

## Genotype Variation in *H. Pylori* Isolates from Iranian Patients by RAPD-PCR

**Siavoshi F**

Department of Microbiology,  
Faculty of Science, Tehran  
University

**Shokouhfard M**

Department of Microbiology,  
Faculty of Science, Tehran  
University

**Malekzadeh R**

Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences

**Dinparast Jadid N**

Department of Biotechnology,  
Pasteur Institute of Iran,  
Tehran

**Massarrat S**

Digestive Disease Research  
Center, Tehran University of  
Medical Sciences

**Emrani A**

Department of Microbiology,  
Faculty of Science, Tehran  
University

**Corresponding Author:**

Farideh Siavoshi PhD,  
Department of Microbiology,  
Faculty of Science, Tehran  
University, Tehran, Iran.  
Tel: +98 21 61112460  
Fax: +98 21 6405141  
E-mail:  
siavoshi@khayam.ut.ac.ir

### ABSTRACT

**Introduction and Aims:** Do *H. pylori* isolates from normal and dyspeptic patients have similar genetic profiles? Since genotype variation occurs within *H. pylori* population with high frequency, it is tempting to exploit techniques such as RAPD-PCR to examine the possible correlation between specific *H. pylori* genotypes and different peptic diseases.

In this study, *H. pylori* isolates from different dyspeptic patients were genotyped by RAPD-PCR.

**Materials and Methods:** *H. pylori* isolates from 66 patients, 41 normal, 21 with ulcer, and 4 with cancer were cultured, DNAs were extracted by phenol-chloroform. RAPD-PCR was optimized, using 10-nt primers of arbitrary sequences (1281, 1254, 1247) and isolate-specific fingerprints were generated. Analysis of PCR products on agarose gel was performed using NTSYSpc program. Dendrograms were calculated according to Jaccard & Nei.

**Results:** According to differences in genetic profiles, *H. pylori* isolates were clustered into 4 distinct groups: 2 groups consisted of isolates from normal patients, 2 groups of isolates from patients with ulcer, and isolates from patients with cancer were clustered along with isolates from normal and ulcer patients. Furthermore, isolates from ulcer patients appeared in the cluster related to isolates from normal patients.

**Conclusions:** Genetic variation is quite frequent within *H. pylori* populations; thus RAPD-PCR is an effective technique to reveal genetic diversity of isolates from different dyspeptic patients. In this study, *H. pylori* strains were clustered into 4 groups: 2 groups from normal patients, and 2 from patients with ulcer. Further studies in larger populations will help to correlate a certain peptic disease to specific strain of *H. pylori*. *Govaresh* 2004; 9: 11-7

**Keywords:** *H. pylori*, Genetic diversity, RAPD-PCR, Dyspepsia diseases

## تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران ایرانی با روش RAPD-PCR

دکتر فریده سیاوشی<sup>۱\*</sup>، دکتر ملیحه شکوه‌فرد<sup>۲</sup>، دکتر رضا ملک‌زاده<sup>۳</sup>، دکتر نوید دین‌پرست جدید<sup>۴</sup>،

دکتر صادق مسرت<sup>۳</sup>، آزاد عمرانی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار، بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

<sup>۲</sup> پژوهشگر، بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

<sup>۳</sup> استاد، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۴</sup> پژوهشگر، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

### خلاصه

#### مقدمه

آیا سویه‌های *H. pylori* جدا شده از افراد طبیعی و بیماران دچار سوءهاضمه، الگوی ژنتیکی مشابهی دارند؟ از آنجا که تنوع ژنتیکی درون جمعیت *H. pylori* به میزان زیاد رخ می‌دهد، شاید بتوان با روشهایی مانند RAPD-PCR رابطه احتمالی بین ژنوتیپ‌های ویژه *H. pylori* و بیماری‌های مختلف معده را تعیین کرد. در این بررسی الگوی ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران دچار سوءهاضمه با روش RAPD-PCR بررسی شدند.

#### مواد و روشها

سویه‌های *H. pylori* جدا شده از ۶۶ بیمار (۴۱ مورد طبیعی، ۲۱ مورد دچار زخم و ۴ مورد دچار سرطان) روی محیط بروسلا آگار کشت شدند. DNA باکتری‌ها با روش فنل-کلروفورم استخراج شد و روش RAPD با استفاده از پرایمرهای ۱۰ نوکلئوتیدی با ترادفهای تصادفی (۱۲۵۴، ۱۲۸۱ و ۱۲۴۷) بهینه شد. محصولات PCR روی ژل آگارز بر اساس اندازه و تعداد باند بررسی شدند و انگشت‌نگاری‌های (Fingerprinting) مختص سویه به دست آمد. تحلیل داده‌های به دست آمده، با استفاده از برنامه NTSYSpc و ترسیم دندروگرام طبق محاسبات Jaccard & Nei انجام شد.

#### نتایج

بر اساس تفاوت در الگوهای ژنتیکی (الگوهای انگشت‌نگاری)، سویه‌های *H. pylori* در ۴ گروه جداگانه دسته‌بندی شدند: دو گروه شامل سویه‌های جدا شده از بیماران طبیعی، و دو گروه شامل سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم. سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی شاخه جداگانه‌ای را در دندروگرام اشغال نکردند و در بین سویه‌های جدا شده از بیماران طبیعی و بیماران دچار زخم قرار گرفتند. همچنین سویه‌هایی از بیماران مبتلا به زخم در دسته مربوط به سویه‌های بیماران طبیعی قرار گرفتند.

#### نتیجه‌گیری

تنوع ژنتیکی در جمعیت *H. Pylori* به‌طور مکرر اتفاق می‌افتد؛ به این ترتیب RAPD-PCR روشی کارآمد است، که تنوع ژنتیکی سویه‌های جدا شده از بیماران مختلف دچار سوءهاضمه را نشان می‌دهد. در این بررسی سویه‌های *H. pylori* در ۴ گروه دسته‌بندی می‌شوند. دو گروه بیماران طبیعی و دو گروه بیماران مبتلا به زخم. با بررسی‌های بیشتر در جمعیت‌های بزرگتر شاید بتوان بین بیماری معدی خاص و سویه معینی از *H. pylori* ارتباطی مشاهده کرد.

گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۷-۱۱

### واژه‌های کلیدی: *H. pylori*، تنوع ژنتیک، RAPD-PCR، بیماری‌های سوءهاضمه

#### مقدمه

شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) در ایران<sup>(۱)</sup> مانند بسیاری از کشورها بالا است<sup>(۲)</sup>. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که

\* نویسنده مسئول: دکتر فریده سیاوشی - دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران

تلفن: ۶۱۱۱۲۴۶۰، نمابر: ۶۴۰۵۱۴۱

E-mail: siavoshi@khayam.ut.ac.ir

الگوی انگشت‌نگاری خاص و ایجاد بیماری گوارشی معین، بررسی شد.

## مواد و روشها

### بیماران

طی این مطالعه مقطعی، نمونه‌های بیوپسی از ۶۶ بیمار شامل ۴۱ بیمار طبیعی (بیمارانی که به علت سوءهاضمه آندوسکوپی شده ولی ضایعه ماکروسکوپی در معده نداشتند)، ۲۱ بیمار دچار زخم و ۴ بیمار دچار سرطان، توسط پزشک متخصص از ناحیه آنتروم گرفته شد و در داخل محیطهای انتقال به آزمایشگاه میکروبی شناسی فرستاده شد. نمونه‌ها طی سال ۱۳۸۲ جمع‌آوری شدند.

### کشت باکتری

نمونه‌های بیوپسی بر روی محیط بروسلا- آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و گرمخانه‌گذاری در شرایط کم‌هوایی (۵٪ CO<sub>2</sub>) و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲ تا ۵ روز انجام شد. هویت باکتری‌ها پس از رنگ‌آمیزی گرم با جواب مثبت آزمایشهای اکسیداز، کاتالاز و اوره‌آز، تأیید گردید. کشت خالص باکتری‌ها به بافر فسفات نمکی منتقل، و تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شد.

### استخراج DNA

استخراج DNA با روش استاندارد فنل-کلروفرم انجام گرفت<sup>(۲۵)</sup>. نمونه‌ها ابتدا با ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده TE<sup>3</sup> با pH=۸، شامل ۱۰ درصد SDS (Sigma)، ۴ میلی‌گرم لیزوزیم (Sigma) و ۲ میکروگرم RNase A (Roche) تیمار شدند. سپس ۴ میکرولیتر پروتئیناز K (20 mg/ml) اضافه گردید و پس از یک ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، حجمهای مساوی فنل و کلروفرم اضافه شد. پس از سانتریفیوژ و جداسازی مایع رویی مرحله آخر دو مرتبه دیگر تکرار شد. به مایع رویی به میزان ۱/۱۰ حجم نمونه استات سدیم ۳ مولار اضافه و در نهایت رسوب DNA با اتانل ۷۰٪ شستشو گردید. DNAهای استخراج شده در بافر TE (pH=۸) در یخچال نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNAها به ترتیب با روشهای اسپکتروفتومتری و الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت<sup>(۲۵)</sup>.

### RAPD-PCR

در این بررسی از پرایمرهای ۱۲۸۳، ۱۲۸۱ و ۱۲۴۷ (Primme, Italy) استفاده شد. پرایمرهای ۱۲۸۳ و ۱۲۴۷ به دلیل عدم تکرارپذیری نتایج از مطالعه حذف و پرایمر ۱۲۸۱ با ترادف

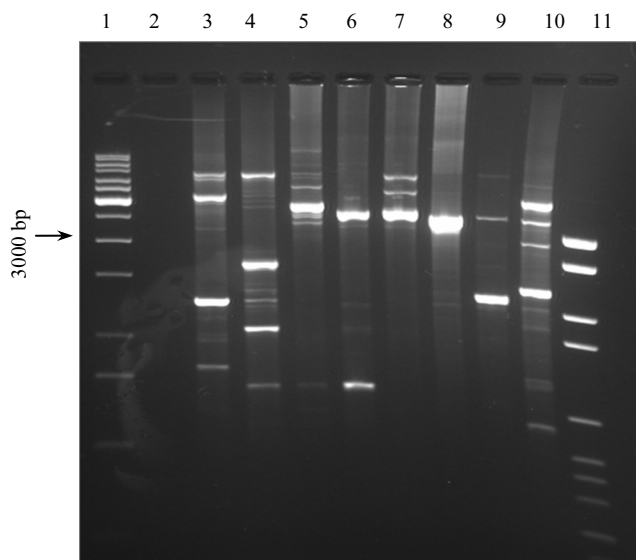
همراه نیست، مشخص نشده است<sup>(۵)</sup>. در این زمینه تأثیر عواملی مثل خصوصیات میزبان انسانی<sup>(۶)</sup>، موقعیت جغرافیایی<sup>(۷)</sup> و همچنین نوع سویه باکتریایی بر عواقب عفونت *H. pylori*<sup>(۸)</sup> به صورت گسترده‌ای در حال بررسی است<sup>(۸)</sup>.

گزارشهای مختلف نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی<sup>۱</sup> قابل توجهی در جمعیت *H. pylori* در نقاط مختلف دنیا وجود دارد. این تنوع ژنتیکی منجر به گوناگونی در خصوصیات بیماری‌زایی باکتری مثل مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ویژگی چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال و حتی تولید توکسین می‌گردد. به نظر می‌رسد زمانی که *H. pylori* از یک میزبان انسانی به میزبان انسانی دیگر انتقال می‌یابد، برای سازگاری با شرایط جدید ناگزیر دچار تغییرات و در نتیجه تنوع می‌شود<sup>(۹-۱۰)</sup>. دلیل تنوع زیاد *H. pylori* را مربوط به پدیده نوترکیبی می‌دانند که به‌طور مکرر در ساختار ژنوم باکتری صورت می‌گیرد. همچنین وجود عفونتهای مخلوط (وجود بیش از یک سویه در یک میزبان انسانی)، امکان تبادل ژنتیکی را بین سویه‌های مختلف فراهم می‌کند<sup>(۱۱-۱۲)</sup>.

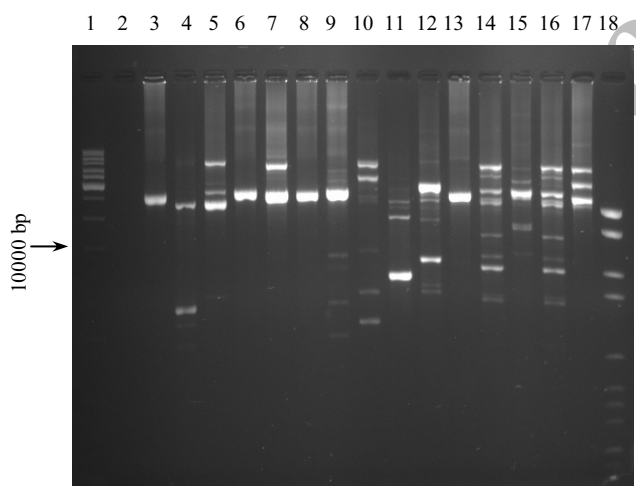
به دلیل میزان بالای تغییرات ژنتیکی در بین سویه‌های *H. pylori* روشهای ملکولی متعددی برای تمایز سویه‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روشها شامل RFLP<sup>(۱۳)</sup>، Ribotyping<sup>(۱۴)</sup>، REP-PCR<sup>(۱۵)</sup>، PFGE<sup>(۱۶)</sup> و RAPD-PCR<sup>(۱۷)</sup> می‌باشند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای گوارشی با روش RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفته است. روش RAPD-PCR یکی از روشهای حساس و کارآمد ملکولی است که برای تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* در جوامع مختلف<sup>(۱۸)</sup> استفاده می‌شود. همچنین این روش در مطالعات اپیدمیولوژیک از جمله بررسی امکان انتقال *H. pylori* بین زوجها<sup>(۱۹)</sup>، یا از طریق آشامیدن آب چاه<sup>(۲۰)</sup>، تشخیص آلوده بودن یک فرد با بیش از یک سویه باکتریایی<sup>(۲۱)</sup> و طراحی درخت فیلوژنی (دندروگرام) برای نمایش میزان قرابت ژنتیکی سویه‌های متفاوت یک گونه به‌کار می‌رود<sup>(۲۲-۲۳)</sup>. در این روش از یک تک پرایمر چند نوکلئوتیدی (اغلب ۱۰ نوکلئوتیدی) استفاده می‌شود که ترادف‌های خاصی (ترادف‌های تکراری معکوس) را در ژنوم باکتری شناسایی و تکثیر می‌کند<sup>(۲۴)</sup>. با داشتن اطلاعات مربوط به محصولات PCR می‌توان الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی<sup>۲</sup> یک باکتری را به دست آورد. با تجزیه و تحلیل الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های به دست آمده از بیماران مختلف، می‌توان درخت فیلوژنی را رسم و سویه‌های باکتریایی را در دسته‌های معین تقسیم‌بندی کرد. در این مطالعه براساس اطلاعات به دست آمده از درخت فیلوژنی، امکان ارتباط بین سویه‌های *H. pylori*

1. heterogeneity
2. genetic fingerprint

3. Tris-EDTA



شکل ۲: الگوی ژنتیکی سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم  
ردیف ۱: مارکر ۱Kb، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف ۳-۱۰: سویه‌های زخم،  
ردیف ۱۱: مارکر ۲۰۰۰bp



شکل ۳: الگوی ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از  
بیماران طبیعی و سرطانی با روش RAPD-PCR  
ردیف ۱: مارکر ۱ Kb، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف ۳-۱۳: سویه‌های  
طبیعی، ردیف ۱۴-۱۷: سویه‌های سرطانی، ردیف ۱۸: مارکر ۲۰۰۰bp

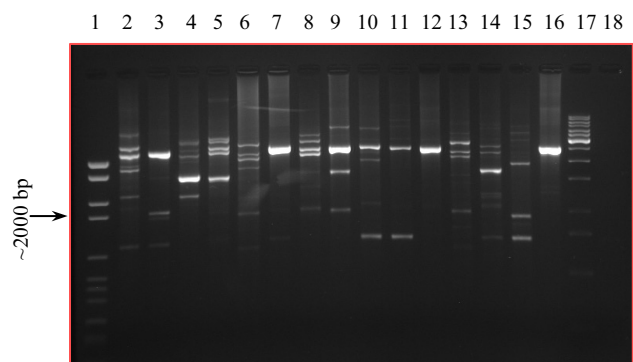
درخت فیلوژنی تهیه شده از ترکیب الگوهای انگشت‌نگاری ژنتیکی ۶۶ سویه *H. pylori* (شکل ۴)، نشان داد که سویه‌های جدا شده از بیماران طبیعی و مبتلا به زخم و سرطان در ۴ گروه شامل دو گروه سویه‌های جدا شده از بیماران طبیعی و ۲ گروه سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم، قرار می‌گیرند. سویه‌های سرطانی شاخه جداگانه‌ای را در درخت فیلوژنی اشغال نکردند و در بین سویه‌های دو

۵'-AACGCGCAAC-3' و دمای annealing ذکر شده در دستور کار شرکت سازنده (۳۶°C) انتخاب شد<sup>(۲۵)</sup>. برای بهینه‌سازی PCR غلظت‌های متفاوت  $MgCl_2$  (fermentas) و آنزیم Taq polymerase (fermentas) و dNTP (Roche) مورد بررسی قرار گرفت<sup>(۲۵)</sup>. غلظت بهینه مواد در حجم کل ۲۵ میکرولیتر، ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۳ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۲۰ پیکومول پرایمر، ۱ آنزیم Taq و ۲۵۰ میکرومولار dNTP تعیین گردید.

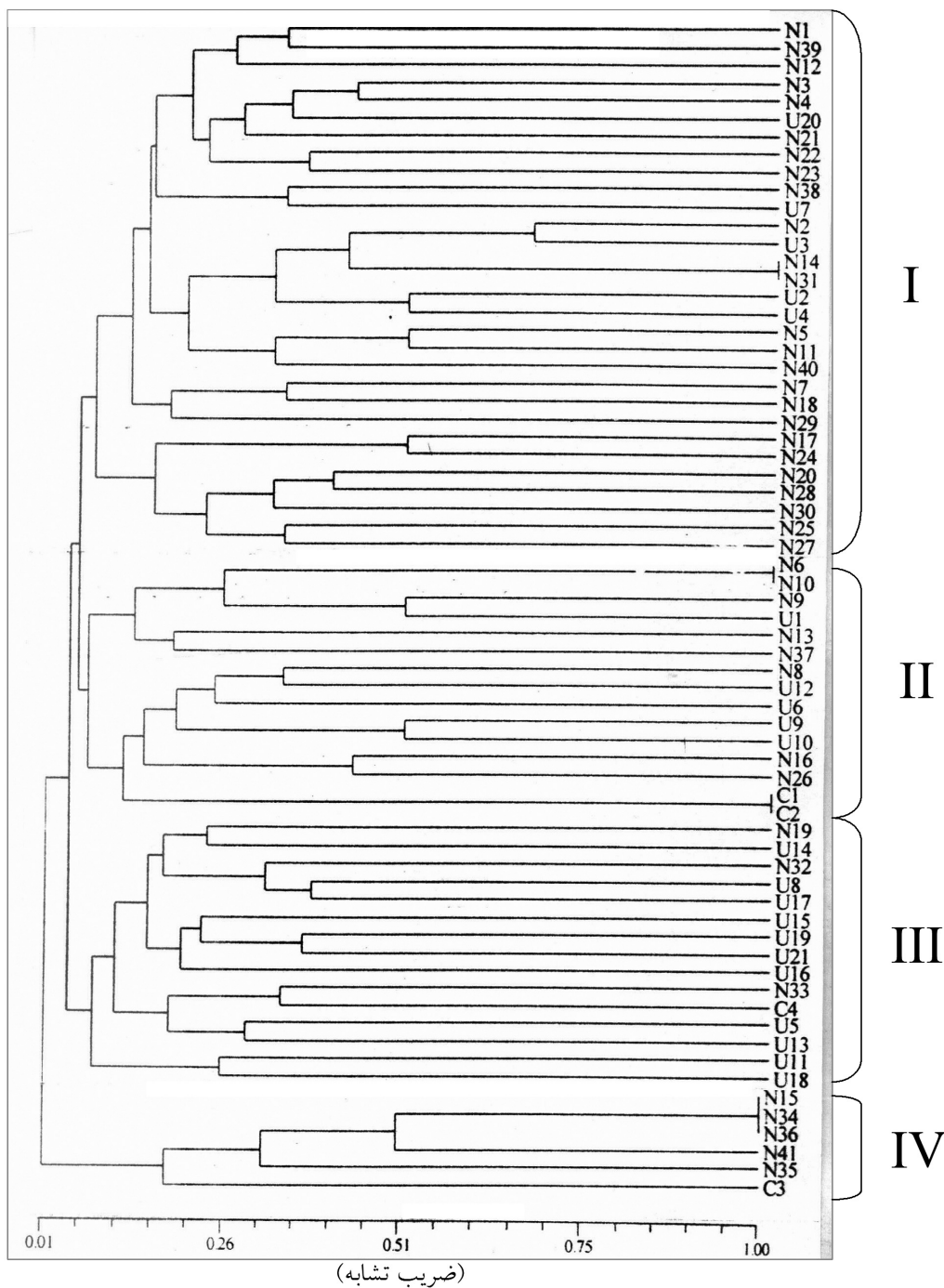
برنامه PCR به صورت زیر بهینه شد: ۴ سیکل (۹۴°C؛ ۵ دقیقه، ۳۶°C؛ ۱ دقیقه، ۷۲°C؛ ۵ دقیقه) و ۳۰ سیکل (۹۴°C؛ ۱ دقیقه، ۳۶°C؛ ۱ دقیقه، ۷۲°C؛ ۲ دقیقه) و مرحله آخر، ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. واکنش PCR با درجه annealing تعیین شده در مورد هر نمونه سه بار تکرار و از تکرارپذیری نمونه‌ها اطمینان حاصل شد<sup>(۲۵)</sup>. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده شدند و از باندهای تشکیل شده، عکسبرداری شد و اندازه باندها با استفاده از شاخص وزن مولکولی تعیین گردید. تجزیه و تحلیل اندازه و تعداد باندها بر اساس برنامه NTSYSpc, version 2.02 و ترسیم دندروگرام طبق محاسبات Jaccard & Nei انجام گرفت و درخت فیلوژنی رسم شد.

## نتایج

نتایج واکنش PCR بر روی ۴۱ سویه جدا شده از بیماران طبیعی نشان داد که هر یک از سویه‌ها الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی مخصوص به خود دارند. تعداد باندها از ۲ تا ۱۱ قطعه DNA و اندازه باندها بین ۱۰۰۰-۵۵۰۰ جفت باز متغیر بود (شکل ۱). محصولات PCR به دست آمده از ۲۱ سویه جدا شده از بیماران مبتلا به زخم گوارشی، ۲ تا ۱۲ باند با اندازه بین ۵۰۰-۶۰۰ جفت باز بودند (شکل ۲). الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی ۴ سویه جدا شده از موارد سرطان معده، شامل ۴ تا ۹ باند با اندازه ۴۲۰-۹۷۰ جفت باز تعیین شد (شکل ۳).



شکل ۱: الگوهای ژنتیکی سویه‌های طبیعی جدا شده از هلیکوباکتر پیلوری با روش RAPD-PCR  
ردیف ۱: مارکر ۲۰۰۰bp، ردیف ۲-۱۷: سویه‌های طبیعی، ردیف ۱۸: مارکر ۱ Kb



شکل ۴: دندروگرام ضریب تشابه سویه‌های هلیکو باکتر پیلوری جدا شده از بیماران طبیعی، مبتلا به زخم و سرطان نمونه‌ها از نظر اندازه و تعداد باند بررسی شدند و داده‌ها به برنامه NTSYS pc داده شد و درخت فیلوژنی متشکل از ۴ گروه (I,II,III,IV) رسم شد. درصد تشابه بین سویه‌ها بر اساس ضریب تشابه نشان داده شده، تعیین می‌شود.  
 N: سویه‌های جدا شده از افراد طبیعی، U: سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم، C: سویه‌های جدا شده از افراد سرطانی

گروه دیگر قرار گرفتند. بر اساس محاسبات به عمل آمده، ۵ سویه جدا شده از موارد زخم در داخل یکی از شاخه‌های مربوط به سویه‌های بیماران طبیعی و ۱۱ سویه جدا شده از افراد طبیعی در گروه سویه‌های مربوط به زخم قرار گرفتند.

## بحث

در سالهای اخیر *H. pylori* به‌عنوان یک عامل مهم در ایجاد بیماری‌های گوارشی از جمله زخم و سرطان معده مطرح شده‌است. بنابراین یکی از اقدامات اساسی در جهت پیشگیری از عواقب شدید عفونت این باکتری، شناسایی سویه‌های بیماری‌زا و تمایز آنها از سویه‌های غیر بیماری‌زا و پی‌آمد آن به‌کارگیری فرمول‌های درمانی مناسب است. بررسی خصوصیات فنوتیپیک سویه‌های *H. pylori* مثل فعالیت اوره‌از اطلاعات مفیدی در مورد طبیعت و شدت بیماری‌زایی آنها در اختیار قرار نمی‌دهد، به همین دلیل دانشمندان هنوز با موشکافی‌های ظریفتر در جست‌وجوی شاخص‌هایی اختصاصی‌تر و دقیق‌تر هستند. الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی یک موجود مانند باکتری، حاوی اطلاعاتی است که الزاماً به‌صورت صفات فنوتیپیک خاصی ظاهر نمی‌شود، ولی می‌تواند به‌عنوان یک شاخص ژنتیکی برای تمایز دقیق سویه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. RAPD-PCR یکی از روش‌هایی است که توسط آن می‌توان الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های باکتریایی را مشخص کرد. این روش امروزه کاربرد مهمی در تقسیم‌بندی سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران مختلف پیدا کرده است. Smith و همکاران قدرت تمایز روش‌های RAPD، RFLP و آنالیز ساترن بلات وجود ژن UreA یا UreCD را روی ۳۳ سویه *H. pylori* جدا شده از افراد نیجری بررسی کردند و نتیجه گرفتند که قدرت تمایز و دسته‌بندی کردن<sup>۴</sup> و سادگی RAPD نسبت به دیگر روش‌ها بیشتر است<sup>(۲۶)</sup>.

در این مطالعه تعداد ۶۶ سویه *H. pylori* جدا شده از بیماران طبیعی و مبتلا به زخم و سرطان با روش RAPD-PCR مورد تجزیه و تحلیل ملکولی قرار گرفتند و الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی آنها تعیین شد. در این بررسی با به‌کارگیری یک تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، باندهای مخصوص به سویه تا ۱۲ قطعه مشاهده شد. Akopyanz و همکاران در سال ۱۹۹۲ با به‌کارگیری تک پرایمرهای ۱۰ نوکلئوتیدی از جمله تک پرایمر ۱۲۸۱ نشان دادند که باندهای مخصوص به سویه تا ۱۵ قطعه بارز را تشکیل می‌دادند<sup>(۲۵)</sup>.

نتایج مطالعه بر روی ۶۶ سویه *H. pylori* جدا شده از بیماران ایرانی نشان داد که هر یک از سویه‌ها الگوی مختص خودشان را دارند. Akopyanz و همکاران نیز با استفاده از روش RAPD توانستند سویه‌های جدا شده از ۵۳ بیمار طبیعی، دو بیمار مبتلا به زخم معده

و یک بیمار مبتلا به متاپلازی روده‌ای را از هم متمایز سازند. نتایج مطالعه مذکور نیز نشان داد که هر کدام از سویه‌ها الگوی مختص خودشان را دارند. نتایج این مطالعات میزان بالای تنوع ترادف‌های خاص DNA را در بین سویه‌های *H. pylori* نشان می‌دهد<sup>(۲۵)</sup>.

در این بررسی بر اساس نتایج به دست آمده، سویه‌های *H. pylori* در ۴ گروه شامل دو گروه مربوط به سویه‌های جدا شده از بیماران طبیعی و دو گروه مربوط به سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند. به دلیل اینکه باندهای ۴۲۰۰، ۲۵۰۰ و ۱۴۵۰ جفت باز در هر دو گروه سرطانی و طبیعی دیده شد، گروه سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی شاخه جداگانه‌ای را در درخت فیلوژنی اشغال نکردند و در بین سویه‌های مربوط به بیماران طبیعی و مبتلا به زخم قرار گرفتند. به دلیل وجود باند مشترک ۲۴۵۰ جفت باز در بین سویه‌های مربوط به هر دو گروه بیماران طبیعی و دارای زخم بعضی از سویه‌های طبیعی هم در بین سویه‌های بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند. با مطالعاتی که در آفریقای جنوبی روی ۱۶ سویه جدا شده از بیماران طبیعی، ۲۶ سویه از موارد زخم گوارشی و ۱۵ سویه از موارد سرطان معده با روش RAPD-PCR انجام گرفت، نشان داده شد که الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* از ۷-۱ باند مجزا با اندازه ۴۶۰۰-۱۰۰ جفت باز متغیر است. تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی در مطالعه مذکور نشان داد که تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های *H. pylori* وجود دارد و سویه‌ها با ضریب شباهت ۴/۳ ± ۶۴/۲٪ در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند. بنابراین سویه‌های جدا شده با الگوی انگشت‌نگاری معین برای هر بیماری خاص گوارشی به‌طور جداگانه گروه‌بندی نمی‌شوند<sup>(۲۷)</sup>.

مطالعه حاضر و مطالعات مشابه نشان می‌دهند که روش RAPD-PCR یک روش مناسب برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های *H. pylori* است. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* آن قدر گسترده است که نمی‌توان سویه‌های مربوط به بیماران طبیعی، دارای زخم و سرطان را در گروه‌های معین و جداگانه قرار داد. در عین حال این نتیجه‌گیری زمانی قابل استناد است که تعداد گزارش‌ها افزایش یابد و تعداد سویه‌های بیشتری از *H. pylori* و با پرایمرهای بیشتری در هر مطالعه بررسی شوند. اعضای گونه *H. pylori* به دلیل قرار گرفتن در میزبان‌های انسانی متفاوت و مواجهه با شرایط محیطی مختلف ممکن است دست‌خوش تغییراتی شوند که نتیجه سازگاری مطلوب با میزبان و ظهور زیر گونه‌های جدید است. تعیین این زیر گونه‌ها از نظر اپیدمیولوژی و تعیین منشأ آلودگی و راه انتقال مهم است. امروزه با پیشرفت و تحول روش‌های بیولوژی ملکولی باید امید داشت که تعیین زیر گونه‌های *H. pylori* به دقت انجام گیرد و شناسایی منشأ آلودگی در طبیعت مانند آب و

## 4. typeability

ریبوزومی را نشان می‌دهد.

**Vac A (Vacuolating cytotoxin A):** توکسین ایجاد کننده واکوئول که در همه سویه‌های *H. pylori* تولید می‌شود و با اختلال در V-ATPase واقع در غشای واکوئول سلول‌های اپیتلیال، باعث جذب آب و بزرگتر شدن واکوئول یا تشکیل واکوئول‌های جدید می‌شود. Vac A همچنین از الحاق فاگوزوم- لیزوزوم و انهدام سلول باکتریایی در فاگولیزوزوم ماکروفاژها ممانعت می‌کند. Vac A همچنین با حذف سیتوکروم C از سیستم انتقال الکترونی باعث القای خودکشی سلولی می‌شود. پروتئین Vac A از دو بخش، پپتید نشانه (s, signal) و بخش میانه (middle, m) تشکیل شده که هر کدام به صورت s1 (با زیر مجموعه s1a, s1b, s1c) و s2 و m1 و m2 تقسیم‌بندی شده‌اند. به نظر می‌رسد که نوع s1/m1 میزان توکسین بیشتری تولید می‌کند ولی نوع s1/m2 توکسین کمتری تولید می‌کند و میزان توکسین تولید شده توسط نوع s2/m2 خیلی کم یا هیچ است. اکثر سویه‌های *H. pylori* از نوع Vac As1، CagA مثبت نیز هستند، بنابراین وجود هر دو پروتئین به‌عنوان شاخص بیماری‌زایی باکتری مطرح است.

**CagA (Cytotoxin associated gene A):** ژن رمزکننده پروتئین CagA که در یک مجموعه ژنی به نام «جزیره بیماری‌زایی» (Pathogenicity Island, PAI) قرار گرفته است. تعدادی از ژن‌های این جزیره تولید یک سیستم ترش‌چی (نوع IV) می‌کنند که به صورت زانده‌ای شبیه سوزن، از سلول باکتری بیرون می‌زند و CagA را به درون سلول اپیتلیال تزریق می‌کند. CagA در سلول توسط تیروزین کیناز در محل اسیدهای آمینه تیروزین فسفریله می‌شود و به سیستم انتقال پیام سلولی متصل می‌شود، بدین ترتیب باعث فعال شدن فسفاتازها و در نتیجه تحریک تکثیر و تحرک غیر طبیعی سلول‌ها می‌شود. شدت عواقب عفونت با *H. pylori* را با وجود CagA مرتبط می‌دانند. در کشورهای آسیایی اکثر سویه‌های مطالعه شده CagA مثبت بوده‌اند، در صورتی که در کشورهای غربی بین ۱/۳ تا ۱/۲ موارد مثبت گزارش شده است، به همین دلیل موارد زخم، آتروفی و سرطان معده در کشورهای آسیایی به مراتب بیشتر از کشورهای غربی می‌باشد. مشخص شده نه تنها فراوانی CagA، بلکه ترادف نوکلئوتیدی آن نیز در این مناطق متفاوت است.

**Dendrogram (درخت فیلوژنی):** نموداری است که میزان درصد شباهت بین سویه‌های باکتریایی را نشان می‌دهد.

**لیزوزیم:** آنزیمی است که دیواره سلولی باکتری‌ها را تجزیه می‌کند. نقطه اثر این آنزیم اتصالات  $\beta$  (۴-۱) -N استیل میورامیل در پپتیدوگلیکان دیواره سلولی است.

**دمای Annealing:** دمایی که در آن پرایمر به DNA الگو می‌چسبد و تکثیر ژن مورد نظر آغاز می‌شود.

همچنین تعیین پراکندگی یک سویه خاص در بین افراد یک خانواده یا اجتماعات بزرگتر امکان‌پذیر شود<sup>(۲۸)</sup> و مهمتر از همه اینکه با دسترسی به جزئیات الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا، شاید بتوان عواقب ابتلا به عفونت یک سویه خاص *H. pylori* را پیش‌بینی و راهکارهای درمانی مناسب را اتخاذ کرد.

## واژه نامه

**Genetic fingerprinting:** انگشت‌نگاری ژنتیکی. یک روش هیبریداسیون که قادر به شناسایی سازمان یافتن یک توالی پلی‌مورفیک به صورت یک الگوی ویژه برای هر موجود زنده، می‌باشد.

**Recombination:** تعویض توالی‌های DNA در بین ملکول‌های DNA مختلف که به صورت طبیعی یا با دستکاری ژنتیکی انجام می‌شود.

**Heterogeneity:** تنوع ژنتیکی حاصل از نوترکیبی در ژنوم باکتری.

**RAPD-PCR (Random amplified polymorphism DNA):** تکثیر قطعات DNA با اندازه‌های متفاوت به وسیله PCR که با استفاده از پرایمرهای کوتاه برای تکثیر قطعات خاصی (تکراری معکوس) از ژنوم به کار می‌رود. با این روش می‌توان ساختار ژنوم ارگانسیم‌های مختلف را مقایسه کرد.

**RFLP (Restriction fragment length polymorphism):** چند شکلی (پلی‌مورفسم) در قطعات حاصل از هضم با آنزیم‌های برش‌دهنده. جهشی که موجب تغییر در الگوی قطعات حاصل از هضم مولکول DNA توسط آنزیم‌های برش‌دهنده می‌گردد.

**REP-PCR (Repetitive extragenic palindromic):** نوعی PCR که باعث تکثیر قطعات ژنتیکی قرار گرفته ما بین توالی‌های تکراری که در نقاط مختلف ژنوم پخش می‌باشند، می‌شود و یک الگوی ویژه برای هر موجود به دست می‌آید.

**PFGE (Pulsed- field gel electrophoresis):** در این روش هضم DNA کروموزومی با آنزیم‌های برش‌دهنده صورت می‌گیرد و قطعات DNA ایجاد شده با تغییرات منظم و متناوب جهت میدان الکتریکی، در روی ژل، در جهات مختلف مهاجرت می‌کند. با هر تغییر در جهت میدان الکتریکی، DNA در جهت جدید حرکت می‌کند.

**Phenotype:** خصوصیات ظاهری که با روشهای بیوشیمیایی مانند سروتایپینگ، فازتایپینگ (تعیین نوع باکتری با استفاده از شاخصهای ویروسی یا باکتریوفازی) قابل بررسی و شناسایی هستند.

**Ribotyping:** روشی است که فقط قطعات برشی ژنهای RNA



- Massarrat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A *et al.* Peptic ulcer disease, irritable bowel syndrome and constipation in two populations in Iran. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1995; **7**: 427-33.
- Frenck RW Jr, Clemens J. Helicobacter in the developing world. *Microbes Infect.* 2003; **5**: 705-13.
- Blaser MJ. The versatility of *Helicobacter pylori* in the adaptation to the human stomach. *J Physiol Pharmacol.* 1997; **48**: 307-14.
- Azuma T, Yamakawa A, Yamazaki S *et al.* Distinct diversity of the cag pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 2508-17.
- Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med.* 1994; **120**: 977-81.
- Del Giudice G, Michetti P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2004; **9** (Suppl 1): 23-8.
- Lee KH, Cho MJ, Yamaoka Y *et al.* Alanine-threonine polymorphism of *Helicobacter pylori* RpoB is correlated with differential induction of interleukin-8 in MKN45 cells. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 3518-24.
- Go MF, Graham DY. How does *Helicobacter pylori* cause duodenal ulcer disease: the bug, the host, or both? *J Gastroenterol Hepatol.* 1994; **9** (Suppl 1): S8-10.
- Hazell SL, Andrews Rh, Mitchell HM *et al.* Genetic relationship among isolates of *Helicobacter pylori*: evidence for the existence of a *Helicobacter pylori* species-complex. *FEMS Microbiol Lett.* 1997; **150**: 27-32.
- Marshall DG, Dundon WG, Beesley SM *et al.* *Helicobacter pylori*--a conundrum of genetic diversity. *Microbiology.* 1998; **144**: 2925-39.
- Logan RP, Berg DE. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1996; **348**: 1462-3.
- Taylor NS, Fox JG, Akopyants NS *et al.* Long-term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**: 918-23.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU *et al.* PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Res.* 1992; **20**: 622.
- Desai M, Linton D, Owen RJ *et al.* Genetic diversity of *Helicobacter pylori* indexed with respect to clinical symptomatology, using a 16S rRNA and a species-specific DNA probe. *J Appl Bacteriol.* 1993; **75**: 574-82.
- Go MF, Chan KY, Versalovic J *et al.* Cluster analysis of *Helicobacter pylori* genomic DNA fingerprints suggests gastroduodenal disease-specific associations. *Scand J Gastroenterol.* 1995; **30**: 640-6.
- Salama SM, Jiang Q, Chang N *et al.* Characterization of chromosomal DNA profiles from *Helicobacter pylori* strains isolated from sequential gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**: 2496-7.
- Berg DE, Akopyants NS, Kersulyte D. Fingerprinting microbial genome using the RAPD or AP-PCR method. *Methods Molecular Cell Biol.* 1994; **5**: 13-24.
- Yakoob J, Hu GL, Fan XG, *et al.* Diversity of *Helicobacter pylori* among Chinese persons with H. pylori infection. *APMIS.* 2000; **108**: 482-6.
- Kuo CH, Poon SK, Su YC *et al.* Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from H. pylori-infected couples in Taiwan. *J Infect Dis.* 1999; **180**: 2064-8.
- Karita M, Teramukai S, Matsumoto S. Risk of *Helicobacter pylori* transmission from drinking well water is higher than that from infected intrafamilial members in Japan. *Dig Dis Sci.* 2003; **48**: 1062-7.
- Kim JW, Kim JG, Chae SL *et al.* High prevalence of multiple strain colonization of *Helicobacter pylori* in Korean patients: DNA diversity among clinical isolates from the gastric corpus, antrum and duodenum. *Korean J Intern Med.* 2004; **19**: 1-9.
- Power EG. RAPD typing in microbiology - a technical review. *J Hosp Infect.* 1996; **34**: 247-65.
- Bush U, Nitschko H. Methods for the differentiation of microorganisms. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; **722**: 263-78.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990; **24**: 7213-8.
- Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU *et al.* DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992; **20**: 5137-42.
- Smith S, Cantet F, Angelini F *et al.* Discriminatory power of RAPD, PCR-RFLP and southern blot analyses of ureCD or ureA gene probes on *Helicobacter pylori* isolates. *Z Naturforsch [C].* 2002; **57**: 516-21.
- Kidd M, Atherton JC, Lastovica AJ *et al.* Clustering of South African *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic-PCR Kid fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 1833-9.
- Swaminathan B, Barrett TJ. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious disease. *J Micro Methods.* 1995; **23**: 129-39.