گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۹-۸۱

انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *Helicobacter Pylori* جدا شده از بیماران ایرانی به روش REP-PCR

دکتر فریده سیاوشی[۱*]، ساناز ذبیحی نیا[۲]، دکتر رضا ملک‌زاده[۳]، دکتر نوید دین‌پرست جدید[۴]، دکتر صادق مسرّت[۳]، آزاد عمرانی[۱]

[۱] استادیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

[۲] پژوهشگر، بخش میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

[۳] استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۴] استادیار، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

خلاصه

مقدمه

عفونت هلیکوباکتر پیلوری با بیماریهای گوارشی و عواقب سخت آن مثل زخم و سرطان معده در ارتباط است. از آنجا که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در جمعیت *H. pylori* دیده می‌شود، با به‌کارگیری روشهای ملکولی مانند PCR و طراحی شاخصهای ژنتیکی می‌توان سویه‌های جدا شده از بیماران گوارشی مختلف را بررسی کرد، با این فرضیه که شاید ارتباطی بین خصوصیات ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری و بیماری گوارشی خاصی وجود داشته باشد. در این مطالعه انگشت‌نگاری ژنتیکی ۶۱ سویه *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم و سرطان معده انجام شد و الگوهای به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

مواد و روشها

DNA از ۶۱ سویه *H. pylori* جدا شده از ۳۹ فرد طبیعی، ۱۸ بیمار مبتلا به زخم و ۴ بیمار مبتلا به سرطان معده استخراج گردید و REP-PCR انجام شد. برای تکثیر مناطق خاص حد فاصل بین توالیهای معکوس و تکراری موجود در سراسر ژنوم باکتری، یک جفت پرایمر ۱۸ نوکلئوتیدی، از قبل طراحی و به کار گرفته شدند. شرایط واکنش PCR بهینه شدند و تکرارپذیری واکنشها مورد بررسی قرار گرفت. محصولات PCR الکتروفورز شدند، سپس تعداد و اندازه باندهای به دست آمده، با استفاده از شاخص وزن ملکولی (مارکر) تعیین شدند. تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده با برنامه کامپیوتری NTSYS-pc انجام و دندروگرام رسم گردید.

نتایج

از میان ۳۹ سویه *H. pylori* به دست آمده از بیماران طبیعی، ۲۸ نمونه در یک گروه مجزا قرار گرفتند و ۵ سویه در گروه سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند. ۶ سویه باقیمانده در فاصله‌ای دورتر از سایر سویه‌ها در گروههای جداگانه (IV-VI) قرار گرفتند. از میان ۱۸ سویه جدا شده از بیماران دارای زخم، ۱۷ سویه در یک گروه مجزا قرار گرفتند و فقط یک سویه در میان سویه‌های طبیعی طبقه‌بندی شد. سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی نیز در یک گروه کاملاً مجزا از سایر سویه‌ها قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه با روش REP–PCR تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری بررسی و نشان داده شد که اغلب سویه‌های جدا شده از افراد طبیعی و بیماران مبتلا به زخم و سرطان، هر کدام الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی مخصوص به خود دارند و در گروههای مجزا قرار می‌گیرند؛ ولی سویه‌های جدا شده از یک گروه بیمار (بیماران مبتلا به زخم یا سرطان) بیشتر به یکدیگر شبیه می‌باشند. این مطالعه نشان داد که REP–PCR یک روش دقیق، مؤثر و تکرارپذیر برای انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های مختلف *H. pylori* است. به نظر می‌رسد که با بررسی سویه‌های بیشتر با این روش، شاید بتوان ارتباط بین عفونت یک سویه خاص *H. pylori* و بیماری گوارشی مشخص را به دقت تعیین نمود. *گوارش*، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۹-۸۱

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری *(H. pylori)*، بیماریهای گوارشی، REP-PCR، انگشت‌نگاری ژنتیکی

مقدمه

مطالعات نشان داده است که عفونت *H. pylori* با گاستریت رابطه حتمی دارد[(۱)] و تعدادی از افراد آلوده به باکتری، دچار زخم یا

* *نویسنده مسئول: دکتر فریده سیاوشی- دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران*
تلفن: ۶۱۱۱۲۴۶۰ نمابر: ۶۴۰۵۱۴۱
E-mail: siavoshi@khayam.ut.ac.ir

www.SID.ir

سرطان معده می‌شوند[۲]، و چون بسیاری از افراد مبتلا به عفونت *H. pylori* شکایتی از عوارض گوارشی نمی‌کنند[۳]، بررسی و تعیین فاکتورهای میزبانی و باکتریایی که می‌توانند در بروز عوارض گوارشی مختلف مؤثر باشند، از اهمیت زیادی برخوردارند. مطالعه فاکتورهای میزبانی دخیل در بروز بیماریهای گوارشی به دلیل در دسترس نبودن مدلهای حیوانی مناسب مشکل است، با وجود این شناسایی فاکتورهایی مانند چسبنده (Adhesin)های BabA و SabA واقع در روی سلولهای اپیتلیال معده، و توجه به نقش آنها در استقرار *H. pylori* و ایجاد بیماریهای گوارشی، افق جدیدی را پیش روی محققین گشوده است[۴]. شناخت عواملی مانند VacA و CagA در ارتباط با فاکتورهای بیماریزایی *H. pylori*، زمینه مهمی را برای مطالعه چگونگی ارتباط این باکتری با میزبان انسانی فراهم آورده است[۵]. با وجود این محققین هنوز موفق نشده‌اند ارتباط دقیقی بین فاکتورهای میزبانی، باکتریایی و نوع بیماریهای گوارشی تعیین کنند[۶]. به همین دلیل، ابداع روشهای قدرتمندی که بتوان با به‌کارگیری آنها جزئیات دقیقتری دربارهٔ این ارتباط به دست آورد اجتناب‌ناپذیر است. از طرف دیگر، در سالهای اخیر دانشمندان به جای استفاده از خصوصیات فنوتیپی (مشخصات ظاهری) برای دسته‌بندی باکتریها تلاش می‌کنند تا از خصوصیات ژنوتیپی (مشخصات ژنتیکی) برای تقسیم‌بندی دقیقتر باکتریها استفاده کنند. به همین دلیل، امروزه محققین با به‌کارگیری روشهای بیولوژی ملکولی، الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* جدا شده از افراد مختلف را مورد مطالعه قرار می‌دهند، با این هدف که شاید ارتباط معنی‌داری بین سویه‌های *H. pylori* با الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی خاص و عارضه گوارشی معین پیدا کنند[۷].

روشهای متعددی به‌منظور تمایز سویه‌های *H. pylori* به کار می‌روند که عبارتند از: روشهای تعیین فنوتیپ به‌وسیله الگوهای الکتروفورز پروتئین، بیوتایپینگ و سروتایپینگ[۸] و نیز روشهای مطالعه ژنوتیپ مانند: Restriction endonuclease analysis[۹]، Pulsed field gel electrophoresis[۱۰]، ریبوتایپینگ[۱۱] و PCR مانند:

RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA- PCR) [۱۲] و

REP-PCR (Repetitive extragenic palindromic PCR) [۱۳]

وجود ترادفهای DNA تکراری در ژنوم باکتریها به اثبات رسیده است[۱۴] که در بین آنها ترادفهای REP (Repetitive Extragenic Palindromic) شناخته شده‌تر می‌باشند. این ترادفهای تکراری معکوس به‌صورت عناصر ژنتیکی بسیار حفظ شده و به تعداد زیاد در سراسر ژنوم پراکنده می‌باشند[۱۵]. قطعات ژنتیکی موجود در بین این ترادفهای تکراری را می‌توان با روش REP-PCR تکثیر کرد[۱۶]. اندازه و تعداد محصولات PCR، الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی یک سویه باکتری را تشکیل می‌دهند. با استفاده از این اطلاعات می‌توان سویه‌های *H. pylori* را در گروههای خاص، تقسیم‌بندی و ارتباط آنها را با بیماریهای گوارشی مختلف بررسی کرد. امروزه الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی باکتریها کاربرد مهمی در مطالعات اپیدمیولوژیک و روشن کردن میزان انتشار و نحوهٔ انتقال عوامل عفونی دارد[۱۷]. در این مطالعه، الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی ۶۱ سویه *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف گوارشی، به روش REP-PCR تعیین و درخت فیلوژنی (دندروگرام) مربوط به آنها ترسیم شد.

مواد و روشها

بیماران: در این مطالعهٔ مقطعی در سال ۱۳۸۲، نمونه‌های بیوپسی از آنتروم معده ۶۱ بیمار که در آنها وجود عفونت *H. pylori* با تست اوره‌آز سریع تأیید شده بود، گرفته شد. بیماران شامل ۳۹ فرد طبیعی (گاستریت)، ۱۸ فرد مبتلا به زخم و ۴ فرد مبتلا به سرطان بودند. نمونه‌های بیوپسی جمع‌آوری شده در محیط ترانسپورت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شدند.

کشت بیوپسی: نمونه‌های بیوپسی در آزمایشگاه روی محیط کشت انتخابی (بروسلا آگار) حاوی خون تاریخ گذشته انسان (۷٪) و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2 دار به مدت ۵-۳ روز قرار گرفتند. تعیین هویت باکتری‌ها به‌عنوان *H. pylori* با رنگ‌آمیزی گرم و تست اکسیداز، کاتالاز و اوره‌آز انجام شد.

استخراج DNA: استخراج DNA با روش استاندارد فنل-کلروفرم انجام گرفت. باکتری‌های کشت شده، ابتدا با بافر لیزکننده شامل: ۵۰۰ میکرولیتر TE (Tris-EDTA, pH 8)، ۴ میلی‌گرم لیزوزیم (Sigma, USA)، ۲ میکروگرم RNase A (Roche, Germany) و SDS (سدیم دودسیل سولفات) (Merck, Germany) به میزان ۱۰٪ در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند، سپس ۴ میکرولیتر پروتئیناز K (Sigma, USA) (20 mg/ml) اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند، به محلول فوق حجمهای مساوی از فنل و کلروفرم اضافه و سانتریفوژ گردید. سپس به میزان ۱/۱۰ حجم هر نمونه، استات سدیم ۳ مولار اضافه و در نهایت رسوب DNA با اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

DNAهای استخراج شده در بافر TE (pH 8) در یخچال نگهداری شدند و سپس کمیت و کیفیت آنها با روشهای اسپکتروفتومتری و الکتروفورز به‌ترتیب مورد تأیید قرار گرفت[۱۲].

PCR: پرایمرهای ۱۸ نوکلئوتیدی REP 1R-Dt (5´IIINCGNCGNCATCNGGC 3') و REP2-Dt (5' RCGYCTTATCMGGCCTAC 3') (Primme,Italy) برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفتند[۱۳]. دمای annealing مطابق با مقالات مورد استفاده ۴۵ درجه در نظر گرفته شد[۱۳].

شرایط PCR، با استفاده از غلظتهای مختلف DNA الگو (۱۰۰-۵۰ نانوگرم)، پرایمرها (۲۰۰- ۵۰ پیکومول)، dNTP (دی‌اکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات) (۵– ۰/۲ میکرولیتر) (Roche, Germany) بافر حاوی $MgCl_2$ (15 mM) (۳/۵- ۲/۵ میکرولیتر) (Roche, Germany) و همچنین آنزیم Taq پلیمراز (Roche) 2U، بهینه‌سازی شد. غلظتهای بهینه اجزای واکنش PCR در ml ۲۵، عبارتند از: پرایمرها هر کدام ۵۰ پیکومول، DNA الگو ۱۰۰ نانوگرم، mM ۰/۶۲۵ از هر یک از dNTPها، U 2 از آنزیم Taq و ۲/۵ میکرولیتر بافر حاوی $MgCl_2$.

برنامه واکنش PCR، به‌ترتیب زیر تعیین شد: یک سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۷ دقیقه)، ۳۰ سیکل (۹۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه؛ ۴۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه؛ ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۸ دقیقه) و یک سیکل نهایی (۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ دقیقه).

ml ۵ از محصولات PCR به همراه Loading buffer 1 ml روی ژل آگارز ۱/۵٪ دارای رنگ اتیدیوم بروماید برده شد و پس از مشاهده با نور UV عکسبرداری انجام گرفت. واکنش PCR برای هر نمونه، سه بار انجام شد و از تکرارپذیری واکنش اطمینان حاصل گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: تعداد و اندازه باندهای مربوط به هر سویه از طریق مقایسه با شاخصهای وزن ملکولی (Kb ۱ و Kb ۲/۱ - ۰/۱۵) تعیین شد. حضور یا عدم حضور باند (عدد ۱ برای حضور باند و عدد صفر برای عدم حضور باند) ثبت گردید[۱۳]. نتایج حاصل، با استفاده از برنامه کامپیوتری NTSYS- pc (version2.02) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و درخت فیلوژنی رسم شد.

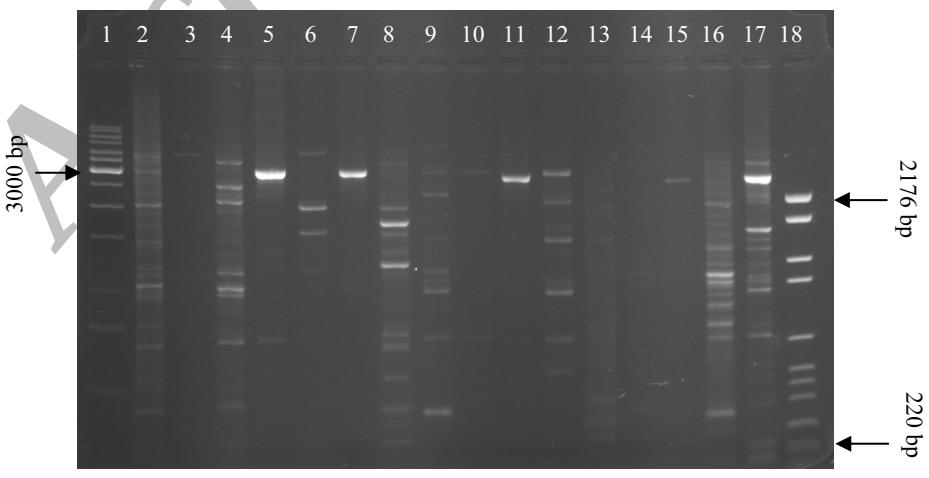
نتایج

الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های جدا شده از ۳۹ بیمار طبیعی شامل ۲۶-۶ باند بود، اندازه باندها نیز از bp ۱۰۰۰۰- ۲۵۰ متغیر بودند (شکل ۱).

الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های جدا شده از ۱۸ بیمار مبتلا به زخم شامل ۱۸-۱ باند با اندازه bp ۱۰۰۰۰- ۳۵۰ بود (شکل ۲).

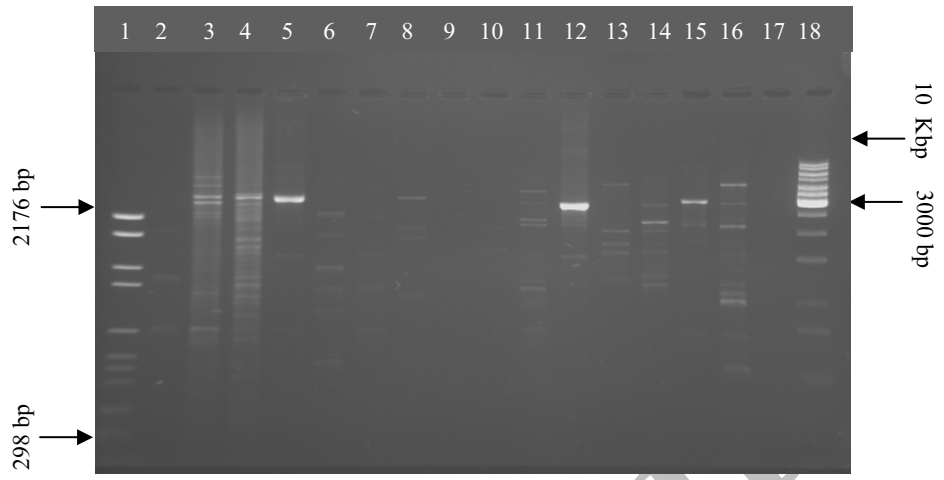
الگوی انگشت‌نگاری سویه‌های جدا شده از ۴ بیمار مبتلا به سرطان شامل ۱۰- ۲ باند با اندازه bp ۲۵۰۰ - ۲۵۰ بود (شکل ۳).

ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از اطلاعات به دست آمده نشان داد که سویه‌های *H. pylori* در سه گروه عمده قرار می‌گیرند (شکل ۴)؛ یک گروه شامل ۷۲/۵ ٪ از نمونه‌های طبیعی با میانگین تشابه ۵۵٪، یک گروه شامل ۹۹٪ از نمونه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم با میانگین تشابه ۳۴٪ و یک گروه شامل ۱۰۰٪ نمونه‌های جدا شده از بیماران سرطانی با میانگین تشابه ۴۳٪ بود. شش نمونه طبیعی (۱۵٪) نیز جدا از سایر نمونه‌ها دسته‌بندی شدند. جز دو سویه

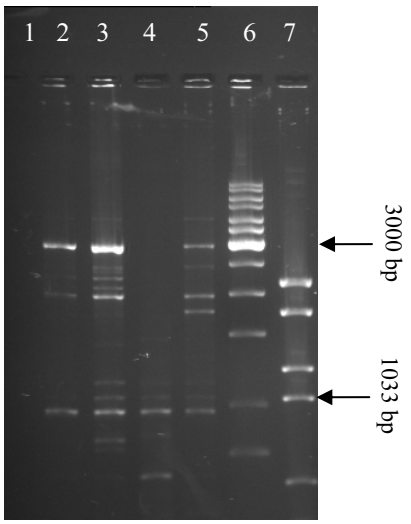


شکل ۱: الگوهای انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از افراد طبیعی با روش REP-PCR
چاهک ۱: مارکر Kb p ۱، چاهک ۲ تا ۱۷: سویه‌های باکتریایی، چاهک ۱۴: کنترل منفی، چاهک ۱۸: مارکر (2.1 Kbp– 0.15)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲: الگوهای انگشت‌نگاری سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به زخم با روش REP-PCR.
چاهک ۱: مارکر (2.1 Kbp – 0.15)، چاهک ۲ تا ۱۶: سویه‌های باکتریایی، چاهک ۱۷: کنترل منفی، چاهک ۱۸: مارکر 1 Kbp



شکل ۳: الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان
چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲ تا ۵: سویه‌های باکتریایی، چاهک ۶: مارکر 1 Kbp، چاهک ۷: مارکر (2.1 Kbp- 0.15)

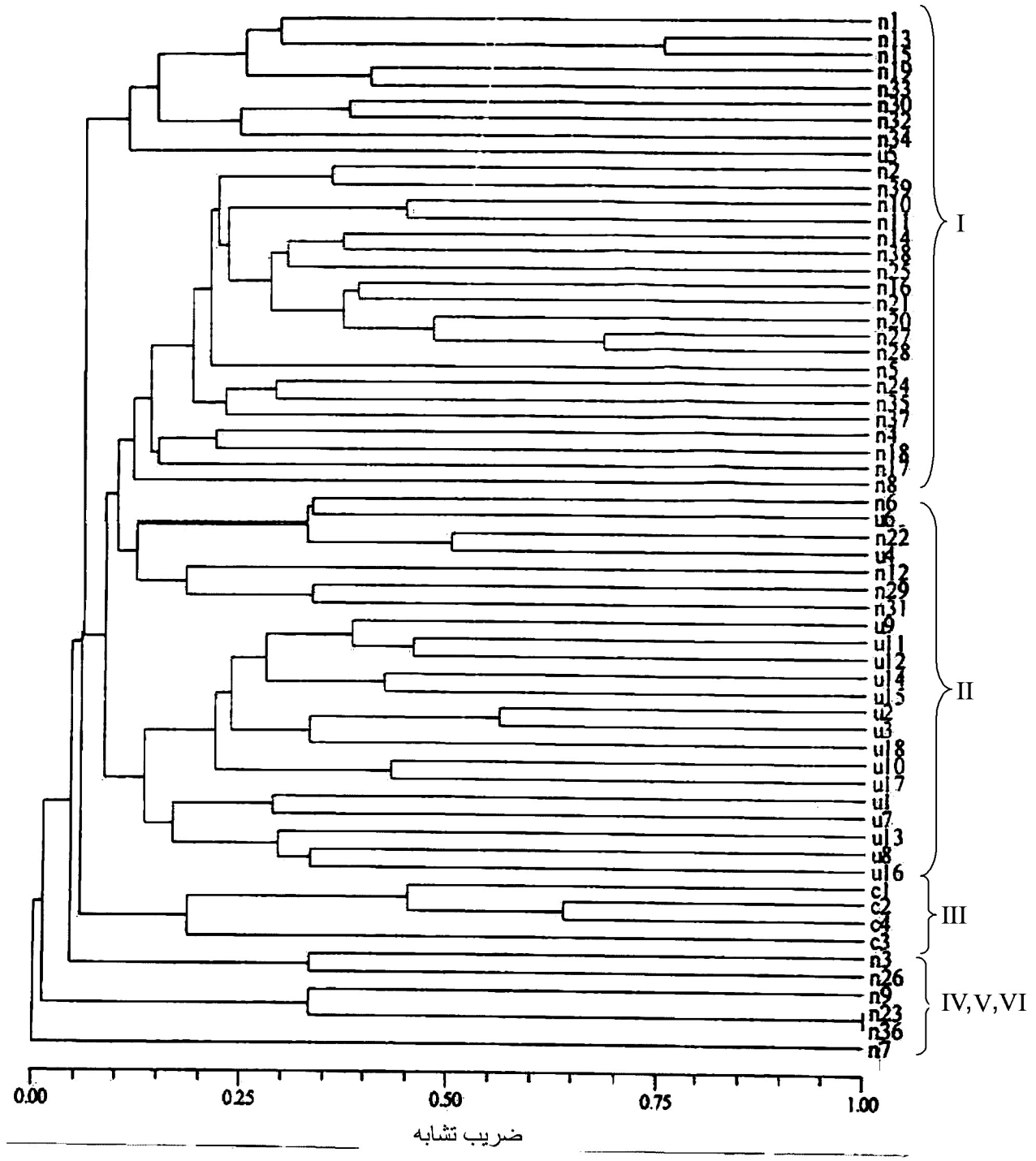
جدا شده از افراد طبیعی که الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی کاملاً یکسان (۱۰۰٪ تشابه) داشتند و در گروه سویه‌های مربوط به بیماران طبیعی قرار گرفتند، سایر سویه‌ها هر کدام دارای الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی متفاوت و منحصر به فرد بودند.

بحث

امروزه روشهای ملکولی متعددی برای تشخیص و تمایز سویه‌های *H. pylori* به کار برده می‌شوند. مطالعات نشان داده که روش REP-PCR، روشی دقیق، حساس و تکرارپذیر برای انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* و تعیین شباهت و تفاوت بین سویه‌ها و تمایز دقیق آنهاست[۱۳، ۱۸]. در این مطالعه، الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی ۶۱ سویهٔ *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای مختلف معده (زخم معده و دوازدهه، سرطان معده) و افراد طبیعی به‌وسیلهٔ روش REP-PCR تعیین گردید. تجزیه و تحلیل الگوی الکتروفورز محصولات PCR برای سویه‌های *H. pylori* با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری نشان داد که هر سویه، الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی متفاوت و خاص خود را داراست. تعداد باندهای به دست آمده بسیار متنوع بودند و در کل نمونه‌ها از ۲۶-۱ باند (میانگین: ۱۳ باند) متغیر بود. همچنین اندازه باندها بین bp ۱۰۰۰۰- ۲۵۰ به دست آمد. در مطالعه‌ای که در تگزاس روی ۷۰ سویه جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت و زخم دوازدهه صورت گرفت، تعداد باندها ۱۴-۷ باند با میانگین ۱۱ و دامنهٔ اندازه باندها بین bp ۳۰۰۰ - ۲۰۰ گزارش شد[۱۳]. همچنین در مطالعهٔ دیگری که در آفریقای جنوبی روی ۷۶ سویه *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم گوارشی و سرطان معده انجام گرفت، تعداد باندها از ۹-۱ باند مجزا با میانگین ۵ و دامنهٔ اندازه bp ۶۰۰۰- ۱۰۰ گزارش گردید[۱۹].

مقایسه الگوی الکتروفورز سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی نشان

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴: دندروگرام تهیه شده از الگوهای انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* جدا شده از بیماران مبتلا به بیماریهای گوارشی

این دندوگرام، شامل سه گروه عمده؛ گروه I: ۷۲/۵٪ از افراد طبیعی، گروه II: ۹۹٪ از بیماران مبتلا به زخم و گروه III: ۱۰۰٪ بیماران مبتلا به سرطان است. شش سویه مربوط به افراد طبیعی در انتهای دندروگرام و جدا از سایر گروهها (IV-VI) قرار گرفتند.

n (طبیعی)، u (زخم)، c (سرطان).

www.SID.ir

داد باندهای bp ۹۷۵ که در تمام این سویه‌ها و باندهای bp ۱۰۵۰ و bp ۱۹۰۰ که در ۷۵٪ این سویه‌ها وجود داشتند در الگوهای الکتروفورز سویه‌های جدا شده از افراد طبیعی و مبتلا به زخم دیده نشدند. همچنین باندهای bp ۲۳۰۰ و bp ۲۱۰۰ و bp ۱۱۵۰ که در ۵۵٪ سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم دیده شدند در سویه‌های دیگر وجود نداشتند. در مطالعه‌ای که در تگزاس انجام گرفت باند pb ۱۰۴۰ را در ۷۷٪ و باند pb ۷۶۰ را در ۷۴٪ از سویه‌های مربوط به بیماران مبتلا به گاستریت، و باند bp ۱۳۵۰ را در ۷۷٪ و باند bp ۸۱۰ را در ۶۱/۵٪ از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه یافتند[۴۰]. مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعات مختلف نشان می‌دهد که تعداد و اندازه باندهای به دست آمده از انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های جدا شده از بیماران مختلف در نقاط مختلف دنیا با یکدیگر متفاوت است که یک دلیل آن می‌تواند تفاوت شرایط آزمایشگاهی در نقاط مختلف دنیا باشد و دلیل دیگر تنوع گسترده سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در جوامع مختلف بشری است.

بررسی درخت فیلوژنی نشان می‌دهد که تمام سویه‌ها به ۷ گروه دسته‌بندی می‌شوند و سه گروه اصلی در آنها مشهود است. گروه اول شامل ۷۲/۵٪ از سویه‌های جدا شده از افراد طبیعی و ۱ سویه جدا شده از فرد مبتلا به زخم بود. در گروه دوم ۹۹٪ سویه‌های جدا شده از افراد مبتلا به زخم و ۵ سویه جدا شده از افراد طبیعی قرار گرفتند و در گروه سوم تمام سویه‌های جدا شده از افراد مبتلا به سرطان قرار داشتند. چهار گروه بعدی که جدا از گروههای اصلی بودند شامل سویه‌های باقیمانده مربوط به افراد طبیعی بودند. در مطالعه‌ای که روی سویه‌های جدا شده از افراد مبتلا به گاستریت و زخم دوازدهه در امریکا انجام گرفت، ترسیم درخت فیلوژنی برای تمام نمونه‌ها به این ترتیب بود که دو گروه اصلی به سادگی قابل تشخیص بود. یک گروه شامل ۲۹ سویه جدا شده از افراد مبتلا به گاستریت و ۱ سویه جدا شده از فرد مبتلا به زخم دوازدهه بود و گروه دوم شامل ۳۲ سویه جدا شده از افراد مبتلا به زخم دوازدهه و ۲ سویه جدا شده از افراد مبتلا به گاستریت بود. ۶ سویه جدا شده از افراد مبتلا به زخم دوازدهه نیز جدا از دو گروه اصلی قرار گرفتند[۱۳]. همچنین در مطالعه‌ای که در آفریقای جنوبی روی سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم گوارشی و سرطان معده انجام گرفت، دو گروه مجزا در درخت فیلوژنی آنها نمایان بودند. گروه اول، شامل ۱۹ سویه جدا شده از بیماران مبتلا به زخم و ۷ سویه جدا شده از بیماران سرطانی و گروه دوم، شامل تمام سویه‌های جدا شده از افراد مبتلا به گاستریت و ۸ سویه از موارد سرطانی و ۷ سویه جدا شده از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه بود[۱۹]. ولی نتایج حاصل از الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* مورد بررسی در آمستردام که از بیماران مختلف گوارشی جدا شده بود نشان دادند که در درخت فیلوژنی رسم شده بر پایه میزان شباهت بین سویه‌ها، گروههای مجزای مخصوص به یک بیماری خاص تشکیل نشدند و همه سویه‌ها به‌صورت مخلوط در درخت فیلوژنی قرار گرفته‌اند[۱۸].

جمع‌بندی نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان از روش REP-PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های *H. pylori* استفاده کرد. با اینکه تنوع ژنتیکی چشمگیری در بین سویه‌های *H. pylori* دیده می‌شوند ولی سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم به یکدیگر، بسیار شبیه‌تر هستند تا به سویه‌های جدا شده از بیماران طبیعی. علاوه‌بر آنها، سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی شباهت بیشتری به یکدیگر نشان می‌دهند و با سایر گروهها تفاوت محسوسی دارند.

دیدگاههای آینده برای استفاده از این روش انگشت‌نگاری ژنتیکی، عبارتند از: تعیین تغییرات ژنتیکی به وجود آمده در یک سویهٔ *H. pylori* جدا شده از شخص تحت درمان، با مقایسهٔ الگوهای انگشت‌نگاری سویه‌های به دست آمده از آن فرد قبل از درمان. همچنین در مناطقی که شیوع عفونت *H. pylori* بالاست با مقایسه الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های به دست آمده از افراد آن منطقه، با الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های جدا شده از محیط، مانند آب آشامیدنی یا غذاهای مخصوص آن مناطق، می‌توان مخازن اصلی و راههای انتقال این باکتری را مورد بررسی قرار داد. به‌علاوه می‌توان با مقایسه الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های به دست آمده از افراد یک خانواده یا فامیل که در میان آنها بیمار مبتلا به سرطان یا زخم وجود دارد، بروز این بیماریها را در دیگر افراد خانواده پیش‌بینی کرد.

واژه نامه

Genetic fingerprinting (انگشت‌نگاری ژنتیکی): هنگامی‌که DNA باکتریها توسط روشهای مختلف PCR تکثیر می‌گردد و قطعات به دست آمده روی ژل آگارز از هم جدا می‌شوند، الگوهای منحصر به فردی ایجاد می‌شوند که بررسی این الگوها انگشت‌نگاری ژنتیکی نامیده می‌شود. بدین‌وسیله می‌توان تغییرات ژنتیکی به وجود آمده در نقاط مختلف ژنوم باکتری را مورد بررسی قرار داد. همچنین از این روش می‌توان در مطالعات اپیدمیولوژیک و رسم شجره‌نامه ژنتیکی (فیلوژنی) یا دندروگرام

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده کرد.

Heterogeneity (تنوع ژنتیکی): نوترکیبی و بازآرایی در ژنوم باکتری که منجر به ایجاد گوناگونی در خصوصیات ژنتیکی سویه‌های یک گونه باکتریایی و به وجود آمدن سویه (subtype یا ژنوتیپ)های مختلف می‌شود. این سویه‌ها دارای صفات فنوتیپی یکسانی هستند و افتراق آنها با روشهای ژنتیکی امکان‌پذیرست. هلیکوباکتر پیلوری دارای تنوع ژنتیکی زیادی است و این تنوع ژنتیکی در بسیاری از سویه‌ها مربوط به خصوصیات بیماریزایی (ویرولانس) و امکان رخداد بیماریهای گوارشی می‌شود.

Vac A (Vacuolating cytotoxin A): سیتوتوکسین (توکسین سلولی) باکتریایی است که باعث ایجاد واکوئل در سلولهای اپیتلیال معده می‌شود. این توکسین توسط تمام سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری تولید می‌شود. ژن رمزکننده سیتوتوکسین دارای دو ناحیه متغیرست: یک ناحیه s (signal sequence) که به‌صورت آلل‌های s1 (s1c, s1b, s1a) یا s2 وجود دارد و یک ناحیه m (middle region) که به‌صورت آلل‌های m1 یا m2a یا m2b وجود دارد. به نظر می‌رسد که عفونت با سویه دارای Vac A از نوع s1 (Vac As1) منجر به بیماری شدیدتری (مثل زخم و سرطان) می‌شود تا عفونت با سویه دارای Vac As2. عفونت با سویه‌های دارای ژنوتیپ Vac As1/m1 اغلب منجر به صدمات شدیدتر بافت اپیتلیال و مخاط معده می‌شود.

CagA (Cytotoxin-associated gene A): ژن CagA شاخص وجود جزیره بیماریزایی PAI (Pathogenicity Island) در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری است. پروتئین CagA از طریق سیستم ترشحی باکتری که توسط جزیره بیماریزایی رمز می‌گردد به سلولهای اپی‌تلیال منتقل می‌شود، در داخل سلولهای اپی‌تلیال فسفریله می‌گردد و فعالیت پروتئین‌های خاص سلولی را در جهت ایجاد زخم و سرطان القا می‌کند. جزیره بیماریزایی پروتئین‌هایی رمز می‌کنند که باعث القای تولید اینترلوکین ۸ (IL-8) توسط سلولهای اپیتلیال معده و ایجاد التهاب می‌شوند. به نظر می‌رسد که عفونت با سویه‌های CagA مثبت خطر ابتلا به زخم یا سرطان معده را افزایش می‌دهد.

Dendrogram (درخت فیلوژنی): نموداری است که با کمک برنامه‌های آنالیز کامپیوتری رسم می‌شود و میزان شباهت بین سویه‌های باکتریایی را نشان می‌دهد. اندازه و تعداد باندهای به دست آمده از واکنش PCR اطلاعاتی است که برای آنالیز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

Phylogeny (فیلوژنی): گروه‌بندی باکتری‌ها براساس تشابهات ژنتیکی بین آنها. فیلوژنی در حقیقت نشان‌دهنده رابطه (نزدیکی یا دوری) تکاملی (طبیعی) بین موجودات است.

Sab A و Bab A: چسبیدن هلیکوباکتر پیلوری به سلولهای اپیتلیال معده از طریق دو ملکول چسبنده باکتریایی به نامهای Bab A (Blood group antigen- binding adhesion) و Sab A (Sialic acid- binding adhesion) صورت می‌گیرد، که گیرنده هر کدام در سطح سلولهای اپیتلیال به ترتیب Leb (Lewis b blood group antigen) و sLex (Sialyl-Lewis x antigen) است. Leb از آنتی‌ژنهای گروه خونی است که به‌عنوان بخشی از گلیکوپروتئین‌ها به‌صورت زواید بلند در سطح سلولهای اپیتلیال بیان می‌شود. sLex از آنتی‌ژنهای سطحی سلولهای اپیتلیال است که به‌عنوان بخشی از گلیکولیپیدها، به‌صورت زواید کوتاه در سطح سلولهای اپیتلیال بیان می‌شود. Bab A در شناسایی اختصاصی Leb دخالت دارد و Sab A با sLex اتصال برگشت‌پذیری را برقرار می‌کند. هنگام عفونت مزمن و التهاب پایدار (گاستریت)، هلیکوباکتر پیلوری مخاط معده را تحریک به تولید sLex می‌کند که همزمان پاسخهای التهابی نیز تحریک می‌شوند. سپس Sab A به sLex می‌چسبد و اتصال باکتری به اپیتلیوم معده اتفاق می‌افتد. در جاهایی که پاسخ شدید سیستم ایمنی و التهاب (هجوم لنفوسیت‌های فعال شده) بروز می‌کند، بیان Sab A در هلیکوباکتر پیلوری کاهش می‌یابد، در نتیجه ارتباط باکتری با sLex در سطح سلولهای اپیتلیال و لنفوسیت‌ها قطع می‌شود، بنابراین باکتری از اپیتلیوم جدا و از محل التهاب دور می‌شود. به نظر می‌رسد که خاموش و روشن شدن بیان Sab A در سطح سلولهای هلیکوباکتر پیلوری یک پدیده قابل تنظیم است و به باکتری این امکان را می‌دهد که هنگام التهاب و هجوم لنفوسیت‌ها از محل دور شود، زنده بماند و به جاهای دورتر مهاجرت کند و مستقر گردد. بدین‌ترتیب، عفونت به‌صورت مزمن در خواهد آمد.

Restriction endonuclease analysis (REA): هضم آنزیمی DNA کروموزومی به‌وسیله آنزیم‌های محدودگر و بررسی قطعات به دست آمده به‌وسیله الکتروفورز

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): DNA استخراج شده تحت تأثیر آنزیم‌های محدودگر به قطعات متعدد شکسته و به ژل آگارز منتقل می‌شود. سپس در دستگاه الکتروفورز قطعات DNA به‌طور متوالی تحت تأثیر میدانهای الکتریکی در زوایای مختلف قرار می‌گیرند و در جهات مختلف با سرعتهای مختلف حرکت می‌کنند. بدین‌ترتیب، ملکول‌های DNA بر اساس دامنه جریان برق و اندازه خود تفکیک می‌شوند. جریانهای برق کوتاه باعث جدا شدن ملکول‌های کوچک و جریانهای برق بلندتر باعث جدا شدن

Archive of SID

www.SID.ir

ملکول‌های بزرگتر می‌گردد. مشاهده و تعیین جایگاه باندهای مربوط به ملکول‌های DNA با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید انجام می‌شوند.

Ribotyping: یک روش ملکولی برای تعیین نوع (subtype) سویه‌های یک گونه باکتریایی است. در این روش ژنهای کروموزومی رمزکننده RNA ریبوزومی با آنزیم‌های محدودگر به قطعات معینی شکسته و الکتروفورز می‌شوند و باندهایی را در ژل الکتروفورز تشکیل می‌دهند. سپس دستواره‌های نشاندار ویژه یک گونه باکتریایی اضافه می‌شوند و برقراری رابطه مکملی این دستواره‌ها با قطعات ژنی RNA ریبوزومی بررسی می‌گردد. چون دستواره‌ها نشاندار می‌باشند، باندهایی قابل رؤیت خواهند بود که این دستواره‌های نشاندار به آنها متصل شده باشند.

RAPD-PCR (Random amplified polymorphism DNA): نوعی PCR که توسط آن نقاط انتخاب شده‌ای در DNA با استفاده از پرایمرهای طراحی شده تکثیر می‌شوند. در این روش می‌توان با استفاده از چند پرایمر، نقاط مختلفی از DNA یک سویه باکتریایی را تکثیر کرد و الگوی الکتروفورتیک ویژه آن را به دست آورد. در این روش، معمول است که از چند پرایمر استفاده شود و واکنش PCR برای هر پرایمر چند بار تکرار گردد، سپس بهترین الگوهای الکتروفورز برای مقایسه و تمایز سویه‌های مورد بررسی استفاده می‌شوند. با روش RAPD می‌توان انواع سویه‌های یک گونه باکتریایی را تقسیم‌بندی (تعیین Type) کرد.

بیمار طبیعی (گاستریت): بیمارانی که به‌علت ناراحتی گوارشی آندوسکوپی شدند ولی ضایعه ماکروسکوپیک در معده نداشتند.

bp) Base pair): جفت شدن دو باز نوکلئوتیدی از طریق اتصال هیدروژنی. یک جفت باز از مکمل شدن باز نوکلئوتیدی آدنین (A) با تیمین (T) یا سیتوزین (C) با گوانین (G) به وجود می‌آید.

کیلو جفت باز (Kbp): هزارجفت باز

Loading buffer: ترکیبی متشکل از یک ماده با چگالی بالا مثل گلیسرول و یک ماده رنگی مثل بروموفنل بلو. گلیسرول با اتصال به ملکول‌های اسیدنوکلئیک باعث سنگین و ته‌نشین شدن DNA در چاهک ژل الکتروفورز می‌شود. بروموفنل بلو شاخصی است برای ارزیابی تحرک الکتروفورتیک ملکول‌ها که جایگاه قرار گرفتن ملکول‌های DNA را نشان می‌دهد.

سویه (Strain): یک جمعیت (یک نسل) از سلولهای باکتریایی که همگی از یک سلول نیایی منشا گرفته‌اند. سویه‌های شبیه به هم در یک گونه (Species) قرار می‌گیرند.

مراجع

1. Blaser MJ. Gastric campylobacter-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 1987; **93**: 371-83.
2. Go MF, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; **325**: 1132-6.
3. 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.
4. Go MF, Lew GM, Lichtenberger LM *et al.* Gastric mucosal hydrophobicity and *Helicobacter pylori*: response to antimicrobial therapy. *Am J Gastroenterol* 1993; **88**: 1362-5.
5. Blaser MJ. Role of vacA and the cagA locus of *Helicobacter pylori* in human disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; **10** (Suppl 10: 73-7.
6. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH *et al.* *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; **325**: 1132-6.
7. Versalovic J, Woods CR Jr, Georghiou PR *et al.* DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch Pathol Lab Med* 1993; **117**: 1088-98.
8. Colding H, Hartzen SH, Roshanisefat H *et al.* Molecular methods for typing of *Helicobacter pylori* and their applications. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; **24**: 193-9.
9. Hirmo S, Kelm S, Wadstrom T *et al.* Lack of evidence for sialidase activity in *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; **17**: 67-72.
10. Bennekov T, Colding H, Ojeniyi B *et al.* Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol* 1996; **34**: 202-4.
11. Maslow J, Mulligan ME. Epidemiologic typing systems. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; **17**: 595-604.

Archive of SID
www.SID.ir

12. 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.
13. 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.
14. Lupski JR, Weinstock GM. Related Articles, Links Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 1992; **174**: 4525-9.
15. Stern MJ, Ames GF, Smith NH *et al.* Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 1984; **37**: 1015-26.
16. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 6823-31.
17. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ *et al.* Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Mol Cell Biol* 1995; **5**: 25-40.
18. Van Doorn NE, Namavar F, Kusters JG *et al.* Genomic DNA fingerprinting of clinical isolates of *Helicobacter pylori* by REP-PCR and restriction fragment end-labelling. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **160**: 145-50.
19. 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 fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 1833-9.
20. Kwon DH, El-Zaatari FA, Woo JS *et al.* REP-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori* strains. *Dig Dis Sci* 1998; **43**: 980-7.

Archive of SID

www.SID.ir

DNA Fingerprinting of *H. Pylori* Isolates from Iranian Patients by REP-PCR

Siavoshi F
Department of Microbiology, Faculty of Science, Tehran University

Zabihinia S
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

Omrani 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: *H. pylori* has been implicated in peptic diseases, some with detrimental consequences such as ulcer or cancer. Since considerable genetic heterogeneity has been observed within *H. pylori* population worldwide, it appears an ideal achievement to recruit PCR-based methods and design genetic markers which recognize isolates from normal and symptomatic individuals. In this study 61 *H. pylori* isolates from dyspeptic patients were fingerprinted by REP-PCR.

Materials and Methods: REP-PCR was performed on extracted DNAs of 61 *H. pylori* isolates from 39 normal, 18 ulcer and 4 cancer patients. Synthetic 18-nt primers, specific for interspersed repetitive elements in the bacterial genome, were recruited. PCR conditions were optimized and reproducibility of the reactions were confirmed. The size and number of PCR products were determined and DNA fingerprints of all isolates were analyzed by NTSYSpc programme, and dendrograms were generated.

Results: Among 39 *H. pylori* isolates from normal patients 28 comprised a distinct cluster and 5 clustered along with isolates from ulcer patients. The remaining 6 isolates comprised a separate cluster distinct from other groups. Among 18 isolates from ulcer patients, 17 classified in a specific cluster, only one isolate was clustered along with isolates from normal patients. Isolates from cancer patients consisted a quite distinct cluster.

Conclusions: In this study REP-PCR was used to show that majority of isolates from normal, ulcer, and cancer patients have distinct fingerprints which can be recruited for predicting the outcome of the infection with certain *H. pylori* isolates. It is concluded that REP-PCR is an effective and reproducible technique for fingerprinting *H. pylori* isolates from different human origins. *Govaresh* 2004; **9**: 81-9

Keywords: *H. pylori,* Dyspeptic diseases, Fingerprinting, REP-PCR

Archive of SID

www.SID.ir