

بررسی ارتباط حضور ژن glmM هلیکوباکتر پیلوری و نوسانات سرمی آنتی بادی های IgA و IgG در افراد مبتلا به عفونت

آیت مرادی پور^۱، عبدالرزاق مرزبان^۲، مریم کارخانه^۳، حامد اسمعیل لشگریان^{۴*}

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳- گروه آموزشی بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۴- استادیار، گروه آموزشی بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

یافته / دوره ۲۲ / شماره ۴ / زمستان ۹۹ / مسلسل ۸۶

چکیده

دریافت مقاله: ۹۹/۸/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۹/۹/۲۴

مقدمه: شیوع بالای عفونت هلیکوباکتر پیلوری در جهان به خصوص در کشورهای جهان سوم و نقش آن در بدخیمی های معده و پیدایش مقاومت آنتی بیوتیک باعث شده است که روش های درمانی و پیشگیری مختلفی علیه عفونت پیشنهاد گردد. glmM ژن کدکننده فسفوگلوکز آمین موتاز است که می توان در شناسایی مولکولی هلیکوباکتر پیلوری استفاده نمود. هدف از انجام این مطالعه بررسی ارتباط بین حضور هلیکوباکتری در مدفوع و تیتراژ آنتی بادی های سرمی IgA و IgG می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه که به صورت مورد - شاهدهی انجام گرفت ۴۲ نفر بیمار به عنوان گروه مورد و ۴۲ از افراد سالم در گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. از تمام افراد هر دو گروه سالم و بیمار، نمونه های خون و مدفوع دریافت و از سرم نمونه های خون به کمک کیت های ایزا تیتراسیون آنتی بادی های IgA و IgG اندازه گیری گردید. از نمونه های مدفوع DNA استخراج و از تکنیک PCR برای بررسی حضور ژن glmM استفاده شد و نتایج حاصله با کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ تحلیل گردید.

یافته ها: در بررسی اولیه از نظر میزان آنتی بادی ها در سرم خون افراد تقریباً در خون ۸۶٪ از افراد گروه مورد IgA و IgG ضد میکروبی به صورت هم زمان مشاهده شد و این در حالی بود که در گروه شاهد میزان آنتی بادی ها در سرم به ۵۹/۹٪ رسید. نتایج حاصل از PCR نیز نشان داد که در گروه مورد از ۴۲ نفر ۲۰ نفر دارای ژن glmM بودند و در گروه شاهد هیچ نمونه مثبتی از نظر این ژن وجود نداشت.

بحث و نتیجه گیری: در این تحقیق سعی شد که ارتباط بین تیتراژ آنتی بادی های IgA و IgG سرمی با وجود هلیکوباکتر در مدفوع بررسی شود. اگرچه نیمی از افراد گروه مورد از نظر وجود ژن glmM هلیکوباکتر مثبت بودند ولی آنالیز آماری ارتباط بین تیتراژ آنتی بادی های فوق با وجود هلیکوباکتر در مدفوع را تایید نکرد. به طور کلی می توان پیشنهاد نمود که با مطالعه بیشتر و افزایش حجم نمونه، همچنین روش های تشخیصی مکمل ارتباط بین تیتراژ آنتی بادی های فوق و وجود هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع مورد بررسی قرار داد.

واژه های کلیدی: IgA، IgG، glmM، هلیکوباکتر پیلوری، عفونت

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی.

پست الکترونیک: hamedesmaili@gmail.com

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری، باسیل گرم منفی، ماریچ و متحرک است که عامل اصلی گاستریت، زخم‌های پپتیک و سرطان معده و لنف‌های سلول‌های نوع B مرتبط با مخاط معده (Mucosal associated lymphoid tissue: MALT) محسوب می‌شود (۲،۱). امروزه کنترل عفونت ناشی از این باکتری نظر محققین زیادی را به خود جلب کرده است. شیوع بالای عفونت هلیکوباکتر پیلوری در جهان و به خصوص در کشورهای جهان سوم و نقش آن در بدخیمی‌های معده و پیدایش مقاومت آنتی بیوتیک باعث شده است که روش‌های درمانی و پیشگیری مختلفی علیه عفونت پیشنهاد گردد (۳،۴).

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات قبلی در مورد شناسایی و بررسی انواع بیماری‌های ذکر شده در رابطه با عفونت هلیکوباکتر پیلوری، بررسی میزان شیوع این باکتری در یک منطقه جغرافیایی خاص از اهمیت بالایی برخوردار است و کمک زیادی به کنترل و پیشگیری از عفونت خواهد نمود (۵). تا کنون تکنیک‌های مختلفی برای شناسایی و غربالگری افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری از قبیل تکنیک‌های تهاجمی و غیر تهاجمی ارائه شده است و در این بین تکنیک‌های مبتنی بر PCR و تیتراسیون آنتی بادی‌های اختصاصی ضد هلیکوباکتر پیلوری در خون افراد دارای حساسیت و دقت بالایی نسبت به سایر روش‌های موجود در تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند (۶-۸).

در جریان مکانیسم‌های دفاعی توسط سیستم ایمنی همورال، مجریان اصلی در این دفاع، آنتی بادی‌های موضعی و سپس سیستمیک هستند که همان آنتی بادی‌های IgM، IgA و IgG می‌باشند (۷،۹). بررسی‌های آسیب شناسی بافتی از نمونه‌های بیوپسی معده مبتلایان به عفونت هلیکوباکتر پیلوری که بهبود یافته‌اند، وجود تعداد اندکی از سلول‌های تک هسته‌ای لنفوسیتی را نشان می‌دهد که با حضور IgA

ترشحاتی در محتویات معده همخوانی دارد و دلیلی بر نقش حفاظتی ایمنی همورال است (۹).

IgM سرمی، اولین آنتی بادی است که در گردش خون بیانگر بروز عفونت حاد اولیه و جدی است و حضور اشکال سیستمیک و ترشحاتی IgG نیز دال بر نفوذ ارگانیزم در سطوح زیرین اپی تلیال است. این آنتی بادی -های ذکر شده به وسیله آزمایش‌های سرولوژیک از جمله تکنیک الایزا قابل اندازه‌گیری و شناسایی هستند (۱۰). یکی از ژن‌های مهم در هلیکوباکتر پیلوری ژن glmM می‌باشد که کدکننده فسفولگلوکوز آمین موتاز است. آنزیم فسفولگلوکوز آمین موتاز باعث تبدیل ایزوفرم گلوکز آمین ۶- فسفات به گلوکز آمین ۱- فسفات می‌شود.

این آنزیم در مسیر سنتز لیپوپلی سارکارید و پپتیدوگلیکان باکتری ضروری است. مطالعات نشان داده‌اند که این آنزیم برای رشد و بقای هلیکوباکتر پیلوری نقش اصلی را ایفا می‌کند. نام دیگر این ژن، ureC است و در باکس اوره قرار دارد اما نام glmM برای این ژن رایج‌تر است چرا که فسفولگلوکوز موتاز ارتباطی به تولید اوره از ندارد (۱۱).

حال با توجه به اهمیت شیوع آلودگی هلیکوباکتر پیلوری، ما برآن شدیم تا با طراحی این مطالعه به بررسی میزان حضور آنتی بادی‌های IgG و IgA سرمی در افراد مبتلا به عفونت و ارتباط آن با وجود هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع از طریق شناسایی آن با ژن glmM به روش مولکولی در افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه ابن سینا واقع در شهر ایلام بپردازیم تا شاید نتایج حاصل از این پژوهش نقشی در تخمین میزان شیوع عفونت و مدیریت کنترل عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری در سطح شهرستان داشته باشد.

مواد و روش‌ها**جمعیت مورد مطالعه**

در این مطالعه که به صورت مورد - شاهدهی انجام گرفت، گروه مورد ۴۲ نفر و گروه شاهد نیز ۴۲ نفر را

اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق در شرایط تاریکی انکوباسیون انجام گرفت و در آخر برای متوقف سازی واکنش های شیمیایی محلول متوقف کننده کیت به درون هر چاهک اضافه گردید سپس به کمک دستگاه خوانش جذب نوری هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر بررسی شد.

روش استخراج DNA

در این مطالعه از تمام نمونه های مدفوع، استخراج DNA به کمک کیت استخراج DNA خریداری شده از شرکت سینا ژن انجام گرفت. مراحل استخراج DNA مطابق با پروتکل کیت و به شرح زیر بود:

۱- مقدار ۱ گرم از نمونه مدفوع به همراه ۴۰۰ میکرولیتر از محلول کیت سیناکلون به همراه ۳۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانول در میکروتیوپ ۱/۵ وارد و پس از ۲۰ ثانیه ورتکس در دمای ۲۰- به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. ۲- تیوپ به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی بدون خروج نمونه ته نشین شده خارج گردید. ۳- ۱ میلی لیتر الکل ۷۵٪ وارد تیوپ و سپس سانتریفیوژ در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مایع رویی خارج گردید. این مرحله به صورت ۲ بار تکرار انجام گردید. ۴- پس از خروج مایع الکی، تیوپ ۲ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد و به میزان ۶۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی اضافه و به مدت ۳۵ ثانیه در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس کیفیت و کمیت نمونه استخراج شده با دستگاه نانودراپ (Thermoscientific, USA) بررسی گردید.

روش انجام PCR

در انجام واکنش زنجیره پلیمرز برای بررسی حضور یا نبود ژن glmM هلیکوباکتر پیلوری، پرایمر اختصاصی برای این ژن به کمک نرم افزار IDALLEL طراحی و بلست گردید (جدول ۲). مجموعه ای از آزمایشات اولیه جهت

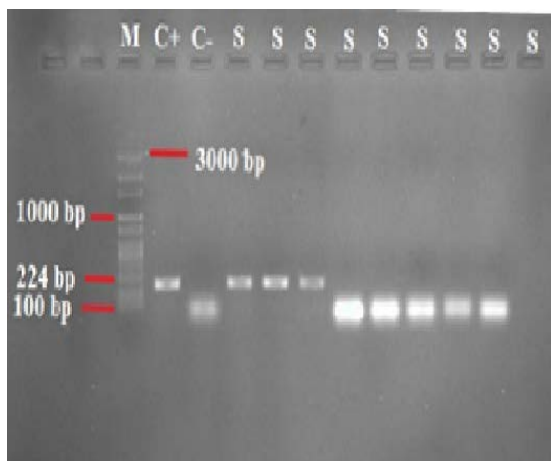
شامل می شوند که از هر دو گروه نمونه های خون و مدفوع دریافت شد. فرم رضایت نامه مشارکت داوطلبانه در طرح تحقیقاتی نیز توسط بیماران و افراد سالم تکمیل شد.

آزمایش تأیید وجود عفونت در این مطالعه، بررسی حضور ژن ۱۶srRNA به کمک PCR و آزمایش HPSA یا آنتی ژن مدفوعی هلیکوباکتر پیلوری مثبت بود. قبل از جمع آوری نمونه های خون و مدفوع، پرسش نامه تنظیم شده که حاوی سؤالاتی در خصوص میزان تحصیلات فردی و جنسیتی و دلایل مراجعه به آزمایشگاه بود که به افراد مورد مطالعه در هر دو گروه مورد و شاهد داده شد و پس از تکمیل آن از نمونه های دریافتی در مطالعه استفاده شد.

سنجش میزان آنتی بادی های سرمی

پس از انتقال نمونه های خون مورد مطالعه به آزمایشگاه از نمونه های خون، سرم به کمک سانتریفیوژ در دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جدا شد و به روش ELISA غیر مستقیم به کمک کیت های الیزا شرکت Euroimmuno تیتراسیون آنتی بادی های IgA و IgG ضد هلیکوباکتر اندازه گیری گردید.

بعد از آماده سازی محلول های استاندارد و رقیق سازی نمونه های سرم به کمک محلول رقیق کننده کیت به نسبت ۱:۱۰۱ دو چاهک را به عنوان نمونه استاندارد و چاهک کنترل مثبت انتخاب کردیم و درون سایر چاهک ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر سرم خون افراد مورد مطالعه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون انجام گرفت. پس از این مرحله محتویات چاهک ها خالی و ۵ مرتبه به کمک بافر PBS چاهک ها شستشو داده شد. در ادامه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم کانژوگه به درون هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون انجام گرفت. مانند مرحله قبل بعد از انجام انکوباسیون محتویات چاهک ها دوباره خالی شد و پنج مرتبه با بافر PBS شستشو انجام گرفت. پس از این مراحل ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا TMB به درون هر چاهک



شکل ۱. تصویر ژل آگارز حاوی باندهای ۲۲۴ جفت بازی حاصل از PCR ژن glmM از نمونه‌های DNA مدفوعی. M (مارکر)، C+ (کنترل مثبت)، C- (کنترل منفی)، S (نمونه‌ها).

تحلیل داده‌ها

نتایج حاصله با کمک نرم افزار آماری SPSS و آزمون ANOVA و کلو موگروف اسمیرنوف تحلیل شدند و برای بررسی ارتباط حضور ژن با میزان تیتراژ آنتی بادی‌ها از آزمون رگرسیون لجستیک استفاده شد. در طول مقایسه داده‌ها ارزش p کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار بود.

یافته‌ها

در این تحقیق حدود ۸۴ زن و مرد مطالعه گردیدند که به صورت خلاصه اطلاعات جنسی و سنی جامعه مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. توصیف جامعه مورد مطالعه از نظر سن و جنس

| متغیرها | | گروه شاهد | | گروه مورد |
|-------------------------|-----|-----------|-----|-----------|
| جنس | مرد | زن | مرد | زن |
| تعداد | ۱۶ | ۲۶ | ۲۰ | ۲۲ |
| میانگین سنی | ۵۵ | ۴۷ | ۴۴ | ۴۲ |
| میانگین سنی کلی گروه‌ها | ۵۱ | | ۴۳ | |

از لحاظ آماری پس از انجام آزمون ANOVA هیچ ارتباط معنی داری بین سن و جنس افراد مورد مطالعه با شیوع عفونت و تیتراژ آنتی بادی‌های IgA و IgG و حضور ژن glmM در مدفوع مشاهده نشد ($\text{sig.} > 0/05$).

بررسی فراوانی و میانگین آنتی بادی‌های سرمی

فراوانی افراد با نتایج مثبت برای آزمایش IgA و IgG، نشان می‌دهد که ۴۷/۵ درصد از افراد گروه مورد و ۲۵

طراحی برنامه دمایی PCR انجام شد (جدول ۳). انجام تکنیک PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف آلمان با شرایط دمایی مشخص تکثیر و DNA هدف در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲ میکرولیتر از مسترمیکس آماده شرکت Ampliqone کشور فنلاند، ۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای مستقیم و معکوس و در پایان ۳ میکرولیتر از DNA الگو یا همان DNA استخراج شده از نمونه‌های مدفوع بود که در میکروتیوپ-هایی با حجم ۰/۲ میلی لیتر ریخته شد و پس از مخلوط کردن کوتاهی در ورتکس، درون دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت.

جدول ۱. توالی یک جفت پرایمر مورد استفاده برای ژن glmM

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| توالی پرایمر رشته Forward | ۵'- AACAGGACAAGTAGCTAGCC-۳' |
| توالی پرایمر رشته Reverse | ۵'- TATTAATGCGTGTGTGGCTG-۳' |
| طول باند محصول PCR | ۲۲۴ bp |

جدول ۲. برنامه دستگاه ترموسایکلر برای انجام PCR ژن glmM

| سیکل | زمان | دما | Thermocycler program |
|------|----------|------|----------------------|
| ۱ | ۵ دقیقه | ۹۴°C | Hot start |
| ۳۰ | ۱ دقیقه | ۹۴°C | Denaturation |
| | ۱ دقیقه | ۵۱°C | Annealing |
| | ۱ دقیقه | ۷۳°C | Extension |
| ۱ | ۱۰ دقیقه | ۷۳°C | Final Extension |

الکتروفورز

پس از انجام تکنیک PCR برای تأیید حضور ژن در محصول PCR از دستگاه الکتروفورز استفاده گردید به این ترتیب که ۴ میکرولیتر از محصول نهایی PCR درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ ایمن که قبلاً در تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE-1X غوطه‌ور شده بود قرار گرفت و به مدت ۵۰ دقیقه جریان الکتریسیته با ولتاژ ۹۰ از ژل حاوی محصول PCR عبور داده شد و در نهایت با کمک دستگاه ژل داک، ژل آگارز از نظر حضور ژن مورد نظر با طول باند ۲۲۴ جفت باز بررسی گردید (شکل ۱).

جدول ۶. رابطه و میزان همبستگی ژن glmM با متغیرهای IgG و IgA

| متغیر | خطای استاندارد | درجه آزادی | سطح معنی داری |
|----------|----------------|------------|---------------|
| IgA | ۰/۰۰۴ | ۱ | *۰/۰۲۵ |
| IgG | ۰/۰۲۷ | ۱ | *۰/۱۸۹ |
| constant | ۱/۲۲۸ | ۱ | *۰/۰۰۰ |

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۸۵/۷٪ از افراد گروه مورد و ۵۹/۵٪ از افراد گروه شاهد تیتراژ مثبت IgG و IgA را به صورت هم زمان داشتند و این در حالی بود که با وجود تفاوت در میان اندازه تیتراسیون های آنتی بادی در بین زنان و مردان هیچ رابطه معنی داری وجود نداشت. مقایسه میزان سطح سرمی آنتی بادی IgG و IgA در بین گروه های مطالعه شده در پژوهش از نظر تحصیلی نشان داد که تیتراژ آنتی بادی در گروه هایی با سطح تحصیلی پایین تر، بیشتر از گروه های دیگر با سطح تحصیلی بالاتر بود و این نتیجه در بسیاری از گزارشات حاصل از مطالعات قبلی به همین صورت تکرار شده و نشان دهنده این امر مهم است که سطح تحصیلات فردی و آگاهی افراد به مسائل بهداشت فردی و سبک زندگی به عنوان عامل مهمی در میزان شیوع عفونت است (۱۲، ۱۳). موریرا و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه ای نشان دادند که آموزش نقش مهمی در پیشگیری از عفونت هلیکوباکتر پیلوری در کودکان دارد (۱۴). هم راستا با این مطالعه، رابطه معکوس چشمگیری بین سطح تحصیلات و شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری در مطالعه ای که توسط گراهام و همکاران انجام شد نیز مشاهده شد (۱۵).

یکی از متداول ترین راه های تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری اندازه گیری سطح آنتی بادی های IgG و IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری در سرم بیماران مبتلا می باشد (۱۶) شیوع عفونت در کشورهای در حال توسعه بالا است و میزان مبتلایان به بیماری های حاد با منشأ هلیکوباکتر پیلوری مانند سرطان معده و زخم معده که دارای ژن های

درصد از افراد گروه شاهد دارای IgG بالاتر از میزان طبیعی بودند. در گروه مورد یا بیمار ۴۷/۵ درصد نیز دارای IgG و IgA توأم بالاتر از حد طبیعی بودند. در خصوص گروه شاهد ۱۲/۵ درصد دارای IgA بیش از حد طبیعی و ۳۵ درصد هم IgG و IgA توأم بالاتر از حد طبیعی داشتند (جدول ۴).

جدول ۴. فراوانی افراد با نتایج مثبت برای آزمایش IgG و IgA در افراد گروه مورد و شاهد

| متغیر های مورد مطالعه | شاهد | | بیمار | |
|-----------------------|-------|------|-------|------|
| | تعداد | درصد | تعداد | درصد |
| فقط IgA | ۵ | ۱۲/۵ | ۰ | ۰ |
| فقط IgG | ۱۰ | ۲۵ | ۱۹ | ۴۷/۵ |
| حضور همزمان IgG و IgA | ۱۴ | ۳۵ | ۱۹ | ۴۷/۵ |

بررسی ها برای تعیین حضور ژن glmM هلیکوباکتر پیلوری در DNA استخراج شده به کمک PCR نشان داد که در گروه بیماران از ۴۲ نفر ۲۰ نفر دارای ژن glmM بودند و در گروه شاهد هیچ نمونه مثبتی از نظر این ژن وجود نداشت.

آزمون واریانس یک طرفه و آزمون کروسکال والیس برای مقایسه داده های حاصل از آزمون های PCR و ELISA استفاده گردید و نشان داده شد که در میان متغیرهایی که در مطالعه وجود داشتند هیچ کدام با گروه PCR رابطه معنی داری نداشتند. در این آزمون به بررسی ارتباط میان متغیر وابسته یعنی ژن glmM با متغیرهای کمی اندازه گیری شده در تحقیق (IgG و IgA) پرداخته شد. با فرض معنی داری $p < 0/05$ با توجه به نتایج آزمون کروسکال والیس و رگرسیون لجستیک هیچ متغیری دارای رابطه معنی دار با ژن glmM نبود (جدول ۵ و جدول ۶).

جدول ۵. رابطه و میزان همبستگی ژن glmM با متغیرهای IgG و IgA

| ارتباط میزان سطح آنتی بادی های گروه مورد با حضور ژن glmM | Group | | |
|--|-------|-------|---------------|
| | IgG | IgA | تست کاسکوور |
| بندی های گروه مورد با حضور ژن glmM | ۰/۹۲۹ | ۵/۳۷۸ | درجه آزادی |
| | ۲ | ۲ | سطح معنی داری |
| | ۶ | ۰/۰۶۸ | |

افراد عفونت هلیکوباکتر منجر به تیترا پایینی از ایمنوگلوبین می‌شود. حتی محتوای ژنتیکی و نوع سازوکار سیستم ایمنی افراد ممکن است باعث شود که برخی از افراد به سمت عفونت حاد و یا مزمن سوق پیدا کنند. اما قابل ذکر است که این امر نیاز به مطالعه بیشتر در سطوح وسیع‌تر با حجم نمونه بالا و بررسی در موقعیت‌های جغرافیایی مختلف و نژادهای مختلف دارد تا نتیجه‌ای محکم‌تر و مستندتر حاصل شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمام همکاران و افرادی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند کمال تشکر و سپاس را داریم.

ویروالانس باکتری هستند حدود ۱ تا ۲ برابر است (۱۸،۱۷).

بر همین اساس ما بر آن شدیم که با بررسی ارتباط بین میزان تیتراسیون آنتی بادی‌ها و حضور ژن ویروالانس هلیکوباکتر پیلوری موجود در مدفوع در واقع یک پیش-آگهی از احتمال بروز بیماری‌های حاد و خطرناک در افراد مبتلا به عفونت را بررسی کنیم که در نتیجه با انجام PCR و اندازه‌گیری تیتراژ آنتی بادی‌ها و تحلیل داده‌های حاصل هیچ رابطه معنی‌داری بین سطح آنتی بادی‌های IgA و IgG در خون و حضور ژن glmM در مدفوع دیده نشد. یکی از دلایل فقدان ارتباط ممکن است به دلیل تعداد ناکافی از باکتری هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع و به دلیل نوع نمونه باشد. هم جهت با نتایج حاصل از این مطالعه، در مطالعه دیگری که از ژن glmM برای تشخیص باکتری در شیر گاو و گوشت خام بز استفاده شد ارتباط معنی-داری از نظر بررسی مولکولی ژن glmM مشاهده نشد و یکی از دلایل تعداد باکتری ناکافی در این نمونه‌ها بود (۱۹). در مطالعه دیگری عامل تأثیرگذار دیگر ممکن است سیستم ایمنی میزبان باشد، با توجه به این که در برخی از

References

1. Miftahussurur M, Yamaoka Y. Diagnostic methods of *Helicobacter pylori* infection for epidemiological studies: critical importance of indirect test validation. *BioMed Res Int*. 2016;2016:1-14.
2. Gomes CC, Gomez RS, Zina LG, Amaral FR. Recurrent aphthous stomatitis and *Helicobacter pylori*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21(2):e187-e191.
3. Moradipour A, Khosravi A, Piri F. Fecal *Helicobacter pylori* glmM and 16S rRNA genes correlate with serum TNF- α and IL-1 β cytokine fluctuations. *Acta Microbiol Imm H*. 2018;65(4):489-499.
4. Alba C, Blanco A, Alarcón T. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Curr opin infect dis*. 2017;30(5):489-497.
5. Lu C, Yu Y, Li L, Yu C, Xu P. Systematic review of the relationship of *Helicobacter pylori* infection with geographical latitude, average annual temperature and average daily sunshine. *BMC Gastroenterol*. 2018;18(1):1-9.
6. Brennan DE, Omorogbe J, Hussey M, Tighe D, Holleran G, O'Morain C, et al. Molecular detection of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in stool vs biopsy samples. *World J Gastroenterol*. 2016;22(41):9214-9221.
7. Kamarehei F, Khabiri A, Saidijam M, Soleimani M, Alikhani MY. Designing a novel ELISA method based on CagA, NapA recombinant antigens to increase sensitivity and specificity of *Helicobacter pylori* whole cell antigen detection. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2018;11(4):333-342.
8. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shih HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol*. 2015;21(40):11221-11235.
9. Shams S, Vesali Jamshid Z, Shahbazi T, Hasani M, Shams E, Ragolia S. Comparison of serum IgG and IgA levels against *Helicobacter Pylori* in patients with gastrointestinal symptoms. *Infect Epidemiol Microbiol*. 2018;4(3):105-108.
10. Cherif MK, Ouédraogo O, Sanou GS, Diarra A, Ouédraogo A, Tiono A, et al. Antibody responses to *P. falciparum* blood stage antigens and incidence of clinical malaria in children living in endemic area in Burkina Faso. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):1-10.
11. Quaglia N, Dambrosio A, Normanno G, Celano G. Evaluation of a Nested-PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene (glmM) for the detection of *Helicobacter pylori* from raw milk. *Food Control*. 2009;20(2):119-123.
12. Talebi Bezmin Abadi A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using invasive and noninvasive approaches. *J Pathog*. 2018;9064952.
13. Moradipour A, Khosravi A, Mehrabi M, Faryadian S. Correlation of 16s rRNA with serum levels of the cytokines, TNF- α and IL-1 β , in subjects with a positive *Helicobacter pylori* Stool Antigen test (HPSA). *JBRMS*. 2016;3(2):35-40.

14. Moreira E, Santos R, Nassri V, Reis A, Guerra A, Alcântara A, et al. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection in children: is education a main determinant? *Epidemiol Infect.* 2004;132(2):327-335.
15. Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States: effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology.* 1991;100(6):1495-1501.
16. Mentis A, Lehours P, Mégraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2015;20:1-7.
17. Raj P, Thompson JF, Pan DH. *Helicobacter pylori* serology testing is a useful diagnostic screening tool for symptomatic inner city children. *Acta Paediatr.* 2017;106(3):470-477.
18. Diab M, Shemis M, El-Ghannam M, Gamal D, Azmy M, Salem D, et al. *Helicobacter pylori vacA* genotyping in relation to *cagA* status, ultra-structure of gastric mucosa and clinical outcomes in Egyptian patients. *Afr J Microbiol Res.* 2016;10(14):465-472.
19. Quaglia N, Dambrosio A, Normanno G, Parisi A, Patrono R, Ranieri G, et al. High occurrence of *Helicobacter pylori* in raw goat, sheep and cow milk inferred by *glmM* gene: a risk of food-borne infection? *Int J Food Microbiol.* 2008;124(1):43-47.

Relationship between the presence of *Helicobacter pylori* glmM gene and serum fluctuations of IgG and IgA antibodies in infected individuals

Moradipour A¹, Marzban A², Karkhane M³, Esmail Lashgarian H^{4*}

1. Young Researchers and Elite Club, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran.

2. Assistant professor, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

3. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

4. Assistant professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, hamedesmaili@gmail.com.

Received: 11 Nov 2020

Accepted: 14 Dec 2020

Abstract

Background: The high prevalence of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection worldwide, especially in developing countries, and its role in gastric malignancies and the emergence of antibiotic resistance have led to proposing the different treatment and prevention methods against infection. HP associated GlmM gene is coding for Phosphoglucosamine mutase that considered for molecular detection of HP.

Materials and Methods: In this case-control study, blood and stool samples were obtained from studied population and the titers of IgG & IgA were measured by ELISA kits. DNA was extracted from stool samples and PCR was used to detect glmM gene. The results were analyzed by SPSS software.

Results: In initial study regarding of antibodies level in the blood serum, 86% of the subjects in the group showed antimicrobial IgA and IgG at the same time, while in the control group this amount was 59.9%. The results of PCR showed that in the case group, 20 out of 42 cases had glmM gene and in the control group there was no positive sample for this gene.

Conclusion: In this attempt, we tried to find a linkage between HP-associated virulence glmM gene and antibodies concentration through which probability of developing acute and severe state of disease in infected patients. The PCR and Ab titers associated results showed no significant relation between glmM gene of HP originated stool sample and serum concentration of IgG and IgA in patients who suffered from HP infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, IgA, IgG, glmM.

***Citation:** Moradipour A, Marzban A, Karkhane M, Esmail Lashgarian H. Relationship between the presence of *Helicobacter pylori* glmM gene and serum fluctuations of IgG and IgA antibodies in infected individuals. *Yafte*. 2021; 22(4):37-45.