



ارزیابی شیوع هلیکوباکتر هپاتیکوس با روش PCR در موش های خانگی (*Mus musculus*) استان اصفهان

دکتر عباس دوستی^{۱*}، علی ظهور^۲، مریم باقرنژاد^۳، صادق قربانی دالینی^{۴،۳}

^۱ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، آگروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور گلپایگان،
^۲ آگروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم،^۳ دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر هپاتیکوس یکی از شایع ترین گونه های هلیکوباکتر می باشد. این باکتری یکی از عوامل مهم ایجاد بیماری های گوناگون گوارشی، صفراوی، و کبدی می باشد. موش متداول ترین میزبان این باکتری است و نقش مهمی در انتقال بیماری های مشترک انسان و حیوان دارد. هدف از این پژوهش تعیین میزان شیوع هلیکوباکتر هپاتیکوس در موش های خانگی سطح استان اصفهان با روش PCR می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش یک بررسی مقطعی - توصیفی است که در تابستان ۱۳۸۸ بر روی ۲۶۱ موش جمع آوری شده از سطح استان اصفهان انجام گردید. پس از تشریح موش ها در شرایط استریل، نمونه ها (بافت کبد) جداسازی گردید. سپس از پرایمر های عمومی به منظور شناسایی جنس هلیکوباکتر و از پرایمر های اختصاصی برای شناسایی هلیکوباکتر هپاتیکوس استفاده گردید. یافته ها: جنس هلیکوباکتر در ۷۲٪ از کل نمونه ها شناسایی گردید. از این میزان ۴۲٪ متعلق به گونه هپاتیکوس بود. با آزمون آماری نسبت ها مشخص شد که ارتباط معنی داری بین جنس هلیکوباکتر و گونه هپاتیکوس در تمام مناطق مورد بررسی وجود دارد. نتیجه گیری: با توجه به اینکه منطقه مورد بررسی، یکی از مناطق پرخطر از نظر ابتلا به گونه های مختلف هلیکوباکتر محسوب می شود. انجام پایش گسترده و حذف موش های خانگی به منظور کاهش خطر ابتلا به بیماری های مختلف ضروری به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر هپاتیکوس، ژن *16S rRNA*، موش خانگی

پذیرش برای چاپ: تابستان ۸۸

دریافت مقاله: بهار ۸۸

مقدمه

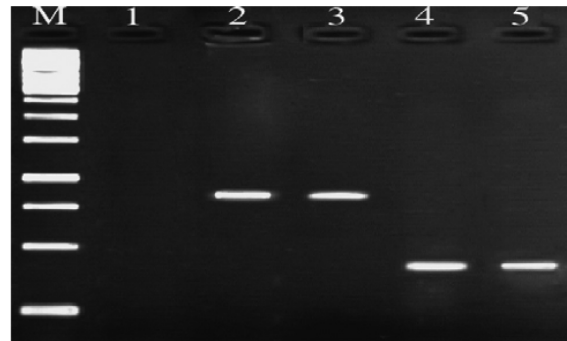
رشد، وجود و عدم وجود فاکتور ویرولانس و اوره آز متفاوت هستند (۱). گونه های متعددی از این گروه مانند *H. hepaticus*، *H. bilis*، *H. rodentium*، *H. typhlonius* و *H. muridarum* موجب آلودگی جوندگان به ویژه موش می گردند. در پژوهش های اخیر ارتباط بین این گونه ها و بیماری های گوارشی، کبدی و صفراوی در انسان نشان داده شده است (۲ و ۳). هلیکوباکتر هپاتیکوس شایع ترین گونه ایجاد کننده عفونت در موش و سایر جوندگان می باشد. با وجود شناسایی اولیه این باکتری در کبد، محل اولیه استقرار هلیکوباکتر هپاتیکوس ناحیه روده ای است. این باکتری از نظر مورفولوژی شبیه گونه های کمپیلوباکتر است و دو فلاژله دو قطبی غلافدار دارد. تست های بیوشیمیایی اوره آز، کاتالاز و

گونه های هلیکوباکتر به دو گروه اصلی گونه های هلیکوباکتر معده ای و گونه های انتروهپاتیک (هلیکوباکتر غیر معده ای) تقسیم می شوند. گونه های انتروهپاتیک هلیکوباکتر در دستگاه گوارش تحتانی به ویژه ایلئوم، کلون و مجاری صفراوی انسان ها و دیگر پستانداران یافت می شوند. همچنین مزمن شدن عفونت موجب التهاب مزمن و تکثیر بیش از حد سلول اپیتلیال و بیماری های نئوپلاستیک می گردد. انتروهپاتیک ها شامل گونه های متفاوت زیادی هستند که از نظر مورفولوژی، فراساختار و شرایط

(* آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۳۰
پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

سینازن استفاده گردید و کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. از پرایمر های عمومی HU-R و HU-F به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* و شناسایی میزان آلودگی نمونه ها با جنس هلیکوباکتر استفاده گردید و برای شناسایی اختصاصی هلیکوباکتر هپاتیکوس از پرایمرهای F-Hepa-R و H-hepa-R استفاده شد (جدول ۱-۵).

روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Mastercycler, gradient) با شرایط: حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (Hotstart)، در ادامه ۳۲ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (Final Extension) انجام شد. برای این منظور ۲ میکرولیتر از DNA الگو (DNA استخراج شده از بافت کبد)، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز اضافه گردید. ۲ میکرولیتر از محصول PCR یاد شده به عنوان DNA الگو برای دومین واکنش PCR جهت شناسایی اختصاصی هلیکوباکتر هپاتیکوس به کار برده شد. تمام مراحل یاد شده برای دومین واکنش PCR مشابه بود و تنها در مرحله Annealin دمای ۵۷ درجه سانتی گراد جایگزین گردید. محصول PCR برای پرایمرهای عمومی و اختصاصی به ترتیب به طول ۷۸۱ و ۴۱۷ جفت باز بود (شکل ۱). محصولات PCR بدست آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده با نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس نتایج حاصل با آزمون نسبت ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مرز معنی داری در $Z > 1.96\%$ در نظر گرفته شد.



شکل ۱: انجام PCR با پرایمر های عمومی (برای تشخیص جنس هلیکوباکتر) و اختصاصی (برای تشخیص گونه هپاتیکوس). شماره ۱، کنترل منفی، شماره های ۳ و ۲ باند ۷۸۱ جفت بازی و نشان دهنده جنس هلیکوباکتر و شماره های ۴ و ۵ باند ۴۱۷ جفت بازی و نشان دهنده هلیکوباکتر هپاتیکوس می باشد M، سایز مارکر (۱kb).

اکسیداز این باکتری مثبت است و بر روی تمام محیط های کشت استاندارد هلیکوباکتر پیلوری رشد می کند. همچنین شرایط رشد این باکتری مشابه هلیکوباکتر پیلوری است (۴).

با توجه به نقش مهم موش خانگی در انتقال بیماری های مشترک بین انسان و حیوان (zoonotic)، بررسی میزان شیوع آلودگی هلیکوباکتر هپاتیکوس در این حیوان از اهمیت زیادی برخوردار می باشد. هدف از این پژوهش تعیین میزان شیوع هلیکوباکتر هپاتیکوس در موش های خانگی استان اصفهان با روش PCR است.

مواد و روش ها

این پژوهش یک بررسی مقطعی - توصیفی است که در تابستان ۱۳۸۸ بر روی ۲۶۱ موش جمع آوری شده با روش تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان شامل شهرهای اصفهان، نجف آباد، مبارکه، فریدون شهر، گلپایگان و کاشان انجام گردید. پس از تشریح موش ها در شرایط استریل، بافت کبد نمونه ها جداسازی گردید. به منظور استخراج DNA از کیت استخراج ساخت شرکت

ژن	موقعیت آمپلیکون	پرایمر	آمپلیکون (bp)
<i>16S rRNA</i>	۲۵۴-۲۷۱	HU-F: CTATGACGGGTATCCGGC	۷۸۱
	۱۰۱۸-۱۰۳۵	HU-R: CTCACGACACGAGCTGAC	
<i>16S rRNA</i>	۵۶۹-۵۸۹	Hepa-F: GCATTTGAAACTGTTACTCTG	۴۱۷
	۹۶۹-۹۸۶	H-hepa-R: CTGTTTCAAGCTCCCC	

جدول ۱- پرایمر های عمومی و اختصاصی به منظور شناسایی جنس هلیکوباکتر و هلیکوباکتر هپاتیکوس.



نمودار ۱- میزان آلودگی موش های خانگی به جنس هلیکوباکتر و هلیکوباکتر هپاتیکوس مناطق مختلف استان اصفهان.

PCR هلیکوباکتر هپاتیکوس را از نمونه های کبد و صفراوی افراد مبتلا به سرطان های دستگاه صفراوی و کبد جداسازی نمودند (۸). Nilsson و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در سوئد با روش PCR گونه های گوناگون هلیکوباکتر از جمله هلیکوباکتر هپاتیکوس را از نمونه های بافتی کیسه صفرا و پانکراس بیماران مبتلا به نئوپلازی نورواندوکراین (neuroendocrin)، سرطان پانکراس و کیسه صفرا شناسایی کردند (۳). با توجه به گسترش رو به رشد شیوع انواع گونه های هلیکوباکتر به ویژه هلیکوباکتر هپاتیکوس و ارتباط آنها با ایجاد بیماری های مختلف در انسان، شناسایی میزان آلودگی میزبان های طبیعی مانند موش خانگی به دلیل نقش مهم آن ها در توسعه عفونت امری اجتناب ناپذیر می باشد (۶).

Shames و همکارانش در سال ۱۹۹۵ با روش های کشت و PCR این باکتری را از موش جدا کردند (۹). Malarkey و همکارانش در سال ۱۹۹۷ با روش PCR-RFLP هلیکوباکتر هپاتیکوس را در کبد ۱۰ تا ۸۰ درصد نمونه های تهیه شده از موش در مناطق مختلف آمریکا شناسایی کردند (۱۰). Fox و همکارانش در سال ۱۹۹۸، ۴۴ موش را از نظر میزان آلودگی با این باکتری با دو روش کشت و PCR بررسی کردند. با روش PCR، ۲۱ موش (۴۷٪) و با روش کشت ۱۴ موش (۳۲٪) آلوده به این باکتری بودند (۱۱). Whary و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با روش های PCR و ELISA گونه های *H. bilis*، *H. hepaticus* و *H. rodentium* را در موش شناسایی کردند (۱۲). Goto و همکارانش در سال ۲۰۰۰ هلیکوباکتر هپاتیکوس را در ۲۵/۵ درصد از موش ها شناسایی کردند (۱۳). در این بررسی جنس هلیکوباکتر در ۷۲٪ از نمونه ها شناسایی گردید که از این تعداد ۴۳٪ از گونه ها متعلق به *H. hepaticus* بود.

نتیجه گیری

از آنجایی که ارتباط زیادی بین شیوع گونه های مختلف

نتایج

جنس هلیکوباکتر در ۷۲٪ از کل نمونه ها شناسایی گردید. بیشترین شیوع مربوط به کاشان (۷۹٪) و کمترین میزان شیوع مربوط به فریدون شهر (۶۱٪) بود. از مجموع هلیکوباکترهای شناسایی شده، ۴۲٪ آن به گونه هپاتیکوس تعلق داشت. بیشترین میزان هلیکوباکتر هپاتیکوس مربوط به کاشان (۳۴ نمونه) با فراوانی ۴۵٪ و کمترین میزان آن مربوط به نجف آباد (۲۳ نمونه) با فراوانی ۴۲٪ بود.

با آزمون نسبت ها مشخص گردید که ارتباط معنی داری بین جنس هلیکوباکتر و گونه هپاتیکوس در تمام مناطق مورد بررسی شامل اصفهان ($Z=2/33$)، نجف آباد ($Z=2/5$)، مبارکه ($Z=2/44$)، فریدون شهر ($Z=2$)، گلیپایگان ($Z=2/45$) و کاشان ($Z=2/45$) وجود دارد. میزان آلودگی مناطق مختلف به جنس هلیکوباکتر و هلیکوباکتر هپاتیکوس در نمودار ۱ نشان داده شده است.

بحث

از زمان کشف هلیکوباکتر پیلوری تا کنون ۳۰ گونه دیگر هلیکوباکتر از دستگاه گوارش و کبد پستانداران و پرندگان جدا گردیده است. هلیکوباکتر هپاتیکوس مهم ترین و فراوان ترین گونه ایجاد کننده عفونت در موش و به دنبال آن در انسان می باشد که برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ توسط Fox و همکارانش از کبد موش جدا گردید. این باکتری موجب هپاتیت فعال، فیبروز و سرطان کبد و همچنین اختلالات و التهاب شکمی در موش می گردد (۶).

باکتری هلیکوباکتر هپاتیکوس با بیماری های گوناگونی در انسان ارتباط دارد. Matsukura و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در ژاپن با روش PCR هلیکوباکتر بیلینس را از نمونه های بیوپسی کیسه صفراوی یک فرد مبتلا به سرطان کیسه صفرا جدا سازی نمودند (۷). Kubayashi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با روش

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل پشتیبانی اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می دارند.

هلیکوباکتر و بیماری های کبدی و صفراوی در انسان وجود دارد و با توجه به ابتلای اکثر نمونه های این منطقه به این گونه ها، حذف موش ها جهت از بین بردن مخزن آلودگی و جلوگیری از انتشار بیماری های گوناگون پیشنهاد می گردد.

References

1. Kusters JG, Vliet AHM and Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev. 2006. 19(3):449-490.
2. Ananieva O, Nilsson I, Vorobjova T, Uibo R, and Wadstrom T. Immune responses to bile-tolerant *Helicobacter* species in patients with chronic liver diseases, a randomized population group, and healthy blood donors. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002. 9:1160-1164.
3. Nilsson I, Kornilovs'ka I, Lindgren S, Ljungh A. and Wadstrom T. Increased prevalence of seropositivity for non-gastric *Helicobacter* species in patients with autoimmune liver disease. J. Med. Microbiol. 2003. 52:949-953.
4. Kusters JG and Kuipers EJ. Non-*pylori Helicobacter* Infection in Human. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1998. 10:239-241.
5. Zenner L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 1999. 22:41-61.
6. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ, Gorelick JPL and Ward JM. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol. 1994; 32:1238-1245.
7. Matsukura N, Yokomura S, Yamada S, Tajiri T, Sundo T, Hadama T, Kamiya S, Natio Z, Fox JG. Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant disease in the biliary tract. Jpn J Cancer Res. 2002. 93:842-847.
8. Kobayashi T, Harada K, Miwa K, Nakanuma Y. *Helicobacter* genus DNA fragments are commonly detectable in bile from patients with extrahepatic biliary disease and associated with their pathogenesis. Dig Dis Sci. 2005. 50:862-867.
9. Shames B, Fox JG, Dewhirst F, Yan L, Shen Z, Taylor NS. Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. J Clin Microbiol. 1995. 33:2968-2972.
10. Malarkey DE, Ton TV, Hailey JR. and Devereux. A PCR-RFLP method for the detection of *Helicobacter hepaticus* in frozen or fixed liver from B6C3F1 mice. Tox Pathology. 1997. 25(6):606-612.
11. Fox JG, Macgregor JA, Shen Z. and Li X. Comparison of methods of identifying *Helicobacter hepaticus* in B6C3F1 mice used in a carcinogenesis bioassay. J of Clin Microbiol. 1998. 36(5):1382-1387.
12. Whary MT, Cline JH, King AE, Hewes KM, Chojnacky D, Salvarrey A, Fox JG. Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium*, and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. Comp Med. 2000. 50:436-443.
13. Goto K, Ohashi H, Takakura A, and Itoh T. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils and house musk shrew in Japan. Current Microbiology. 2002. 41:161-166.