA* در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران دارای عفونت معده بدون زخم و بیماران دارای زخم معده بود.

**روش کار:** در این مطالعه توصیفی - مقطعی ۶۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری که ۳۵ سوش آنها از بیماران دارای عفونت معده بدون زخم و ۳۰ سوش آنها از بیماران دارای زخم معده جدا شده بودند با روش RFLP-PCR مورد مطالعه قرار گرفتند.

**نتایج:** شیوع ژن *vacA* در سوشهای جدا شده از بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بصورت معنی داری ( $P < 0.05$ )، بیشتر بود. در RFLP ژن *cagA* دو الگوی متفاوت دیده شد. الگوی  $\beta$  با سه باند در هر دو گروه بیماران فراوانی بیشتری داشت. هضم آنزیمی منجر به تولید یک الگوی کاملاً یکنواخت در ۸۳/۳۳٪ از سوشهای دارای *vacA* جدا شده از بیماران دارای زخم شد. این الگوها حالت زخم دار بیماری از نظر آماری مرتبط بود. آنالیز پلی مرفیسمهای *ureAB* ۱۰ الگوی قابل افتراق را مشخص کرد که الگوی *ureAB* 5a شایعترین الگو در تمام سوشها بود (۴۷/۶۱٪). برای ژنهای *ureAB*، *cagA* هیچ ارتباطی بین الگوهای خاص DNA و حالت کلینیکی بیماری مشاهده نشد.

**نتیجه نهایی:** اگرچه در بیماران مورد بررسی حضور ژن *cagA* ممکن است که فاکتور خطری برای ایجاد حالت زخم دار بیماری نباشد اما به نظر می رسد که وجود یک ژنوتیپ یکسان *vacA* با افزایش خطر ایجاد زخم همراه است. در نهایت علیرغم وجود درجه بالایی از تنوع ژنومی در ژن *ureAB*، الگوهای محافظت شده ای از DNA در منطقه ما انتشار دارند.

**کلید واژه ها:** زخم معده / ژن های بیماری زا / واکنش زنجیره ای پلیمر از / هلیکوباکتر پیلوری

### مقدمه:

باشند (۲،۳). تکنیکهای مختلف، تغییرات ژنتیکی بسیار متنوعی را در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری نشان داده اند (۴-۷). تفاوت های ژنتیکی در ارگانیسم ممکن است که فاکتورهای بیماریزا، عملکرد و خصوصیات آنتی ژنی آنها را تحت تاثیر قرار دهد. تنوع آنتی ژنی محصولات یک ژن مشخص ممکن است که یک مکانیسم فرار از سیستم ایمنی را برای سوشهای هلیکوباکتر در میزبان ایجاد نماید. مطالعات وسیعی برای تعیین ژنوتیپ شاخصهای بیماریزای

امروزه التهاب معده ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل اصلی زخم معده، دئودنوم، ادنوکارسینوما معده و لنفوم بافت لنفوئیدی وابسته به مخاط شناخته شده است (۱). دلایل این تنوع پیامدهای کلینیکی عفونت ممکن است که به فاکتورهای محیطی، میزبان و همچنین اختلاف در شیوع یا بیان فاکتورهای بیماریزای وابسته به باکتری مرتبط

\* استادیار مرکز تحقیقات میکروبیشناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (s\_farshad@yahoo.com)

\*\* استاد گروه اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

\*\*\* کارشناس ارشد مرکز تحقیقات میکروبیشناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

هلیکوباکتر پیلوری انجام شده است تا بتوان با استفاده از آنها پیامدهای بیماری یک عفونت را پیشگویی کرد. اساس تمام مطالعات انجام شده بررسی ژنهای *vacA* (۳،۸،۹)، *cagA* (۱۰-۱۲) و *ureAB* (۱۳،۱۴) می باشد. براساس تحقیقات گذشته سوشهای تولید کننده ژنهای *vacA* و *ureAB*، *cagA* در بیماران با علائم کلینیکی مختلف مانند گاستریت، زخم معده، زخم دئودنوم و التهاب مری همراه با رفلکس شیوع بیشتری دارند (۱۵،۱۶). با این وجود در مطالعات انجام شده در نواحی جغرافیایی مختلف جهان در زمینه ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف با افزایش بیماریزایی و ایجاد زخم یا بیماری بدون زخم ویا ایجاد کارسینومای معده اختلاف نظرانی وجود دارد (۱).

شیوع عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در ایران تقریباً ۹۲-۸۲ درصد گزارش شده است (۱۷،۱۸). بنابراین هدف از این مطالعه تعیین وضعیت ژنهای *ureAB*، *vacA*، *cagA* در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران، هم چنین شناسایی تنوع ژنتیکی سوشها با استفاده از تعیین ژنوتیپ فاکتورهای بیماریزا و ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف و حالت های توام با زخم و فاقد زخم بیماری می باشد.

### روش کار:

در این مطالعه توصیفی - مقطعی ۱۱۴ بیمار (۶۰ مرد و ۵۴ زن با محدوده سنی ۸۰-۱۶ سال و میانگین سنی ۴۱/۳±۱۴ سال) مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان نمازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سالهای ۸۵-۸۴ مورد بررسی قرار گرفتند. تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری و تائید بیماری معده توسط آسیب شناس از بررسی بافت معده انجام شد. از این تعداد بیمار ۳۷ نفر مبتلا به زخم معده و ۷۷ نفر بدون زخم معده بودند. قسمتی از بیوپسی آنتروم معده نیز در محیط انتقالی مناسب (محیط مایع عصاره قلب و مغز غنی شده با ۲۰٪ گلوز) به آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی استاد البرزی شیراز ارسال شد. معیارهایی مانند استفاده از آنتی بیوتیک ها، بازدارنده های پمپ پروتونی و ترکیبات بسیموت، ۲ هفته قبل از اندوسکوپی و جراحی قبلی معده برای حذف بیماران از این مطالعه در نظر گرفته شد.

جداسازی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری: نمونه های بیوپسی بیماران به آرامی بین دو لام هموزن شده و در محیطهای آزمایش اوره آز سریع و بروسلا آگار غنسی شده با ۱۰٪

خون اسب لیز شده و آنتی بیوتیکهای آمفوتریسین B (۲ میکروگرم در لیتر) تری متوپریم (۵ میکروگرم در لیتر) و نالیدیکسیک اسید (۱۰ میکروگرم در لیتر) کشت داده شدند. کشتهها در شرایط میکرو اتروفیلیک (۶٪ اکسیژن، ۷/۱٪ دی اکسیدکربن، ۷/۱٪ هیدروژن و ۷۹/۸٪ نیتروژن) ایجاد شده توسط دستگاه آنوکسومات (ساخت شرکت مارت هلند) بمدت ۱۰-۵ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. جهت تائید ارگانیسماهای رشد کرده از تستهایی مانند اکسید از، کاتالاز و اوره آز سریع استفاده شد.

استخراج DNA: سوشهای هلیکوباکتر پیلوری را پس از شستشو در ۳۸۳ میکرولیتر با فر [ ۱۰ میلی مولار Tris - HCl و یک میلی مولار EDTA (PH=8) و ۱۵ میکرولیتر سدیم دود سیل سولفات (۱۰٪) ] و ۲ میکرولیتر از ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر محلول پروتئیناز K بصورت سوسپانسیون در آورده و بمدت ۲ ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با استفاده از حجم برابر فنل و کلروفرم در ایزوپروپانل (۱:۲۵:۲۵) DNA استخراج شده و در ۲ حجم از اتانول ۹۷ درجه سرد، رسوب داده و سپس با اتانول ۷۰ درجه شستشو و در ۵۰ میکرولیتر از بافر TE حل شده وبعنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (۱۹).

واکنش زنجیره ای پلیمرز: توالی پرایمرها که در مطالعات دیگر گزارش شده بودند (۹) از کمپانی TIBMOBBIOL Syntheselabor GmbH برلین آلمان تهیه شدند. توالی و مشخصات این پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ترادف پرایمرهای اختصاصی ژنهای *vacA*، *cagA* و

#### *ureAB* مورد استفاده در واکنش PCR

پرایمر	ترادف پرایمرها (۵'-۳')	اندازه
		محصول PCR (bp)
<i>vacA</i>	F GCTTCTCTTACCACCAATGC	۱۱۶۲
	R TGTCAGGGTTGTTCCACCATG	
<i>cagA</i>	F AGTAAGGAGAAACAATGA	۱۳۲۰
	R AATAAGCCTTAGAGTCTTTTGGAAATC	
<i>ureAB</i>	F AGGAGAATGAGATGA	۲۴۲۰
	R ACTTTATTGGCTGGT	

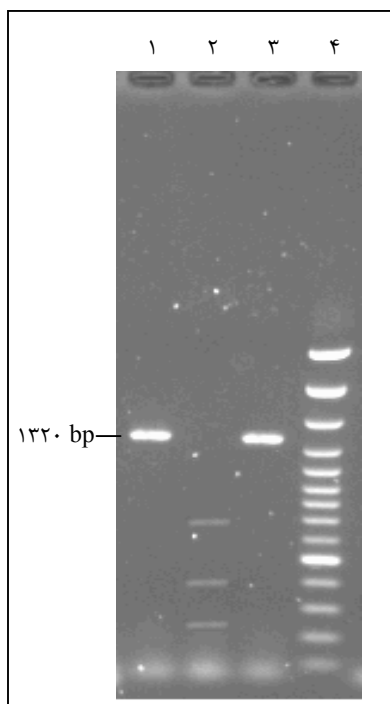
واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر با مقادیر 1x بافر PCR، ۲۰۰ میکرومول از هر دزکسی نوکلئوزید تری فسفات، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز و ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده از سوشهای هلیکوباکتر پیلوری انجام شد.

**الگوهای RFLP-PCR:** بدنال هضم آنزیمی ژن *cagA* تکثیر یافته توسط آنزیم *HinfI*، دو الگوی مختلف  $\alpha$  و  $\beta$  بدست آمد (جدول ۲) (تصویر ۱). الگوی  $\beta$  در مقایسه با الگوی  $\alpha$  دارای فراوانی بیشتری در هر دو گروه بیماران بود که این تفاوت از نظر آماری معنی دار بود اما هیچ ارتباط معنی داری بین این الگوهای بدست آمده و تظاهرات کلینیکی وجود نداشت ( $P > 0.05$ ).

جدول ۲: الگوهای RFLP-PCR ژن *cagA* در دو گروه از بیماران با زخم معده و بدون زخم

الگو	بیماران <i>cagA</i> <sup>+</sup>		جمع
	دارای زخم	بدون زخم	
$\alpha$ (بدون برش)	۲ (۱۱/۱۱)*	۱ (۷/۶۹)	۳ (۹/۶۷)
$\beta$ (۳ باند)	۱۶ (۸۸/۸۸)	۱۲ (۳۰/۹۲)	۲۸ (۹۰/۳۲)
تعداد کل	۱۸	۱۳	۳۱

\* اعداد داخل پرانتز درصد می باشند.



تصویر ۱: الکتروفورزیس نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی قطعه ۱۳۲۰ جفت بازی ژن *cagA* سوشهای هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران بر روی ژل آگاروز ۲٪. ردیف ۱ و ۳ قطعه هضم نشده (الگوی  $\alpha$ )، ردیف ۲ قطعه هضم شده (الگوی  $\beta$ )، ردیف ۴ قطعات نشانگر

هضم آنزیمی قطعه *vacA* با اندازه ۱۱۶۲ جفت باز توسط آنزیم *HphI* به تولید الگوی کاملاً یکنواختی (الگوی ۱ با ۳ باند) منجر شد که در ۸۳/۳۳٪ از سوشهای *vacA* مثبت (۲۰ سوش از ۲۴ سوش) جدا شده از بیماران دارای زخم

برنامه سیکل حرارتی PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون کردن اولیه بمدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ چرخه بصورت زیر بود؛ برای ژن *vacA*، ۱ دقیقه در ۹۴°C، یک دقیقه در ۵۸°C و ۱ دقیقه در ۷۲°C برای ژن *cagA* ۴۵ ثانیه در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در ۵۰°C و ۴۵ ثانیه در ۷۲°C و برای ژن *ureAB* یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، یک دقیقه در ۵۰°C و دو دقیقه در ۷۲°C. تکثیر DNA توسط دستگاه ترموسایکریک (اپندرف، آلمان) انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز الکتروفورز شده و توسط اتیدیوم برومید رنگ آمیزی و تصویر برداری شدند.

آنالیز PCR-RFLP: قطعات *vacA*، *cagA* و *ureAB* تکثیر شده به ترتیب توسط آنزیمهای *HaeIII*، *HinfI*، *HphI* در بافر مناسب توصیه شده توسط کارخانه سازنده (MBI فرمنتاس لیتوانی) بمدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد شکسته و هضم شدند. محصولات بدست آمده در ژل آگارز ۲٪ همراه با 1x بافر TAE الکتروفورز شده و در اتیدیوم برومید رنگ آمیزی شدند.

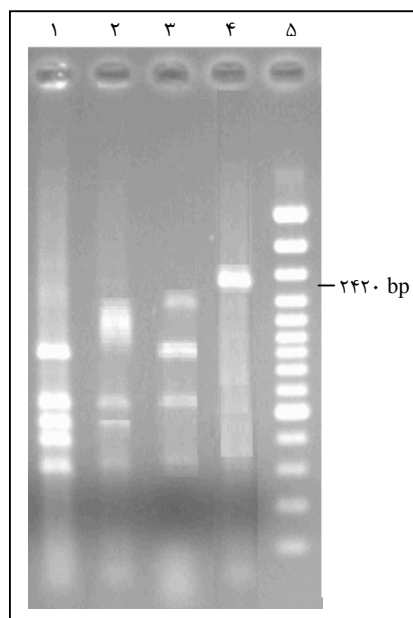
آنالیز آماری: از تست آماری دقیق فیشر برای آنالیز داده های بدست آمده از روش شرح داده در بالا استفاده شد. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دارد نظر گرفته شد.

### نتایج:

گروه بیماران و شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری: براساس یافته های پاتولوژی و اندوسکوپی، بیماران به دو گروه دارای زخم و فاقد زخم معده تقسیم شدند. در کل با روش کشت از بیماران دارای زخم ۳۰ سوش (۸۱/۸۰٪) و از بیماران فاقد زخم ۳۵ سوش (۴۵/۴۵٪) هلیکوباکتر پیلوری جدا شد.

شیوع ژنهای *ureAB*، *vacA*، *cagA* در هلیکو باکتر پیلوری های جدا شده از بیماران: نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز برای ۶۵ سوش هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران نشان داد که ۳۱ سوش (۴۷/۶۹٪) دارای ژن *cagA*، ۳۷ سوش (۵۶/۹۲٪) دارای ژن *vacA* و ۴۲ سوش (۶۴/۶۱٪) دارای ژن *ureAB* بودند.

ژنهای *ureAB*، *vacA*، *cagA* در بیماران دارای زخم (به ترتیب ۵۶٪، ۸۰٪ و ۷۳٪) نسبت به بیماران فاقد زخم (به ترتیب ۳۷/۱۴٪، ۳۷/۱۴٪ و ۵۷/۱۴٪) دارای فراوانی بیشتر بودند، اما این تفاوت بین دو گروه بیمار تنها در مورد ژن *vacA* از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ).



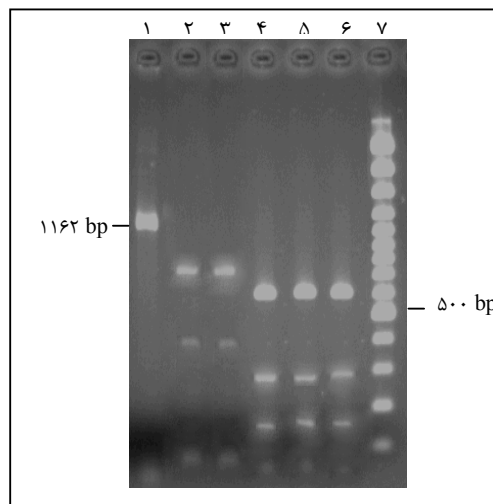
تصویر ۳: الکتروفورزیس نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی قطعه ۲۴۲۰ جفت بازی ژن *ureAB* سوشهای هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران بر روی ژل آگاروز ۲٪؛ ردیف (ا) (الگوی ۵a)، ردیف ۲ (الگوی ۴a)، ردیف ۳ (الگوی ۴b)، ردیف ۴ قطعه هضم نشده، ردیف ۵ قطعات نشانگر

این یافته بر تنوع ژنتیکی بسیار زیاد ژن اوره آز در سوشهای جدا شده از نمونه های بالینی تاکید دارد. این الگوها بر اساس تعداد و تنوع اندازه باندها نامگذاری شدند. الگوها دارای ۳ تا ۶ باند با اندازه های مختلف بودند. ۲۰ سوش از ۴۲ سوش (۴۷/۶٪) دارای الگوی *ureAB* با ۵ باند بودند که ۱۳ سوش از ۲۰ سوش (۶۵٪) جدا شده از بیماران دارای زخم را تشکیل می دادند. بنا بر این فرض براین است که سوشهای جدا شده از بیماران دارای بیماری شدید گاستر و دئودنال نسبت به بیماران دارای بیماری خفیف تر الگوی یکنواخت تری را بیان می کنند. برای ژن *ureAB* هیچ ارتباط معنی دار آماری بین الگوهای اختصاصی DNA و بیماری کلینیکی مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ).

#### بحث:

درباره ویژگیهای ژنتیکی سوشهای هلیکوباکترپیلوری که در ایران بیماری عفونی معده را ایجاد می کنند اطلاعات کمی در دسترس می باشد. در بررسی حاضر مشخص شد که از ۶۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده ۴۷/۶۹٪ ژن *cagA*، ۵۶/۹۲٪ ژن *vacA* و ۶۴/۶۱٪ ژن *ureAB*

مشاهده شد. با وجود اینکه ۴۶/۱۵٪ از سوشهای *vacA* مثبت (۶ سوش از ۱۳ سوش) جدا شده از بیماران بدون زخم این الگوی یکنواخت را نشان دادند اما این الگو بصورت معنی داری ( $P < 0.05$ ) با وضعیت زخم دار بیماری مرتبط بود (تصویر ۲).



تصویر ۲: الکتروفورزیس نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی قطعه ۱۱۶۲ جفت بازی ژن *vacA* سوشهای هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران با زخم معده (ردیفهای ۲، ۳، ۴) (الگوی ۱) و بدون زخم (ردیفهای ۵، ۶) (الگوی ۲) بر روی ژل آگاروز ۲٪؛ ردیف ۱ قطعه هضم نشده ژن *vacA*، ردیف ۷ قطعات نشانگر

بر اساس آنالیز پلی مرفیسمهای *ureAB*، تمام ۴۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از این مطالعه به ۱۰ الگوی DNA مشخص طبقه بندی شدند (جدول ۳) (تصویر ۳).

جدول ۳: الگوهای RFLP-PCR ژن *ureAB* در دو گروه از بیماران با زخم معده و بدون زخم

الگو	بیماران <i>ureAB</i> <sup>+</sup>		جمع
	بدون زخم	دارای زخم	
<i>ureAB</i> ۳a	۱ (۵)	۱ (۴/۵۴)*	۲ (۴/۷۶)
<i>ureAB</i> ۳b	۱ (۵)	۱ (۴/۵۴)	۲ (۴/۷۶)
<i>ureAB</i> ۴a	۲ (۱۰)	۱ (۴/۵۴)	۳ (۷/۱۴)
<i>ureAB</i> ۴b	۱ (۵)	۲ (۹/۰۹)	۳ (۷/۱۴)
<i>ureAB</i> ۴c	۲ (۱۰)	۱ (۴/۵۴)	۳ (۷/۱۴)
<i>ureAB</i> ۵a	۸ (۴۰)	۱۲ (۵۴/۵۴)	۲۰ (۴۷/۶۱)
<i>ureAB</i> ۵b	۲ (۱۰)	۱ (۴/۵۴)	۳ (۷/۱۴)
<i>ureAB</i> ۵c	۱ (۵)	۱ (۴/۵۴)	۲ (۴/۷۶)
<i>ureAB</i> ۶a	۱ (۵)	۱ (۴/۵۴)	۲ (۴/۷۶)
<i>ureAB</i> ۶b	۱ (۵)	۱ (۴/۵۴)	۲ (۴/۷۶)
تعداد کل	۲۰	۲۲	۴۲

\* اعداد داخل پرانتز درصد می باشند

داشت. این ژنوتیپ به عنوان شاخص ژنوتیپی سوشهای جدا شده از کشورهای غربی شناخته شده است. بنابراین به نظر می رسد که ارزیابی تنوع ژنتیکی ژن *cagA* مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری می تواند در ارتباط کلونها و اپیدمیولوژی هلیکوباکترپیلوری در جمعیت های خاص نقش داشته باشد. از طرفی دیگر اگر چه فراوانی ژن *cagA* در سوشهای جدا شده از بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بیشتر می باشد اما این تفاوت از نظر آماری بین دو گروه معنی دار نبوده بنابراین به نظر می رسد که حضور ژن *cagA* در جامعه تحت بررسی ما فاکتور خطر مهمی محسوب نمی شود. این مطالب را می توان با نداشتن تنوع در توالی ژن *cagA* در سوشهای جدا شده در این مطالعه توجیه کرد زیرا که تنوع در محصول *cagA* ممکن است که ساختمان، خواص آنتی ژنی، عملکرد و در نتیجه نقش آن را در بروز علائم کلینیکی تحت تاثیر قرار دهد. هضم محصول PCR توسط آنزیمهای محدود کننده مختلف، درجات زیادی از تنوع را در ساختمان ژنومی ژن *vacA* در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه های بیوپسی معده را تأیید کرده است (۳۰،۳۱). هضم محصول های PCR با آنزیم *HaeIII* موجب شناسایی ارتباط ژنتیکی برای ۲۶ سوش از ۳۷ سوش هلیکوباکتر پیلوری تحت بررسی شد که نتیجه آن تشخیص وجود یک گروه یکنواخت از سوشهایی با الگوهای محدود شونده مشابه از ژن *vacA* بود. بعلاوه در این سوشها حضور ژن *ureAB* در مقایسه با *cagA* فراوانتری باشد که این فراوانی بیشتر در بیماران دارای زخم معده مشاهده شد. در حقیقت سوشهایی که از نظر ژنتیکی مرتبط بودند از ۸۳/۳۳٪ بیماران دارای زخم جدا شدند در حالیکه در گروه فاقد زخم (۴۶/۱۵٪) فراوانی کمتری داشتند و این تفاوت معنی دار بود. بنابراین نتایج این تحقیق یافته های قبلی یاماوکا و همکارانش را که توضیح داده بودند که وضعیت ژن *cagA* ممکن است که تنها شاخص بیماریزا نباشد را تأیید کرد (۱۶). با این وجود بر خلاف نتایج آنها، مطالعه حاضر مطابق با نتایج تحقیقات ریان و همکارانش (۳۲) تأیید کرد که تعیین ژنوتیپ *vacA* میتواند توانایی پیشگویی علائم کلینیکی را داشته باشد.

همانطوریکه در نتایج نشان داده شد، ۴۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری *ureAB* مثبت جدا شده در این

را حمل می کردند. درصد حمل هر سه ژن در گروه بیماران دارای زخم نسبت به بیماران بدون زخم فراوانتر بود اما تنها تفاوت معنی دار ( $P < 0.05$ ) بین دو گروه در مورد ژن *vacA* مشاهده شد. گزارشهای ارائه شده از مراکز دیگر نیز بیانگر این مطلب است که در سوشهای جدا شده از بیماران دارای زخم، در صد مثبت بودن *vagA*، *cagA* به تنهایی و یا هر دو با هم به ترتیب ۱۰۰-۷۱، ۹۲-۴۷/۵، ۳۷-۷۵ درصد می باشد (۲۰،۲۱). در تمامی مطالعات انجام شده، شیوع ژنهای *vacA*، *cagA* در بیماران دارای زخم نسبت به بیماران بدون زخم بیشتر بوده است، اگرچه در برخی مطالعات این تفاوت از نظر آماری معنی دار (۲۲،۲۳) و در دیگر مطالعات بی معنی گزارش شده است (۲۴،۲۵). هر چند توضیح روشنی برای این تفاوتها در فراوانی شیوع ژنهای *vacA*، *cagA* وجود ندارد با این وجود، علت آنرا به ناهمگنی ژنتیکی و یا اختلافات مربوط به نواحی جغرافیایی نسبت داده اند (۱،۲۶،۲۷). اتصال هلیکوباکتر پیلوری به اپتیلیوم معده و ترشح اینترلوکینها یک مرحله مهم در القاء التهاب فعال لایه مخاطی می باشد که می تواند به تولید زخم منجر شود. سیتوتوکسین واکوئل کننده (A *vacA*) به کلونیزه شدن در مخاط معده کمک می کند که به نظر می رسد نتیجه آن تعدیل سیستم ایمنی میزبان باشد (۲۸). پلی مرفیسمهای موجود در ژن سایتوکاینها ی میزبان نیز ممکن است که عامل مهمی در مقدار سایتوکاینها ی تولیدی و در نتیجه تفاوت در الگو و شدت پاسخهای التهابی باشند (۲۹). براساس تنوع ژنتیکی ممکن است که این پلی مرفیسمها از یک ناحیه جغرافیایی به ناحیه دیگر متفاوت باشند که می تواند احتمال حضور ژنوتیپهای خاص در جمعیت ایران که آنها را نسبت به عفونت با سوش هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن *vacA* مستعد می سازد را توضیح دهد.

با استفاده از آنزیم محدود کننده *HinfI* دو ژنوتیپ برای ژن *cagA* یافت شد. ژنوتیپ  $\beta$  در مقایسه با ژنوتیپ  $\alpha$  در تمام سوشهای جدا شده شیوع بیشتری داشت (۹۲/۳۱٪ در مقایسه با ۷/۶۹٪) اما هیچ ارتباط آماری معنی داری بین ژنوتیپهای بیان شده با علائم کلینیکی بیماری مشاهده نشد. این مطالعه با مطالعه ساریبا ساک و همکارانش (۱۲) که تنها ژنوتیپ 2a را برای سوشهای هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن *cagA* یافتند همخوانی

البرزی، بیمارستان نمازی شیراز و با همکاری خانم معصومه حیاتی در جمع آوری، کشت و جداسازی باکتری از نمونه‌ها انجام گرفته است. همچنین از همکاری صمیمانه اساتید محترم بخش تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز، جناب آقایان دکتر کامران باقری لنگرانی، دکتر مهدی صابرفیروزی و سید علیرضا تقوی قدردانی می‌گردد.

#### منابع:

1. Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science 1999; 284:1328–1333.
2. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. Helicobacter pylori infection: genetic and environmental influences. A study of twins. Ann Intern Med 1994;120:982-986.
3. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori. Gastroenterology 1997; 112: 92–99.
4. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Berg DE. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nucleic Acids Res 1992; 20: 6221-6225.
5. Forbes KJ, Fang Z, Pennington TH. Allelic variation in the Helicobacter pylori flagellin genes *flaA* and *flaB*: its consequences for strain typing schemes and population structure. Epidemiol Infect 1995; 114: 257-266.
6. Jiang Q, Hiratsuka K, Taylor DE. Variability of gene order in different Helicobacter pylori strains contributes to genome diversity. Mol Microbiol 1996; 20: 833-842.
7. Tee W, Lambert JR, Dwyer B. Cytotoxin production by Helicobacter pylori from patients with upper gastrointestinal tract diseases. J Clin Microbiol 1995;33:1203-1205.
8. Blaser MJ, Parsonnet J. Parasitism by the “slow” bacterium Helicobacter pylori leads to alter gastric homeostasis and neoplasia. J Clin Invest 1994; 94: 4–8.
9. Han SR, Schreiber HJ, Bhakdi S, Loos M, Maeurer MJ. *vacA* Genotypes and Genetic Diversity in Clinical Isolates of Helicobacter pylori. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5: 139-145.
10. Gonzalez-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, La Garza AM, Torres J. Helicobacter pylori *vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. J Infect Dis 2000; 182: 1450–1454.
11. Graham DY, Yamaoka Y. Helicobacter pylori and CagA: relationships with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. Helicobacter 1998; 3: 145–151.

مطالعه با استفاده از آنالیز پلی مرفیسمهای این ژن به ۱۰ الگوی DNA قابل تمایز طبقه بندی شدند. این نتایج نشان دادند که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده که در جامعه ما در چرخش هستند وجود دارد. فاکسل و همکاران (۳۳) توانستند با استفاده از آنزیم محدود کننده *HaeIII* برای هضم محصول PCR با اندازه ۲/۴ kb که از روی ژن *ureAB* تکثیر شده بود ۱۰ الگوی مشخص را برای ۲۲ سوش کلینیکی هلیکوباکتر پیلوری گزارش کنند. آکوپیانز و همکارانش نیز (۴) با استفاده از آنزیم *HaeIII* برای همان محصول PCR از ژن *ureAB* توانستند ۲۷ الگوی RFLP را نشان دهند. در یک مطالعه مشابه که توسط کاتالونو و همکارانش انجام شد با تجزیه پلی مرفیسمهای *ureAB* بر روی ۹۰ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده ۳۳ الگوی قابل تمایز DNA بدست آمد (۱۴). در مطالعه حاضر اگر چه ۱۰ الگوی متفاوت برای *ureAB* مشخص شد اما تقریباً ۴۸٪ از سوشها تنها متعلق به الگوی *ureAB 5a* با ۵ باند بودند. این نتایج با نتایج کاتالونو و همکارانش که نشان دادند یک ژنوتیپ بنام *ureAB 4* فراوانترین حالت بین ۳۳ الگو بود مطابقت دارد.

#### نتیجه نهایی:

بطور کلی، با وجود اینکه به نظر می‌رسد که تنوع ژنتیکی زیادی در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری موجود در جامعه ما وجود دارد اما شاخصهای ژنومی خاصی مانند *ureAB* پراکندگی وسیعی دارند و تقریباً دارای توالی حفظ شده هستند. در نتیجه با استناد به نتایج حاصل از این بررسی که بروش آنالیز الگوهای PCR-RFLP ژنهای ویروالانس انجام گرفته است اینطور تصور می‌شود که حضور ژن *cagA* ضرورتاً یک فاکتور خطر برای ایجاد بیماری زخم معده نمی‌باشد در حالیکه بنظر می‌رسد یک الگوی ژنوتیپی همگن *vacA* با افزایش خطر بیماری توام با زخم در جامعه مورد بررسی ما همراه می‌باشد. در نهایت وجود تنوع ژنومی متعدد در ژن *ureAB* نیز ممکن است که در تولید واکنشهای ضد *urease* در جمعیت متنوع و ناهمگن انسانی مشخص دارای ارزش عملی بالایی باشد.

#### سپاسگزاری:

این طرح تحت حمایت مالی پروژه تحقیقاتی شماره ۸۲-۱۷ مرکز تحقیقات میکروبیشناسی بالینی استناد

12. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1648-1651.
13. Olmos JA, Rios H, Higa R. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Argentina: results of a nationwide epidemiological study. Argentinean Hp Epidemiological Study Group. *J Clin Gastroenterol* 2000; 31: 33-37.
14. Catalano M, Matteo M, Barbolla RE, Jimenez Vega DE, Crespo O, Leanza AG, et al. *Helicobacter pylori vacA* genotypes, *cagA* status and *ureAB* polymorphism in isolates recovered from an Argentine population. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 41: 205-210.
15. van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Pena AS, Midolo, Maria de Magalhães Queiroz D, Carneiro F, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-830.
16. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA* and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2374-2379.
17. Fakhri H, Merat S, Hosseini V, Malekzadeh R. Low dose furazolidone in triple and quadruple regimens for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 89-93.
18. Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghighat M, Hayati M, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 259-61.
19. Wilson K, Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al. Preparation of genomic DNA from bacteria in: *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons 1994: 2.4.1-2.4.5.
20. Britto CAA, Silva LMB, Juca N, Leal NC, Souza W, Queiroz D, et al. Prevalence of *cagA* and *vacA* genes in isolates from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 817-821.
21. Lamarque D, Gilbert T, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Chaumette MT, Delchier JC. Seroprevalence of eight higher rate of seroreactivity against *CagA* and 35kDa antigens in patients with peptic ulcer originating from Europe and Africa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 721-726.
22. Leite KRM, Darini E, Canavez FC, Carvalho CM, Silveira Mitteldorf CAT, Camara-Lopes LH. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med J* 2005; 123: 113-118.
23. Hennig EE, Trzeciak L, Regula J, Butruk E, Ostrowski J. *VacA* genotyping directly from gastric biopsy specimens and estimation of mixed *Helicobacter pylori* infections in patients with duodenal ulcer and gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 743-749.
24. Mahachai V, Tangkijvanich P, Wannachai N, Sumpathanukul P, Kullavanijaya P. *CagA* and *VacA*: virulence factors of *Helicobacter pylori* in Thai patients with gastroduodenal diseases. *Helicobacter* 1999; 4: 143-147.
25. Audibert C, Janvier B, Grignon B, Salaun L, Burucoa C, Lecron JC, et al. Correlation between IL-8 induction, *CagA* status and *VacA* genotypes in 153 French *Helicobacter pylori* isolates. *Res Microbiol* 2000; 151: 191-200.
26. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, et al. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999; 117: 342-349.
27. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, et al. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett* 2002; 517: 180-184.
28. Papini E, Zoratti M, Cover TL. In search of the *Helicobacter pylori VacA* mechanism of action. *Toxicon*. 2001 Nov; 39(11):1757-1767.
29. Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine* 2005 Feb 21; 29(4): 141-152.
30. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.
31. Cover TL, Tummuru MKM, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem* 1994; 269: 10566-10573.
32. Ryan KA, Moran AP, Hynes SO, Smith T, Hyde D, O'Morain CA, et al. Genotyping of *cagA* and *vacA*, Lewis antigen status and analysis of the poly-(C) tract in the alpha (1,3)-fucosyltransferase gene of Irish *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000; 28: 113-120.
33. Foxall PA, Hu LT, Mobley HL. Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 739-741.