

روند تکاملی ژن های *cagA* و *vacA* هلیکوباکتر پیلوری در ایران و ارتباط با پی آمدهای بالینی

سعید لطیفی نوید^۱، فریده سیاوشی^۲، حافظ فاخری^۳، افسانه شریفیان^۴، حسین نوبخت^۵، رامین طواف زاده^۶، حسن سلمان روغنی^۷، مهران بهبهانیان^۸، صادق مسرت^۹، رضاملک زاده^۹

^۱ استادیار، گروه ژنتیک، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۲ دانشیار، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران
^۳ دانشیار، بخش داخلی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۴ استادیار، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی کردستان، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
^۵ استادیار، بخش داخلی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ایران
^۶ استادیار، بخش داخلی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران
^۷ دانشیار، بخش داخلی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، ایران
^۸ استادیار، بخش داخلی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
^۹ استاد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف

ارتباط بین ژنوتیپ های مشخص از ژن های *cagA* و *vacA* و خطر بالای زخم و سرطان معده نشان داده شده است. این ژن ها الگوهای الی متفاوتی را از نظر جغرافیایی نشان می دهند. هدف از این مطالعه آنالیز توالی این ژن ها به منظور شناسایی الگوهای تنوع ژنتیکی و ارتباط با پی آمدهای بالینی بیمار می باشد.

روش بررسی

نواحی انتهایی آمینی ژن *cagA* و مرکزی هر دو ژن از ۱۴۷ سوپه جدا شده از منابع جغرافیایی و قومیتی مختلف در ایران تعیین توالی شدند. روش های فیلوژنتیکی برای مطالعه تنوع این ژن ها و ارتباط بین دودمان های تکاملی و پی آمدهای بالینی استفاده شدند.

یافته ها

آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از توالی های ژن *cagA* و *vacA* به ترتیب چهار و دو دودمان مجزا را نشان داد. دودمان ۲ ژن *cagA* در مقایسه با دودمان ۱ تنوع ژنتیکی بسیار گسترده ای را نشان داد. دودمان های ۳ و ۴ دارای نیای مخلوط با نوکلئوتیدهای نو ترکیب بودند و خاستگاه نیایی نوکلئوتیدها از دودمان های ۱ و ۲ بود. سوپه های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *vacA* به طور معنی داری *cagA* + بوده ($p=0$ ، $>90\%$) و با میزان بالای بیماری زخم گوارشی (زخم معده و دوازدهه) در افراد آلوده مرتبط بودند ($p=0/003$). بیشتر سوپه ها در دودمان ۱ از ژن *cagA*، ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *vacA* را نشان دادند ($p=0/003$) و به طور معنی داری با خطر بالای بیماری زخم گوارشی در افراد آلوده مرتبط بودند ($p=0/022$). سوپه های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *cagA* به طور معنی داری با گاستریت مرتبط بودند ($p=0$).

نتیجه گیری

تعداد بالای الگوهای تنوع الی در ژن های بیماری زا روند تکاملی قوی را نشان داد که موجب ظهور دودمان های کلونال جدید از ژن *cagA* در ایران شده است. دودمان های مشخصی از ژن های *cagA* و *vacA* با بیماری زخم گوارشی مرتبط بودند.

کلید واژه: هلیکوباکتر پیلوری، تنوع ژنتیکی، وضعیت بالینی، *cagA*، *vacA*، ایران

گوارش / دوره ۱۵، شماره ۴ / زمستان ۱۳۸۹ / ۲۹۲-۲۸۳

نویسنده مسئول:

اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی،

گروه ژنتیک، کد پستی: ۱۱۳۶۷-۵۶۱۹۹، صندوق پستی: ۱۷۹،

تلفن: ۰۴۵۱-۵۵۱۳۹۱۵

نمابر: ۰۴۵۱-۵۵۱۴۷۰۱

پست الکترونیک: slatifin@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۲

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۰/۴/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۳۰

زمینه و هدف

هلیکوباکتر پیلوری عامل مهم در ایجاد آتروفی معده، زخم های معده و دوازدهه و لنفوم مالت بوده و یکی از عوامل تعیین کننده در بروز سرطان معده می باشد.

(۱)، این باکتری تنوع الی و تغییر پذیری ژنتیکی بالایی را در ژن های مرکزی (Core genes) و بیماری زا (Virulence genes) نشان می دهد. (۲-۶)، بر

این اساس آنالیز توالی تعدادی از ژن های چند هزار بازی می تواند مشخصه ژنومی

Sectional) می‌باشد. در این مطالعه ۱۴۷ سویه هلیکوباکترپیلوری از سال ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ از کشت‌های بیوپسی معده بیمارانی که به مراکز آندوسکوپی در استان‌های مختلف ایران مراجعه کرده بودند، به دست آمد. معیار ورود هر بیمار در این مطالعه سکونت در یک منطقه جغرافیایی مشخص، مشخصات زبانی و نژادی و ازدواج‌های درون نژادی در سه نسل گذشته بود. بر همین اساس پرسشنامه زبانی-نژادی استاندارد برای هر بیمار تکمیل گردید. بیوپسی‌ها مربوط به بیمارانی بودند که ملیت ایرانی داشته و محل سکونت و تولد آنها یکسان بود. هم چنین پدر و مادر و هر چهار جد مادری و پدری فرد مورد مطالعه دارای خاستگاه قومی و زبانی یکسان بودند. به طور کلی سویه‌ها از ۷ گروه قومی تعریف شده در ۱۱ ناحیه جغرافیایی ایران به دست آمدند (جدول ۱).

یافته‌های آندوسکوپی در مورد هر بیمار ثبت شده و سپس بیمارانی که سه گروه شامل سوء هاضمه بدون زخم (NUD)،^۱ نرمال (NUD-normal) (۴۰ نفر)، گاستریت (NUD-gastritis) (۷۳ نفر) و بیماری زخم گوارشی^۲ (زخم معده^۳ و زخم دوازدهه^۴) (۳۴ نفر) تقسیم شدند. گروه نرمال ضایعه‌های التهاب معده قابل تشخیص را در مشاهدات آندوسکوپی نشان نداد و مخاط معده نیز حالت عادی داشت.

جدا سازی باکتری و شناسایی آن

از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم توسط آندوسکوپیست گرفته شد و برای یکی از نمونه‌ها تست اوره آز سریع^۵ در محل انجام شد. بیوپسی‌ها داخل محیط ترانسپورت و تحت زنجیره سرد در مدت ۲۴ ساعت به آزمایشگاه هلیکوباکترپیلوری در دانشگاه تهران منتقل شده و روی محیط کشت بروسلا آگار^۶ انتخابی که با ۷-۵٪ خون گوسفند دفیبرینه غنی شده بود، کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هواری حاوی CO₂ ۵٪ و رطوبت بالای ۹۸٪ به مدت ۴ تا ۱۰ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. تعیین هویت کلنی‌های باکتریایی بر اساس رنگ آمیزی گرم، شکل مارپیچی در زیر میکروسکوپ، مثبت بودن تست‌های اوره آز، کاتالاز و اکسیداز و هم چنین تکثیر قطعه SrDNA^۷ ۱۶ هلیکوباکترپیلوری (۲۱) با پرایمرهای اختصاصی انجام شد (جدول ۲).

استخراج PCR، DNA و تعیین توالی

استخراج DNA با استفاده از کیت DNPTM (سیناژن، ایران) انجام شد. میانگین غلظت DNA در هر نمونه مشخص شد. از هر نمونه DNA، غلظت‌های ۵۰ ng/μl و ۵ ng/μl در میکروپلیت ۹۶ خانه آماده شده و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر توسط PCR^۸ و تعیین

هویت گسترده‌ای برای هر سویه فراهم کند. (۶ و ۷)، الگوی تغییر پذیری نتیجه جهش و نوترکیبی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای فراوان می‌باشد که ممکن است منجر به سازگاری در میزبان شود. (۸-۱۰)، سویه‌هایی که به لحاظ ژنتیکی یکسان هستند در یک گروه قرار گرفته و یک دودمان کلونال را به وجود می‌آورند. نوترکیبی بین سویه‌ای که در هنگام آلودگی هم زمان با چند نوع سویه رخ می‌دهد می‌تواند آمیختگی نوکلئوتیدی بین دودمان‌های کلونال متفاوت را موجب شده و از این رو بیشتر نشانه‌های گروه بندی کلونال را حذف کند. (۶)، با این وجود ارتباط‌های الی غیر تصادفی بین دو ژن بیماری زای مشهور هلیکوباکترپیلوری vacA و cagA نشان داده شده است. فراوانی الی این ژن‌ها بر اساس خاستگاه قومی/جغرافیایی سویه‌ها متفاوت بوده و از این رو درجه‌ای از گروه بندی‌های کلونال را نشان می‌دهند. (۱۱ و ۱۲)، توکسین VacA سویه‌های مختلف، تغییرپذیری گسترده‌ای را در ساختار ژنی موزاییک خود نشان داده و ارتباط متفاوت الی‌های vacA با بیماری‌های معده مشخص شده است. (۱۳)، ناحیه انتهای کربوکسیلی CagA سویه‌های هلیکوباکترپیلوری نیز الگوی ژنی موزاییک مرتبط با پی آمدهای بالینی متفاوت را نشان می‌دهند. (۱۴)، اگرچه تغییرپذیری ژنتیکی و کسب یا فقدان برخی ژن‌ها در زمان عفونت مزمن هلیکوباکترپیلوری نشان داده شده، اما تاثیر آن‌ها در زنده ماندن و بیماری زایی باکتری هنوز مورد بحث و بررسی است.

در ایران تنوع قومی/جغرافیایی بالایی وجود داشته و نزدیک به ۶۹٪ از جمعیت ایرانی آلوده به عفونت هلیکوباکترپیلوری می‌باشند. (۱۵)، علاوه بر این، فراوانی زخم معده و سرطان معده به شدت تحت تاثیر خاستگاه جغرافیایی و یا قومی می‌باشد. (۱۶ و ۱۷)، این یافته‌ها همراه با میزان پایین ریشه کنی عفونت هلیکوباکترپیلوری در ایران (۱۸) و میزان قابل ملاحظه (۲۰٪) برگشت عفونت یا آلودگی مجدد (۱۹) ممکن است نشان دهنده روند تکاملی گسترده در درون سویه‌های ایرانی باشد. آنالیز توالی‌های هفت ژن مرکزی (۳/۵kb) از هر سویه) نشان داده که خصوصیات ژنتیکی هلیکوباکترپیلوری در ایران به شدت تحت تاثیر تبادل ژنتیکی با کشورهای همسایه بوده و تفاوت قومی-جغرافیایی سویه‌ها در درون کشور به خوبی حفظ شده است. (۲۰)، اگرچه هنوز این تفاوت در سطح الی‌های الی شناخته شده ژن‌های بیماری‌زای هلیکوباکترپیلوری که دارای روند تکاملی سریع‌تر بوده و بیشتر تحت تاثیر فشارهای انتخابی هستند، مشخص نشده است. هدف از این مطالعه، آنالیز گسترده توالی ژن‌های vacA و cagA به منظور شناسایی الی‌های تنوع ژنتیکی و جریان تکاملی آن‌ها در ایران می‌باشد. ارتباط بین عفونت با سویه‌های ایرانی و پی آمد بالینی بر اساس الگوی فیلوژنتیکی (خویشاوندی ژنتیکی) باکتری‌ها نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

روش بررسی

سویه‌های باکتریایی

مطالعه حاضر از نوع مقطعی درون گونه‌ای (Intra-Specific Cross-)

1. Non ulcer dyspepsia
2. Peptic ulcer disease (PUD)
3. Gastric ulcer
4. Duodenal ulcer
5. Rapid urease test
6. Polymerase chain reaction

جدول ۱: مشخصات سویه های هلیکوباکتریلوری جدا شده از منابع جغرافیایی و قومیتی مختلف در ایران

استان	ناحیه (تعداد سویه ها)	خاستگاه قومی	خانواده زبانی ^۱	مکان جغرافیایی
اردبیل	اردبیل (۲۱)	آذری	آلتایی / ترکی ^۲	شمال غرب
گیلان	رشت (۱۰)	گیلکی	هند- اروپایی ^۳	شمال
مازندران	ساری (۱۳)	مازندرانی	هند- اروپایی	شمال
کردستان	سنندج (۱۰)	کرد	هند- اروپایی	غرب
کرمانشاه	کرمانشاه (۱۲)	کرد	هند- اروپایی	غرب
لرستان	خرم آباد (۱۰)	لر	هند- اروپایی	غرب
کهگیلویه و بویراحمد	یاسوج (۷)	لر	هند- اروپایی	جنوب غرب
خراسان رضوی	مشهد (۱۸)	فارس	هند- اروپایی	شمال شرق
یزد	یزد (۱۴)	فارس	هند- اروپایی	جنوب
هرمزگان	بندرعباس (۱۰)	فارس	هند- اروپایی	جنوب
خوزستان	اهواز (۲۲)	عرب	آفریقایی-آسیایی / سمیتیک ^۴	جنوب غرب

۱. برگرفته از دایره المعارف بین المللی زبان شناسی (وبرایش شانزدهم، <http://www.ethnologue.com>) که اطلاعات دقیق مربوط به ۹۰۹،۶ زبان زنده دنیا را شامل می شود.
۲. Altaic/Turkic . ۳. Indo-European . ۴. Afro-Asiatic/Semitic

جدول ۲: پرایمرهای استفاده شده برای تعیین هویت کلنی های هلیکوباکتریلوری، PCR و تعیین توالی ژن های بیماری زا (*vacA* و *cagA*).

Locus	Gene function	Name	Sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Genome positions (expected size [bp])
H. pylori 16S rDNA	16S rRNA	HP1	GCAATCAGCGTCAGTAATGTTC	56	773-1293 (521) ^a
		HP2	GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC		
cagA (-N)	Cytotoxin-associated gene A	cagAN-F	CCATTTTAAGCAACTCCATAAACC	56	-
		cagAN-F1	AAGATACCGATAGGTATGAA		
		cagAN-F2	CTAACGAAGCCATTAACCAACAAC		
		cagAN-R	CTGCAAAAAGATTGTTTGGCAGA		
cagA (-C)		cagAC-F	GGCAATGGTGGTCCTGGAGCTAGGC	55	-
		cagAC-R	GGAAATCTTTAATCTCAGTTCCGG		
vacA	Vacuolating cytotoxin A	OLHPVacA-F	ACAACCGTGATCATTCCAGC	56	-
		HPvacA-R	ATACGCTCCCACGTATTGC		
		vacA_F2	CTGCTGTAGGAACGGTCTC		
		vacA_R2	GCGTGGCGCCATCATAAAGAG		

^a H. pylori 26695 (cytotoxic strain with the s1a/m1 vacA type).

توالی قطعات میانی و انتهای آمینی *cagA* از ۹۵ سویه هلیکوباکترپیلوری و قطعه ژن *vacA* از ۱۴۴ سویه با استفاده از پرایمرهای فهرست شده در جدول ۲ انجام شد. شرایط تکثیر توسط PCR به صورت زیر می باشد: ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد، ۳۰ سیکل هر کدام شامل ۴۰ ثانیه در ۹۶ درجه سانتی گراد، ۴۰ ثانیه در ۵۶ درجه سانتی گراد (به جز *cagAC* با دمای اتصال درجه سانتی گراد ۵۵)، ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد و گرمخانه گذاری نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه.

آنالیز داده‌ها

توالی‌های ژن‌های *cagA* (نواحی آمینی و مرکزی) و *vacA* در داده پایگاه برنامه BioNumerics v5.10 (Applied-Maths, Sint Maartens-Latem, Belgium) ذخیره شدند. توالی‌های رفت و برگشتی با هم جفت شده و ویرایش و تصحیح آنها به منظور دستیابی به طول توالی یکسان مطابق با الگوهای ویرایشی تعریف شده برای لوکوس‌های بیماری‌زا انجام شد. درخت‌های Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA v4 (۲۲) ترسیم شدند. بدین منظور ماتریس‌های فاصله‌ای مابین توالی‌های DNA با استفاده از مدل تکامل مولکولی Kimura 2 محاسبه و استفاده شدند. پارامترهای تنوع مولکولی با استفاده از برنامه DnaSP 4.50 محاسبه شد. (۲۳)

برنامه STRUCTURE 2.2 (۲۴) که یک روش خوشه بندی پارامتریک را مورد استفاده قرار می‌دهد برای تعیین ساختار جمعیتی سویه‌های هلیکوباکترپیلوری، شناسایی جمعیت‌های ژنتیکی مجزا، نسبت دادن هر سویه به جمعیت‌های نیایی فرض شده و تعیین آمیختگی نیایی سویه‌ها استفاده شد. این برنامه مدلی را فرض می‌کند که در آن k جمعیت وجود دارد و هر کدام از جمعیت‌ها مجموعه‌ای از فرکانس‌های اللی در هر لوکوس را شامل می‌شوند. سویه‌ها ممکن است به دو جمعیت نیایی یا بیشتر نسبت داده شوند در صورتی که ژنوتیپ‌هایشان نوعی آمیختگی بین آن‌ها را نشان دهند. در این مطالعه پس از ارزیابی اولیه با مدل Admixture، از مدل Linkage در برنامه STRUCTURE 2.2 (۲۴) به منظور مشخص کردن جمعیت‌های نیایی دارای فرکانس‌های اللی مجزا و تعیین نسبت‌های نیایی برای هر سویه استفاده شد. عملکرد این مدل تکاملی بر این اساس است که ال‌های پیوسته اغلب روی یک قطعه کروموزوم منفرد بوده و از جمعیت نیایی یکسان به ارث می‌رسند. هر قطعه به طور مستقل از تعدادی از جمعیت‌های باکتریایی، k با احتمال q_k مشتق می‌شود. q_k نسبت نیایی از هر جمعیت k برای هر کدام از سویه‌ها می‌باشد. برنامه با k مابین ۱ و ۵ توسط شبیه سازی MCMC اجرا شد. تعداد تکرار اولیه در برنامه ۱۰۰,۰۰۰ انتخاب شد که توسط ۲۰۰,۰۰۰ تکرار بعدی ادامه پیدا کرد. احتمال حداکثر مربوط به $k=2$ بود در حالی که $k > 2$ الگوهای جمعیتی غیر پیوسته را به وجود آورد. برنامه Distruct 1.1 برای نمایش گرافیکی

ساختار جمعیتی حاصله استفاده شد. میزان نوترکیبی در جمعیت توسط روش پارامتریک مبتنی بر مدل Neutral coalescent به نام Composite likelihood estimate (CLE) استفاده از برنامه LDhat محاسبه شد. (۲۵)، در این روش، نوترکیبی متغیر در سراسر ردیف توالی تعریف شده با استفاده از روش تخمین احتمال با لحاظ جریمه لازم در قالب طرح Bayesian reversible-jump Markov chain Monte Carlo (RJMCMC) محاسبه شد. مدل کراس اور (Cross-over) برای آنالیز جایگاه‌های دو اللی استفاده شد. آزمون‌های مربع کای (χ^2) و فیشر (Fisher exact test) برای ارزیابی ارتباط مابین دودمان‌های تکاملی و پی آمد بیماری استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

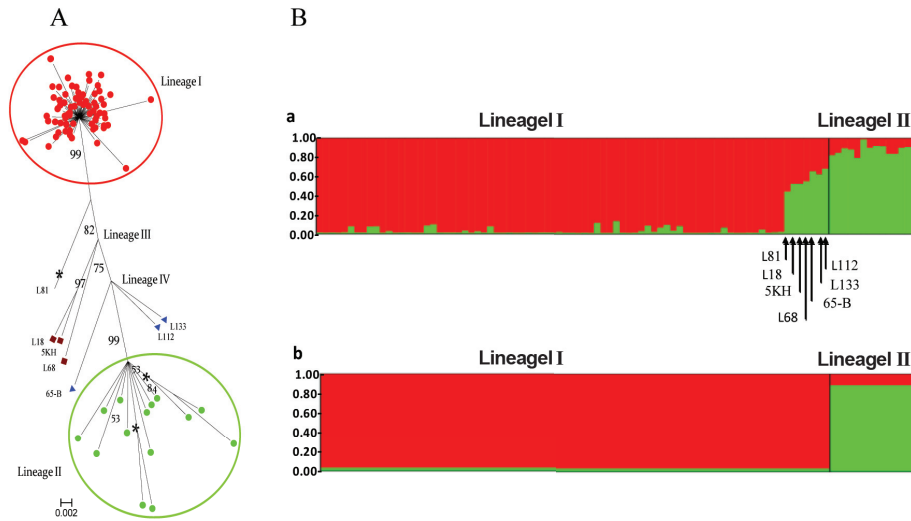
یافته‌ها

روند تکاملی در لوکوس *cagA*

آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های ژن *cagA*، روند تکاملی گسترده ای را در درون جمعیت‌های هلیکوباکترپیلوری ایرانی مشخص کرد. این جمعیت‌ها در درون چهار دودمان مجزا، خوشه بندی شده بودند. از میان سویه‌ها، ۷۲/۱٪ (۱۰۶/۱۴۷) از نظر حضور ژن *cagA* مثبت بودند. ۶۵۶ نوکلئوتید از ژن *cagA* (انتهای آمینی: ۴۱۳ نوکلئوتید، ناحیه مرکزی: ۲۴۳ نوکلئوتید)، در ۹۵ سویه هلیکوباکترپیلوری تعیین توالی و سپس آنالیز شد. توالی‌های نواحی انتهای آمینی یا مرکزی ۱۱ سویه (از ۱۰۶ سویه) قابل استفاده برای آنالیز نبود. دودمان‌ها توسط شاخه‌های درونی بلند با ۷۰٪ ارزش Cut-off در درخت نهایی به هم متصل شده بودند (شکل ۱ A). سویه‌های حد واسط در دودمان‌های ۳ و ۴ قرار گرفتند. سویه‌های IRANL18، IRAN5KH و IRANL68 در دودمان ۳ و سویه‌های IRANL133، IRAN65-B و IRANL112 در دودمان ۴ واقع شده بودند. این سویه‌ها همراه با سویه IRANL81 که به تنهایی در شاخه جدا واقع شده بود، دارای نیای مخلوط با نوکلئوتیدهای نوترکیب بودند و خاستگاه نیایی نوکلئوتیدها از دودمان‌های ۱ و ۲ بود (شکل ۱ B). قطعات توالی ژن *cagA* در دودمان ۱، ۱۰۷ پلی مورفیسم (۱۶/۳۱٪) و در دودمان ۲، ۷۹ پلی مورفیسم (۱۲/۰۴٪) را نشان داد. اگر چه پلی مورفیسم‌ها به مقدار قابل ملاحظه ای در دودمان ۲ کاهش یافته بودند، اما مقادیر پارامترهای π (تنوع نوکلئوتیدی)، Θ (میزان جهش) و نسبت Ka/Ks افزایش یافته بود (جدول ۳). نسبت Ka/Ks نمایانگر میزان فشار انتخابی بر روی ژن رمزگردان یک پروتئین است. نسبت بالای Ka/Ks در دودمان ۲ نشان داد که انتخاب منفی (حذف انتخابی ال‌های مضر) در این دودمان به سهولت انجام می‌شود.

روند تکاملی در لوکوس *vacA*

۴۴۶ نوکلئوتید از توالی داخلی ژن *vacA* در ۱۴۴ سویه هلیکوباکترپیلوری



شکل ۱: ساختار جمعیتی سویه‌های ایرانی بر اساس آنالیز قطعات ژن *cagA* (نواحی انتهایی آمینی و مرکزی) و *vacA* (نواحی انتهایی آمینی و مرکزی) با استفاده از قطعات توالی ادغام شده ژن *cagA* (نواحی انتهایی آمینی و مرکزی). چهار دودمان کاملاً جدا در شکل مشخص می‌باشد. سویه IRANL81 که با ستاره مشخص شده است نیای مخلوط با نوکلئوتیدهای نوترکیب را شامل می‌شود. ستاره‌ها در دودمان ۲ خوشه‌هایی را نشان می‌دهند که سریعاً در حال گسترش هستند. هر دودمان ارزش بوت استرپ بیشتر از ۷۰ را در شاخه‌های منتهی به دودمان شامل شد. (B). ساختار جمعیتی سویه‌های ایرانی بر اساس آنالیز قطعات ژن *cagA* (نواحی انتهایی آمینی و مرکزی) ادغام شده برای هر سویه و با دو جمعیت نیایی فرض شده توسط مدل Linkage در برنامه STRUCTURE. (a). ستون‌های عمودی رنگی نسبت‌های نیایی از دو جمعیت را برای هر سویه نشان می‌دهد. سویه‌های IRANL18، IRAN5KH، IRANL68، IRAN65-B، IRANL133 و IRANL112 نیا‌های مختلف را شامل شدند و تقریباً بیشتر از نیمی از نوکلئوتیدهایشان را از دودمان ۲ (سبز) و بقیه را از دودمان ۱ (قرمز) دریافت کرده بودند. سویه IRANL81، ۵۵٪ از نوکلئوتیدهایش را از دودمان ۱ و ۴۵٪ باقیمانده را از دودمان ۲ دریافت کرده بود. (b). برای هر دودمان، میانگین ضرایب عضویت برای دو جمعیت نیایی به صورت گرافیکی در این پلات نمایش داده شده است. دودمان ۱، ۳٪ از نوکلئوتیدهایش را از دودمان ۲ و دودمان ۲، ۱۲٪ از نوکلئوتیدهایش را از دودمان ۱ دریافت کرده است.

جدول ۳: داده‌های ژنتیک جمعیت در ژن های *cagA* (نواحی انتهایی آمینی و مرکزی) و *vacA* از سویه های هلیکوباکتر پیلوری ایرانی

	Lineage (No. strains)	Length (bp)	No. haplo-type	Hd	No. (%) poly-morphic sites	Ks	Ka	Ka/Ks	π	θ	ρ	ρ/θ
<i>cagA</i>	I (۷۴)	۶۵۶	۶۹	۰/۹۹۸	۱۰۷ (۱۶/۳۱)	۰/۰۳۹۶۰	۰/۰۰۹۹۹	۰/۲۵۳۵۵	۰/۰۱۶	۰/۰۳۱	۰/۶۲۸	۲۰/۰۸۲
	II (۱۴)	۶۵۶	۱۴	۱	۷۹ (۱۲/۰۴)	۰/۰۸۳۶۹	۰/۰۲۷۰۲	۰/۳۲۲۸۵	۰/۰۳۷	۰/۰۳۶	۰/۱۷۳	۴/۷۴۸
<i>vacA</i>	I (۸۷)	۴۴۵	۸۵	۰/۹۹۹	۷۴ (۱۶/۵۹)	۰/۰۷۱۶۴	۰/۰۳۵۳۴	۰/۴۹۳۲۹	۰/۰۴۲	۰/۰۳۷	۰/۱۶۴	۴/۴۵۳
	II (۵۵)	۴۴۵	۵۳	۰/۹۹۹	۱۰۴ (۲۳/۳۱)	۰/۰۸۳۱۰	۰/۰۳۸۰۴	۰/۴۶۲۵۷	۰/۰۴۷	۰/۰۴۷	۰/۲۷۵	۵/۸۰۶

Ks: No. of synonymous change per synonymous site, Ka: No. of non-synonymous change per non-synonymous site, π : nucleotide diversity, θ : mutation rate, ρ : average rho (recombination) per site obtained by Ldhat (p-value < 0.05).

ما بین دو دودمان بود. سویه‌های IRANL114 و IRANL121 در یک خوشه مجزا واقع شدند. اکثر سویه‌های دودمان ۲، به طور معنی داری حضور ژن *cagA* را در درون ذخیره ژنومی شان نشان دادند (۵۲/۵۵)٪ (۹۴/۵۶)٪. در برابر ۳۲/۵۶٪ (۴۹/۸۷)، $P=0$. دودمان یک، ۶۸/۹۲٪ (۳۸/۴۱)٪ از سویه‌های *cagA* را شامل شد. قطعات توالی ژن *vacA* در دودمان ۱، ۷۴٪ پلی مورفیسیم (۱۶/۵۹)٪ را در مقایسه با ۱۰۴ پلی مورفیسیم (۲۳/۳۱)٪ در دودمان ۲، شامل شد. پلی مورفیسیم بالاتر دودمان ۲ با افزایش در مقادیر π و θ همراه بود در صورتی که نسبت Ka/Ks کاهش یافته بود (جدول ۳).

ایرانی تعیین توالی و آنالیز شد. توالی‌های ژن *vacA* سه سویه (از ۱۴۷ سویه) که از بیوپسی معده بیماران مبتلا به سرطان معده جدا شده بودند قابل استفاده نبودند. منحنی‌های کروماتوگرام برای تعدادی از جایگاه‌ها دو نوکلئوتید متفاوت را نشان داد. از این رو توالی‌های این سویه‌ها از این مطالعه خارج شدند. آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌های ژن *vacA* دو دودمان مجزا را در درون سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری ایرانی با توزیع وابسته به دودمانی سویه‌های *cagA*⁺ نشان داد (شکل ۲). دو دودمان توسط یک شاخه درونی بلند به هم متصل شده بودند که نشان از تفاوت ژنتیکی بالا

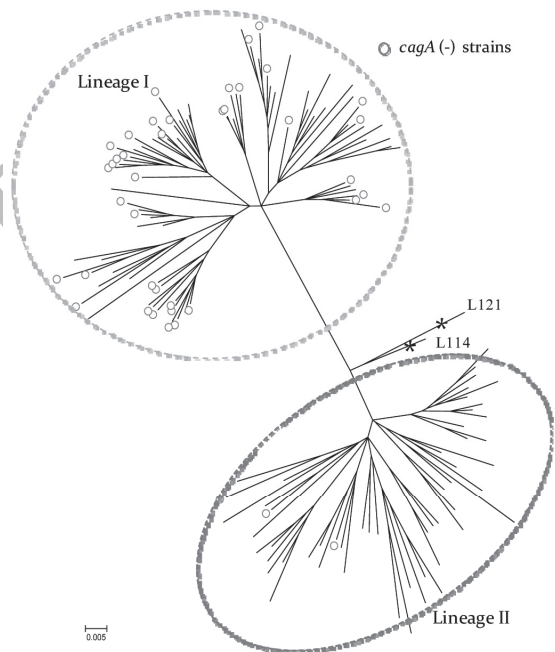
در برابر ۱۴/۹۴٪ (۱۳/۸۷)، $p = ۰/۰۰۳$]. بیشتر سویه‌ها در دودمان ۱ از ژن *cagA*، ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *vacA* را نشان دادند [۶۴/۸۶٪ (۴۸/۷۴)] در برابر ۲۱/۴۳٪ (۳/۱۴)، $p = ۰/۰۰۳$ و به طور معنی داری با خطر بالای بیماری زخم گوارشی در افراد آلوده مرتبط بودند [۲۸/۳۸٪ (۲۱/۷۴)] در برابر صفر٪ (zero/۱۴)، $p = ۰/۰۲۲$]. براین اساس، سویه‌های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *vacA* و دودمان ۱ از ژن *cagA* به طور معنی داری با بیماری شدید معده در افراد آلوده مرتبط بودند. سویه‌های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *cagA* به طور معنی داری با گاستریت مرتبط بودند [۱۰۰٪ (۱۴/۱۴)] در برابر ۴۳/۲۴٪ (۳۲/۷۴)، $p = ۰$]. به نظر می‌رسد که سویه‌های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *cagA*، الگوهای توالی منحصر به فردی در نواحی انتهایی آمینی و مرکزی داشته و با شدت کمتر بیماری مرتبط می‌باشند.

تأثیر جهش و نوترکیبی در بیماری زایی هلیکوباکتریلوری

در این مطالعه میزان جهش و نوترکیبی برای نوکلئوتیدها در دودمان‌های متفاوت جمعیت هلیکوباکتریلوری ایرانی محاسبه شد (جدول ۳). میزان نوترکیبی در دودمان ۱ از ژن *cagA* (۰/۶۳۴) تقریباً ۳/۴۲ مرتبه بیشتر از دودمان ۲ (۰/۱۸۵) بود. نسبت $\rho(\Theta)$ برای نوکلئوتیدها در دودمان‌های ۱ و ۲ از ژن *cagA* به ترتیب ۲۰/۴۵ و ۵/۱۳۸ بود که نشان داد که تغییرات نوکلئوتیدها توسط نوترکیبی به ترتیب ۲۰ و ۵ مرتبه بیشتر از تغییرات نوکلئوتیدها توسط جهش می‌باشد. میزان نوترکیبی در دودمان ۲ از ژن *vacA* (۰/۲۷۵)، تقریباً ۱/۶۷ مرتبه بیشتر از دودمان ۱ (۰/۱۶۴) بود. این یافته‌ها میزان قابل ملاحظه تغییرپذیری ژنومی براساس نوترکیبی را در دودمان ۲ از ژن *vacA* و دودمان ۱ از ژن *cagA* نشان داد. این دودمان‌ها با میزان بالاتر بیماری زخم گوارشی در افراد آلوده مرتبط بودند. در دودمان‌های ژن *vacA* ایرانی، میزان پلی مورفیسم، تنوع نوکلئوتیدی، جهش و نوترکیبی به موازات هم تغییر یافته بودند. در مقابل، کاهش قابل ملاحظه در میزان پلی مورفیسم از ۱۰۷٪ (۱۶/۳۱) به ۷۹٪ (۱۲/۰۴) در دودمان‌های *cagA* تقریباً با ۳/۵ مرتبه کاهش در میزان نوترکیبی همراه بود در حالی که مقدار π تقریباً ۲/۳۳ مرتبه افزایش یافته بود (۰/۱۶) در برابر ۳۷٪). افزایش در تنوع نوکلئوتیدی π با افزایش ۴ برابری در تکامل نوکلئوتیدی ایجاد شده توسط جهش همراه شده بود.

ارتباط بین دودمان‌های تکاملی در جمعیت هلیکوباکتریلوری ایرانی و نوع بیماری ایجاد شده

در این مطالعه گروه‌های تکاملی مجزا در جمعیت هلیکوباکتریلوری ایرانی با استفاده از آنالیز خوشه‌ای قطعات از هر دو ژن بیماری زاء مشخص گردید. علاوه بر آن آزمون آماری به منظور تشخیص ارتباط بین دودمان‌های تکاملی و تیپ بیماری ایجاد شده نیز انجام شد (جدول ۴). این آنالیزها نشان داد که سویه‌های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *vacA* به طور معنی داری $cagA^+$ بوده [۹۴/۵۶٪ (۵۲/۵۵)] در برابر ۵۶/۳۲٪ (۴۹/۸۷)، $p = ۰$ و با میزان بالای بیماری زخم گوارشی در افراد آلوده نیز مرتبط بودند [۳۶/۳۶٪ (۲۰/۵۵)]



شکل ۲: آنالیز فیلوژنتیکی ۱۴۴ سویه هلیکوباکتریلوری ایرانی با استفاده از قطعات توالی داخلی ژن *vacA*. دو دودمان کاملاً مجزا در شکل مشخص بوده و بیشتر از ۹۰٪ سویه‌ها در دودمان ۲، $cagA^+$ می‌باشند. دو سویه IRANL114 و IRANL121 که در شکل با ستاره مشخص شده‌اند، در یک خوشه جدا قرار گرفته بودند.

جدول ۴: تیپ بیماری ایجاد شده توسط سویه‌های هلیکوباکتریلوری با ژنوتیپ دودمانی مختلف از ژن‌های *vacA* و *cagA* ایرانی

Lineage	No. strains	<i>Cag A</i> positive	NUD-normal	NUD-gastritis	Peptic ulcer
<i>vacA</i> Lineage I	۸۸	۵۰	۲۸	۴۷	۱۳
<i>vacA</i> Lineage II	۵۶	۵۳	۱۲	۲۴	۲۰
<i>cagA</i> Lineage I	۷۴	-	۲۱	۳۲	۲۱
<i>cagA</i> Lineage III	۱۴	-	۰	۱۴	۰
<i>cagA</i> negative	۴۱	-	۱۳	۲۴	۴

بحث

بررسی‌ها نشان داده اند که خصوصیات ژنتیکی هلیکوباکتریپیلوری به لحاظ وضعیت جغرافیایی و قومیتی میزبان‌های انسانی بسیار متنوع می‌باشد. (۱۱ و ۲۰ و ۲۶ و ۲۷)، در مطالعه قبلی تعیین ویژگی سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری ایرانی بر اساس آنالیز ۷ ژن مرکزی انجام شده و تفاوت قومی - جغرافیایی قابل ملاحظه در درون ایران نشان داده شده بود. (۲۰)، سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری ایرانی مشابه با سویه‌های دیگر جدا شده از اروپا-آسیای غربی بوده و در داخل جمعیت hpEurope واقع شده بودند. hpEurope از آمیختگی دو جمعیت نیایی مجزا، AE1 (Ancestral Europe1) و AE2 (Ancestral Europe2) تشکیل شده که نسبت‌های نیایی آن‌ها بر اساس مکان جغرافیایی متغیر می‌باشد، سویه‌های ایرانی توزیع نسبتاً یکسانی از دو نیا را نشان دادند. به این خاطر به نظر نمی‌رسد که قبل از گسترش جمعیت‌ها در سراسر اروپا-آسیای غربی، منبعی از ایران آمده باشد. در این مطالعه گروه بندی کلونال هلیکوباکتریپیلوری در ایران با استفاده از آنالیز توالی ژن‌های بیماری زای مهم هلیکوباکتریپیلوری *cagA* و *vacA* بررسی شد و ارتباط بین الگوهای تنوع ژنومی و پی آمد بیماری در قالب الگوهای فیلوژنتیکی ارزیابی شد. آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌های ژن *cagA*، چهار دودمان کاملاً مجزا را با زیر خوشه‌هایی که سریعاً در حال گسترش بودند، نشان داد. این دودمان‌ها الگوهای کاملاً متفاوت از تنوع ژنومی را نشان داده و برخی از آن‌ها نوکلئوتیدهای نوترکیب را شامل شدند. تعداد زیاد الگوهای تنوع الی در ژن‌های بیماری زا روند تکاملی قوی را نشان داد که موجب ظهور دودمان‌های کلونال جدید از ژن *cagA* (دودمان‌های ۲، ۳ و ۴) در ایران شده است. این دودمان‌ها تنوع ژنتیکی و ساختار موزاییک گسترده‌ای را در بین سویه‌ها نشان داده و الگوهای تنوع ژنومی به طور معنی داری مرتبط با پی آمد بیماری بود. پروتئین CagA از سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری مختلف، تنوع گسترده‌ای را در نواحی انتهایی کربوکسیلی که شامل بخش‌های فسفوریلاسیون تکراری (موتیف‌های EPIYA) است، نشان می‌دهد. (۱۴ و ۲۸)، بررسی‌ها نشان داده که تعداد و ترکیب موتیف‌های مختلف، براساس مکان‌های جغرافیایی تغییر کرده و پی آمد بالینی بیماری را تعیین می‌کند. (۲۹-۳۱)، براین اساس سویه‌های غربی با سویه‌های آسیای شرقی به طور کامل تفاوت دارند. (۳۲ و ۳۳)، به عنوان نمونه سویه‌های آسیای شرقی با میزان بالای سرطان معده مرتبط می‌باشند. (۳۲ و ۳۴) مطالعه ما نشان داد که نواحی انتهایی آمینی و مرکزی ژن *cagA* نیز ممکن است به طور مشابه دارای نشان‌های افتراقی باشند. براین اساس تنوع گسترده ژنتیکی محدود به ناحیه انتهایی ۳' نبوده، بلکه نواحی ۵' و مرکزی ژن *cagA* را نیز شامل می‌شود. اگر چه میزان بالای نوترکیبی ممکن بود به شدت ساختار کلونال را در درون جمعیت هلیکوباکتریپیلوری تغییر دهد، اما در این مطالعه برای نخستین بار الگوی خوشه بندی باکتریایی بسیار افتراقی در ایران که کشوری با شیوع بالای عفونت هلیکوباکتریپیلوری و منابع قومی - جغرافیایی

مختلف است، نشان داده شد. ژن *cagA* احتمالاً فشارهای انتخابی قوی و در حال گسترش را تحمل کرده، که این فشارها موجب ظهور دودمان‌های کلونال جدید در درون سویه‌های ایرانی شده است. آنالیز فیلوژنتیک با استفاده از توالی‌های ژن *vacA* دو دودمان مجزا را نشان داد. دودمان ۲ به طور معنی داری سویه‌های *cagA*⁺ را نشان داد. الگوهای کاملاً متفاوت از تنوع ژنومی بین دو دودمان نشان داد که آنالیز تنها بخش کوچکی از این ژن می‌تواند خوشه‌های کاملاً متمایز را در یک کشور با شیوع بالای هلیکوباکتریپیلوری مثل ایران مشخص کند.

در این مطالعه ارتباط مابین دودمان‌های تکاملی در جمعیت هلیکوباکتریپیلوری ایرانی و نوع بیماری ایجاد شده مورد پژوهش قرار گرفت. سویه‌های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *cagA* به طور معنی داری با بیماری گاستریت در ارتباط بودند. اکثر سویه‌ها با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *vacA*، *cagA*⁺ (> ۹۰٪) بوده و مانند دودمان ۱ از ژن *cagA* به طور معنی داری با بیماری زخم گوارشی مرتبط بودند. مطالعه‌های مختلف نشان می‌دهد که وجود ژن *cagA* و ارتباط آن با بیماری‌های معده بر اساس منابع قومی - جغرافیایی مختلف تغییر می‌کند. (۳۵ و ۳۶)، فراوانی بالای سویه‌های *cagA*⁺ به طور معنی داری با زخم معده و سرطان معده مرتبط بوده است. (۲۹ و ۳۰ و ۳۷)، مانند *cagA*، ژنوتیپ‌های *vacA* s1, i1 نیز با فراوانی بالا در سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم و سرطان معده گزارش شده است. (۲۹ و ۳۸ و ۳۹)، مطالعه‌های مختلف ارتباط مابین شیوع *cagA* و برخی ترکیب‌های الی *vacA* (مانند s1, i1) را در سویه‌های هلیکوباکتریپیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم و یا سرطان معده نشان داده است. (۴۰ و ۴۱)

در این مطالعه مشخص شد که بیشتر از ۷۰٪ سویه‌های ایرانی *cagA*⁺ می‌باشند که یافته‌های قبلی را تایید می‌کند. (۴۴-۴۲)، فراوانی بالای ژن *cagA* اگرچه قابل تصور است اما لزوماً منجر به بیماری‌های شدید معده مانند زخم و سرطان معده نمی‌شود. چنین یافته‌ای ممکن است به دلیل تعداد زیاد الگوهای تنوع الی در ژن *cagA* سویه‌های ایرانی باشد. سویه‌های با ژنوتیپ دودمان ۲ از ژن *cagA* و ژنوتیپ دودمان ۱ از ژن *vacA* که با بیماری‌های خفیف معده مرتبط می‌باشند، دارای نسبت بالای Ka/Ks بوده که نشان می‌دهد انتخاب منفی (حذف انتخابی ال‌های مضر) در این دودمان‌ها به سهولت انجام شده است. در دودمان‌های *vacA* میزان پلی مورفیسم، نوترکیبی، جهش و تنوع نوکلئوتیدی به صورت همسو تغییر می‌کنند. در دودمان ۲ از ژن *cagA* میزان نوترکیبی و پلی مورفیسم به شدت کاهش پیدا کرده بود در حالی که میزان تنوع نوکلئوتیدی، نسبت Ka/Ks و میزان جهش افزایش یافته بود. این نتایج نقش قابل ملاحظه تغییرات نوکلئوتیدی بر پایه جهش را در تکامل دودمان ۲ از ژن *cagA* در مقایسه با دودمان ۱ نشان می‌دهد. بر این اساس، زمانی که تکامل نوکلئوتیدی از نوترکیبی به جهش تغییر جهت می‌دهد، بیماری زایی باکتریایی ممکن است کاهش پیدا کند در حالی که احتمالاً حیات

در سویه‌های مربوط به دودمان‌های کلونال جدید در ایران منجر به روشن شدن روند تکاملی و تحلیل علت تنوع ژنتیکی و ساختار موزاییک گسترده بین سویه‌ها در این دودمان‌های ظهور یافته جدید خواهد شد. علاوه بر این، ارزیابی فعالیت بیولوژیک پروتئین CagA این دودمان‌ها در شرایط *in vitro* و *in vivo* می‌تواند به روشن شدن نقش درون سلولی و تفاوت اثرکردهای زیستی آن‌ها در مقایسه با پروتئین‌های CagA غربی (اروپا-آسیای غربی، دودمان ۱ ژن cagA در ایران) و شرقی (آسیای شرقی) کمک کند.

باکتریایی حفظ می‌شود. به هر حال این فرضیه باید با طراحی آزمایش‌های بعدی مورد بررسی بیشتر قرار گرفته و اثبات شود.

نتیجه‌گیری

تعداد بالای الگوهای تنوع اللی در ژن‌های بیماری‌زای سویه‌های جدا شده از منابع قومی - جغرافیایی در ایران روند تکاملی قوی را نشان داد که موجب ظهور دودمان‌های کلونال جدید از ژن cagA در ایران شده است. دودمان‌های مشخصی از ژن‌های cagA و vacA با بیماری زخم گوارشی مرتبط بودند. از این رو تعیین توالی کامل ژن cagA (~۳/۵kb)

REFERENCES

- Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 2002;347:1175-86.
- Giannakis M, Chen SL, Karam SM, Engstrand L, Gordon JI. Helicobacter pylori evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4358-63.
- Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, Yamaoka Y, et al. Gain and loss of multiple genes during the evolution of Helicobacter pylori. *PLoS Genet* 2005;1:e43.
- Kraft C, Suerbaum S. Mutation and recombination in Helicobacter pylori: mechanisms and role in generating strain diversity. *Int J Med Microbiol* 2005;295:299-305.
- Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis Helicobacter pylori strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9999-10004.
- Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, et al. Free recombination within Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12619-24.
- Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M, et al. Genotyping of Helicobacter pylori isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique. *Res Microbiol* 1996;147:661-9.
- Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14607-12.
- Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, et al. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15056-61.
- Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of recombinant strains of Helicobacter pylori during human infection. *Mol Microbiol* 1999;31:31-43.
- Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. *Science* 1999;284:1328-33.
- Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B, Su W, Pan Z, Garcia C, et al. Differences in genotypes of Helicobacter pylori from different human populations. *J Bacteriol* 2000;182:3210-8.
- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-7.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burrone D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5791-5.
- Nouraei M, Latifi-Navid S, Rezvan H, Radmard AR, Maghsudlu M, Zaer-Rezaei H, et al. Childhood hygienic practice and family education status determine the prevalence of Helicobacter pylori infection in Iran. *Helicobacter* 2009;14:40-6.
- Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S, et al. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. *J Clin Pathol* 2004;57:37-42.
- Massarrat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A, Himmelmann GW, Hitzges M, Keshavarz H. Peptic ulcer disease, irritable bowel syndrome and constipation in two populations in Iran. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:427-33.
- Fakheri H, Malekzadeh R, Merat S, Khatibian M, Fazel A, Alizadeh BZ, et al. Clarithromycin vs. furazolidone in quadruple therapy regimens for the treatment of Helicobacter pylori in a population with a high metronidazole resistance rate. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:411-6.
- Zendehdel N, Nasser-Moghaddam S, Malekzadeh R, Massarrat

- S, Sotoudeh M, Siavoshi F. Helicobacter pylori reinfection rate 3 years after successful eradication. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:401-4.
20. Latifi-Navid S, Ghorashi SA, Siavoshi F, Linz B, Massarrat S, Khegay T, et al. Ethnic and geographic differentiation of Helicobacter pylori within Iran. *PLoS One* 2010;5:S001.
21. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of Helicobacter pylori from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1436-9.
22. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244-5.
23. Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 1999;15:174-5.
24. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 2003;164:1567-87.
25. McVean GA, Myers SR, Hunt S, Deloukas P, Bentley DR, Donnelly P. The fine-scale structure of recombination rate variation in the human genome. *Science* 2004;304:581-4.
26. Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, et al. Recombination and clonal groupings within Helicobacter pylori from different geographical regions. *Mol Microbiol* 1999;32:459-70.
27. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. *Science* 2003;299:1582-5.
28. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002;43:971-80.
29. Basso D, Zamboni CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135:91-9.
30. Hatakeyama M, Higashi H. Helicobacter pylori CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005;96:835-43.
31. Xia Y, Yamaoka Y, Zhu Q, Matha I, Gao X. A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of Helicobacter pylori. *PLoS One* 2009;4:e7736.
32. Azuma T, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Muramatsu A, Suto H, et al. Association between diversity in the Src homology 2 domain--containing tyrosine phosphatase binding site of Helicobacter pylori CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis* 2004;189:820-7.
33. van der Ende A, Pan ZJ, Bart A, van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, et al. cagA-positive Helicobacter pylori populations in China and The Netherlands are distinct. *Infect Immun* 1998;66:1822-6.
34. Li J, Ou Z, Wang F, Guo Y, Zhang R, Zhang J, et al. Distinctiveness of the cagA genotype in children and adults with peptic symptoms in South China. *Helicobacter* 2009;14:248-55.
35. Chiarini A, Cala C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, et al. Prevalence of virulence-associated genotypes of Helicobacter pylori and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:437-46.
36. Parsonnet J, Replogle M, Yang S, Hiatt R. Seroprevalence of CagA-positive strains among Helicobacter pylori-infected, healthy young adults. *J Infect Dis* 1997;175:1240-2.
37. Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Ito Y, Keida Y, et al. The diversity of vacA and cagA genes of Helicobacter pylori in East Asia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;40:81-7.
38. Sugimoto M, Zali MR, Yamaoka Y. The association of vacA genotypes and Helicobacter pylori-related gastroduodenal diseases in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1227-36.
39. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133:926-36.
40. Douraghi M, Talebkhan Y, Zeraati H, Ebrahimzadeh F, Nahvijoo A, Morakabati A, et al. Multiple gene status in Helicobacter pylori strains and risk of gastric cancer development. *Digestion* 2009;80:200-7.
41. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1998;115:58-66.
42. Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, et al. Differences in virulence markers between Helicobacter pylori strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in H. pylori-associated disease. *J Clin Microbiol* 2008;46:1774-9.
43. Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K, Yamaoka Y, Zojaji H, et al. vacA genotypes of Helicobacter pylori in relation to cagA status and clinical outcomes in Iranian populations. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:290-3.
44. Siavoshi F, Asgharzadeh A, Ghadiri H, Massarrat S, Latifi-Navid S, Zamani M. Helicobacter pylori genotypes and types of gastritis in first-degree relatives of gastric cancer patients. *Int J Med Microbiol* 2011;301:506-12.

Evolutionary Dynamics of *Helicobacter pylori* cagA and vacA Genes in Iran and their Association with Clinical Outcomes

Latifi-Navid S¹, Siavoshi F², Fakheri H³, Sharifian A⁴, Nobakht H⁵, Tavafzadeh R⁶, Salman Roghani H⁷, Behbahanian M⁸, Massarrat S⁹, Malekzadeh R⁹

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

² Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Internal Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ KDRC (Kurdistan Digestive Disease Research Center), Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

⁵ Department of Internal Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁶ Department of Internal Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁷ Department of Internal Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁸ Department of Internal Medicine, Imam Khomeini Hospital, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahwaz, Iran

⁹ Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background:

There is a relationship between specific genotypes of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes and the increased risk of peptic ulcer diseases and gastric cancer. These genes also possess strong patterns of geographical differentiation. The present study aims to determine the patterns of variation of the virulence genes in Iran and their association with clinical status.

Materials and Methods:

Sequence fragments for cagA and vacA were obtained from a total of 147 *H. pylori* isolates from diverse geographical and ethnic sources within Iran. We used phylogenetic methods to determine the patterns of allelic diversity, and the relationship between evolutionary lineages and clinical status.

Results:

Phylogenetic analyses of Iranian cagA gene disclosed four lineages, whereas the vacA gene had two distinct lineages. The cagA lineage II showed extensive genetic diversity compared with lineage I. cagA lineages III and IV disclosed mixed ancestries with recombinant nucleotides that originated from lineages I and II. Iranian strains with vacA lineage II genotype were significantly cagA+ (> 90%, $p = 0.0$) and correlated with a higher rate of peptic ulcers in infected individuals ($p = 0.003$). Most strains in the cagA lineage I showed a vacA lineage II genotype ($p = 0.003$) and significantly correlated with an increased risk of peptic ulcers in infected individuals ($p = 0.022$). Strains with cagA lineage III genotype significantly correlated with gastritis ($p = 0.0$).

Conclusion:

The increased level of allelic diversity in the virulence genes shows strong evolutionary dynamics, resulting in the emergence of new clonal genealogies of the cagA gene within Iran. Particular lineages of the Iranian cagA and vacA genes correlate with peptic ulcer diseases.

Keywords: *H. pylori*, Genetic diversity, Clinical status, vacA, cagA, Iran

Govaresh/ Vol.15, No.4, Winter 2011; 283-292

Corresponding author:

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, 56199-11367 Iran.

Tel: +98 451 5513915

Fax: + 98 451 5514701

E-mail: slatifin@yahoo.com

Received: 23 Jun. 2011-08-20

Edited: 18 Jul. 2011

Accepted: 21 Jul. 2011