ارزیابی مارکرهای تهاجمی هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی بیماران مبتلا به گاستریت: یک مطالعه مقدماتی

دکتر نادر نوابی*، دکتر محمد رضا بذرافشانی[1]، دکتر مهرناز طهماسبی ارشلو[2]، فاطمه السادات حسینی[3]

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری نوعی میکروارگانیسم گرم منفی متحرک و مارپیچی شکلی است که به قطعیت با بیماری‌های گوارشی در ارتباط می‌باشد. اخیراً پلاک دندانی به‌عنوان منبع محتمل عفونت آن مطرح گردیده است. دو مارکر مهم تهاجمی معرفی شده Vac A (Vacuolating toxin) و Cag A (Cytotoxin-associated gene A) این میکروارگانیسم در واقع آللهای ژن‌های سایتوتوکسین آن محسوب می‌گردند. هدف از مطالعه مقدماتی حاضر بررسی حضور این مارکرهای تهاجمی در پلاک دندانی بیماران مبتلا به گاستریت بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، نمونه‌های جدا شده پلاک دندانی ۴۲ بیمار مبتلا به گاستریت که به بخش اندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی یک بیمارستان مراجعه نموده بودند برای انجام آزمایش PCR (Polymerase Chain Reaction) فرستاده شد و در آزمایشات به‌عمل آمده تلاش برای پیدا نمودن سوش‌های Vac A و Cag A هلیکوباکتر پیلوری صورت گرفت.

یافته‌ها: DNA مربوط به هلیکوباکتر پیلوری در ۴ نمونه از نمونه‌های پلاک دندانی مشخص گردید که هر ۴ نمونه برای سوش Vac A مثبت بودند و نیز ۲ نمونه از نمونه‌های مذکور برای سوش Cag A مثبت گزارش شدند.

نتیجه‌گیری: سوش‌های پاتوژنیک جدا شده از پلاک‌های دندانی در این مطالعه نشان می‌دهند که در برخی از بیماران امکان حضور بیش از یک مارکر ویرولانس هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی وجود دارد، اما به انجام مطالعات بیشتری برای تأیید این فرضیه نیاز است.

کلید واژه‌ها: پلاک دندانی، هلیکوباکتر پیلوری، گاستریت

* استادیار، گروه بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران (مؤلف مسؤول)
n_navabi@kmu.ac.ir

۱: استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۲: دندانپزشک، کرمان، ایران.

۳: کارشناس ارشد علوم آزمایشگاهی، کرمان، ایران

این مقاله در تاریخ ۹۲/۴/۱۱ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۳/۳/۲۰ اصلاح شده و در تاریخ ۹۳/۴/۳ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۱۰(۶): ۴۶۸ تا ۴۷۶

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (Helicobacter pilori: HP) باکتری گرم منفی متحرک و مارپیچی شکلی است که در واقع بی‌هوازی می‌باشد اما در شرایط هوازی نیز رشد می‌نماید. این میکروارگانیسم از پاتوژن‌های عمده دستگاه گوارش محسوب می‌شود و نقش آن به‌عنوان ریسک فاکتور گاستریت فعال مزمن، زخم‌های پپتیک معده و دوازدهه، آدنوکارسینومای معده و نوع خاصی از لنفوما به‌خوبی شناخته شده است[۶-۱]. به‌طور متوسط پنجاه درصد از جمعیت دنیا و بیش از ۸۰ درصد جمعیت کشورهای درحال توسعه به عفونت گوارشی HP آلوده می‌باشند[۸، ۷]. انسان منبع عمده این میکروارگانیسم در طبیعت به‌شمار می‌رود و دو راه سرایت عمده شناخته شده آن (مدفوعی- دهانی) و (دهانی- دهانی) می‌باشد[۴]. بنابراین، حفره دهان نقش تعیین‌کننده‌ای را در پروسه سرایت HP در انسان ایفا می‌کند[۴، ۳].

عفونت گوارشی HP به‌صورت موفقیت‌آمیزی با آنتی‌بیوتیک تراپی سیستمیک، قابل درمان است و به‌میزان ۹۰-۸۰ درصد پس از یک دوره درمانی موسوم به سه دارویی ریشه‌کن می‌گردد[۱]. با این وجود عفونت مجدد گوارشی، در تعداد زیادی از بیماران درمان شده مشاهده می‌گردد[۹] و این عفونت مجدد، معضل مهمی سر راه درمان آن محسوب می‌شود[۱۰، ۶]. وجود مخازن بالقوه HP و جایگاه‌هایی غیر از معده در بدن به‌عنوان مکانیسم کلونیزاسیون مجدد و عود عفونت گوارشی آن مطرح شده است[۱۰، ۱].

پلاک دندانی یک محیط میکروآئروفیلیک ایده‌آل را برای بقای HP فراهم می‌آورد به‌صورتی که مجموعه میکروارگانیسم‌های نهفته در یک ماتریکس متشکل از موادی مانند گلیکوپروتئین‌ها این بیوفیلم را تشکیل می‌دهد و منجر به تکثیر و حفاظت از جمعیت میکروبی می‌گردد. هم‌چنان‌که باکتری‌های مقیم این بیوفیلم، توانایی پاتوژن شدن را نیز دارند[۱۰-۸]. بنابر یک فرضیه، HP با ورود به این بیوفیلم از دسترس آنتی‌بیوتیک‌ها مصون مانده و زمینه عود مجدد عفونت گوارشی خود را فراهم می‌کند[۳]. نوابی و همکاران پس از متاآنالیز مطالعات انجام شده در این زمینه بدین نتیجه رسیدند که در ۴۹ درصد از بیماران مبتلا به عفونت گوارشی هلیکو باکتر، این میکروارگانیسم در پلاک دندانی نیز حضور داشته است[۱۱].

در مورد نقش هلیکو باکتر پیلوری در بروز بیماری‌های گوارشی، تفاوت ژنوتیپ‌های متفاوت مطرح شده و اعتقاد بر این است که ویرولانس سوش‌های مختلف این میکروارگانیسم برای ایجاد این عوارض متفاوت می‌باشد[۱۲]. دو مطالعه انجام شده در این زمینه تأثیر تهاجمی دو سوش CagA (Cytotoxin-associated gene A) و VacA (Vacuolating toxin) را بر سلول‌های اپی‌تلیال بیشتر می‌دانند[۱۳، ۱۲])، اما در زمینه تأثیر بیشتر یکی از این دو سوش نیز در میان مطالعات تناقضات واضحی به‌چشم می‌خورد. چنان‌چه عده‌ای از محققان، ژن Cag A را دارای ویرولانس بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های Vac A دانسته‌اند و این ژن را با کارسینوم معده مرتبط دانسته‌اند در حالی‌که به اعتقاد ایشان، ژن Vac A ارتباط بیشتری را با پروسه‌های التهابی نشان می‌دهد[۱۶-۱۴]. اما گروهی دیگر، ژن VacA را دارای ویرولانس بالاتری می‌دانند[۱۸-۱۷]. در حالی‌که از دیدگاه گروه سوم، تفاوت معنی‌داری میان ویرولانس این دو سوش یافت نگردیده است[۱۹]. به‌نظر می‌رسد تفاوت منطقه جغرافیایی در بروز این تناقضات تأثیرگذار بوده است[۱۸-۱۵، ۱۳]. در صورتی‌که ژنوتیپ میکروارگانیسم یافت‌شده در پلاک دندانی دارای نسبت قابل توجهی از سوش‌های با ویرولانس بالا باشد فرضیه دخالت هلیکو باکتر موجود درپلاک دندانی در عود عفونت گوارشی آن، قوت بیشتری خواهد گرفت[۲۰]. هدف تحقیق حاضر، بررسی سوش غالب هلیکوباکتر پیلوری در پلاک دندانی بیمارانی بوده که مبتلا به عفونت گوارشی حاصل از این میکروارگانیسم بوده‌اند و بدین منظور، جستجو برای پیدا نمودن هر دو سوش مهاجم (Vac A و Cag A) از طریق روش PCR (Polymerase chain reaction) صورت گرفته است.

اپیدمیولوژی آلودگی افراد به هلیکوباکتر پیلوری در مناطق مختلف تنوع بالایی دارد و این میزان آلودگی در کشورهای درحال توسعه در سطح قابل توجهی گزارش شده است. قدر مسلم این‌که به مانند تنوع سوش میکروارگانیسم در دستگاه گوارش، تنوع سوش آن در پلاک دندانی نیز محتمل است و در یک منطقه جغرافیایی خاص مانند کشور ایران نیز در ابتدا نیاز به انجام یک بررسی مقدماتی برای تعیین سوش این

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

میکروارگانیسم در پلاک دندانی احساس می‌شود. مطالعه حاضر در واقع، نخستین تلاش در کشور ما جهت تعیین ژنوتیپ هلیکو باکتر موجود در پلاک دندانی محسوب می‌گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های پلاک دندانی: مطالعه حاضر به‌صورت مقطعی انجام گرفت و طی آن بیماران ارجاع‌شده به بخش اندوسکوپی بیمارستان افضلی‌پور دانشگاه علوم پزشکی کرمان مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران بالای ۱۸ سالی که پس از معاینه متخصص داخلی و انجام آزمایشات مربوطه تشخیص گاستریت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری برای ایشان داده می‌شد وارد مطالعه گردیدند. برای این بیماران درمان سه دارویی هلیکو باکتر آغاز نگردیده بود و هم‌چنین بیمارانی که تعداد دندان‌های طبیعی ایشان برای جمع پلاک کافی نبود یا از دندان مصنوعی کامل استفاده می‌کردند وارد مطالعه نشدند. هم‌چنین بیماران با پرسش از تعداد دفعات مسواک زدن روزانه انتخاب گردیدند و کلیه بیماران انتخاب شده، روزانه یک‌بار از مسواک استفاده می‌نمودند. با توجه به مطالعات مشابه انجام شده در این زمینه و نیز با در نظرگیری قدرت مطالعه برابر ۸۰ درصد و d = ۰/۰۵ حجم نمونه ۴۰ نفری برای بیماران مبتلا به گاستریت در نظر گرفته شد[۱۸، ۱۶، ۱۵].

جمع‌آوری نمونه‌های پلاک دندانی توسط دندان‌پزشک آموزش دیده دراین زمینه انجام گردید و بدین منظور جمع‌آوری در سه ناحیه مولر، پرمولر و انسیزور از فک بالا و پایین انجام شد. برای پلاک‌های بالای لثه با خراشیدن سطوح دندانی توسط کورت و برای پلاک‌های زیر لثه‌ای پس از تعیین عمیق‌ترین نقطه پاکت دور دندان توسط پروب پریودونتال با کنهای کاغذی استریل شده با اشعه گاما میزان مورد نظر از پلاک‌های دندانی از نواحی تعیین شده جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری از پلاک دندانی بیماران با موافقت ایشان انجام گردید و نام بیماران برای نمونه‌ها ثبت نشد.

استخراج DNA: نمونه‌های پلاک بلافاصله فریز شده و تا زمان استخراج در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ده میکرولیتر پروتئیناز K و ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیزیز (NaCl, 1.2% SDS mmol/L300 ،mmol/L Tris-HCl200, mmol/L EDTA25) به نمونه‌های پلاک دندانی اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت دربن ماری ۵۵ درجه انکوبه شدند. سپس از حجم مساوی فنول و کلروفرم استفاده گردید. DNA با ایزوپروپانول به‌صورت کلاف تشکیل گردید و با اتانول ۷۵ درصد شسته شد. پلیت DNA از هر نمونه خشک و در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید[۱۰]. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. DNA دارای غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم و کیفیت ۲-۱/۷ وارد آزمایش PCR گردید. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد نیز استفاده شد. سپس DNAهای استخراج شده تا زمان استفاده در ۲۰- درجه نگهداری شد[۱۴].

تکنیک PCR: برای شناسایی باکتری HP در نمونه‌های پلاک دندان از یک ست پرایمر که آنتی‌ژن ۲۶ کیلو دالتونی را تکثیر می‌نماید استفاده شد. این پرایمرها قطعه ۲۹۸ جفت‌بازی را تکثیر می‌نمایند. سپس نمونه‌های DNA مثبت هلیکو باکتر پیلوری، از نظر حضور ژن‌های Vac A و Cag A مورد بررسی قرار گرفت. به این صورت که از پرایمرها برای شناسایی ژن Cag A استفاده شد. هم‌چنین ژن Vac A نیز با یک جفت پرایمر اختصاصی شناسایی گردید. برای تعیین حضور هر کدام از آلل‌ها از یک جفت پرایمر اختصاصی مختص به همان آلل استفاده گردید. پس از انجام هر PCR، نمونه‌ها داخل دستگاه PCR قرار داده شد تا قطعات تکثیری مورد نظر به‌دست آید.

در هر آزمایش از نمونه کنترل مثبت و منفی و کنترل آلودگی (بدون DNA) برای تایید PCR استفاده گردید. شاهد مثبت عبارت از نمونه بیوپسی بیماری که با تست اوره آز مثبت بودن آن تأیید شده بود و برای کنترل آلودگی آب به‌جای DNA الگو استفاده گردید. در انتها محصولات تکثیری با الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفته و پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید باندهای مورد نظر تحت نور ماوراء بنفش رویت گردید[۱۹.]. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن کدکننده آنزیم اوره آز استفاده گردید. ژن کدکننده آنزیم اوره آز (ureC) یک ژن حفظ شده است و کمتر مورد تغییرات ژنتیکی قرار می‌گیرد. برای هر یک از پرایمرها غلظت بهینه مواد به‌کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک و نیم میکرولیتر از کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

x۱۰، 1 میکرولیتر از پرایمر glmM1-F و glmM2-R (۱۰ پیکومول) جدول ۱، ۰/۱ میکرولیتر از dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ میکرولیتر از DNA نمونه‌های پلاک دندانی می‌باشد[۲۰].

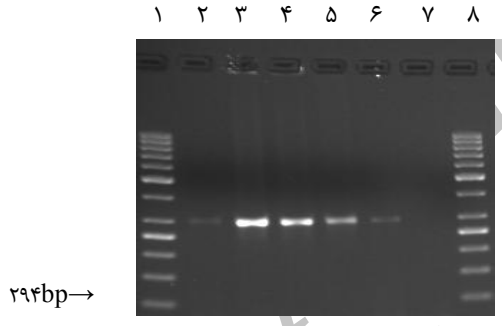
برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن کدکننده آنزیم اوره آز به‌ترتیب یک مرحله به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به‌ترتیب: ۹۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۰ دقیقه می‌باشد ۷ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۲ درصد اجرا شد. حضور باند ۲۹۴ جفت بازی در نمونه‌های پلاک نشان‌دهنده حضور باکتری پیلوری در نمونه می‌باشد[۱۴]. به‌منظور تعیین ژنوتایپ‌های پیلوری از پرایمرهای Vac , Cag استفاده گردید که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. مراحل انجام PCR برای تعیین هر ژنوتایپ مانند روش قبل بود. تنها تفاوت در دمای اتصال پرایمرها بود که دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، بهترین اتصال را ایجاد نمود. پرایمرها از شرکت روبین طب گستر (تهران) تهیه گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

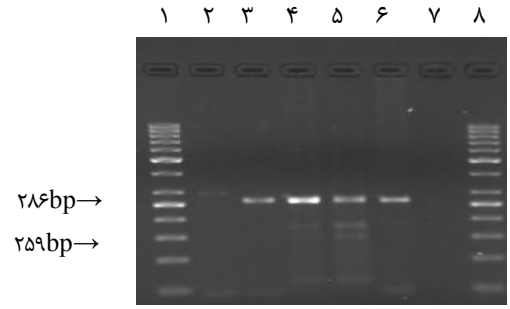
Gene	Primer name	Sequence	Size (bp) of PCR producT
glmM	glmM1-F	AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTTT	۲۹۴
	glmM2-R	AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC	
cagA	CagA-F1	GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G	۳۹۴
	CagA-B1	CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A	
vacA	VA1-F	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	۲۵۹ یا ۲۸۶
	VA1-R	CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	

یافته‌ها

در مطالعه حاضر از ۴۲ بیماری که تشخیص گاستریت ناشی از هلیکوباکترپیلوری برای ایشان داده شده بود نمونه‌گیری از پلاک دندانی انجام گردید (۲۰ مرد و ۲۲ زن). میانگین سنی بیماران ۵/۶ – + ۴۱/۷۶ سال بود. پس از انجام PCR بر روی کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده وجود هلیکو باکتر پیلوری در ۴ نمونه پلاک دندانی تأیید گردید که پس از تعیین ژنوتیپ، مشخص گردید هر ۴ نمونه برای ژن Vac A مثبت بوده و دو نمونه برای ژن Cag A نیز مثبت گزارش گردیدند. به‌عبارت دیگر مثبت بودن توأم دو نمونه پلاک دندانی برای هر دو ژن Vac A و Cag A با استفاده از PCR تأیید گردید. محصول PCR با استفاده از پرایمر glm 1-f و glm 2-R به‌منظور تأیید حضور هلیکو باکتر پیلوری در شکل ۱ مشاهده می‌گردد. در این شکل ارقام ۲، ۴، ۵ و ۶ بیان‌گر مثبت بودن پلاک دندانی برای HP و رقم ۳ بیان‌گر کنترل مثبت می‌باشد. اشکال شماره ۲ و ۳ نیز نشان دهنده نتایج مربوط به PCR نمونه‌ها از نظر دو ژن Vac A و Cag A می‌باشد (۱ و ۸ مشخص‌کننده وزن مولکولی است). در هر دو شکل، ارقام ۲ تا ۵ مربوط به نتیجه پلاک دندانی، رقم ۶ مربوط به کنترل مثبت (نمونه‌های مربوط به بیوپسی) و رقم ۷ مربوط به کنترل منفی (بدون DNA) می‌باشد.

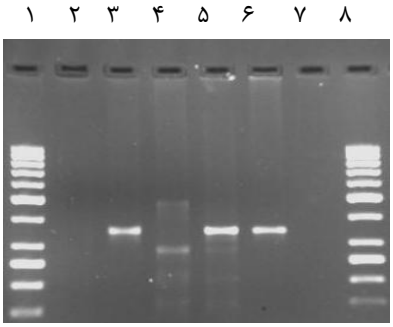


شکل ۱. محصول PCR ژن glmM



شکل ۲. محصول PCR ژن Vac A

www.SID.ir
www.mui.ac.ir



شکل ۳ : محصول PCR ژن CagA

بحث

کشف مارکرهای ژنتیکی Vac A و Cag A به نوعی مؤید تنوع ژنومی هلیکو باکتر پیلوری می‌باشد و آثار تفاوت در ژنوتیپ هلیکو باکتر پیلوری بر پیش‌آگهی بالینی عوارض ناشی از آن از قبیل زخم‌های پپتیک در تحقیقات متعددی با استفاده از PCR مورد بررسی قرار گرفته است[۱۸]. این دو ژنوتیپ هلیکو باکتر پیلوری در واقع شایع‌ترین انواع با ویرولانس بالای آن محسوب می‌شوند چنان‌چه در نمونه‌های PCR مربوط به معده شیوع کلی عفونت هلیکو باکتر سوش Cag A در کشورهای خاورمیانه در محدوده ۷۰- ۵۶ درصد به‌دست آمده است[۱۵] و این رقم در مطالعه Maeda و همکاران در ژاپن برای سوش Cag A معادل ۷۹ درصد گزارش شده است[۱۶]. Yakoob و همکاران گونه Cag A را در ارتباط بیشتری با زخم‌های پپتیک و کارسینومای معده و در مقابل آللهای مربوط به Vac A را با التهاب بافتی ناشی از هلیکو باکتر پیلوری مرتبط دانسته‌اند[۱۵]. این در حالیست که در این زمینه میان نتایج مطالعات ، تناقض به چشم می‌خورد چنانچه Nguyen و همکاران حضور سوش Vac A را با افزایش ریسک اولسر پپتیک مرتبط دانسته‌اند[۱۷] اما Uchida و همکاران ارتباط نزدیک سوش Vac A را با وقوع کارسینومای معده بیان نموده‌اند[۱۸]. قدر مسلم این‌که تناقضات مذکور در تعیین سوش دارای ویرولانس بالاتر برای عود اولسر پپتیک مشکل تعیین آن در پلاک دندانی را نیز پیچیده‌تر می‌نماید.

Argent و همکاران نشان دادند که گونه Vac A بر فسفوریلاسیون Cag A تأثیر بر جای نمی‌گذارد. این یافته نشان می‌دهد که دو سوش Vac A و Cag A در پروسه اثر بر سلول‌های اپی‌تلیالی بدن میزبان بر یکدیگر اثر تقویتی ندارند و این امر به‌صورت بالقوه سبب می‌گردد تا از آسیب بیش از حد سلولی جلوگیری گردد[۱۳]. اما Nagiyev و همکاران مشخص نمودند که حضور Cag A سبب می‌گردد تا ویرولانس ژنوتیپ Vac A به‌صورت معنی‌داری افزایش یابد که این مسأله مغایر نتیجه مطالعه Argent و همکاران می‌باشد[۱۴]. این در حالیست که Paniagua و همکاران هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری را میان مارکرهای ویرولانس Vac A و Cag A پیدا ننموده‌اند[۱۹]. شواهد حاصل از مطالعات Argent، Nagiyev و Paniagua که همگی تداخل این دو سوش را در نمونه‌های بیوپسی معده بیماران بررسی نموده‌اند نشان می‌دهد که تا کنون نحوه تأثیرات متقابل دو مارکر مورد نظر در معده نیز به قطعیت مشخص نگردیده است[۱۹، ۱۴، ۱۳].

در مطالعه حاضر فراونی سوش Vac A در نمونه‌های پلاک دندانی معادل ۹ درصد و فراوانی Cag A برابر ۴/۵ درصد به‌دست آمد. نتایج مطالعه Assumpcao و همکاران با مطالعه حاضر مغایرت دارد زیرا در مطالعه آن‌ها ۸۹ درصد از نمونه‌های پلاک دندانی حاوی هلیکو باکتر پیلوری با میکروارگانیسم موجود در معده تشابه ژنوتیپی (Vac A یا Cag A) داشته و به اعتقاد ایشان هلیکو باکتر پیلوری موجود در پلاک دندانی با عود بیماری‌های گوارشی شدید ناشی از این میکروارگانیسم در ارتباط است اما در همین‌حال Assumpcao و همکاران بیان نموده‌اند که نمی‌توانیم امکان کلونیزاسیون دهانی موقتی هلیکو باکتر را که به‌دلیل رفلاکس‌های مکرر در این بیماران صورت بگیرد رد نماییم[۲۰].

از ارقام پایین به‌دست آمده برای حضور این دو نوع سوش هلیکو باکتر پیلوری در مطالعه حاضر دو فرضیه قابل طرح باشد: این‌که هلیکو باکتر پیلوری موجود در پلاک دندانی سوش غالبی به غیر از دو سوش با ویرولانس بالا (Vac A و Cag A) داشته باشد که این فرضیه دخالت هلیکو باکتری موجود در پلاک دندانی را در عود مجدد مشکلات گوارشی مربوط به آن کم‌رنگ می‌نماید و فرضیه دوم: جستجوی سوش‌های با ویرولانس بالا در پلاک دندانی تا کنون با دقت کافی انجام نگرفته و نیازمند انجام مطالعات بیشتر و احتمالاً با تغییر روش PCR می‌باشد زیرا تفاوت تکنیک مورد استفاده PCR در تحقیقاتی از این دست از

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

جمله عللی است که می‌تواند بر نتایج آن تأثیرگذار باشد چنان‌چه Goosen و همکاران با استفاده از ارزیابی Heminested PCR بدین نتیجه رسیدند که این روش اختصاصی هیچ‌گونه پاسخ مثبت کاذبی را به‌همراه ندارد و با استفاده از آن رقمی معادل ۳ درصد برای میزان حضور هلیکو باکتر پیلوری در حفره دهان به‌دست می‌آید[۲۱].

هم‌چنین بنابر نظریه Ishihara و همکاران گونه‌های مختلف باکتریایی دهان از رشد سوش‌های هلیکو باکتر پیلوری جلوگیری می‌کنند و با تولید پروتئین‌های مشابه باکتریوسین مانع کلونیزاسیون این میکروارگانیسم در حفره دهان می‌گردند[۲۲]. این مسأله نیز می‌تواند به پایین گزارش شدن میزان حضور سوش‌های هلیکو باکتر در مطالعه حاضر منجر شده باشد.

در مطالعه حاضر نتیجه آزمایش PCR در دو نمونه پلاک دندانی برای هر دو سوش Vac A و Cag A مثبت گردید. هر چند این یافته را در میان ۴۲ نمونه گرفته شده می‌توان تصادفی فرض نمود اما احتمال حضور هم‌زمان دو سوش مذکور در پلاک دندانی نیز بایستی در نظر گرفته شود.

Wang و همکاران به مقایسه ژنوتیپ هلیکو باکتر پیلوری، میان معده و بزاق بیماران پرداختند و نتایج مطالعه ایشان تأیید نمود که دریک مقطع زمانی و در یک بیمار امکان وجود بیش از یک نوع از ژنوتیپ هلیکو باکتر پیلوری وجود دارد که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد[۲۳]. اما مطالعه Wang و همکاران دو تفاوت عمده با مطالعه حاضر دارد یکی این‌که در آن، جستجوی هلیکو باکتر پیلوری موجود در دهان به‌جای پلاک دندانی در بزاق انجام شده است و دوم این‌که به درصد بالایی از توافق میان ژنوتیپ نمونه‌های جدا شده از دهان با معده دست یافته است (۹۵ درصد برای حداقل یک تشابه ژنوتیپی) که از این لحاظ مشابه نتایج مطالعه Assumpcao و همکاران می‌باشد[۲۳،۲۰]. اما در همین زمینه ممتاز و همکاران فاکتورهای ویرولانس هلیکو باکتر پیلوری را میان بزاق دهان و معده متفاوت ارزیابی نموده‌اند و اعلام داشته‌اند که در ۳۸/۸ درصد از موارد، سوش هلیکو باکتر پیلوری موجود در بزاق یک بیمار با نمونه حاصل از معده همان بیمار متفاوت است که با نتایج مطالعه Wang و همکاران مغایرت دارد[۲۳، ۲۴]. در حالی‌که بیشترین یافته‌های حضور هلیکو باکتر در دهان مربوط به پلاک دندانی بوده است اما به‌نظر می‌رسد ارزیابی تشابه سوش‌های با ویرولانس بالا بر خلاف مطالعه حاضر، بیشتر با استفاده از بزاق دهان صورت گرفته است.

همان‌گونه که ذکر گردید در مطالعه حاضر، نتیجه PCR نمونه پلاک دندانی برای دو سوش مهاجم مد نظر، تنها برای ۴ بیمار از مجموع ۴۲ بیماری که تشخیص گاستریت ناشی از هلیکو باکتر پیلوری برایشان داده شده بود مثبت گزارش شد که این تعداد کم باعث گردید امکان استفاده از آزمون‌های آماری برای جستجوی رابطه مشخص فراهم نشود. این مسأله از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر محسوب می‌گردد.

هم‌چنین برای مشخص شدن جنبه‌های بیشتر موضوع حاضر پیشنهاد می‌گردد که طراحی مطالعات آینده به گونه‌ای باشد تا گروه شاهد غیر مبتلا به گاستریت و نمونه مخاط معده بیماران، هم‌زمان با نمونه پلاک دندانی ایشان مورد ارزیابی PCR قرار گیرد تا بتوان در دو حیطه ابتلا یا عدم ابتلا به گاستریت و نیز حضور توامان سوش‌های مهاجم در پلاک دندانی و مخاط معده به مقایسه آماری پرداخت.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر به‌عنوان یک ارزیابی مقدماتی، امکان وجود سوش‌های دارای ویرولانس بالای هلیکوباکترپیلوری را در پلاک دندانی بیماران مبتلا به گاستریت تأیید می‌نماید و نیز نشان می‌دهد که در برخی از بیماران، امکان حضور بیش از یک مارکر دارای ویرولانس بالا از هلیکو باکتر پیلوری در پلاک دندانی وجود دارد. به‌نظر می‌رسد تأیید تشابه ژنوتیپی هلیکو باکتر پیلوری موجود در پلاک دندانی با سوش‌های دارای ویرولانس بالا در دستگاه گوارش (Vac A و Cag A) نیاز به انجام تحقیقات بیشتری با تغییر روش PCR، دسته‌بندی بیماران در گروه‌هایی با شرایط مختلف مانند ابتلا یا عدم ابتلا به پریودونتیت دارد. مشخص شدن این سوش‌ها در پلاک دندانی نشان خواهد داد که حذف پلاک دندانی با درمان‌های دندان‌پزشکی مانند جرم‌گیری و رعایت دقیق بهداشت دهان و دندان توسط بیماران به موفقیت درمان آنتی بیوتیکی هلیکو باکتر پیلوری و جلوگیری از عود گاستریت ناشی از آن کمک می‌نماید.

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی شماره ۹۱/۳۴ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی کرمان که بودجه انجام آن به‌عنوان گرنت پژوهشی به مجری آن اعطا شده منتج گردیده است. بدین‌وسیله از آن معاونت محترم به‌واسطه حمایت مالی تحقیق حاضر قدردانی می‌گردد.

References

1. Czesnikiewicz-Guzik M, Karczewska E, Bielanski W, Guzik TJ, Kapera P, Targosz A, et al. Association of the presence of Helicobacter pylori in the oral cavity and in the stomach. J Physiol Pharmacol 2004; 55 (Suppl 2): 105-15.

2. Gebara EC, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MP , Lima LA. Persistence of Helicobacter pylori in the oral cavity after systemic eradication therapy. J Clin Periodontol 2006; 33(5): 329-33.

3. Gebara EC, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer Mp, Lima LA. Prevalence of Helicobacter pylori detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol 2004; 19(4): 277-80.

4. Kignel S, de Almeida Pina F, André EA, Alves Mayer MP, Birman EG. Occurrence of Helicobacter pylori in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. Oral Dis 2005; 11(1): 17-21.

5. Czesnikiewicz-Guzik M, Bielanski W, Guzik TJ, Loster B , Konturek SJ. Helicobacter pylori in the oral cavity and its implications for gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. J Physiol Pharmacol 2005; 56 (Suppl 6): 77-89.

6. Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, Hayashi J, Morotome-Hayashi Y, Yano K, et al. High prevalence of Helicobacter pylori detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients.J Periodontol 2003; 74(1): 129-34.

7. Anand PS, Nandakumar, Shenoy KT. Are dental plaque, poor oral hygiene, and periodontal disease associated with Helicobacter pylori infection?. J Periodontol 2006; 77(4): 692-8.

8. Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza ME, Tombazzi C, Goncalvez R, et al. Detection of Helicobacter pylori DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. J Med Microbiol 2002; 51(9): 764-70.

9. Chitsazi MT, Fattahi E, Farahani RM, Fattahi S. Helicobacter pylori in the dental plaque: is it of diagnostic value for gastric infection?. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006; 11(4): E325-8.

10. Ozdemir A, Mas MR, Sahin s, Sağlamkaya U, Ateskan U. Detection of Helicobacter pylori colonization in dental plaques and tongue scrapings of patients with chronic gastritis. Quintessence Int 2001; 32(2): 131-4.

11. Navabi N, Aramon M, Mirzazadeh A. Does the presence of the Helicobacter pylori in the dental plaque associate with its gastric infection? A meta-analysis and systematic review. Dent Res J (Isfahan) 2011; 8(4): 8-12.

12. Saxena A, Shukla S, Prasad KN, Ghoshal UC. Virulence attributes of Helicobacter pylori isolates & their association with gastroduodenal disease. Indian J Med Res 2011; 133: 514–20.

13. Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR , Atherton JC. Functional association between the Helicobacter pylori virulence factors VacA and CagA. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 2): 145–50.

14. Nagiyev T, Yula E, Abayli B, Koksal F. Prevalence and genotypes of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens from patients with gastroduodenal pathologies in the Cukurova Region of Turkey. J Clin Microbiol 2009; 47(12): 4150–3.

15. Yakoob J, Abid Sh, Zaigham A, Jafri W, Ahmad Z, Ahmed R, et al. Distribution of Helicobacter pylori virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in Pakistan. BMC Gastroenterology 2009; 9: 87.

16. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in Helicobacter pylori isolates in Japan. Gut 1998; 42(3): 338–43.

17. Nguyen TL, Uchida T, Tsukamoto Y, Trinh DT, Ta L, Mai BH, et al. Helicobacter pylori infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study. BMC Gastroenterol 2010; 10: 114.

18. Uchida T , Nguyen LT, Takayama A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, et al. Analysis of virulence factors of Helicobacter pylori isolated from aVietnamese population. BMC Microbiol 2009; 9: 175.

19. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arroniz S, Rodríguez C, Cortés JL, et al. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in Helicobacter pylori strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2009; 8: 14.

www.SID.ir

www.mui.ac.ir

Archive of SID

20. Assumpção MB, Martins LC, Melo Barbosa HP, Barile KA, de Almeida SS, Assumpção PP, et al. Helicobacter pylori in dental plaque and stomach of patients from Northern Brazil. World J Gastroenterol 2010; 16(24): 3033-9.
21. Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree FF, Olckers A, Botha SJ, et al. Evaluation of a Novel Heminested PCR assay Based on the Phosphoglucosamine Mutase Gene for Detection of Helicobacter pylori in Saliva and Dental Plaque. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 205-9.
22. Ishihara K, Miura T, Kimizuka R, Ebihara Y, Mizuno Y, Okuda K. Oral bacteria inhibit Helicobacter pylori growth. FEMS Microbiol lett 1997; 152(2): 355-61.
23. Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA Jr, Litchfield P, et al. Comparison of cytotoxin genotypes of Helicobacter pylori in stomach and saliva. Dig Dis Sci 2002; 47(8): 1850-6.
24. Momtaz H, Souod N, Dabiri H. Comparison of the virulence factors of Helicobacter pylori isolated in stomach and saliva in Iran. Am J Med Sci 2010; 340(5): 345-9.

Archive of SID

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Evaluation of the virulence markers of Helicobacter pylori in dental plaque of patients with gastritis: A preliminary study

Nader Navabi*, Mohammadreza Bazrafshani, Mehrnaz Tahmasebi Arashloo, Fatemehsadat Hoseini

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori (H. pylori) is a gram-negative motile spiral-shaped bacterium that is strongly associated with gastroduodenal diseases. Recently, dental plaque has been implicated as a possible source of H. pylori infection. Two important virulence factors that are expressed by the alleles of vac A (vacuolating toxin) and cag A (cytotoxin-associated gene A) have been identified. The aim of this study was to determine whether or not virulence factor genes vac A and cag A are present in H. pylori retrieved from dental plaque in patients with gastritis.*
Materials and Methods: *In this cross-sectional study, dental plaque specimens from 42 patients with gastritis, referring to the endoscopy section of a hospital, were subjected to polymerase chain reaction (PCR) assay to detect the presence of cag A and vac A genotypes of H. pylori.*
Results: *DNA from H. pylori was detected in 4 dental plaque samples. All these 4 samples were vac A-positive and 2 samples were positive for both vac A and cag A genotypes.*
Conclusion: *The pathogenic strains isolated from the dental plaque in the present study suggest it is possible for more than one virulence factor of H. pylori to exist in some patients. However, further studies are required to confirm this finding.*

Key words: *Dental plaque, Gastritis, Helicobacter pylori.*

Received: 2 Jul, 2013 **Accepted:** 24 Jun, 2014

Address: Assistant professor, Department of Oral and Maxillofacial Medicine, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
Email: n_navabi@kmu.ac.ir

Citation: Navabi N, Bazrafshani M, Tahmasebi Arashloo M, Hoseini F. **Evaluation of the virulence markers of Helicobacter pylori in dental plaque of patients with gastritis: A preliminary study**. J Isfahan Dent Sch 2014; 10(6): 468-476.

Archive of SID

www.SID.ir