Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۹۸/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۲

# بررسی منابع مختلف آب شهر اصفهان از نظر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری با استفاده از روش مولکولی Fluorescent nested PCR

دکتر فرح تاج نواب اکبر[۱]، دکتر رسول صالحی[۲]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** هلیکوباکترپیلوری یکی از عوامل عفونت در دستگاه گوارش است که انتشار جهانی دارد. عقیده بر این است که عفونت از دوران کودکی کسب می‌شود. راه انتقال باکتری به درستی روشن نشده است و یکی از راه‌هایی که برای آن فرض می‌شود، انتقال از طریق آب است. هدف از این مطالعه، بررسی وجود هلیکوباکترپیلوری در منابع آب شهر اصفهان از جمله آب شهری، آب چاه‌های اطراف اصفهان وآب زاینده‌رود بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه در مجموع ۱۰۰ l آب از منابع پیش‌گفته جمع‌آوری و جهت شناسایی باکتری با روش Fluorescent nested PCR (Fluorescent nested polymerase chain reaction) و با استفاده از سه پرایمر برای ژن‌های UerC، ۱۶srRNA و Adhesion-۱ مورد بررسی قرارگرفت.

**یافته‌ها:** با بررسی آب‌های مورد مطالعه، آب زاینده‌رود آلوده به این باکتری شناخته شد. در مورد نمونه‌های آب چاه‌ها، منطقه‌ی شمالی ۳ نمونه، منطقه‌ی غربی دو نمونه، منطقه‌ی شرقی صفر و منطقه‌ی جنوبی ۳ نمونه آلودگی به هلیکوباکترپیلوری را نشان دادند. در خصوص آب شرب شهری، فقط دو نمونه از شرق اصفهان آلودگی به هلیکوباکترپیلوری را نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** با استفاده از پرایمر ژن۱۶srRNA، UreC و روش Fluorescent nested PCR و فلوروکروم CY۵ تعداد بسیارکمی باکتری مورد شناسایی قرار گرفتند.

**واژگان کلیدی:** هلیکوباکترپیلوری، ۱۶srRNA، Fluorescent nested PCR، UreC، Adhesion-۱، آب

**ارجاع:** نواب اکبر فرح تاج، صالحی رسول. **بررسی منابع مختلف آب شهر اصفهان از نظر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری با استفاده از روش مولکولی Fluorescent nested PCR.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۸): ؟؟

## مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری عامل التهاب دستگاه گوارش و زخم دوازدهه می‌باشد و وجود آن در مخاط معده با بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان دستگاه گوارش، لنفوما (MALT, Mucosa associtated tissue) و بیماری عروق کرونر مرتبط می‌باشد (۱). هلیکوباکترپیلوری از طرف سازمان بهداشت جهانی (WHO یا World health organization) به عنوان کارسینوژن درجه‌ی یک قلمداد شده است. شناسایی منابع و راه انتقال عفونت هلیکوباکترپیلوری به منظور پیشگیری حایز اهمیت است (۲).

راه انتقال میکروارگانیسم مشخص نمی‌باشد، اما

۱- استادیار، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir



www.SID.ir

Archive of SID



یکی از راه‌های انتقال از شخص به شخص و از طریق مدفوعی- دهانی و دهانی- دهانی می‌باشد (۳). گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی نیمی از جمعیت جهان به این باکتری در دست می‌باشد (۴). عفونت به طور معمول از دوران کودکی کسب می‌شود (۵).

سویه‌هایی از هلیکوباکترپیلوری در معده و یا روده‌ی کوچک جانوران دیگر از جمله پریمات‌ها، سگ‌ها، گربه‌ها، جوندگان و پرندگان مانند نمونه‌های کلینیکی انسان یافت شده است (۶). بنا بر بعضی گزارش‌ها، ممکن است آب به عنوان عاملی در انتقال این باکتری نقش داشته باشد (۷). در یک مطالعه در کشور پرو، منابع آب شهری به عنوان عامل احتمالی در افزایش خطر عفونت به هلیکوباکترپیلوری فرض شده است (۸).

آلودگی منابع آب به هلیکوباکترپیلوری ازکشورهای پرو، سوئد، مکزیک، ژاپن و آمریکا گزارش شده است (۱۱-۱۰، ۹، ۷، ۲). هلیکوباکترپیلوری درآب به فرم کوکوئید تغییر شکل می‌دهد که قابل کشت نیست، اما زنده می‌ماند. از این رو بررسی وجود DNA هلیکوباکترپیلوری در آب، با انواع روش‌های PCR (Polymerase chain reaction) امکان پذیر می‌باشد (۲).

در این تحقیق، با توجه به احتمال وجود تعداد بسیار کم باکتری در آب که جداسازی آن با روش‌هایی مانند کشت مشکل می‌باشد، از روشی استفاده شد که از حساسیت کافی برخوردار باشد و امکان شناسایی باکتری را میسر سازد. بنابراین از روش Fluorescent nested PCR و سه پرایمر Adhesion-۱، ۱۶srRNA و UreC جهت شناسایی باکتری در آب‌های منطقه‌ی اصفهان (لوله‌کشی، چاه‌های اطراف و رودخانه‌ی زاینده‌رود) استفاده شد.

## روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع توصیفی به روش نمونه‌گیری آسان بود و مقدار هر نمونه‌ی آب ۳۳ l بود. آب از رودخانه‌ی زاینده‌رود به طور تصادفی از مناطق مختلف برداشت شد.آب چاه‌ها و نیز آب لوله‌کشی شهر از مناطق شمال، جنوب، غرب و شرق برداشت شد. آب‌های تغییر رنگ داده از مطالعه حذف شدند. احتمال جداسازی هلیکوباکترپیلوری از نمونه‌های آب P = ۰/۴۰۰ و با دقت d = ۰/۱۰۰ بود (۱۰).

بر اساس فرمول محاسبه‌ی حجم نمونه ($n = z^2.p\ (1-p)/d^2$ و $z_\alpha$ = ۱/۹۶) حجم کل نمونه‌ها ۱۰۰ l محاسبه گردید و با توجه به این که سه نوع نمونه‌ی آب بایستی در این مطالعه بررسی می‌شد، از هر یک از منابع، ۳۳ l آب جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری هر دو هفته ۸ l از مناطق پیش‌گفته انجام شد. نمونه‌ها در بهار ۱۳۹۲ طی ۲ ماه با وقفه‌ی زمانی ۲ هفته بین نمونه‌گیری‌ها جمع‌آوری شدند. با برداشت هر یک از ۸ l آب طی چهار مرحله از هر یک از منابع، عملیات فیلتر کردن و استخراج DNA بر روی آن‌ها انجام پذیرفت. پس از جمع‌آوری، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شدند تا ناخالصی‌های مشهود آن حذف گردد. سپس نمونه‌های آب فیلتر شده از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۵ µ عبور داده شد تا باکتری‌های موجود در آب بر روی فیلتر باقی بماند. سپس فیلتر به آرامی با ۱ ml بافر فسفا ت شستشو داده شد و پس از انتقال محتویات به یک اپندرف ۱/۵ ml به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.



www.SID.ir

Archive of SID



سوپرناتانت به دست آمده تخلیه و به تـه نشسـت موجود در تیـوپ µl ۱۰۰ بـافر فسـفات اضـافه و بـه خـــوبی ورتکـــس گردیـــد. ســـپس از کیـــت (Qiagen ,Germany) QiAamp DNA Mini Kit و طبق دستورالعمل آن استخراج DNA انجام پـذیرفت. جهت بررسی این که حداقل توان پروتکل PCR برای تشخیص ژنوم باکتری در نمونـه‌ی موردآزمـایش چـه میزان است، رقت سریالی از DNA بـاکتری برابـر بـا ۱۰۰۰-۱۰نسخه معادل ژنـوم بـاکتری تهیـه گردیـد و پـس از انجـام فلورسـنت PCR مـورد ارزیـابی قـرار گرفت. پروتکل طراحی شده قادر بود کمتـرین میـزان هلیکوباکترپیلوری را به سهولت تشخیص دهد.

پـــس از اســـتخراج DNA، بـــا اســـتفاده از روش Fluorescent nested PCR و ســـه جفـــت پرایمـــر ۱-Adhesion، UreC و ۱۶srRNA نمونـــه‌هـــا مـــورد ارزیابی قرار گرفتند.

از پرایمر ۱۶srRNA برای بررسـی مناسـب بـودن DNA اسـتخراج شـده بـرای واکـنش PCR اسـتفاده گردید. از این طریق، تمامی نمونه‌های استخراج شـده به لحـاظ قابلیـت تکثیـر بـا PCR غربـالگری شـدند. تشـخیص هلیکوبـاکترپیلوری بـا اسـتفاده از پرایمـر UreC انجام پذیرفت (جداول ۱ و ۲).

**جدول ۱. مقادیر مواد مصرفی استفاده شده بر حسب µl در PCRهای انجام شده**

| پرایمر | DNA | $H_2O$ | پرایمرها (µl) | Taq پلیمراز | $MgCl_2$ | dNTP | بافر X ۱۰ | کل |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| srRNA۱۶ | ۵ | ۱۴/۰۰ | F = ۱<br>R = ۱ | ۰/۲۵ | ۰/۷۵ | ۰/۵ | ۲/۵ | ۲۵ |
| Helicobacter pylori (PCR دور اول) | ۵ | ۱۰/۸۵ | F = ۱/۵<br>R = ۱/۵ | ۰/۴۰ | ۰/۷۵ | ۰/۵ | ۵/۰ | ۲۵ |
| Helicobacter pylori (PCR دور دوم) | ۳ از دور اول | ۱۴/۶۰ | F = ۱/۵<br>R= ۱/۵ | ۰/۴۰ | ۱/۵۰ | ۰/۵ | ۲/۵ | ۲۵ |

PCR: Polymerase chain reaction; dNTP: Deoxynucleotide

**جدول ۲. توالی پرایمرهای به کار رفته و برنامه‌های PCR (Polymerase chain reaction)**

| پرایمر | توالی | شرایط انجام PCR |
|---|---|---|
| srRNA۱۶ | ۳´ CCTACGGGAGGCAGCAGTAG ۵´<br>۳´CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA-۵´ | مرحله‌ی ۱: $94\ ^oC$، ۵ دقیقه (۱ سیکل)<br>مرحله‌ی ۲: $94\ ^oC$، ۳۰ ثانیه- $60\ ^oC$، ۳۰ ثانیه- $72\ ^oC$، ۳۰ ثانیه (۳۵ سیکل)<br>مرحله‌ی ۳: $72\ ^oC$، ۱ دقیقه (۱ سیکل) |
| Helicobacterpylori (Nested PCR) | دور اول:<br>UreC-F<br>۳´ AAGCCTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-۵´<br>۳´ AAGCCTACTTTCTAACACTAACGC-۵´UreC-R<br>دور دوم:<br>UreC-F<br>۳´ CTTTCTTCTCAAGCAATTGTC-۵´<br>UreC-R<br>۳´ CAAGCCATCGCCGGTTTTAGC -۵´ | دور اول: $94\ C^o$، ۵ دقیقه (۱ سیکل)- $94\ C^o$، ۴۵ ثانیه- $56\ C^o$، ۴۵ ثانیه- $72\ C^o$، ۴۵ ثانیه (۱۵ سیکل)- $72\ ^oC$، ۵ دقیقه (۱ سیکل)<br>دور دوم: $94\ C^o$، ۵ دقیقه (۱ سیکل)- $94\ C^o$، ۳۰ ثانیه- $64\ C^o$، ۳۰ ثانیه- $72\ C^o$، ۳۰ ثانیه (۴۵ سیکل)- $72\ C^o$، ۵ دقیقه (۱ سیکل) |



www.SID.ir

Archive of SID



برای بالا بردن کیفیت واکنش PCR از آنزیم AmpliTaq Gold استفاده گردید. با پرایمرهای مربوط به ژن Adhesion-۱ نتایج مطلوبی به دست نیامد و از این رو، از پرایمرهای ژن UreC برای تشخیص ژنوم هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌ها استفاده شد. پرایمر فوروارد با فلوروکروم Cy۵ نشاندار گردید تا محصول PCR فلورسنت گردد و بتوان با دستگاه DNA Sequencer که از حساسیت بالایی برخوردار است، استفاده شود. نرم‌افزار مربوط که از طرف کارخانه‌ی سازنده‌ی دستگاه DNA Sequencer روی دستگاه نصب گردیده بود، کار آنالیز محصولات PCR را انجام داد. برای تمامی واکنش‌های PCR شاهدهای مثبت و منفی مناسب لحاظ گردید.

پس از انجام واکنش PCR مقدار ۳ µl از محصول PCR با ۳ µl از Loading dye مخصوص دستگاه Sequencer ALF-Express DNA مخلوط شد و بر روی دستگاه بارگذاری گردید. پس از ران شدن نمونه‌ها، به مدت ۸ ساعت آنالیز نتایج با استفاده از نرم‌افزار دستگاه انجام پذیرفت و نمونه‌ها از نظر مثبت یا منفی بودن طبقه‌بندی گردیدند.

## یافته‌ها

DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای ۱۶srRNA چک شدند تا وجود باکتری درآن‌ها و مناسب بودن DNA استخراج شده برای استفاده در واکنش PCR تأیید گردد. کلیه‌ی نمونه‌ها با استفاده از پرایمر ۱۶srRNA به خوبی تکثیر شدند. تهیه‌ی رقت‌های سریالی برای ارزیابی کارایی پروتکل طراحی شده جهت تشخیص ژنوم هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌ها، نشان داد که کمترین رقت که نشان دهنده‌ی ۱۰ کپی از ژنوم هلیکوباکترپیلوری بود، قابل تشخیص می‌باشد.

از نظر وجود ژنوم هلیکوباکترپیلوری، نمونه‌های آب زاینده‌رود در همه‌ی موارد مثبت بودند. در مورد نمونه‌های آب چاه نتایج به ترتیب به دست آمد:

منطقه‌ی شمالی ۳ نمونه، منطقه‌ی غربی ۲ نمونه و منطقه‌ی جنوبی ۳ نمونه آلودگی به هلیکوباکترپیلوری را نشان دادند و هیچ نمونه‌ای از آب‌های منطقه‌ی شرقی آلوده نبودند. در خصوص آب شرب شهری، فقط از نمونه‌های شرق اصفهان ۲ نمونه آلودگی داشتند، اما برای بقیه‌ی نمونه‌ها آلودگی با هلیکوباکترپیلوری دیده نشد

## بحث

راه انتقال هلیکوباکترپیلوری به درستی روشن نیست (۳). در دو دهه‌ی گذشته، مقالاتی انتشار یافته‌اند مبنی بر این که ممکن است هلیکوباکترپیلوری از طریق آب منتقل شود (۱۱-۷). هلیکوباکترپیلوری درآب به شکل کوکوئید تغییر شکل می‌یابد که توانایی زنده ماندن را دارد، اما قابل کشت نیست و فقط با روش‌های مولکولی قابل شناسایی می‌باشد (۲).

نتایج مثبت بررسی با روش‌ای مولکولی از کشورهای آمریکا، انگلستان، سوئد، پرو، برزیل، اسپانیا و پاکستان گزارش شده است (۱۶-۱۰، ۸-۷).

هدف از تحقیق حاضر، جداسازی هلیکوباکترپیلوری از آب‌های شهر اصفهان (زاینده‌رود، چاه و شرب) با استفاده از پرایمرهای Adhesion-۱، UreC و ۱۶srRNA و روش حساس Fluorescent nested PCR بود. این روش قادر به شناسایی تعداد بسیار کم باکتری در نمونه می‌باشد (۱۴).



www.SID.ir

Archive of SID



DNA استخراج شده دراین تحقیق بااستفاده از پرایمرهای ۱۶srRNA چک شدند تا وجود باکتری در آن‌ها و مناسب بودن DNA استخراج شده در واکنش PCR تأیید گردد. با استفاده از پرایمر ۱۶srRNA کلیه نمونه‌ها به خوبی تکثیر شدند. Horiuch و همکاران از ژاپن گزارشی از بررسی آب‌های چاه با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA و فلورسانس CY۳ با نتایج مثبت از ۵۰ نمونه ارایه کردند که مشابه تحقیق حاضر است (۲).

همچنین Mazari-Hiriat و همکاران با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA و روش Nested PCR در پنج سیستم آبی مکزیکوسیتی بر روی ۱۳۹ نمونه تحقیقی انجام دادند که ۵۸ مورد از آن‌ها را مثبت گزارش کردند که با تحقیق حاضر مشابه می‌باشد (۷).

Adnan و همکاران نیز با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA موفق به جداسازی هلیکوباکترپیلوری از آب شدند که مشابهت تحقیق حاضر است (۱۷).

در این تحقیق از پرایمر ژن UreC که ژن اصلی در هلیکوباکترپیلوری است، استفاده شد (۱۸) که با نشان‌دار کردن پرایمر فوروارد با فلوروکروم CY۵، باعث فلورسنت شدن محصول PCR گردید. با اتخاذ این استراتژی، جداسازی باکتری انجام شد که با سایر تحقیقات انجام شده مطابقت دارد. بهرامی و همکاران با استفاده از ژن UreC و روش PCR نتایج مثبتی از آب‌های شرب، یونیت دندانپزشکی و آب‌سردکن‌های شهراصفهان ارایه نمودند (۱۹)؛ اما Ander و همکاران با استفاده از ژن UreC و hepA و روش Real time PCR موفق به جداسازی باکتری نشدند که در استفاده از ژن UreC با تحقیق ما مشابه اما در عدم تشخیص باکتری در نمونه‌های مورد آزمایش، با پژوهش حاضر مغایر است (۲۰).

در تحقیق حاضر، هیچ یک از نمونه‌ها با پرایمر ژن Adhesion نتیجه‌ی مثبتی نداشت که با تحقیق Horiuch و همکاران (۲) و نیز Rasheed و همکاران (۱۱) مطابقت دارد. تأثیر ترکیباتی مانند کلرین بر روی باکتری به درستی روشن نیست. در پژوهش‌های Gia و همکاران (۲۱) و نیز Sulami و همکاران (۲۲) نشان داده شده است که هلیکوباکترپیلوری، میزان ۰/۵ mg/l کلرین را می‌تواند تحمل کند. این احتمال وجود دارد که در تحقیق حاضر، وجود تعداد نمونه‌های مثبت بیشتر مربوط به آب‌های چاه و زاینده‌رود، به همین علت بوده است. این امر، نیاز به بررسی بیشتری دارد. با توجه به سایر تحقیقات و مقایسه‌ی آن‌ها با تحقیق حاضر، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با استفاده از پرایمر ژن ۱۶srRNA و UreC و روش Fluorescent nested PCR و فلوروکروم CY۵، تعداد بسیار کم باکتری شناسایی شدند.

همچنین بر اساس نتایج این مطالعه مشخص می‌شود که علاوه بر آب چاه‌ها که آلوده به هلیکوباکترپیلوری است و در صورت شرب می‌تواند موجب انتقال عفونت گردد، آب شرب شهری از منطقه‌ی شرق اصفهان نیز آلوده است. این مسأله می‌تواند به دلیل وجود آلودگی از سر منشأ تصفیه‌خانه باشد و یا در خطوط انتقال آب و شبکه‌ی توزیع در اثر شکستگی‌ها و نشت آب و ارتباط یافتن با محیط خارج ایجاد شده باشد. همچنین ممکن است باکتری‌های ایجادکننده‌ی بیوفیلم به جدار داخلی لوله‌های آب چسبیده و بیوفیلم ایجاد کنند که چنین محلی موضعی مناسب برای تجمع و تکثیر باکتری‌ها است. این احتمال نیز



www.SID.ir

Archive of SID



وجـــود داردکـــه هلیکوبـــاکترپیلوری از چنـــین بیوفیلم‌هایی برای محافظت و تکثیـر اسـتفاده کنـد و منابع آب را پس از ورود بـه شـبکه‌ی توزیـع آلـوده نماید (۲۲).

## تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بـه دلیل حمایت مالی از این پژوهش تقدیر و تشـکر بـه عمل می‌آید.

## References

1. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, et al. Relation of Helicobacter pylori infection and coronary heart disease. Br Heart J 1994; 71(5): 437-9.
2. Horiuchi T, Ohkusa T, Watanabe M, Kobayashi D, Miwa H, Eishi Y. Helicobacter pylori DNA in drinking water in Japan. Microbiol Immunol 2001; 45(7): 515-9.
3. Parsonnet J, Shmuely H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults. JAMA 1999; 282(23): 2240-5.
4. Vyse AJ, Gay NJ, Hesketh LM, Andrews NJ, Marshall B, Thomas HI, et al. The burden of Helicobacter pylori infection in England and Wales. Epidemiol Infect 2002; 128(3): 411-7.
5. Brown LM. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 2000; 22(2): 283-97.
6. Fox JG. The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. Gut 2002; 50(2): 273-83.
7. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Calva JJ. Helicobacter pylori in water systems for human use in Mexico City. Water Sci Technol 2001; 43(12): 93-8.
8. Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet 1991; 337(8756): 1503-6.
9. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, et al. Helicobacter pylori in the drinking water in Peru. Gastroenterology 1996; 110(4): 1031-5.
10. Hegarty JP, Dowd MT, Baker KH. Occurrence of Helicobacter pylori in surface water in the United States. J Appl Microbiol 1999; 87(5): 697-701.
11. Hulten K, Enroth H, Nystrom T, Engstrand L. Presence of Helicobacter species DNA in Swedish water. J Appl Microbiol 1998; 85(2): 282-6.
12. Baker KH, Hegarty JP. Presence of Helicobacter pylori in drinking water is associated with clinical infection. Scand J Infect Dis 2001; 33(10): 744-6.
13. Enroth H, Engstrand L. Immunomagnetic separation and PCR for detection of Helicobacter pylori in water and stool specimens. J Clin Microbiol 1995; 33(8): 2162-5.
14. Findlay I, Matthews PL, Mulcahy BK, Mitchelson K. Using MF-PCR to diagnose multiple defects from single cells: implications for PGD. Mol Cell Endocrinol 2001; 183(Suppl 1): S5-12.
15. Cellini L, Del VA, Di CM, Di CE, Favaro M, Donelli G. Detection of free and plankton-associated Helicobacter pylori in seawater. J Appl Microbiol 2004; 97(2): 285-92.
16. Fujimura S, Kato S, Kawamura T. Helicobacter pylori in Japanese river water and its prevalence in Japanese children. Lett Appl Microbiol 2004; 38(6): 517-21.
17. Khan A, Farooqui A, Kazmi SU. Presence of Helicobacter pylori in drinking water of Karachi, Pakistan. J Infect Dev Ctries 2012; 6(3): 251-5.
18. Al-Sulami AA, Al-Taee AM, Juma'a MG. Isolation and identification of Helicobacter pylori from drinking water in Basra governorate, Iraq. East Mediterr Health J 2010; 16(9): 920-5.
19. Bahrami AR, Rahimi E, Ghasemian SH. Detection of Helicobacter pylori in city water, dental units' water, and bottled mineral water in Isfahan, Iran. ScientificWorldJournal 2013; 2013: 280510.
20. Janzon A, Sjoling A, Lothigius A, Ahmed D, Qadri F, Svennerholm AM. Failure to detect Helicobacter pylori DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive real-time PCR assays. Appl Environ Microbiol 2009; 75(10): 3039-44.
21. Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Persistence of Helicobacter pylori in heterotrophic drinking-water biofilms. Appl Environ Microbiol 2008; 74(19): 5898-904.
22. Percival SL, Thomas JG. Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms. J Water Health 2009; 7(3): 469-77.



www.SID.ir

Archive of SID

**Journal of Isfahan Medical School** Received: 04.07.2014

**Vol. 32, No. 298, 3rd Week, October 2014** Accepted: 13.09.2014

# Evaluation of various water resources in Isfahan for the presence of Helicobacterr pylori using Fluorescent nested PCR

Farah Taj Navab-Akbar PhD[1], Rasoul Salehi PhD[2]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Helicobacter pylori infection is one of the most common infectious agents worldwide. However, origin and the mode of transmission of this bacterium have not been clearly explained. One of the most probable routs of H. pylori transmission is through water resources. The aim of this study was to evaluate the presence of H. pylori in tap waters, well waters and Zayandeh Rood River collected from various locations in Isfahan.

**Methods:** Totally 100 liters of water collected from Zayandeh Rood River, wells and drinking water pipeline network in the north, west, south and west locations of Isfahan city. Collected waters first subjected to filteration through 0.25µm, then filters were washed with PBS and the washed out PBS used for DNA extraction. For DNA extraction QiAamp DNA Mini Kit was used, fluorescent nested PCR was used for detection of H. pylori genome using UreC, 16srRNA and adhesion gene specific primers.

**Findings:** Our results showed H. pylori infection in Zayandeh Rood river, well waters and drinking water from eastern region of Isfahan.

**Conclusion:** Using primers srRNA16, UreC Fluorescent nested PCR method and fluorochromes 5CY very little number of bacteria were identified.

**Keywords:** Helicbacter pylori Fluroscent nested PCR UreC 16srRNA Adhesion Water

**Citation:** Navab-Akbar FT, Salehi R. **Evaluation of various water resources in Isfahan for the presence of Helicobacterr pylori using Fluorescent nested PCR.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(298): ??.

1- Assistant Professor, Department of Microbiology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir



www.SID.ir