تشخیص همزمان ژن *cagA* و آللهای ژن *vacA* باکتری هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مبتلا به التهابات دستگاه گوارشی با روش Multiplex PCR

محمد مبارکی[۱]، رسول روغنیان[۱*]، طالب آزرم[۲]، سید حمید زرکش اصفهانی[۱] و حامد دقاق زاده[۲]

[۱] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲] اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه داخلی

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۲۷

چکیده

هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی میکروآئروفیلیکی‌است که در سراسر جهان جمعیت زیادی از انسانها را آلوده می‌کند. آلودگی با این باکتری گرچه در اکثر موارد بدون علائم بالینی است ولی در برخی از افراد می‌تواند همراه با علائم بالینی و در مواردی منجر به بروز بدخیمیهایی مانند آدنوکارسینوما و لنفومای معده گردد. فاکتورهای ویرولانس متعددی از این باکتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از آن جمله می توان به ژنهای *cagA* و *vacA* اشاره نمود. هدف از این مطالعه، علاوه بر پایه‌ریزی تست Multiplex PCR جهت تشخیص سریع و همزمان این‌دو ژن در یک نمونه، بررسی ارتباط حضور این فاکتورهای ویرولانس با شدت بروز التهابات دستگاه گوارش انسان می‌باشد. این مطالعه برروی ۶۶ بیمار مبتلا به التهابات دستگاه گوارشی که تست سریع اوره‌آز مثبت داشتند، انجام گردید. از این تعداد ۲۱ مورد رشد هلیکوباکتر پیلوری از نمونه بیوپسی معده بر روی محیط کشت مشاهده گردید. شناسایی کلنیهای باکتری با تستهای بیوشیمیایی تأیید شد. با انجام Multiplex PCR برروی DNA باکتری جدا شده در ۱۵ مورد ژن *cagA* ، ۹ مورد ژنوتیپ s_1m_1 ، ۱۲ مورد s_1m_2 و ۵ مورد s_2m_2 برروی ژل شناسایی گردید. ضمن اینکه ژنوتیپ s_2m_1 در این مطالعه مشاهده نشد. بیشترین فراوانی آللی مربوط به آللهای s_1 و m_2 بود. بیشتر بیماران مورد مطالعه التهاب منتشره ناحیه آنتروم معده داشتند و در اکثر موارد حضور ژن *cagA* با ژنوتیپ s_1m_2 بود. این تحقیق نشان دهندهی آن است که احتمالاً بین حضور همزمان این‌دو و شدت بروز التهابات دستگاه گوارشی رابطه‌ای وجود دارد.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، ژن *cagA*، آلل های ژن *vacA*، مولتی پلکس PCR، التهابات دستگاه گوارشی.

*نویسنده مسئول، تلفن: ۷۹۳۲۴۵۸-۰۳۱۱ ، پست الکترونیکی: rasoul_roghanian@yahoo.co.uk

مقدمه

نخستین بار حدود صد سال پیش گونه‌های هلیکوباکتر در معده انسان و سایر حیوانات مشاهده گردید. هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی ، میکروآئروفیلیک و دارای ۶-۴ تاژک غشادار است که به ترتیب حدود ۵۰ و ۸۰ درصد افراد در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه را آلوده می‌کند. این باکتری دارای یکی از قوی ترین اوره‌آزها است. ضمن اینکه فعالیت کاتالازی و اکسیدازی نیز داراست (۲، ۶، ۱۲ و ۱۴).

اگرچه ورود باکتری به بدن سبب تحریک سیستم ایمنی می‌گردد ولی در اغلب موارد فعالیت دستگاه ایمنی منجر به حذف باکتری نمی‌گردد. بدین ترتیب باکتری می‌تواند سالها و حتی مادام العمر در بدن به شکل مزمن باقی بماند (۲). آلودگی با این باکتری در اکثر موارد بدون هیچ گونه علامت بالینی بوده و تنها درصد کمی از افراد علائمی از قبیل سوزش سر دل، التهاب معده، التهاب ناحیه دوازدهه، زخم معده و دوازدهه وکم خونی ناشی از فقر آهن از خود

Archive of SID
www.SID.ir

بروز می‌دهند. حدود ۳-۲ در صد از افراد مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری امکان ابتلا به آدنوکارسینوما و لنفومای معده دارند (۵). بررسیهای متعددی در ارتباط با فاکتورهای مؤثر در بروز این علائم انجام شده که از آن جمله می‌توان به ژنتیک میزبان، عوامل محیطی و فاکتورهای ویرولانس باکتری مانند ژنهای *cagA* و *vacA* اشاره نمود (۵ و ۱۲).

cagA نام ژنی است که پروتئین ۱۴۵ – ۱۲۸ کیلو دالتونی به همین نام را رمز دهی می‌کند. این ژن در ۷۰-۵۰ درصد سویه‌های باکتری مشاهده می‌شود. پروتئین cagA پس از ورود به سیتوزول سلول میزبان و فسفریله شدن، فعال گشته و تغییرات عملکردی و مورفولوژیکی زیادی را درون سلول میزبان باعث می‌شود (۱۷ و ۲۰).

در مقابل، تمام سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن *vacA* بوده که پروتئین vacA را رمز می‌کند. این ژن دارای دو ناحیه‌ی متغیر سیگنالینگ و ناحیه میانی می‌باشد. ناحیه سیگنالینگ رمزکننده بخش پپتید سیگنالی انتهای آمینی توکسین بالغ است و ۲ تیپ اصلی توالی سیگنالی s_1 و s_2 می‌باشند. (۸ و ۲۱). شکل s_1 یک انتهای آمینی آب گریز دارد که برای فعالیت کامل توکسین ضروری می‌باشد. از طرفی *vacA* در ناحیه m خود نیز تنوع دارد. دو شکل آللی در ناحیه m قابل تشخیص‌اند که m_1 و m_2 می‌باشند (۲۱). پروتئین vacA یک ناقل خود به خود بوده که به صورت پیش ساز ۱۴۰ کیلو دالتونی تولید می‌گردد. سپس به فرم بالغ منومریک ۹۵ کیلو دالتونی پردازش گردیده و طی فرآیند دو مرحله‌ای از باکتری ترشح می‌شود. این پلی پپتید دارای یک سیگنال پپتید ۳۳ اسید آمینه‌ای در انتهای آمینی و یک انتهای کربوکسیلی ۴۵ کیلو دالتونی می‌باشد که باعث تشکیل واکوئل در سلول اپی‌تلیومی می‌شود (۷).

مطالعات متعددی در نواحی مختلف جهان و مناطقی از ایران در مورد بررسی ارتباط میان آلودگی با سویه‌های دارای ژن *cagA* و همچنین اشکال آللی متفاوت ژن *vacA* با بروز انواع التهابات و بیماریهای دستگاه گوارشی صورت گرفته است. نتایج ضد و نقیضی در این مطالعات مشاهده می شود، به طوری‌که برخی محققین بر این باورند که آلودگی با سویه های *cagA* مثبت و با ژنوتیپ s_1m_2 همراه با افزایش شدت التهابات و زخمها و همچنین افزایش شانس ابتلا به سرطانهای معده می‌باشد. در حالی‌که نتایج گروههای دیگری از پژوهشگران وجود چنین ارتباطی را تأیید نمی‌کند (۱، ۱۰، ۱۶ و ۱۸ و ۱۹). در این تحقیق ابتدا کشت نمونه بیوپسی تهیه شده از ناحیه آنتروم معده ۶۶ بیمار با التهابات بخش فوقانی دستگاه گوارش انجام شد. به دنبال استخراج DNA باکتری و انجام Multiplex PCR ، ارتباط میان حضور ژنهای ویرولانس *cagA* و *vacA* با انواع و شدت التهابات دستگاه گوارش بررسی گردید. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌نماید که بین ژنوتیپ هلیکوباکتر پیلوری و شدت التهابات ایجاد شده در دستگاه گوارش ارتباط وجود دارد.

اهداف این تحقیق عبارتند از:

۱- پایه‌گذاری یک تست Multiplex PCR جهت تعیین سریع و دقیق ژنهای *cagA* و آللهای مختلف *vacA*

۲- بررسی فراوانی ژنهای *cagA* و *vacA* و ارتباط آنها با انواع التهابات مورد بررسی در دستگاه گوارش.

مواد و روشها

تهیه نمونه : دو نمونه بیوپسی ، از ناحیه آنتروم معده ۶۶ بیمار مشکوک به عفونت *Helicobacter pylori* مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان نور اصفهان گرفته شد. یک نمونه جهت بررسی وضعیت اوره‌آزی و نمونه دیگر جهت کشت بر روی محیط کشت استفاده گردید. نمونه دوم افرادی که تست اوره‌آز سریع آنها مثبت بود (کیت تست اوره‌آز محصول شرکت شیم آنزیم)، در لوله‌های در پیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژیک استریل به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شد و بلافاصله روی محیط کشت اختصاصی *Helicobacter pylori* با رعایت

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط آسپتیک کشت داده شد (۱۳). بیماران مورد بررسی حداقل به مدت ۲ هفته هیچ گونه درمان آنتی بیوتیکی علیه هلیکوباکتر پیلوری یا داروی مهارکننده پمپ پروتونی مصرف نکرده بودند (۱۰). برای ایجاد شرایط میکروآئروفیلیک مناسب جهت رشد باکتری، از جار بی‌هوازی و گازپک نوع C (Merk Germany) استفاده شد. جار به مدت ۳ الی ۵ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محیط کشت اختصاصی مورد استفاده، محیط با پایه بروسلا آگار بود. برای تهیه یک لیتر از این محیط کشت مقدار ۴۱ گرم بروسلا آگار، ۳ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم عصاره گوشت، ۰/۵ گرم فرو سولفات، ۰/۵ گرم اسید پیرورویک به همراه ۱۰ درصد خون تازه دفیبرینه گوسفند و سه آنتی بیوتیک ونکومایسین ۶ میلی گرم، تری متوپریم ۵ میلی گرم و آمفوتریسینB ۲ میلی گرم استفاده گردید (۱۵).

طریقه تلقیح: نمونه‌های بیوپسی پس از انتقال به آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان بر روی پلیتهایی که قبلاً استریل شده بود قرارگرفت و توسط سرسمپلر و لامهای استریل شده به خوبی له گردید. این‌کار بدین منظور انجام شد تا باکتریهایی که در لابلای نمونه بافتی به‌دام افتاده‌اند آزادگشته و در نتیجه راحت‌تر با محیط کشت در تماس باشند و بدین ترتیب شانس بالاتری جهت رشد داشته باشند.

شناسایی باکتری *H. pylori* : ۴ تا ۵ روز پس از کشت نمونه‌های آندوسکوپی روی محیط کشت اختصاصی *H. pylori*، کلنیهای بسیار ریز خاکستری ، شفاف و محدب رشد کرد. که توسط رنگ آمیزی گرم از نظر مورفولوژی و تستهای اوره‌آز ، کاتالاز و اکسیداز شناسایی آن مورد تأیید قرار گرفت.

استخراج DNA از کلنی باکتری

روش جوشاندن: در روش جوشاندن مقداری از کلنیها به آرامی از سطح محیط کشت به درون لوله‌های اپندورف منتقل گردید. با توجه به اینکه محیط کشت حاوی خون و هسته پورفیرین می‌باشد و این مواد در مراحل استخراج DNA و انجام PCR می‌توانند به عنوان بازدارنده عمل کنند، از این‌رو قبل از استخراج DNA ابتدا شستشوی کلنیها با فسفات بافر سالین انجام شد. سپس آب دوبار تقطیر به آنها اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. آنگاه تمام نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به لوله‌های اپندورف استریل منتقل شد. این محلول که حاوی قطعات DNA می‌باشد تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جدول ۱ - مشخصات پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق

DNA regions Amplified	Primer Name	Primer Sequence	Amplicon Size(bp)
vacA s_1/s_2	VAI-F VAI-R	5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3' 5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	259-286
vacA m_1/m_2	VAG-F VAG-R	5' CAATCTGTCCAATCAAGCGAG 3' 5' GCGTCAAAATAATTGAAGG 3'	567-642
cagA	cag5c-F cag3c-R	5' GTTGATAACGCTGTCGCTTC 3' 5' GGGTTGTATGATATTTTCCATAA 3'	350

Archive of SID
www.SID.ir

انجام Multiplex PCR : توالی دو جفت پرایمر اختصاصی برای *vacA* و یک جفت پرایمر اختصاصی برای *cagA* که بر اساس مقالات قبلی در جدول ۱ ارائه شده است. در صورت حضور ژن *cagA* در نمونه مورد بررسی و پس از تکثیر، قطعه‌ای با اندازه ۳۵۰ جفت باز به دست می‌آید. همین طور در صورت وجود اشکال آللی s_1/s_2 و m_1/m_2 ژن *vacA* به ترتیب قطعاتی با اندازه‌های ۲۸۶- ۲۵۹ و ۶۴۲- ۵۶۷ به دست می‌آیند (۴).

برنامه دهی ترموسایکر PCR برای تعداد ۳۴ سیکل به صورت دناتوره اولیه ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دناتوره ثانویه ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه، اتصال یک دقیقه در دمای ۵۵ درجه، بسط و گسترش ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه و بسط و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام شد.

حجم مواد مورد نیاز جهت انجام Multiplex PCR از آللهای m_1/m_2 وs_1/s_2 مربوط به ژن *vacA* و ژن *cagA* در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲ - حجم مواد مورد نیاز برای انجام Multiplex PCR

مواد مورد نیاز	حجم به میکرولیتر
آب دو بار تقطیر	۱۶/۶
بافر PCR	۲/۵
dNTP	۰/۷
$MgCl_2$	۰/۸
P_1: Forward m_1/m_2	۰/۲
P_2: Reverse m_1/m_2	۰/۲
P_3: Forward s_1/s_2	۰/۲
P_4: Reverse s_1/s_2	۰/۲
P_5: Forward *cagA*	۰/۲
P_6: Reverse cagA	۰/۲
آنزیم Tag پلیمراز	۰/۲
الگو DNA	۳
حجم نهایی	۲۵

بعد از افزودن همزمان سه جفت پرایمر به مخلوط با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و انجام PCR ، الکتروفورز محلول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ در صد به مدت تقریبی ۹۰ دقیقه انجام شد.

نتایج

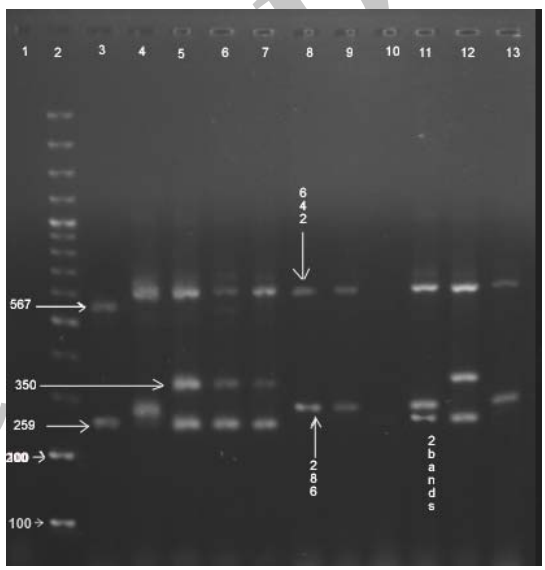
نتیجه کشت نمونه‌هایی‌که دارای تست سریع اوره آز مثبت بودند: از ۶۶ بیمار با تست سریع اوره آز مثبت ۲۱ مورد رشد هلیکوباکتر پیلوری بر روی محیط کشت اختصاصی مشاهده گردید. به عبارتی میزان بازیابی باکتری (Recovery Rate) از نمونه بیوپسی ۳۱/۸ در صد بود.

انواع التهابات گوارشی مشخص شده در نمای آندوسکوپی: در بررسی آندوسکوپی انجام شده از بیماران التهابات تشخیص داده شده توسط متخصص آندوسکوپی شامل موارد التهاب منتشره ناحیه آنتروم معده (Diffuse Antral Gastritis, DAG) ، التهاب منتشره و خفیف آنتروم (Mild Diffuse Antral Gastritis, Mild DAG) ، التهاب معده-دوازدهه (Gastroduodenitis) ، التهاب فرسایسی معده- دوازدهه (Erosive Gastroduodenitis) و التهاب فرسایشی ناحیه فوندوس معده (Erosive EFG Fundal Gastritis,) بودند (جدول ۳). بیشترین فراوانی مربوط به التهاب منتشره ناحیه آنتروم معده بود. اعتقاد براین است که باکتری تمایل بیشتری به استقرار در این ناحیه معده دارد.

نتایج Multiplex PCR : شکل ۱ تصویر یک ژل تیپیک حاصل از انجام Multiplex PCR بر روی چند نمونه را نشان می‌دهد. چاهک دوم مربوط به مارکر 100bp می باشد. چاهک شماره ۱۰ به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده که فاقد DNA بوده، و در چاهک ۱۱، دو باند s_1 و s_2 مشاهده می‌شود. حداقل باند در مواردی مشاهده می‌شود که *cagA* حضور نداشته باشد و فقط دو باند مربوط به ناحیه سیگنال و میانی وجود داشته باشد. در این بررسیها تمام سویه‌ها دارای ژن *vacA* بودند. فراوانی آللهای s_1، s_2، m_1 و m_2 به ترتیب ۶۲، ۳۸، ۲۳ و ۷۷ درصد بود (جداول

Archive of SID
www.SID.ir

۴ و ۵). همچنین نتایج به دست آمده در این مطالعه فراوانی ژنوتیپهای s_1m_1، s_1m_2 و s_2m_2 را به ترتیب ۴۳، ۵۷ و ۲۳ درصد نشان می‌دهد. لازم به تذکر است که ژنوتیپ s_2m_1 در این بررسی دیده نشد. از ۲۱ مورد باکتری رشد یافته بر روی محیط کشت اختصاصی *H. pylori* ۱۵ مورد ژن *cagA* مشاهده گردید. در دو مورد آلودگی همزمان با دو سویه یا اصطلاحاً آلودگی مخلوط(Mixed infection) مشاهده گردید. بیشترین حضور ژن *cagA* همراه با شکل آللی s_1m_2 بود.



شکل ۱- **تصویر ژل آگارز حاصل از**Multiplex PCR .

شکل ۱ Multiplex PCR تعدادی از نمونه‌های مورد بررسی : چاهک ۲ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱۰ کنترل منفی، است. آمپلیکون ۳۵۰ جفت بازی مربوط به ژن *cagA* ، آمپلیکون‌های ۲۵۹ و ۲۸۶ به ترتیب مربوط به آللهای s_1 و s_2 ،ناحیه سیگنالینگ است. آمپلیکون‌های ۵۶۷ و ۶۴۲ به ترتیب مربوط به m_1 و m_2 ناحیه میانی می‌باشند.

بحث

تکثیر سریع و همزمان چند ژن در یک مخلوط واکنش یکی از اهدافی است که در تست Multiplex PCR دنبال می‌شود. محاسن استفاده از این روش علاوه بر سریع و مقرون به صرفه بودن، به حداقل رساندن احتمال آلودگی نمونه مورد بررسی می‌باشد. در این تحقیق بیشترین فراوانی ژن *cagA* در افراد با التهابات منتشره ناحیه آنتروم مشاهده شد. در مجموع فراوانی ژن *cagA* بدون در نظر گرفتن شدت التهابات ۷۱/۴ درصد بود که با مطالعاتی که توسط کمالی سروستانی و همکاران در سال ۲۰۰۶ میلادی انجام شده و ۷۶ درصد گزارش شده نزدیک می‌باشد. این محققین در بررسیهای خود که بر روی ۲۸۹ بیمار با انواع اختلالات گوارشی (از التهابات معده و دوازدهه ، زخم معده و دوازدهه و آدنوکارسینومای معده) در مدت ۴ سال در بیمارستان نمازی شیراز انجام شده بود نشان دادند که اولاً در میان گروههای مختلف بیماری حضور ژن *cagA* معنادار نمی‌باشد وثانیاً فراوانی ژنوتیپهای s_1m_1، s_1m_2 و s_2m_2 به ترتیب ۳۰/۷، ۴۱/۷ و ۲۷/۷ در صد بود که از نظر فراوانی ژنوتیپهای s_1m_1، s_1m_2 و s_2m_2 به دست آمده توسط این محققین با یافته‌های حاصل از این تحقیق تفاوتهایی وجود دارد. با این وجود در بررسی این محققین نیز بیشترین فراوانی مربوط به s_1m_2 بود و شکل s_2m_1 مشاهده نشد (۱۰). دلیل تفاوت در این نتایج می‌تواند ناشی از نوع اختلالات گوارشی مورد بررسی و نیز تعداد کم نمونه مورد بررسی باشد. در مطالعه دیگری که توسط شکوهی زاده و همکاران در بیمارستان بقیه‌ا... تهران بر روی ۵۴ نمونه‌ای که تست سریع اوره‌آزی مثبت بودند انجام شد فراوانی ژن *cagA* ۳۵/۸۱ درصد شد که با فراوانی حاصله از تحقیق حاضر تفاوت زیادی دارد (۱). این تفاوت می‌تواند به دلیل نوع عوارض ایجاد شده توسط باکتری و شدت التهاب ایجاد شده باشد. همچنین بررسی دیگری که توسط جعفری و همکاران بر روی ۲۸۰ نمونه بیوپسی معده در تهران انجام شده فراوانی ژن *cagA* ۷۴/۳ درصد بوده که با مطالعه حاضر تطابق دارد، و فراوانی آلل s_1 و m_2 به ترتیب ۶۳/۵ و ۶۱/۲ شد. از طرف دیگر جعفری و همکاران میزان بازیابی باکتری از نمونه بیوپسی (Recovery Rate) تهیه شده از افراد مبتلا به سرطان معده

Archive of SID
www.SID.ir

و زخم دوازدهه به ترتیب ۴/۵ و ۱۵/۱ در صد گزارش کردند که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تفاوت قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد (۹).

جدول ۳ – انواع اختلالات گوارشی مشخص شده در نمای آندوسکوپی

یافته آندوسکوپی / تعداد	التهاب منتشره در ناحیه آنتروم	التهاب منتشره و خفیف آنتروم	التهاب معده- دوازدهه	التهاب فرسایسی معده- دوازدهه	التهاب فرسایشی ناحیه فوندوس معده
۲۱	۱۰	۴	۳	۱	۳

جدول ۴ – فراوانی ژن *cagA* در انواع التهابات مورد بررسی

نتایج / نوع اختلال	مواردcagA مثبت		مواردcagA منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
التهاب منتشره آنتروم معده(DAG)	۸	۸۰	۲	۲۰	۱۰	۱۰۰
التهاب منتشره و خفیف آنتروم(Mild DAG)	۲	۵۰	۲	۵۰	۴	۱۰۰
التهاب معده- دوازدهه(Gastroduodenitis)	۲	۶۶	۱	۳۳	۳	۱۰۰
التهاب فرسایشی معده-دوازدهه (Erosive Gastroduodenitis)	–	–	–	–	۱	۱۰۰
التهاب فرسایشی فوندوس معده(EFG)	۳	۱۰۰	–	–	۳	۱۰۰

DAG (Diffuse Antral Gastritis)
EFG (Erosive Fundal Gastritis)
GD (Gastroduodenitis)
EGD (Erosive Gastroduodenitis)

جدول ۵ – فراوانی آللی ژن *vacA* در انواع التهابات مورد بررسی

نتایج / انواع التهابات	فراوانی s		فراوانی m	
	S_1	s_2	m_1	m_2
التهاب منتشره آنتروم معده (DAG)	۶	۴	۲	۸
التهاب منتشره و خفیف آنتروم معده (Mild DAG)	۲	۲	۱	۳
التهاب معده- دوازدهه (Gastroduodenitis)	۲	۱	۱	۲
التهاب‌فرسایشی‌معده-دوازدهه(Erosive Gastroduodenitis)	۱	۰	۰	۱
التهاب فرسایشی فوندوس معده(EFG)	۲	۱	۱	۲

Archive of SID
www.SID.ir

لازم به ذکر است که میزان بازیابی در این مطالعه ۳۱/۸ به دست آمد. علت این تفاوت می‌تواند ناشی از نوع محیط کشت مورد استفاده و همچنین نوع اختلالات گوارشی مورد بررسی باشد. بعلاوه فاصله زمانی انتقال نمونه‌ها تا تلقیح برروی محیط کشت نیز بر میزان بازیابی مؤثر می‌باشد. سیاوشی و همکاران نیز در بررسیهای خود که بر روی ۱۳۷ بیمار با زخم دوازدهه، سوء هاضمه غیر زخمی و آدنوکارسینومای معده انجام دادند فراوانی ۴۴ درصدی و ۷۸ درصدی را به ترتیب برای *cagA* و s_1 گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر تفاوت زیادی دارد و می‌تواند به دلیل نوع اختلال مورد بررسی باشد. از طرفی این محققین در ۱۳ مورد آلودگی مخلوط m_1m_2 (۰/۰۹ درصد) مشاهده کردند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۱۸). Ashour و همکاران سال ۲۰۰۲ در برزیل فراوانی ۸۱/۷ در صدی را برای *cagA* گزارش کردند. ۸۶/۶ در صد بیماران در این مطالعه فقط با یک سویه آلوده شده بودند که تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نتایج حاصل از این مطالعه دارد. از طرفی بیشترین فراوانی آللی در گزارش آنها مربوط به s_1 (۸۳/۱) و m_1 (۸۰/۳) بوده است (۳). در حالی‌که در تحقیق حاصل m_2 از فراوانی بالاتری برخوردار است. از طرف دیگر در مطالعه دیگری که توسط Kieran A. و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر روی ۴۳ بیمار با انواع اختلالات گوارشی در اتریش انجام شده است مشخص گردیده که در ۹۳ درصد بیماران ژن *cagA* وجود دارد و ناحیه سیگنالینگ به صورت s_1 در تمام موارد و ناحیه میانی به صورت ۲۸ درصد m_1 و ۸۲ درصد m_2 بود. به عبارت دیگر در این تحقیق شکل آللی s_2 گزارش نشده است (۱۱). اختلاف چشمگیر در فراوانی ژن *cagA* و *vacA* می‌تواند ناشی از توانایی بالای این باکتری جهت تغییر و تنوع ژنتیکی به تناسب نواحی مختلف جغرافیایی برخوردار باشد. با توجه به تعداد نسبتاً کم نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه پیشنهاد می‌شود که با همکاری چند مرکز آندوسکوپی تعیین فراوانی و وضعیت آللی ژنهای *cagA* و *vacA* در ایران انجام شود تا الگوی ژنتیکی و آللیک بیماری در این منطقه از جهان تعیین گردد.

منابع

۱- شکوهی زاده، ل.، مجتبی مبارز، الف.، صادقی زاده، م. و امینی ،م . ۱۳۸۵. بررسی ارتباط ژن cagA در هلیکوباکتر پیلوری و یافته های آندوسکوپی. مجله پزشکی کوثر. ۱۱: ۳، ص. ۲۶۱-۲۶۶

2. Algood, H. and Cover, T .(2006). *Helicobacter pylori* persistence. An overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *American Society for Microbiology*. 19 (4), 597-613.

3. Ashour, A.,Magalhaes, P., Mendes, E., Collares, G., DeGusmao, V., Dulciene, M., Queiroz, A., Nogueira, M., Rocha, G. and DeOliveira, C. (2002). Distribution of vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis,duodenal ulcer or gastriccarcinoma. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 33; 173-178.

4. Chattopadhyay, S., Patra, R., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Santra, A., Dhali, G.K., Bhattachary, S.K., Berg, D., Nair, G.B. and Mukhopadhyay, A.K. (2004). Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *Journal of clinical microbiology*. 42(6); 2821-2824.

5. Dubois, A. and Boren, T. (2007). *Helicobacter pylori* is invasive and it may be a facultative intracellular organism. *Cellular Microbiology*. 9 (5); 1108-1116.

6. Dunn, B. E., Cohen, H. and Blaser, M. J. (1997). *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*. 10 (4); 720-741.

7. Fischer, W., Buhrdorf, R., Gerland, E. and Haas, R. (2001). Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 69; 6769–75.

8. Forsyth, M.H., Atherton, J.C., Blaser, M.J. and Cover, T.L. (1998). Heterogenecity in levels of

Archive of SID
www.SID.ir

vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infection and Immunity*. 66; 3088–94

9. Jafari, F., Aslani, M., Shokrzadeh, L., Baghai, K., Dabiri, H., Zojaji, H., Razavilar, V., Kharaziha, P., Haghazali, M., Molaei, M. and Zali, M.R. (2007). Distribution of UreC, cagA and vacA genes in *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastroduodenal disease in Tehran, Iran. European Society of *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Abstract number. 1733_1339

10. Kamali-Sarvestani, E., Bazargani, A., Masoudian, M., Lankarani, K., Taghavi, A. and Saberifiroozi, M. (2006). Association of *H. pylori* CagA and VacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World journal of gastroenterology*. 12(32); 5205-5210

11. Kieran, A., Ryan, A., Moran, S., Hynes, T., Denisehyde, C. and O'Morain, M. (2000.) Genotyping of cagA and vacA, Lewis antigen status, and analysis of the poly-(C) tract in the K (1,3)-fucosyltransferase gene of Irish *Helicobacter pylori* isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 28: 113-119.

12. Kusters, J. G., VanVlient, A. H. M. and Kuipers, E. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical Microbiology reviews. 19 (3); 449-490.

13. Ndip, R., Mackay, W., Farthing, M. and Weaver, L. (2003). Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 36; 616-622

14. O'Toole, P., Lane, W., and Porwollik, S. (2000) *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*. 2;1207–1214.

15. Piccolomini, R., Bonaventura, G., Festi, D., Catamo, G., Laterza, F. and Neri, M. (1997). Optimal combination of media for primary isolation 0f *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *Journal of clinical microbiology*. 6;1541-1544.

16. Qiao, W., Hu, J., Xiao, B., Wu, K., Peng, D., Atherton, J. and Xue, H. (2003). CagA and VacA genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xian area. *World journal of gastroenterology*. 9(8);1762-1766.

17. Selbach, M., Moese, S., Hurwitz, R., Hauck, C.R., Meyer, T.F. and Backert, S. (2003). The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. Embo J. 22; 515–28.

18. Siavoshi, F., Malekzadeh., R, Daneshmand, M. and Ashktorab, H. (2005). *Helicobacter pylori* endemic and gastric disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 50:11, 2075–2080

19. Smith, S., Kirsch, C., Oyedeji, K., Arigbabu, A., Coker, A., Bayerdoffer, E. and Miehlke, S. (2002). Prevalence of *Helicobacter pylori* VacA, CagA and iceA genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *Medical microbiology*. 35; 851-854.

20. Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W.J. and Covacci, A. (2002). c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular Microbiology*. 43; 971–80.

21. Van Doorn, L., Figueiredo, C., Sanna, R., Pena, S. and Midolo, P. (1998). Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *Journal of Clinical Microbiology*. 36; 2597–603.

Archive of SID

www.SID.ir

Simultaneous detection of *caga* gene and *vaca* alleles in *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastrointestinal inflammations using multiplex PCR.

Mobaraki M.[1], Roghanian R.[1], Azarm T.[2], Zarkesh-Esfahani S.H.[1] and Daghaghzadeh H.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of IRAN

[2] Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, I.R. of IRAN

Abstract

Helicobacter pylori is a gram negative and microaerophilic bacterium which infects a lot of people all over the world. Although in most cases the infected individuals usually show no symptoms of infection, but seldom its infection leads to gastrointestinal inflammation, peptic ulcer and even malignancies such as gastric adenocarcinoma and lymphoma. Several virulence factors of this bacterium including *cagA* and *vacA* adequately have been investigated by numerous researchers in this field. The aim of this study was to establish the multiplex PCR test for a simultaneous and rapid detection of the above mentioned genes as well as determining any relationship between the virulence factors and the severity of the gastrointestinal inflammations. In this study, gastric biopsies of 66 patients with positive rapid urease test were collected for further studies. From these samples, only 21 could grow on standard culture media. All the bacterial isolates were confirmed by biochemical tests. Chromosomal DNA was extracted from bacterial isolates and further examined by multiplex PCR. In 15 cases *cagA*, 9 cases s_1m_1, 12 cases s_1m_2 and 5 cases s_2m_2 were seen. No s_2m_1 genotype was found. The most frequent allelic forms were related to s_1 and m_2 alleles. Most of the patients in this study had diffuse antral gastritis. In most cases *cagA* and s_1m_2 were accompanied together. These data indicate that probably there is a relationship between simultaneous presence of these factors and the severity of the gastrointestinal inflammations.

Keywords:*Helicobacter pylori*, Multiplex PCR, *cagA* gene and *vacA* alleles, Gastrointestinal inflammation.

Archive of SID

www.SID.ir