Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

مقاله پژوهشی

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 بـه فاکتورهای محیطی و میزبان وهمچنین 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 سوشـهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران دارای عفونت معده بدون زخم و بیماران دارای زخم معده بود.

روش کار: در این مطالعه توصیفی ـ 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 معنـی داری (P<۰/۰۵)، بیشتر بود. درRFLP *ژن cagA* دوالگوی متفاوت دیده شد. الگوی β با سه باند در هر دوگروه بیماران فراوانی بیـشتری داشـت. هضم آنزیمی منجر به تولید یک الگوی کاملاً یکنواخت در ۸۳/۳۳٪ از سوشهای دارای *vacA* جداشده از بیماران دارای زخـم شـد. این الگوبا حالت زخم دار بیماری از نظر آماری مرتبط بود. آنالیز پلی مرفیسمهای *ureAB* ۱۰ الگوی قابل افتراق را مشخص کـرد که الگوی *ureAB* 5a شایعترین الگو در تمام سوشها بود (٤٧/٦١٪). برای ژنهای *ureAB, cagA* هیچ ارتباطی بـین الگوهـای خـاص DNA و حالت کلینیکی بیماری مشاهده نشد.

نتیجه نهائی: اگرچه در بیماران مورد بررسی حضور ژن *cagA* ممکن است که فاکتور خطری برای ایجاد حالـت زخـم دار بیمـاری نباشد اما به نظر می رسد که وجود یک ژنوتیپ یکسان *vacA* با افزایش خطر ایجاد زخم همراه است. در نهایـت علیـرغم وجـود درجه بالائی 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 پلیمراز / هلیکوباکترپیلوری

مقدمه :

امـــروزه التهـــاب معـــده ایجـــاد شـــده توســـط هلیکوبـاکترپیلوری بـه عنـوان عامـل اصـلی زخـم معـده، دئودنوم، ادنوکارسینومای معده و لنفـوم بافـت لنفوئیـدی وابسته به مخاط شناخته شده است (۱). دلایل ایـن تنـوع پیامدهای کلینیکی عفونت ممکن است که به فاکتورهـای محیطی ، میزبان وهمچنـین اخـتلاف در شـیوع یـا بیـان فاکتورهـــای بیمـــاریزای وابـــسته بـــه بـــاکتری مـــرتبط باشند(۲،۳). تکنیکهای مختلف ، تغییـرات ژنتیکـی بـسیار متنوعی را در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری نشان داده انـد (۷-۴). تفاوتهای ژنتیکـی در ارگانیـسم ممکـن اسـت کـه فاکتورهای بیماریزا، عملکرد و خصوصیات آنتی ژنی آنها را تحت تاثیر قرار دهد . تنوع آنتی ژنی محـصولات یـک ژن مشخص ممکن است کـه یـک مکانیـسم فـرار از سیـستم ایمنی را برای سوشهای هلیکوباکتر در میزبان ایجاد نماید. مطالعات وسیعی برای تعیین ژنوتیپ شاخصهای بیماریزای

* استادیار مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز (s_farshad@yahoo.com)

** استاد گروه اطفال دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

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

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

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* (۱۲-۱۰) و *ureAB* (۱۳،۱۴) می باشد. براساس تحقیقات گذشته سوشهای تولید کننده ژنهای ویرولانس *ureAB, cagA* و*vacA* 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 درمطالعات 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 نظراتی 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 ازتعیین ژنوتیپ فاکتورهای بیماریزا و ارتباط بین ژنوتیپ های مختلف و حالتهای توام با زخم و فاقد زخم بیماری می باشد.

روش کار:

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی ۱۱۴ بیمار(۶۰ مرد و ۵۴ زن با محدوده سنی ۸۰-۱۶ سال و میانگین سنی ۱۴±۴۱/۳ سال) مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان نمازی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شیرازدر 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 ٪ گلوکز) 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 درنظر گرفته شد.

جداسازی سوشهای هلیکوباکتر پیلوری : نمونه های بیوپسی بیماران به آرامی بین دو لام هموژن شده و در محیطهای آزمایش اوره آز سریع و بروسلا آگار غنی 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. کشتها در شرایط میکرو ائروفیلیک (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 ارگانیسمهای رشد کرده از تستهایی مانند اکسید از ، کاتالاز و اوره آزسریع استفاده شد.

استخراج DNA : سوشهای هلیکوباکتر پیلوری را پس از شستشو در ۳۸۳ میکرولیتر با فرTE [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 (۲۵:۲۵:۱) 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 پلیمراز : توالی پرایمرها که در مطالعات دیگرگزارش شده بودند(۹) ازکمپانی TIBMOLBIOL Syntheselabor GmbH برلین آلمان تهیه شدند. توالی و مشخصات این پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: ترادف پرایمرهای اختصاصی ژنهای *cagA, vacA* و *ureAB* مورد استفاده در واکنش PCR

	پرایمر	ترادف پرایمرها (۵′-۳′)	اندازه محصول PCR (bp)
vacA	F	GCTTCTCTTACCACCAATGC	۱۱۶۲
	R	TGTCAGGGTTGTTCACCATG	
cagA	F	AGTAAGGAGAAACAATGA	۱۳۲۰
	R	AATAAGCCTTAGAGTCTTTTTGGAAATC	
*ureA*B	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 پلیمراز و ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده از سوشهای هلیکوباکتر پیلوری انجام شد.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

برنامه سیکل حرارتی PCR شامل یک مرحله دنـاتوره کردن اولیه بمدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ چرخه بصورت زیـر بـود: بـرای ژن *vacA* ، ۱ دقیقه در۹۴°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 در۷۲ °C و بـرای ژن *ureAB* یـک دقیقـه در°C ۹۴ درجه سانتی گراد، یک دقیقـه در ۵۰ °C و دو دقیقـه در۷۲ °C. تکثیر DNA توسط دستگاه ترمـــوسایکـــر (اپندرف ، آلمان) انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز الکتروفورز شده و توسط اتیـدیوم بروميـد رنـگ آمیـزی و تصویر برداری شدند.

آنالیز PCR-RFLP: قطعات *vacA, cagA* و*ureAB* تکثیـر شده به ترتیب توسط آنزیمهـای *Hph*I ،*Hinf*I ،*Hae*III و 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 اتیـدیوم بروميد رنگ آمیزی شدند.

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

نتایج :

گروه بیماران و شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری : براساس یافته های پاتولوژی و اندوسـکوپی، بیمـاران بـه دو گـروه دارای زخم و فاقد زخم معده تقسیم شدند. در کل با روش کـشت از بیمـاران دارای زخـم ۳۰ سـوش (۸۱/۸۰٪) و از بیمـاران فاقـد زخـم ۳۵ سـوش (۴۵/۴۵٪) هلیکوبـاکتر پیلوری جداشد.

شیوع ژنهای *ureAB, vacA, cagA* در هلیکو باکتر پیلوری هـای جدا شده از بیماران : نتـایج حاصـل از واکـنش زنجیـره ای پلیمراز برای ۶۵ سوش هلیکو باکتر پیلـوری جـدا شـده از بیمـاران نـشان داد کـه ۳۱ سـوش (۴۷/۶۹٪) دارای ژن *cagA* ، ۳۷ سوش (۵۶/۹۲٪) دارای ژن *vacA* و ۴۲ سوش (۶۴/۶۱٪) دارای ژن *ureAB* بودند.

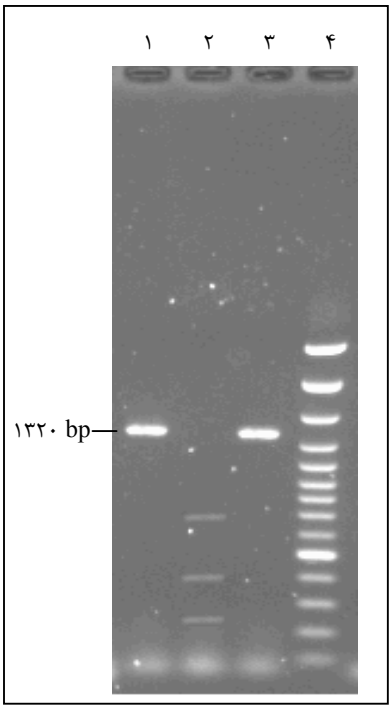
ژنهای *ureAB, vacA, cagA* در بیماران دارای زخـم (به ترتیب ۵۶٪، ۸۰٪ و ۷۳٪) نسبت به بیماران فاقد زخم (به ترتیب ۳۷/۱۴٪، ۳۷/۱۴٪ و ۵۷/۱۴٪) دارای فراوانـی بیشتر بودند، اما این تفاوت بین دو گروه بیمار تنها درمورد ژن *vacA* از نظر آماری معنی دار بود (P< ۰/۰۵).

الگوهای RFLP- PCR: بدنبال هضم آنزیمـی ژن *cagA* تکثیر یافته توسط آنزیم *Hinf*I ، دو الگوی مختلـف β وα بدست آمد (جدول۲) (تصویر۱). الگـوی β در مقایـسه بـا الگوی α دارای فراوانی بیشتری در هـر دو گـروه بیمـاران بود که این تفاوت از نظر آمـاری معنـی دار بـود امـا هـیچ ارتبـاط معنـی داری بـین ایـن الگوهـای بدسـت آمـده و تظاهرات کلینیکی وجود نداشت (P> ۰/۰۵).

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

الگو	بیماران $cag\ A^+$		جمع
	دارای زخم	بدون زخم	
α (بدون برش)	۲ (۱۱/۱۱)*	۱ (۷/۶۹)	۳ (۹/۶۷)
β (۳ باند)	۱۶ (۸۸/۸۸)	۱۲ (۳۰/۹۲)	۲۸ (۹۰/۳۲)
تعداد کل	۱۸	۱۳	۳۱

* اعداد داخل پرانتز درصد می باشند.

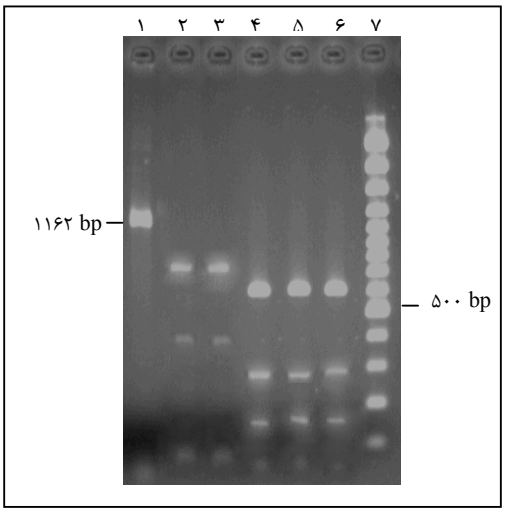


تصویر ۱: الکتروفورزیس نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی قطعه ۱۳۲۰جفت بازی ژن *cagA* سوشهای هلیکو باکتر پیلوری جـدا شده از بیماران بر روی ژل آگاروز ۲٪. ; ردیف ۱ و ۳ قطعه هضم نشده (الگوی α), ردیف ۲ قطعه هضم شده (الگویβ), ردیف ۴ قطعات نشانگر

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

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

مشاهده شد. با وجود اینکه ۴۶/۱۵ ٪ از سوشهای *vacA* مثبت(۶ سوش از۱۳ سوش) جدا شده از بیماران بدون زخم این الگوی یکنواخت را نشان دادند اما این الگو بصورت معنی داری (P< ۰/۰۵) با وضعیت زخم دار بیماری مرتبط بود (تصویر۲).



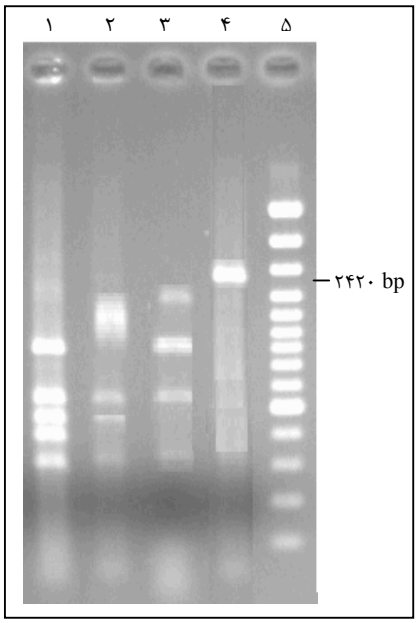
تصویر ۲: الکتروفورزیس نمونه ای از نتایج هضم آنزیمی قطعه ۱۱۶۲ جفت بازی ژن *vacA* سوشهای هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران با زخم معده (ردیفهای ۲،۳،۴) (الگوی ۱) و بدون زخم (ردیفهای ۵،۶) (الگوی ۲) بر روی ژل آگاروز ۲٪. ردیف ۱ قطعه هضم نشده ژن *vacA*, ردیف ۷ قطعات نشانگر

بر اساس آنالیز پلی مرفیسمهای *ureAB* ، تمام ۴۲ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از این مطالعه به ۱۰ الگوی DNA مشخص طبقه بندی شدند (جدول۳) (تصویر۳).

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

الگو	بیماران *ure AB*$^{+}$		جمع
	دارای زخم	بدون زخم	
ureAB ۳a	۱ (۴/۵۴)*	۱ (۵)	۲ (۴/۷۶)
ureAB ۳b	۱ (۴/۵۴)	۱ (۵)	۲ (۴/۷۶)
ureAB ۴a	۱ (۴/۵۴)	۲ (۱۰)	۳ (۷/۱۴)
ureAB ۴b	۲ (۹/۰۹)	۱ (۵)	۳ (۷/۱۴)
ureAB ۴c	۱ (۴/۵۴)	۲ (۱۰)	۳ (۷/۱۴)
ureAB ۵a	۱۲ (۵۴/۵۴)	۸ (۴۰)	۲۰ (۴۷/۶۱)
ureAB ۵b	۱ (۴/۵۴)	۲ (۱۰)	۳ (۷/۱۴)
ureAB ۵c	۱ (۴/۵۴)	۱ (۵)	۲ (۴/۷۶)
ureAB ۶a	۱ (۴/۵۴)	۱ (۵)	۲ (۴/۷۶)
ureAB ۶b	۱ (۴/۵۴)	۱ (۵)	۲ (۴/۷۶)
تعداد کل	۲۲	۲۰	۴۲

* اعداد داخل پرانتز درصد می باشند



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 ۱(الگوی۵a), ردیف۲ (الگوی۴a), ردیف ۳ (الگوی۴b), 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 دارآماری بین الگوهای اختصاصی DNA و بیماری کلینیکی مشاهده نشد (P> ۰/۰۵).

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*

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

را حمل میکردند. درصد حمل هر سه ژن در گروه بیماران دارای زخم نسبت به بیماران بدون زخم فراوانتر بود اما تنها تفاوت معنی دار (P< ۰/۰۵) بین دو گروه درمورد 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 ویا هر دوبا هم به ترتیب ۱۰۰-۷۱، ۹۲-۴۷/۵ ، ۷۵-۳۷ 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 درفراوانی شیوع ژنهای *vacA, cagA* وجود ندارد با این وجود, علت آنرا به ناهمگنی ژنتیکی ویا 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 واکوئله 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 هلیکوباکترپیلوری دارای ژن *vacA* مستعد می سازد را توضیح دهد.

با استفاده از آنزیم محدود کننده *Hinf*I دو ژنوتیپ برای ژن *cagA* یافت شد. ژنوتیپ β در مقایسه با ژنوتیپ α 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 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 جداشده از بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بیشتر می باشد اما این تفاوت ازنظر 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 ودر 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 تائید کرده است (۳۰،۳۱). هضم محصول های PCR با آنزیم *Hae*III 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* فراوانترمی 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 تائید کرد (۱۶). با این وجود بر خلاف نتایج آنها ، مطالعه حاضر مطابق با نتایج تحقیقات ریان و همکارانش (۳۲) تائید 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

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

مطالعه با استفاده از آنالیز پلی مرفیسمهای این ژن بـه ۱۰ الگوی DNA قابل تمایز طبقه بنـدی شـدند. ایـن نتـایج نشان دادند که تنـوع ژنتیکـی قابـل ملاحظـه ای در بـین سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده که در جامعه ما در چـرخش هـستند وجـود دارد. فاکـسل و همکـاران (۳۳) توانستند با استفاده از آنزیم محدود کننـده *Hae*III بـرای هضم محصول PCR با اندازه ۲/۴ kb که از روی ژن*ureAB* تکثیر شـده بـود۱۰ الگـوی مـشخص را بـرای ۲۲ سـوش کلینیکی هلیکو باکتر پیلـوری گـزارش کننـد . آکوپیـانز و همکارانش نیز (۴) بااستفاده از آنزیم *Hae*III برای همـان محصول PCR از ژن *ureAB* توانستند ۲۷ الگـوی RFLP را نشان دهند. در یک مطالعه مشابه که توسـط کاتـالونو و همکارانش انجام شد با تجزیـه پلـی مرفیـسمهای *ureAB* برروی ۹۰ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده ۳۳ الگـوی قابل تمایز DNA بدست آمد(۱۴). در مطالعـه حاضـر اگـر چه ۱۰ الگوی متفـاوت بـرای *ureAB* مـشخص شـد امـا تقریباً ۴۸ ٪ از سوشها تنها متعلق به الگوی *ureAB* 5a بـا ۵ باند بودند. این نتایج با نتایج کاتـالانو و همکـارانش کـه نشان دادند یک ژنوتیپ بنام *ureAB 4* فراوانتـرین حالـت بین ۳۳ الگو بود مطابقت دارد.

نتیجه نهایی :

بطور کلی، با وجود اینکه به نظر می رسـد کـه تنـوع ژنتیکی زیادی در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری موجـود در جامعه ما وجود دارد اما شاخصهای ژنـومی خاصـی ماننـد *ureAB* پراکندگی وسیعی دارند و تقریباً دارای توالی حفظ شده هستند. در نتیجه با استناد بـه نتـایج حاصـل از ایـن بررسـی کـه بـروش آنـالیز الگوهـای PCR-RFLP ژنهـای ویرولانس انجام گرفته است اینطـور تـصور مـی شـود کـه حضور ژن *cagA* ضرورتاً یـک فـاکتور خطـر بـرای ایجـاد بیماری زخم معده نمی باشد در حالیکـه بنظـر مـی رسـد یک الگوی ژنوتیپی همگن *vacA* با افزایش خطـر بیمـاری توام با زخم در جامعه مورد بررسی ما همراه می باشـد. در نهایت وجود تنوع ژنومی متعدد در ژن *ureAB* نیز ممکن اسـت کـه در تولیـد واکـسنهای ضـد urease در جمعیـت متنوع و ناهمگن انسانی مشخص دارای ارزش عملی بالائی باشد.

سپاسگزاری :

این طرح تحت حمایت مالی پروژه تحقیقـاتی شـماره ۱۷- ۸۲ مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی استـــــاد البرزی ، بیمارسـتان نمـازی شـیراز و بـا همکـاری خـانم معصومه حیاتی در جمع آوری ، کشت و جداسازی باکتری از نمونـه هـا انجـام گرفتـه اسـت. همچنـین از همکـاری صمیمانه اساتید محترم بخـش تحقیقـات گـوارش و کبـد دانشگاه علوم پزشکی شیراز ، جناب آقایان دکتـر کـامران باقری لنکرانی ، دکتر مهدی صابرفیروزی و سـید علیرضـا تقوی قدردانی می گردد.

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.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 13:00 +0330 on Thursday November 23rd 2017

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, Mégraund 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. Fakheri 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)-fucocyltransferase 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.