مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۲۱-۳۱
بهار و تابستان ۱۳۸۷

# بررسی تیپ‌های مختلف و ژن *vacA cytotoxin* در هلیکوباکتر پیلوری با روش PCR در بیماری‌های دستگاه گوارش فوقانی

**محمدرضا بوجاری‌نصرآبادی[1*]، مهدی فروزنده[2]، امیرهوشنگ الوندی[3]**

۱- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید چمران، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۱۰

## چکیده

**هدف:** عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در سطح جهان گسترده است و بیشترین عامل بیماری‌زایی در عفونت‌های سوء هاضمه التهاب معده (گاسترودئودنال) است. گاهی شیوع آن تا ۸۰ درصد بعضی از جمعیت‌ها را در بر می‌گیرد اما تنها ۱۰ تا ۲۰ درصد از این افراد به بیماری‌های مرتبط با این باکتری مبتلا می‌شوند. همچنین عفونت‌های حاصل از هلیکوباکتر پیلوری مانند زخم گوارشی، التهاب معده، التهاب دوازدهه و سوء هضم است و تفاوت در بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری به عوامل میزبان و بیماری‌زایی باکتری وابسته است. هلیکوباکتر پیلوری براساس ژن‌های *vacA* و *cagA* به سویه (تیپ)های متعددی تقسیم‌بندی می‌شود که بیماری‌زایی متفاوتی دارند. وجود این ژن‌ها در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری ممکن است برای تشخیص نوع باکتری بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا به‌کار برده شود.

هدف این تحقیق بررسی فراوانی ژن تولیدکننده سیتوتوکسین واکوئلی (*vacA*) در ژنوتیپ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری است که از میان بیماران مراجعه‌کننده به مجتمع آموزشی، پژوهشی و درمانی حضرت رسول اکرم (ص)، پذیرفته شده در بخش داخلی همراه با عفونت‌های زخم گوارشی، التهاب معده، التهاب دوازدهه و سوء هاضمه انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه نمونه بیوپسی ناحیه آنتروم معده از ۱۸۰ بیماران مراجعه‌کننده به بخش داخلی مجتمع آموزشی، پژوهشی و درمانی حضرت رسول اکرم (ص)، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران در تهران که به‌طور معمول تحت آندوسکوپی گوارشی- معدی قرار گرفته‌اند، جمع‌آوری شد. پس از کشت و جداسازی سویه‌های مثبت هلیکوباکتر پیلوری با آزمایش‌های استاندارد و استخراج DNA باکتری، حضور ژن *vacA* و نیز تیپ‌های مختلف آن با استفاده از روش PCR تعیین شد.

**نتایج:** در این مطالعه از نمونه‌های ۱۸۰ بیمار بیوپسی ۹۲ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا (۵۱ درصد) و توسط روش‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شد. نمونه‌ها از زخم گوارشی (۷۹ درصد)، التهاب معده (۶۰ درصد)، التهاب دوازدهه (۹۰ درصد) و سوء هاضمه (۳۰ درصد) بود که ۸۷ سویه هلیکوباکتری پیلوری (۹۴ درصد) دارای ژن *vacA* هستند و بیشتر ژنوتیپ‌ها هم در ژن *vacA* است. همچنین ۵۹ نمونه سویه‌ها (۶۴ درصد) ژنوتیپ s1/m2 را نشان داده است. ۵۷ (۶۲ درصد) سویه از این ۹۲ سویه هلیکوباکتر پیلوری متعلق به تیپ I بوده و ۳۱ (۳۳ درصد) سویه‌ها در تیپ IV و ۳ (۳/۲۶ درصد) نمونه در تیپ II و ۲ (۲/۱۷ درصد) نمونه در تیپ III قرار گرفتند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه، تفاوت بین فراوانی تیپ I و IV، نشان‌دهنده بیماری‌زایی بیشتر سویه‌های تیپ I (۶۲ درصد) است و در بیماران مبتلا به زخم گوارشی درمقایسه با سایر عفونت‌ها، به‌طور معنی‌داری اختلاف دارد ($P \leq ۰/۰۱$).

**کلیدواژگان:** هلیکوباکتر پیلوری، *vacA cytotoxin*، PCR.

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، صندوق پستی: ۵۹۸۳-۱۴۱۵۵.
Email: Bojarymr@hotmail.com

## ۱- مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori: H.pylori*) باسیل گرم منفی و میکروآئروفیلی است که در مخاط معده اغلب به‌صورت مارپیچی [۱] و در محیط کشت به‌صورت خمیده دیده می‌شود [۲]. این باکتری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت (Gastritis: G)، زخم‌های گوارشی (Peptic ulcer disease: PUD)، سرطان معده و لمفوما (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue: MALT) است [۳]. عفونت با این باکتری در سطح جهان گسترده است، به‌طوری‌که در کشورهای در حال توسعه به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد [٤]، اما بیماری‌های مرتبط با *H.pylori* تنها در ۱۰ تا ۲۰ درصد این جمعیت‌ها دیده می‌شود [٥، ٦]. محققان این تفاوت در بیمای‌زایی را مربوط به دو عامل می‌دانند: ۱) عواملی که به میزبان وابسته است و شامل خصوصیات ژنتیکی و ایمونولوژیک افراد، مصرف سیگار و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و غیره است که آن را خطر ابتلا به بیماری می‌نامند و ۲) عواملی که به باکتری وابسته است [۷] که *H.pylori* را با توجه به تفاوت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی به سویه‌ها و تیپ‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌کنند [۳]. بیماری‌زایی هر سویه با توجه به میزان تبادل علائم بین باکتری و سلول‌های پوششی میزبان متفاوت است [۷]. مهم‌ترین تفاوت‌های بین سویه‌های *H.pylori*، دو ژن *vacA* (کدکننده سیتوتوکسین واکوئل‌زا) و *cagA* (کد کننده پروتئین وابسته به سیتوتوکسین) است [۸]، که ژن *cagA* جزئی از مجموعه cagPAI و دارای ۳۱ ORF (Open Reading Frame) است. سایر ژن‌های این مجموعه، سیستم ترشحی تیپ IV باکتری‌ها را کد می‌کنند که پروتئین cagA را پس از ورود به سلول میزبان ترشح می‌کنند. این پروتئین پس از ورود به سلول میزبان، باعث تغییراتی در سلول و تخریب آن می‌شود [۳، ۹]. ژن *vacA* کد کننده پروتئین vacA است که به‌صورت اتوترانسپورت (Auto-transport) وارد سلول شده و باعث تشکیل واکوئل‌های اسیدی در سیتوپلاسم سلول می‌شود [۱۰]. فعالیت سیتوتوکسیک پروتئین vacA با توجه به الل‌های مختلف m و s این پروتئین تفاوت دارد [۱۱-۱۳]. امروزه براساس خصوصیات واکوئله‌کنندگی و نیز حضور ژن *cagA*، *H.pylori* به تیپ‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شود، تیپ I که شامل سویه‌های دارای ژن *cagA* و فعالیت سیتوتوکسیک توسط *vacA* است، و تیپ II که شامل سویه‌های فاقد ژن *cagA* و فعالیت سیتوتوکسیک‌اند و تیپ III که سویه‌های دارای ژن *cagA* و فاقد فعالیت سیتوتوکسیک‌اند و تیپ IV که سویه‌های فاقد ژن *cagA* و دارای فعالیت سیتوتوکسیک‌اند [۸، ۹، ۱۱]. در مطالعات قبلی برای بررسی حضور و فعالیت سیتوتوکسیک پروتئین vacA از SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و کشت سلولی استفاده می‌شد اما در تحقیق حاضر با استفاده از تجربیات به‌دست آمده توسط رودی (Rudi) و همکاران و همچنین تاکاتا (Takata) و همکاران [۱۱، ۱۲]، فعالیت سیتوتوکسیک پروتئین cagA با استفاده از ژنوتیپ آن پیش‌بینی شد. به‌همین دلیل در صورت وجود ژنوتیپ‌های s1/m1 و s1/m2 سویه دارای فعالیت سیتوتوکسیک و در صورت وجود ژنوتیپ s2/m1 و s2/m2 یا فقدان ژن *vacA* سویه فاقد فعالیت سیتوتوکسیک درنظر گرفته می‌شد. هدف از انجام این مطالعه بررسی شیوع تیپ‌های مختلف *H.pylori* در بیماران مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی مراجعه‌کننده به بخش داخلی مجتمع آموزشی، پژوهشی و درمانی حضرت رسول اکرم(ص)، دانشگاه علوم پزشکی ایران در تهران است.

## ۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه، بیماران مبتلا به ناراحتی‌های ناحیه فوقانی دستگاه گوارش، مراجعه‌کننده به بخش آندوسکوپی مجتمع آموزشی، پژوهشی و درمانی حضرت رسول اکرم (ص)، وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران به‌مدت یکسال تحت بررسی قرار گرفتند. بیماران توسط پزشک متخصص تحت آندوسکوپی قرارگرفته و تشخیص بیماری براساس نمای میکروسکوپی معده انجام گرفت. اطلاعات مربوط به بیماران نیز به‌وسیله پرسشنامه به‌دست آمد. بیمارانی که سابقه جراحی معده، بدخیمی و خونریزی فعال در معده و ابتدای روده داشتند از بررسی حذف شدند. از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم (Antrum) معده گرفته شد. در مورد یکی از نمونه‌ها، آزمایش سریع اوره‌آز (Urease test) به‌کار رفت و نمونه دیگر برای

کشت در محیط انتقالی [۱٤] در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. نتایج اوره‌آز سریع تا ٤ ساعت پس از تلقیح پیگیری و یادداشت شد [۱۵].

## ۲-۱- جداسازی اولیه *H.pylori*

نمونه‌های بیوپسی منتقل شده به آزمایشگاه (در گروه میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس) در مدت زمانی کمتر از ٦ ساعت پس از نمونه‌گیری روی دو محیط کشت اختصاصی طبق روش پیکول‌مینی (Piccolmini) [۱۷،۱٦]، انتقال و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت بالا و شرایط میکروآئروفیل به‌مدت ۳-۷ روز در گرم‌خانه قرار داده شد. *H.pylori* براساس ریخت‌شناسی (Morphology) کلونی و رنگ‌آمیزی گرم و واکنش‌های مثبت کاتالاز و اکسیداز و اوره‌آز تعیین هویت شد. عدم رشد طی ۷ روز منفی تلقی شد. باکتری‌ها از سطح پلیت به کمک سواپ استریل جمع‌آوری و در محیط نگهدارنده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱٤].

## ۲-۲- جداسازی DNA

پس از تهیه کشت تازه ۳ روزه از *H.pylori* آن را به کمک سواپ استریل جمع‌آوری شده و در میکرولوله حاوی سالین (Saline) استریل معلق شد. پس از یک‌بار شستشو به‌وسیله سالین استریل، رسوب حاصل در بافر لیزکننده معلق شد. دراین روش DNA به‌وسیله روش وندورن (Van Doorn)، و همکاران استخراج شد [۱۸].

## ۲-۳- PCR

در این مرحله با استفاده از آغازگرهای (Primers) اختصاصی در واکنش‌های PCR جداگانه، وجود ژن‌های *vacA* و *cagA* درایزوله‌ها بررسی شد. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی بافر PCR ۱x، ۲۰۰ میکرومول مخلوط dNTP، ۱/۲۵ میکرولیتر DNA پلیمراز *Taq* (*Taq* DNA Polymerase) و ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ (همگی تهیه شده از شرکت Fermentas، Lithuania) و ۲۰ میکرومول (پیکومول در میکرولیتر) از آغازگرها انجام شد. پس از تهیه مخلوط اصلی (Mastermix) و پوشاندن آن با روغن معدنی (Cinnagen، ایران)، فرایند در دستگاه Master - cycler با دمای زیر انجام گرفت. ۱- دمای واسرشتگی (Denaturation) ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۲- ۳۵ چرخه حرارتی شامل: الف- دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ب- دمای اتصال (Annealing) آغازگر مخصوص هر آغازگر (برای *cagA*-Ir در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و برای m و *vacA*-s دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و ج- دمای بسط (Extension)، ۷٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، سپس محصول واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد در کنار نشانگر (Marker) وزن مولکولی Generuler 1kb ladder (Fermentas) طبق روش استاندارد بررسی شد [۱۷].

## ۲-٤- آغازگرها

برای بررسی حضور ژن *cagA* در سویه‌های *H.pylori* جدا شده از بیماران به‌وسیله روش PCR از آغازگر *cagA* –Ir استفاده شد. این آغازگر با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 و توالی *cagA* از سویه 60190 با شماره (ATCC 49503) موجود در بانک ژنی (Gene Bank) با شماره (AB015415) طراحی شد. این آغازگر باعث سنتز محصولی با طول ٥٦١ جفت‌بازمی‌شود. برای بررسی حضور الل‌های ژن *vacA* از دو آغازگر *vacA*-m و *vacA*-s مربوط به مطالعه ون‌دورن و همکارانش استفاده شد (جدول ۱) [۱۸]، واکنش PCR مربوط به آغازگر *vacA*-s محصول ۲۵۰ جفت‌بازی برای الل s1 و ۲۸٦ جفت‌بازی برای الل s2 را سنتز می‌کند. آغازگر *vacA*-m محصول ٤۰۰ جفت‌بازی برای الل m1 و ٤۸٦ جفت‌بازی برای الل m2 را سنتز می‌کند.

## ۲-۵- روش‌های آماری

در پایان نتایج به‌دست آمده به کمک آزمون‌های من‌ویتنی U (Mann-Whitney U) و $X^2$ به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

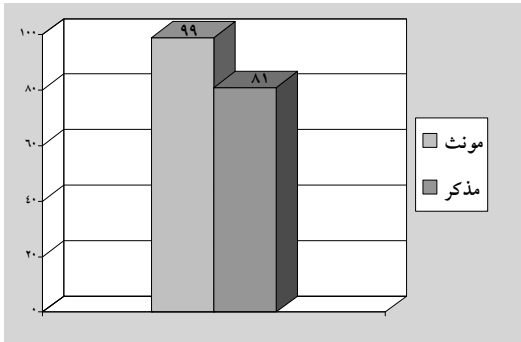
**جدول ۱** توالی و موقعیت آغازگرهای *cagA*-Ir، *vacA*-s و *vacA*-m.

| آغازگر | | توالی '5→3' | موقعیت از ORF | مرجع |
|---|---|---|---|---|
| *cagA*-Ir | F | TGG AGG GTC TAC TGG TGG G | ٥٩٧ – ٦١٦ | طراحی شده، با نرم‌افزار Oligo 5 با استفاده از توالی ژن *cagA* از سویه 60190 (ATCC49503) |
| | R | CGT TGT GAG CCT GTG AGT TG | ١١٣٨ – ١١٥٨ | |
| *vacA*-s | F | ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC | ١ – ٢١١و٢ | (١٤) |
| | R | CTG CTT GAA TGC GCC AAA C | ٢٤١ – ٢٥٩[1]<br>٢٦٨ – ٢٨٦[2] | |
| *vacA*-m | F | CAC AGC CAC TTT CAA TAA CGA | ١٤١٩ – ١٤٣٩[1]<br>١٤٤٣ – ١٤٦٣[2] | (١٤) |
| | R | CGT CAA AAT AAT TCC AAG GG | ١٨٢٤ – ١٨٤٣[1]<br>١٨٧٥ – ١٨٩٤[2] | |

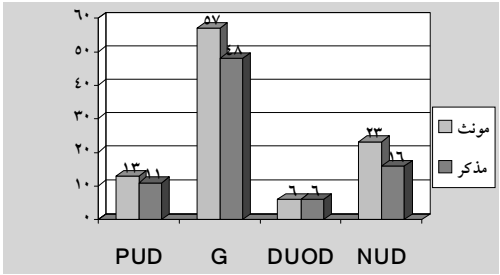
١- شماره بازها از روی کدون شروع، ORF سویه 60190 با شماره بانک ژنی u05676 برای الل‌های s1 و m1
٢- شماره بازها از روی کدون شروع، ORF سویه Tx.30 با شماره بانک ژنی u29401 برای الل‌های s2 و m2

## ۳- نتایج

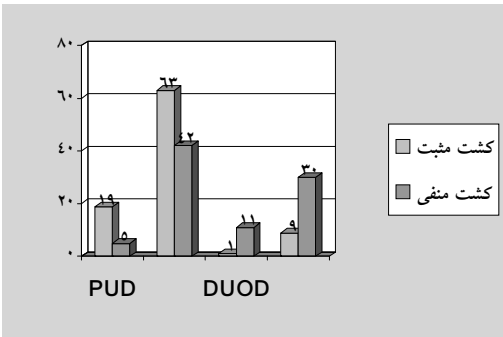
در این مطالعه ۹۲ سویه *H.pylori* جدا شده از بیماران مبتلا بـه ناراحتی‌های ناحیه فوقانی دستگاه گوارش بررسی شد. این ۹۲ سویه از تعداد ۱۸۰ بیمار جداسازی شد (۵۱ درصد) که جمعیـت بیمـاران شامل ۹۹ مونث (۵۵ درصد) و ۸۱ مذکر (٤٥ درصد) بودند و دامنـه سنی ۱۷ تا ۸۰ سال داشتند و نسبت جداسازی *H.pylori* در بیماران مبتلا به PUD، ۸۰ درصـد (تعـداد ۱۹ از ۲٤ بیمـار)، G، ٦۰ درصـد (تعـداد ٦۳ از ۱۰۵ بیمـار)، دئودنیـت (Duodenitis: DUOD) ۸ درصـد (تعـداد ۱ از ۱۲ بیمـار)، و سـوء هاضـمه (Non ulcer dyspepsia: NUD) ۲۳ درصد (تعداد ۹ از ۳۰ بیمار) بود که در اشکال ۱ تا ۸ و جدول ۲ نشان داده شده است.




**شکل ۱** ۱۸۰ بیمار دارای التهاب معدی بر حسب جنس.



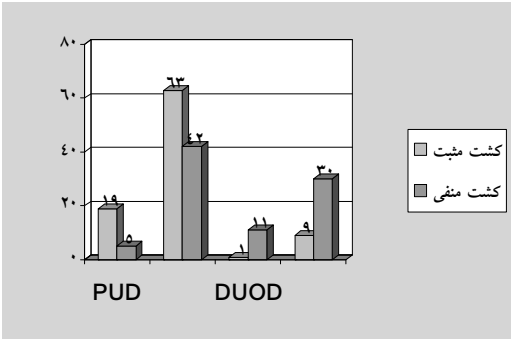

**شکل ۲** فراوانی بیماران مورد مطالعه به تفکیک جنس و بیماری سوء هاضمه: NUD، التهاب دوازدهه: Du، گاستریت: G، التهاب گوارشی معده: PUD.



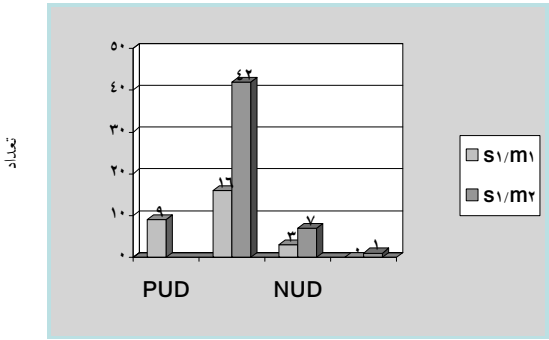

**شکل ۳** فراوانی جداسازی *H.pylori* از بیوپسی معده و دوازدهه بیمـاران بـه روش کشت.

**جدول ۲** میزان جداسازی سویه‌های *H.pylori* از بیماران و فراوانی تیپ‌های مختلف آن.

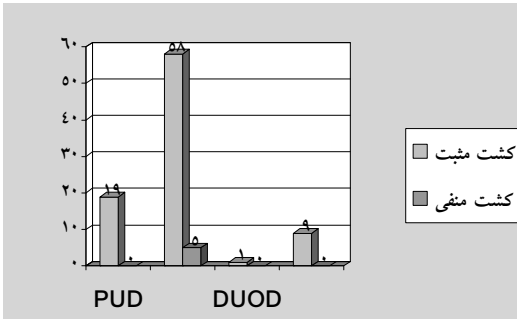
| نوع بیماری | تعداد بیمار | فراوانی جداسازی *H.pylori* | تیپ (درصد) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | I | II | III | IV |
| PUD | ۲٤ | ۱۹(۸۰) | ۱۸(۹۵) | – | – | ۱(۵) |
| G | ۱۰۵ | ٦۳(٦۰) | ۳۱(٤۹) | ۳ (۵) | ۲(۳) | ۲۷(٤۳) |
| DUOD | ۱۲ | ۱(۸) | ۱(۱۰۰) | – | – | – |
| NUD | ۳۹ | ۹(۲۳) | ۷(۲۲) | – | – | ۲(۷۸) |
| مجموع | ۱۸۰ | ۹۲(۵۱) | ۵۷(٦۲) | ۳(۳) | ۲(۲) | ۳۱(۳۳) |



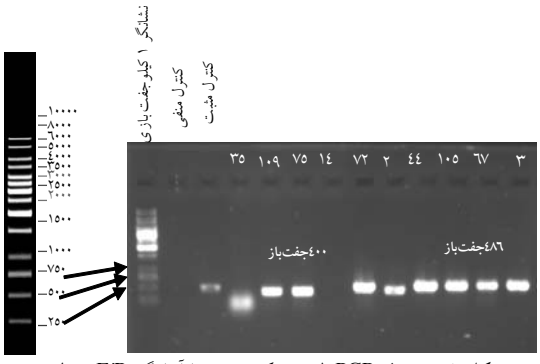

**شکل ٤** فراوانی *vacA* در انواع جداسازی *H.pylori* در اختلالات گوارشی– معدی.



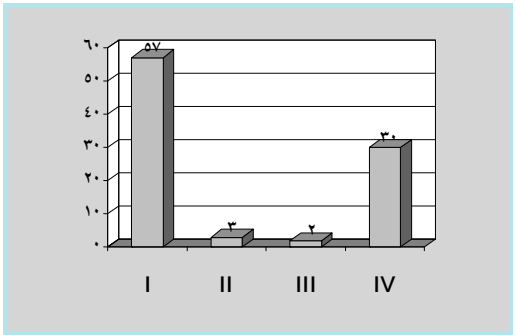

**شکل ۷** فراوانی الل‌های *vacA* به تفکیک بیماری.




**شکل ۵** فراوانی *vacA* در انواع جدا شده *H.pylori* در اختلالات گوارشی بر حسب بیماری.




**شکل ۸** محصول *vac*A PCR تکثیر شده با آغازگر *vacA*-m F/R.




**شکل ٦** فراوانی انواع مختلف سویه‌های *H.pylori* جدا شده از بیماران.

به‌طوری‌که یافته‌ها نشان می‌دهد فراوانی سویه‌های تیپ I نسبت به سایر تیپ‌ها در بیماران بیشتر است (٦۲ درصد سویه‌های تیپ I در مقایسه با ۳۳ درصد تیپ IV، ۳/۲٦ درصد در تیپ II و ۲/۱۷ درصد نمونه‌ها در تیپ III) قرار گرفتند. فراوانی سویه‌های تیپ I در بیماران مبتلا به PUD در مقایسه با G به‌طور معنی‌داری اختلاف دارد (۹۵ درصد در PUD و ٤۹ درصد G با $P \leq ۰/۰۱$)، و به‌نظر می‌رسد حضور همزمان

ژن‌های *cagA* و الل‌هایی از *vacA* که دارای فعالیت واکوئله‌کنندگی هستند باعث افزایش بیماری‌زایی *H.pylori* می‌شوند. مطالعات اپیدمیولوژیک به‌همراه مطالعاتی که به‌صورت آزمایشگاهی (in vitro) روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، نشان‌دهنده پتانسیل بیماری‌زایی بیشتر سویه‌های تیپ I است که می‌توانند ترشح اینترلوکین ۱ (Interleukin-1: IL-1) را در سلول‌های پوششی القاء کنند.

## ٤- بحث

عفونت با *H.pylori* از شایع‌ترین عفونت‌های ناحیه دستگاه گوارش انسانی است به‌طوری‌که در حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد جمعیت‌ها را در بر می‌گیرد و در گزارش‌ها آمده است که میزان کلونیزاسیون (Clonization) با این باکتری از دوران کودکی تا سن بالاتر از ٦۰ سال افزایش می‌یابد [۱۹، ۲۰]. مطالعه انجام شده در ژاپن نشان داد که ۵ درصد افراد مبتلا به عفونت با *H.pylori* طی ۱۰ سال دچار بدخیمی معده می‌شوند [۱۱]. در سایر مطالعات نیز گزارش شده است که نمای غالب مختلف پاتولوژی در زمینه ۸۲ درصد عفونت از نظر وجود *H.pylori* مثبت است که با آمارهای کتب مرجع و مقالات هماهنگی دارد [١٦- ۲۱]. التهاب معدی به علت این باکتری، سطحی و در قسمت فوقانی لامینا پروپریا (Lamina Propria) دیده می‌شود و افراد مبتلا به گاستریت، معمولاً بدون علامت هستند بنابراین معالجه این عفونت در افراد علامت‌دار که با درمان ضد اسید پاسخ نمی‌دهند یا به درمان طولانی مدت نیاز دارند، قابل قبول است [۳].

جنس *H.pylori* که در حال گسترش است و مهم‌ترین عامل بیماری‌زای بسیاری از اختلالات (عفونت) معده از جمله گاستریت، زخم معده، آدنوکارسینوما (Adenocarcinoma) و لنفوم معده است. برای تشخیص بیماری‌های وابسته به این باکتری از روش‌های تشخیصی مولکولی مانند دورگه‌سازی در محل (In Situ Hybridization)، FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)، PCR (Polymerase Chain Reaction) و آزمون‌های سرولوژیک استفاده می‌شود [۲۲، ۲۳].

PCR در ساده‌ترین شکل آن ترکیبی از DNA، آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی dNTPs، DNA پلیمراز (DNA Polymerase) مقاوم به حرارت و بافر مناسب است که مکرراً حرارت داده و سرد می‌شوند تا مقداری DNA کوتاه هدف سنتز شود [٢٤]. از این روش برای تشخیص *H.pylori* از بیوپسی معده، عصاره معدی، پلاک دندان و مدفوع استفاده می‌شود. علاوه بر تشخیص از این روش برای تعیین سویه (Typing) باکتری به‌صورت مستقیم از بیوپسی و نیز بعد از کشت استفاده می‌کنند که چندین جایگاه (Locus) به‌عنوان DNA هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد که شامل ژن ١٦s rRNA، ژن‌های اوره‌آز زیر واحدهای A و B و ژن فسفوگلوکوموتاز glm M که قبلاً "اوره‌آز C" نامیده می‌شد، است که در این صورت این روش با حضور ۱۰ باکتری برای تشخیص به‌کار برده می‌شود [۱۱، ۱۲].

*H.pylori* دارای فاکتورهای بیماری‌زایی (Virulence) است که باعث بقای آن در محیط اسیدی می‌شود و همچنین اجازه می‌دهد تا باکتری در مخاط معده کولونیزه شود و با سیستم ایمنی میزبان مقابله کند و باعث تخریب بافتی می‌شود.

گسترش جغرافیایی ژنوتیپ‌های مختلف *H.pylori* بین شرق آسیا و کشورهای اروپایی متفاوت است [٤، ۲۵، ٢٦] و بررسی‌های اپیدمیولوژیک در ایران به‌دلیل قرارگرفتن در محل ارتباطی این کشورها دارای اهمیت فراوانی است که به‌نظر می‌رسد توسعه بیماری به فاکتورهای بیماری‌زایی سویه باکتری، حساسیت میزبان و فاکتورهای کمکی (Co-factor) محیطی، بستگی دارد. مهم‌ترین تفاوت بین سویه‌های مختلف *H.pylori* حضور یا عدم حضور *cagA* و الل‌های مختلف *vacA* است.

مطالعات در این زمینه هرچند محدود است اما این مطالعات نیز اغلب سویه‌ها را در تیپ I طبقه‌بندی کرده‌اند [۱۱، ٢٦]. به‌نظر می‌رسد حضور همزمان ژن‌های *cagA* و الل‌هایی از *vacA* که دارای فعالیت واکوئله‌کنندگی هستند باعث افزایش بیماری‌زایی باکتری می‌شوند. تنها سویه جدا شده از بیماران دارای تیپ II و در سویه دارای تیپ III از بیماران مبتلا به گاستریت (بیماری خوش‌خیم‌ترPUD) جدا شده است.

اما مطالعات اپیدمیولوژیک به‌همراه مطالعاتی که به‌صورت آزمایشگاهی روی حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است، نشان‌دهنده پتانسیل بیماری‌زایی بیشتر سویه‌های تیپ I است. سویه‌های تیپ I برخلاف سویه‌های تیپ II منجر به آسیب‌های شبیه به انسان در معده موش‌های آزمایشگاهی می‌شوند. همچنین تنها سویه‌های تیپ I می‌توانند ترشح IL-1 را در سلول‌های پوششی القاء کنند [۳، ۲۷]. از طرف دیگر سویه‌های تیپ II نسبت به سویه‌های تیپ I بسیار سخت‌گیرترند [۸]، بنابراین احتمال دارد قدرت انتقال آن‌ها بین افراد و همچنین قدرت کلونیزاسیون آن‌ها کمتر باشد. بنابراین، مطالعات برای شناخت سویه‌های با ویرولانس بیشتر روی این دو ژن متمرکز شده است و برهمین اساس سویه‌های *H.pylori* را به دو تیپ $cagA^+$ I و $vacA^+$ (خاصیت واکوئله‌کنندگی) و تیپ $cagA^-$ II و $vacA^-$ تقسیم‌بندی می‌کنند.

## ٤-۱- خاصیت پروتئین واکوئله‌کنندگی (vacA)

این پروتئین که باعث ایجاد واکوئل در کشت سلول‌های پوششی می‌شود از سوسپانسیون فیلتر شده *H.pylori* در سال ۱۹۹۲ تخلیص و در سال ۱۹۹٤ تعیین توالی شده است. ژن *vacA* دارای دامنه‌ای از ۳۸٦٤ تا ۳۹۳۳ جفت‌باز است که یک پره‌توکسین (per-toxin) ١٤ کیلودالتونی را کد می‌کند این پروتئین در حالت واسرشته آن به‌صورت تقریباً ۹۰ کیلودالتون حرکت می‌کند [٤]. vacA باعث تسهیل کلونیزاسیون و بقای *H.pylori* است به‌طوری‌که واکسینه کردن موش با ایمنی مؤثری علیه کلونیزاسیون تجربی مانع کلونیزاسیون باکتری به موش می‌شود [۲۸].

پروتئین vacA در شرایط آزمایشگاهی باعث ایجاد واکوئل در سیتوپلاسم سلول‌های Hela می‌شود اما از آنجا که نقش vacA در شرایط بدن (in vivo) بسیار پیچیده‌تر از نقش آن در شرایط آزمایشگاهی است (ایجاد واکوئل در نمونه بیوپسی کمتر دیده می‌شود). بررسی الل‌های مختلف آن در سطح ژن (ژنوتایپینگ: Genotyping) و ارتباط آن‌ها با بیماری نسبت به بررسی پروتئین آن (فنوتایپینگ: Phenotyping) ارجح‌تر است.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که فراوانی سویه‌های تیپ I نسبت به سایر تیپ‌ها در بیماران بیشتر است (٦۲ درصد) در بررسی ژن *vacA* تحقیق انجام شده نشان از فراوانی این ژن در سویه‌های جدا شده از بیماران دارد یعنی ۹٤ درصد از *H.pylori* جدا شده از بیماران دارای ژن *vacA* هستند (۸۷ مورد از۹۲ سویه جدا شده). در مطالعاتی که در همین زمینه در ایران با استفاده از SDS-PAGE انجام گرفته فراوانی سویه‌های $vacA^+$، ٦۰ درصد) است [۲۹-۳۲]. در این مطالعه بررسی الل‌های مختلف ژن *vacA* در رفع این نقص گام نهاده شد زیرا که از طریق بررسی الل‌های *vacA* می‌توان فعالیت پروتئین vacA را پیش‌بینی نمود. نتایج حاصل نشان داده است که الل s1، برتری کاملی در سویه‌های جدا شده دارد و سویه با الل s2 جدا نشده است، این مطلب در سایر مطالعات بیشتر در بیمار PUD دیده می‌شود و باعث شده است که از این الل به‌عنوان شاخصی برای خطر ابتلاء به PUD یاد شود [۳۳- ۳۷] در مطالعات داخلی نیز الل s1 با فراوانی ۷٤ درصد در NUD و ۷۹ درصد در بیماران مبتلا به PUD گزارش شده است [۳۸].

در ایالات متحده ۹۰ درصد بیماران مبتلا به زخم اثنی‌عشر حامل سویه‌های دارای الل s1 هستند در مجموع بیماران عفونی با *H.pylori* دارای این الل خطر زیادی برای ابتلاء به PUD دارند [۳٤، ۳۷، ۳۹، ٤۰]، بنابراین به‌نظر می‌رسد درایران نیز احتمال ابتلا به PUD در بیماران عفونی با *H.pylori* بسیار بالا باشد. از الل‌های ناحیه میانی (m) ژن *vacA*، نیز یافته‌های به‌دست آمده، تفاوت‌هایی را با سایر نقاط جهان نشان می‌دهد [٤۰].

تاکنون گزارش‌های متعددی از سراسر جهان با تفاوت‌های فاحش در شیوع ژن‌ها و الل‌های مختلف منتشر شده است که نشان‌دهنده دخالت فاکتورهای متعدد در بیماری‌زایی *H.pylori* است [۳۲، ۳۳، ۳۵، ٤۱] . در سال ۱۹۹۹ کید (Kidd) و همکارانش شیوع ۹۵ درصد و (شیوع ۸۰ درصد الل s1 و ۲۰ درصد الل s2) را در بیماران آفریقای جنوبی گزارش کردند و به‌طرز جالبی الل‌های s2 تنها درسویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به G دیده می‌شود [۳۲]. همچنین نتایج این مطالعه نشان از غالب بودن الل m2 دارد (٦٤ درصد الل m2 در مقایسه با

۳۱ درصد الل m1). در مطالعات داخلی در همین زمینه نیز نتایج مشابهی به‌دست آمده است که در آن مطالعه نیز الل m2 غالب است [۳۷] و در مطالعه‌ای دیگر الل m1 با فراوانی ۵۵ درصد گزارش شده است [٤] در سایر نقاط جهان الل m2 با فراوانی بیشتر در سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت دیده می‌شود [٤۰،۳۲]. اما با توجه به نتایج مطالعه حاضر، الل m2 در بیماران مبتلا به PUD درمقایسه با G کمتر دیده می‌شود که می‌تواند نشانه‌ای از بیماری‌زایی کمتر آن باشد، و این تفاوت بین الل‌های s1/m1 و s1/m2 در بیماران مختلف معنی‌دار نیست، در این صورت نشان می‌دهد که این الل‌ها معیار مناسبی برای غربالگری سویه‌های دارای پتانسیل بیماری‌زایی بیشتر نیستند. البته فقدان الل‌های خاصی در این جمعیت ایرانی نیازمند مطالعات وسیع‌تر در این زمینه است.

## ۵- تشکر و قدردانی

این مقاله با کمک آقایان دکتر سیدمرتضی هاشمی، دکتر احمد نظیفی در تهیه نمونه‌های بالینی و آقای علی احمدی (دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی) در تهیه مطالب آن انجام شده است که بدین‌وسیله از همکاری آنان سپاسگزاری می‌شود.

## ٦- منابع

[1] Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; 1(8336): 1273-5.

[2] Archer JR, Romers S, Ritchie AE, Hamacher ME, Steiner BM, Bryner JH, Schell RF. Characterization of unclassified microaerophilic bacteria associated with the gasteroenteritis. J Clin Microbiol 1988; 26(1): 101-5.

[3] Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Bordovsky M, Rappuoli R, Covacci A. cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(25): 14648-53.

[4] Atherton JG, Cover TL, Papini E, Telford JL. "Vaculating cytotoxin in " *Helicobacter pylori*": Physiology and Genetics" Mobley HL, Mendez GL, Hazell ST (eds). Washington DC, ASM Press, 2001; p: 97-110.

[5] Harlin S. Detection anomalous gene clusters and pathogen-city island in divers bacterial genome Trends in Microbiol 2001; 9: 335-43.

[6] Ashour AR, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmao VR, Queiroz DMM. Detection of vacA genotypes in Helicobacter pylori strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis duodenal ulcer or gastric carcinoma. FEMS Imunol Med Microbiol 2002; 33: 173-8.

[7] Blaser MJ, Atherton JC. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. J Clin Invest 2004; 113(3): 321-33.

[8] Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, Covacci A. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect Immun 1995; 63(1): 94-8.

[9] Wen S, Velin D, Felley CP, Du L, Michetti P, Pan-Hammarström Q. Expression of Helicobacter pylori virulence factors and associated expression profiles of inflammatory genes in the human

Mendez GL, Hazell ST (eds). Heliobacter pylori: Physiology and Genetics. Washington DC, ASM press, 2001; p: 27-38.

[17] Alvandi AH, Bojary MR. Analysis of prevalence in different genotypes of Helicobacter pylori strains isolated from patients with upper gastrointestinal disorders in Iran. Presented for the M.Sc., Tehran, Iran University of Medical Sciences, 2003.

[18] Van Doorn LJ, Figueido C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, Carneiro F, Quint WG. Typing of Helicobacter pylori vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol 1998; 36(5): 271-6.

[19] Mandell G, Dolin R, Bennttsj. Principles and proactive of infectious Disease. 5th ed, New York, Churchill Livingstone, 2000; p: 2285-91.

[20] Braunwald E, Fauci A, kasper D, Harrison's principle of internal medicine 15th ed, USA, Macgrow-Hill, 2001; p: 960-2.

[21] Goldman L, Bennett J. Cecil textbook of medicine 21st ed, Philadelphia, Pennsylvania, W.P Saunders co., 2000; p: 671-7.

[22] Holton J, Vaira D. "Gastric Helicobacter" In: Cimolari N (ed). Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections. New York, marcel Dekker Inc, 2001; p: 605-34.

[23] Rüssman H, kempf VAJ, Koletzoko S, Heesemann J, Autenrieth IB. Comparison of Fluorescent In Situ Hybridization and conventional culturing for deteetion of Helicobater pylori in gastric biopsy specimens. J Clin Microbial 2001; 39(1): 304-8.

[24] Vanden Hevvel JP. "PCR protocols in Molecular Toxicology". Florida, CRC press,

gastric mucosa. Infect Immun 2007; 75(11): 5118-26.

[10] Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori. J Med Microbiol 1988; 26(2): 93-9.

[11] Takata T, Fujimoto S, Anzai K, Shirotani T, Okada M, Sawae Y. Analysis of the expression of cagA and vacA and the vaculating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcer or non-ulcer dyspepsia. Am J Gasteroentrol 1998; 93: 30-4.

[12] Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR, Stremmel W. Diversity of Helicobacter pylori vacA and cagA genes and relationship to vacA and cagA protein expression, cytotoxin production and associated disease. J Clin Microbiol 1998; 36(4): 944-8.

[13] Bagnoli F, Buti L, Tompkins L, Covacci A, Amieva MR. Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(45): 16339-44.

[14] Han SW, Flamm R, Hachem CY, Kim HY, Clarridge JE, Evans DG, Beyer J, Drnec J, Graham DY. Transport and storage of Helicobacter pylori from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995; 14(4): 349-52.

[15] Carnaha AM, Andrews G. Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas and Campylobacter species. In: Mahon CR, Manuselis G (eds). "Text book of Diagnostic Microbiology", 2nd ed, Philadelphia, Pensylvania, Saunders, 2000; p:515-37.

[16] Andersen LP, Wad Storm T. "Basic Bacteriology and cultures" in: Mobley, HL,

1998; p: 1-39.

[25] Pan ZJ, Berg DE, Van der Hulst RW, SU WW, Raudonikiene A, Xiao SD, Dankert J, Tytgat GN, Van der Ende A. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vacA alleles in Helicobacter pylori from China. J Infect Dis 1998; 178: 220-6.

[26] Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, Argent RH, Atherton JC. 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(5): 1774-9.

[27] Torres VJ, VanCompernolle SE, Sundrud MS, Unutmaz D, Cover TL. Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets. J Immunol 2007; 179(8): 5433-40.

[28] Pan ZJ, Van der Hupst RW, Tytgat GN, Dankert J, Van der Ende A. Relation between vacA subtypes, cytotoxin activity, and disease in Helicobacter pylori-infected patients from The Netherlands. Am J Gastroenterol 1999; 94(6): 1517-21.

[29] Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for Hehcebacter pylori. J Clin Microbiol 2000; 38(5): 1984-7.

[30] Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori. Gastroentrology 1997; 112(1): 92-9.

[31] Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological association of cagA and vacA genotypes in Helicobacter pylori gastritis. J Clin Pathol 1998; 51(1): 55-61.

[32] Kidd M, Lastovica A, Atherton J, Louw J. Heterogeneity in the Helicobacter pylori vacA and cagA gene: association with gastroduodenal disease in South Africa? Gut 1999; 45(4): 499-502.

[33] Pan ZJ, Van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dankert J, Van der Ende A. Equally prevalence of infection with cagA-positive Helicobacter pylori in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1344-7.

[34] Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of cagA and vacA subtypes of Helicobacter pylori in pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. J Clin Pathol 1998; 51(10): 761-4.

[35] Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JT, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, Chowdhury S, Santra A, Bhattacharya SK, Azuma T, Nair GB, Berg DE. Distinctiveness of genotypes of Helicobacter pylori in Calcutta, India. J Bacteriol 2000; 182(11): 3219-27.

[36] Van Doorn NEM, Namaver F. Analysis of vacA, cagA and Is605 genotypes and those determined by PCR amplification of DNA between repetitive sequence of Helicobacter pylori strain isolated from patients with non-ulcer dyspepsia or MALT lymphoma. J Clin Microbial 1999; 37: 2348-9.

[37] Mohammadi M, Oghalaie A, Mohajerani N, Massarrat S, Nasiri M, Bennedsen M, Colding

Govaresh 2004; 9(3): 176-80. (Persian)

[40] Maciorkowska E, Roszko I, Kowalczuk O, Kaczmarski M, Chyczewski L, Kemona A. The evaluation of *vacA* gene alleles frequency in Helicobacte pylori strains in children and adults in Podlaskie region. Folia Histochem Cytobiol 2007; 45(3): 215-9.

[41] Gonzalez-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, la Garza AM, Torres J. Helicobacter pylori vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. J Infect Dis 2000; 182(5): 1450-4.

H, Andersen LP. Prevalence of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin and its allelic mosaicism as a predictive marker for Iranian dyspeptic patients. Bull Soc pathol Exot 2003; 96(1): 3-5.

[38] Atherton JC. The clinical relevance strain type of Helicobacter pylori. Gut 1997; 40(6): 701-3.

[39] Bojary MR, Foroozandeh M, Alvandi AH, Hashemi SM, Masjedian F, Nazifi A. Study of the cagA gene prevalence in Helicobacter pylori strains isolated from patients with upper gastrointestinal disorders in Iran.