Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

بررسی میزان فراوانی ژن وابسته به سیتوتوکسین در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده در شهرستان شهرکرد

دکتر عباس دوستی*
دکتر قربانعلی رحیمیان**
دکتر جعفر نصیری**
پروین یاوری فروشانی***

*دکترای ژنتیک مولکولی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
** فوق تخصص گوارش، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، بیمارستان هاجر، گروه داخلی
***کارشناس ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ وصول:۱۳۸۵/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش:۱۳۸۶/۳/۲۳

مؤلف مسئول: دکتر عباس دوستی
پست الکترونیک: doostiiranii@yahoo.com

چکیده:

مقدمه و هدف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌های مزمن باکتریایی در انسان است. هلیکوباکتر پیلوری یک باسیل گرم منفی مارپیچی شکل است که بیماری‌های متعددی نظیر؛ گاستریت مزمن، زخم معده وسرطان معده را ایجاد می‌کند. ژن وابسته به سیتوتوکسین در بیشتر سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و طبق بررسی‌های به عمل آمده ثابت شده است که سویه‌های وابسته به سیتوتوکسین مثبت نسبت به سویه‌های وابسته به سیتوتوکسین منفی از قدرت بیماری‌زایی بالاتری برخوردار هستند و وجود ژن وابسته به سیتوتوکسین با زخم دئودنوم و آتروفی مخاط معده و سرطان معده در ارتباط می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین میزان فراوانی ژن وابسته به سیتوتوکسین در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده بیماران بود.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه مولکولار اپیدمیولوژی است که در زمستان سال ۱۳۸۵ بر روی نمونه‌های بیوپسی معده ۱۲۰ بیمار مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد انجام شد. از نمونه‌های بیوپسی مورد مطالعه ابتدا استخراج دی ان آ صورت پذیرفت. سپس وجود عفونت هلیکوباکتر پیلوری در آنها به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بررسی گردید و نمونه‌های آلوده به هلیکوباکتر پیلوری از لحاظ وجود ژن وابسته به سیتوتوکسین با پرایمرهای اختصاصی این ژن مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار اکسل و آزمون مجذور کای تحلیل گردید.

یافته‌ها: تشخیص هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش تست سریع اوره آز، در ۷۴ مورد (۶۱/۶۶ درصد) نتیجه مثبت داشت، در صورتی که به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۱۰۳ مورد (۸۵/۸۳ درصد) مثبت یافت شد و همه نمونه‌هایی که در تست سریع اوره آز مثبت گردیدند با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز تأیید شدند. ژن وابسته به سیتوتوکسین نیز در ۸۶ مورد (۸۳/۵ درصد) از نمونه‌ها یافت شد ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به شیوع بسیار بالای هلیکوباکتر پیلوری در منطقه مورد مطالعه و وجود درصد زیادی از سویه‌های وابسته به سیتوتوکسین مثبت در این بین نیاز به توجه جدی‌تر نسبت به پیشگیری و درمان احساس می‌شود.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ، ژن وابسته به سیتوتوکسین

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک باسیل گرم منفی مارپیچی شکل است که عفونت ناشی از آن گسترش جهانی دارد. این باکتری به صورت بسیار موفق به زندگی در معده انسان‌ها سازش یافته، به طوری که نصف مردم دنیا به این باکتری آلوده گشته‌اند (۲و۱). این باکتری نه تنها عامل بسیاری از ناراحتی‌های گوارشی شامل؛ التهاب معده (گاستریت)، زخم معده و سوء هاضمه می‌باشد، بلکه در بسیاری از موارد، ارتباط آن با سرطان معده نیز به اثبات رسیده است (۳ و۱). ابتلا به عفونت معمولاً در دوران کودکی رخ می‌دهد، اما اثرات آن برای تمام عمر باقی می‌ماند (۴ و۲). آزمایش‌های مختلفی برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد. در برخی از آزمایش‌ها از قبیل؛ هیستولوژی بافت معده، کشت باکتری و تست سریع اوره‌آز[1] ، نیاز به بیوپسی معده و در نتیجه احتیاج به آندوسکوپی است. در مقابل در روش‌هایی چون تست تنفسی اوره[2] و سرولوژی نیاز به آندوسکوپی نمی‌باشد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز[3] یک روش مهم و حساس برای تشخیص دی ان آ[4] به عنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم می‌باشد. تشخیص سریع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا که در مقادیر بسیار کم وجود دارند و تشخیص آنها وقت و کار زیادی می‌طلبد و یا اصلاً قابل کشت نیستند، با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز امکان‌پذیر است. امروزه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به عنوان یک روش بسیار حساس و دقیق برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی معده، پلاک‌های دندانی و حتی بزاق دهان به کار می‌رود (۶ و۵). چندین نوع پرایمر برای تشخیص و تعیین هویت هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد که متداول‌ترین آنها برای ژن اوره‌آز و ژن زیر واحد کوچک ریبوزوم[5] می‌باشد(۸ و ۷).

ژن وابسته به سیتوتوکسین A[6] یکی از فاکتورهای ویرولانس هلیکوباکتر پیلوری محسوب می‌شود. در ناحیهٔ وابسته به سیتوتوکسین چندین قالب ژنی وجود دارد که یکی از آنها ژن وابسته به سیتوتوکسین را که در ناحیهٔ ۳ این جزیره واقع شده است کد می‌کند. ژن وابسته به سیتوتوکسین اغلب به عنوان مارکری برای لوکوس کامل وابسته به سیتوتوکسین به کار می‌رود و این ژن اولین ژنی بود که نشان داده شد در تمام سویه‌ها به صورت حفظ شده و پایدار حضور ندارد. دیده شده است که سویه‌های دارای وابسته به سیتوتوکسین بر روی تکثیر سلول‌های اپیتلیال دستگاه گوارش اثر گذاشته و قدرت زنده ماندن را افزایش می‌دهد و باعث تضعیف آپوپتوزیس می‌شود. بنابراین با دخالت ژن وابسته به سیتوتوکسین در چرخهٔ سلولی، این عامل ممکن است به عنوان یک عامل خطرزا در سرطان معده به شمار آید. سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران

1-Rapid Urease Test (PUT)
2-Urease Breath Test (UBT)
3-Polymerase Chain Reaction(PCR)
4-DNA
5-ssu rRNA (16srRNA)
6-Cytotoxin associated gene A

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

مبتلا به بیماری‌هایی نظیر گاستریت مزمن فعال، زخم معده و سرطان معده در ۹۰ درصد موارد ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت بوده‌اند که این امر نشان دهنده رابطه مستقیم بین این ژن و بیماری‌های معده است (۹). هدف از این تحقیق تعیین میزان فراوانی ژن وابسته به سیتوتوکسین در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده بیماران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه مولکولار اپیدمیولوژی است که در زمستان سال ۱۳۸۵ بر روی نمونه‌های بیوپسی معده به دست آمده از بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد که اغلب به خاطر داشتن ناراحتی‌های گوارشی نیاز به انجام آندوسکوپی داشتند، انجام شد.

در خصوص ملاحظات اخلاقی، پس از کسب رضایت‌نامه آگاهانه و کتبی از بیماران، به آنها اطمینان داده شد که از کلیه اطلاعات دریافت شده فقط در طرح استفاده خواهد شد.

در این تحقیق تعداد ۱۲۰ نمونه بیوپسی معده مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های بیوپسی بلافاصله بعد از انجام آندوسکوپی، به محیط اوره منتقل گردید و پس از گذشت ۳۰ دقیقه نتایج ثبت گردید. هلیکوباکتر پیلوری به علت داشتن فعالیت اوره‌آزی، محیط اوره را تجزیه و آن را به دی اکسید کربن و یون آمونیوم تبدیل می‌کند و باعث قلیایی شدن محیط می‌گردد و در نتیجه فنل رد موجود در محیط در اثر تغییر pH، رنگ زرد محیط اوره را به صورتی مایل به بنفش تبدیل می‌کند.

همه ۱۲۰ نمونه‌ای که به روش تست سریع اوره‌آز از لحاظ وجود هلیکوباکتر پیلوری بررسی شدند، بدون توجه به نتایج حاصل از آزمون تست سریع اوره‌آز برای تست‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور انجام آزمایش‌های مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ژن‌های کد کننده آنزیم اوره‌آز [1] و وابسته به سیتوتوکسین به کار گرفته شد که در زیر به تفصیل بیان خواهد شد. از نمونه‌های بیوپسی به دست آمده به صورت مستقیم با استفاده از کیت استخراج دی ان آ[2] ساخت شرکت سیناژن ایران، تخلیص دی ان آ صورت گرفت. به منظور تأیید صحت انجام مراحل استخراج دی ان آ، از دی ان آ به دست آمده از هر نمونه مقدار ۲ میکرولیتر روی ژل آگارز برده شد و پس از انجام الکتروفورز با نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ژن کد کننده آنزیم اوره‌آز استفاده می‌گردد، به دلیل این که ژن کد کننده آنزیم اوره‌آز یک ژن حفظ شده است و کمتر مورد تغییرات ژنتیکی قرار می‌گیرد. توالی پرایمرهای مربوط به تکثیر این ژن به صورت

PrimerF: 5- GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG- 3

Primer R: 5- GCT TAC TTT CTA ACA CTA ACG CGC – 3

است که اندازه باند حاصل از تکثیر آنها ۲۹٤ جفت باز می‌باشد (۸و۷).

1-ureC
2-DNP™ Kit

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در حجم کل ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم دی ان آ الگو، ۲ میلی مولار کلرید منیزیم[۱]، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم تک پلی‌مراز[۲] و ۲۰۰ میکرومولار از مخلوط نوکلئوتیدهای آزاد[۳]تعیین گردید. همچنین ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از تبخیر شدن، به مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اضافه گردید. برای کنترل آزمایش‌ها از شاهد مثبت و منفی نیز استفاده شد. شاهد مثبت لوله میکروتیوبی است که حاوی دی ان آ تخلیص شده هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد و شاهد منفی شامل؛ مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به جز دی ان آ هدف است که به آن هم حجم دی ان آ هدف، آب مقطر اضافه گردید.

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر ژن کد کننده آنزیم اوره آز به ترتیب یک مرحله به صورت ۹٤ درجه سانتی‌گراد ٤ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب؛ ۹۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه تنظیم گردید.

۱۰ میکرولیتر از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به همراه ۲ میکرولیتر بافر بار گذاری[۴] روی ژل آگارز ۱/۵ درصد دارای رنگ اتیدیوم بروماید برده شد و پس از مشاهده با نور ماورای بنفش، عکس‌برداری انجام گرفت. انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ژن وابسته به سیتوتوکسین مطابق مراحل انجام شده برای ژن کد کننده آنزیم اوره آز صورت پذیرفت، با این تفاوت که توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر این ژن به صورت زیر است؛

Primer F: 5- ATA ACA GGC AAG CTT TTG AGG -3

Primer R: 5-TGC AAA AGA TTG TTT GGC AGA – 3

در صورت وجود ژن وابسته به سیتوتوکسین در هلیکوباکترهای موجود در نمونه بیوپسی، باند ۳٤۹ جفت بازی به دست خواهد آمد که با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز مشخص می‌گردد.

داده‌های جمع‌آوری شده با نرم افزار اکسل[۵] و آزمون آماری مجذور کای [۶] آنالیز گردید.

یافته‌ها

بر اساس تست سریع اوره‌آز تعداد ۷۴ مورد (۶۱/۶۶ درصد) آلوده به هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند. استخراج دی ان آ از کل نمونه‌های مورد بررسی با موفقیت صورت پذیرفت و کیفیت دی ان آ استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید که نتایج آن در تصویر۱ مشاهده می‌شود.

نتایج این مرحله نشان می‌دهد در بین ۱۲۰ نمونه‌ای که استخراج دی ان آ از آنها صورت گرفته، تعداد ۱۰۳ مورد (۸۵/۸۳ درصد) مثبت یافت شد. یعنی باند ۲۹۴ مربوط به محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن مذکور را نشان دادند که نتایج آن در تصویر۲ مشاهده می گردد.

مقایسه دو روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و

1-MgCl2
2-Taq Polymerase
3-dNTP Mix
4-Loading Buffer
5-Excel
6-Chi-square test

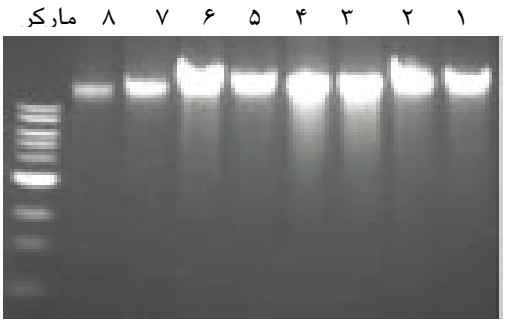
Archive of SID

www.SID.ir

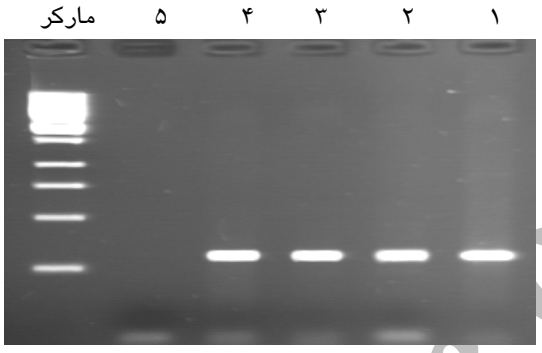
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

تست سریع اوره‌آز نشان می‌دهد که هر ۷۴ نمونه‌ای که به وسیله روش تست سریع اوره‌آز مثبت گزارش شده بودند، با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز مثبت تشخیص داده شدند و تعداد قابل توجهی از نمونه‌هایی که در روش تست سریع اوره‌آز نتیجه منفی به دست داده بودند، در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از لحاظ وجود هلیکوباکتر پیلوری، مثبت شدند، یعنی از بین ۴۶ نمونه‌ای که در تست سریع اوره‌آز نتیجه منفی داشتند، با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تعداد ۲۹ مورد مثبت دیگر یافت شد و مجموعاً تعداد ۱۷ نمونه (۱۴/۱۶درصد) با هر دو روش تشخیصی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تست سریع اوره‌آز، از لحاظ وجود هلیکوباکتر پیلوری منفی بودند.

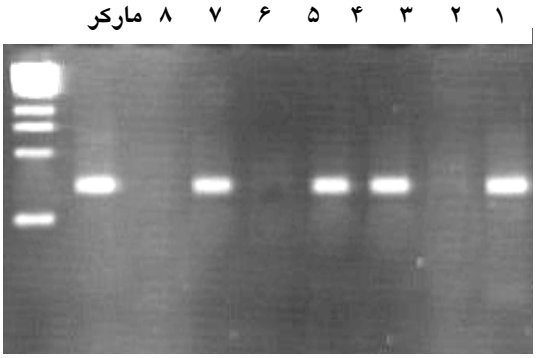
به منظور تعیین ژنوتیپ وابسته به سیتوتوکسین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مورد مطالعه، یک قطعه ۳۴۹ جفت بازی که بخشی از ژن وابسته به سیتوتوکسین می‌باشد به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. بدین صورت که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن وابسته به سیتوتوکسین تنها روی ۱۰۳ نمونه‌ای که وجود دی ان آ هلیکوباکتر پیلوری به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن کد کننده آنزیم اوره آز در آنها به اثبات رسیده بود، انجام شد. وجود قطعه ۳۴۹ جفت بازی مؤید ژنوتیپ ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت و در صورت عدم وجود باند ۳۴۹ جفت بازی، سویه‌ها به عنوان ژن وابسته به سیتوتوکسین منفی تلقی گردیدند. نتایج این مرحله در تصویر ۳ مشاهده می‌شود. فراوانی ژنوتیپ ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت در ۱۰۳ نمونه هلیکوباکترپیلوری مثبت، به میزان ۸۶ مورد (۸۳/۵ درصد) مشخص گردید.



تصویر ۱: استخراج دی ان آ از نمونه‌های بیوپسی معده شماره‌های ۱ تا ۸ شامل نمونه های مورد آزمایش می‌باشد و مارکر مورد استفاده یک کیلو جفت بازی می‌باشد.



تصویر۲: نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن کد کننده آنزیم اوره آز. شماره‌های ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های بیماران می‌باشند که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آنها برای ژن کد کننده آنزیم اوره‌آز مثبت می‌باشد. شماره ۴ کنترل مثبت و شماره ۵ کنترل منفی بوده و مارکر مورد استفاده یک کیلو جفت بازی می‌باشد.



تصویر ۳: نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژن وابسته به سیتوتوکسین، نمونه‌های ۱، ۳، ۴ و ۶ مثبت می‌باشند و نمونه‌های ۲ و ۵ منفی هستند. شماره ۷ کنترل منفی و شماره ۸ کنترل مثبت است. مارکر مورد استفاده یک کیلو جفت بازی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

بحث و نتیجه گیری

هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی گاستریت مزمن بوده و در بیماری‌زایی زخم و سرطان معده نقش مهمی دارد. مخزن طبیعی هلیکوباکتر پیلوری هنوز شناخته نشده است، اما قسمتی از زیستگاه طبیعی این باکتری مخاط معده انسان است (۳). از آنجا که بیش از نیمی از مردم دنیا (چند میلیارد نفر) به این باکتری آلوده هستند، بنابراین انسان به عنوان مخزن طبیعی هلیکوباکتر پیلوری محسوب می‌شود. با توجه به گسترش جهانی این عامل عفونی و خطرات ناشی از آن، تشخیص سریع و دقیق این باکتری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. آزمایش‌های مختلفی برای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری شامل؛ هیستولوژی بافت معده، کشت باکتری، تست سریع اوره‌آز، سرولوژی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز وجود دارد. این باکتری دارای مارکر بیماری‌زای مهمی به نام ژن وابسته به سیتوتوکسین می‌باشد. وجود ژن وابسته به سیتوتوکسین در هلیکوباکتر پیلوری باعث افزایش قدرت بیماری‌زایی ارگانیسم می‌شود، به طوری که در برخی مطالعات حضور ژن وابسته به سیتوتوکسین در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با زخم و سرطان معده مرتبط دانسته شده است (۹). هدف از این تحقیق تعیین میزان فراوانی ژن وابسته به سیتوتوکسین در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده بیماران می‌باشد.

در بین ۱۲۰ بیمار مراجعه کننده، به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تست سریع اوره‌آز جمعاً ۱۰۳ مورد (۸۵/۸۳ درصد) مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری یافت شد که از این تعداد نمونه آلوده، ۸۶ مورد (۸۳/۵ درصد) دارای ژن وابسته به سیتوتوکسین بودند.

بررسی وضعیت بیماران مبتلا به سویه‌های وابسته به سیتوتوکسین مثبت هلیکوباکتر پیلوری در بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان بقیه‌الله تهران نشان می‌دهد که وجود ژن وابسته به سیتوتوکسین با علایم بالینی شدیدتر ارتباط دارد(۱۰).

طالب خان و همکاران (۱۳۸۴) نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین وجود ژن وابسته به سیتوتوکسین با زخم و سرطان معده وجود ندارد(۱۱).

اولیورا و همکاران[1] (۲۰۰۳) با بررسی ژنوتیپ وابسته به سیتوتوکسین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران برزیلی مبتلا به گاستریت، زخم دوازدهه و سرطان معده چنین گزارش نمودند که فراوانی سویه‌های ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت در گاستریت۵۹ درصد، زخم دوازدهه ۹۰ درصد و در سرطان معده ۹۴ درصد بود، اما هیچ ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری بین سویه‌های ژن وابسته به

1-Olivera et al

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

سیتوتوکسین مثبت و بیماری‌های مذکور وجود نداشت (۱۲).

مایشلکس و همکاران[1](۲۰۰۰) با بررسی ژنوتیپ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان معده و گروه کنترل در آلمان چنین گزارش کردند که ژنوتیپ ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت در بیماران مبتلا به سرطان معده بیش از گروه کنترل بوده و از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بوده است (۱۳).

شیمویاما و همکاران[2] (۱۹۹۷) طی مطالعه‌ای در کشور ژاپن در خصوص تعیین ارتباط بین ژنوتیپ ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده در بین بیماران مبتلا به سرطان معده و بیماران مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی بدون علایم، چنین گزارش کردند که فراوانی ژنوتیپ ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت در بیماران مبتلا به سرطان معده ۱۰۰ درصد و در گروه کنترل ۹۲/۳ درصد بود و هیچ ارتباط معنی‌داری از لحاظ آماری بین ژنوتیپ ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت و سرطان معده دیده نشد(۱۴).

هوانگ و همکاران[3] (۲۰۰۳) طی مطالعه‌ای تحلیلی بر روی ۱۶ پژوهش صورت گرفته در خصوص ارتباط بین حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت سرطان معده چنین گزارش کردند که ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری و سرم مثبت بودن از نظر ژن وابسته به سیتوتوکسین، خطر ابتلا به سرطان معده را به ترتیب؛ ۲/۲۸ و ۲/۸۷ برابر افزایش می‌دهد و در بین جمعیت مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری، آلودگی به سویه‌های ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت خطر ابتلا به سرطان معده را ۱/۶۴ برابر و خطر ابتلا به سرطان معده از نوع غیر کاردیا را ۲/۰۱ برابر افزایش می‌دهد. سرطان معده از نوع کاردیا با عفونت هلیکوباکتر پیلوری و یا با سویه‌های ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت مرتبط نبود(۱۵).

با توجه به تحقیقات صورت گرفته به وسیله دیگر محققین در سراسر دنیا بین وجود ژنوتیپ وابسته به سیتوتوکسین به عنوان یکی از عوامل مهم ویرولانس و شدت بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری رابطه مؤثر وجود دارد و در این تحقیق از آنجا که درصد بالایی از سویه‌های جدا شده واجد ژن وابسته به سیتوتوکسین می‌باشند، یافتن چنین ارتباطی دشوار است.

در مجموع می‌توان گفت که هلیکوباکتر پیلوری در جامعه مورد مطالعه از شیوع نسبتاً بالایی برخوردار است و ژنوتیپ وابسته به سیتوتوکسین مثبت، درصد زیادی از سویه‌های شایع در منطقه را شامل می‌شود. در این بین نیاز به توجه جدی‌تر نسبت به پیشگیری و درمان احساس می‌شود و پیشنهاد می‌گردد با توجه به شیوع بسیار بالای سویه‌های وابسته به سیتوتوکسین مثبت که مطالعات دیگر محققین

1-Mieshlkes et al
2-Shimoyama et al
3-Huang et al

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

در سراسر دنیا ارتباط این گونه سویه‌ها را با افزایش سرطان معده نشان داده‌اند (۱۴و۹)، در تحقیقات آینده می‌توان اختصاصاً به بررسی ارتباط بین بیماری سرطان معده با سویه‌های ژن وابسته به سیتوتوکسین مثبت در این منطقه پرداخت.

تقدیر و تشکر

این طرح تحقیقاتی با حمایت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به انجام رسیده است که از همکاران شاغل در این بخش سپاسگزاری می‌نماییم و همچنین از همکاران بخش آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان قدردانی می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

Prevalence of the cagA-Positive Helicobacter pylori Strains Isolated from Gastric Biopsy Specimens in Shahrekord

Doosti A[*]
Rahimian GH[**]
Nassiri J[**],
Yavari-Forushani P[***].

[*] Assistant Professor of Molecular Genetic, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
[**]Assistant Professor of Gastrology, Internal Department, Hajar Hospital, Shahrekord University of Medical Science, Shahrekord, Iran
[***]MSc of Biology, Biology Department, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran

KEYWORDS:
Helicobacter pylori,
Polymerase Chain Reaction(PCR)
Cytotoxin associated gene A(cagA)

Received:12/11/1385
Accepted:23/3/1386

Corresponding Author: Doosti A
Email: doostiiranii@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Helicobacter pylori are among the important pathogens responsible for chronic gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. The present study aimed to comparatively evaluate PCR and RUT methods for detection of H. Pylori and determination of the prevalence of the cagA-positive Helicobacter pylori strains in Shahrekord.

Materials & Methods: This is a molecular epidemiology study conducted in 1385 on biopsy samples collected from 120 patients with dyspeptic symptoms who were referred to endoscopy department of Hajar hospital of Shahrekord. In order to detect H. pylori, RUT method was used at first and then DNA was directly extracted from biopsy specimens. PCR-amplification was preformed for the ureC and then for cagA gene.

Results: The H. pylori infection was found in 74 (61.66%) of the patient by RUT method. In parallel, ureC PCR detected H. pylori in 103 (85.83%) of patients. All RUT-positive patients were found to be ureC-PCR positive, too. The cagA-positive H. pylori strains were found in 83.5 percent of isolated strains.

Conclusion: These findings indicate that ureC PCR is more sensitive than RUT for diagnosis of H. pylori infection. In addition, the high prevalence of the CagA-positive H. pylori strains is present in Shahrekord.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 23:35 +0430 on Monday April 22nd 2019

REFERENCES:

1.Xue-Jun C, Jie Y, Yue-fang S. Dominant cagA/vacA genotype and coinfection frequency of H. pylori in peptic ulcer or chronic gastric patients in Zhejiang Province and correlation among genotypes, coinfection and severity of the diseases. Chin Med J 2005; 118(6): 460-7.

2.Lundin A, Bjorkholm B, kupershmidt I, Unemo M, Nilsson P, Andersson DI, et al. Slow genetic divergence of H. pylori strains during long-term colonization. Infection and Immunity 2005; 73 (8): 4818-22.

3.Zhou L, Sung JJ, Lin S. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after H. pylori eradication. Chin Med J 2003; 116: 11-4.

4.Granstrom N, Tindberg Y, Blennow M. Seroepidemiology of helicobacter pylori infection in cohort of children monitored from 6 months to 11 years of age. J Clin Microbiol 1997; 35: 468-70.

5.Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, et al. Comparison of three PCR method for detection of Helicobacter pylori DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. World J Gastrol 2004; 10 (13): 1958-60.

6.Kabir S. Detection of Helicobacter pylori DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction. Helico 2004; 9 (2): 115.

7.Fernando N, Holton J, Vaira D, DeSilva M, Fernando D. Prevalence of Helicobacter pylori in Sri Lanka as determined by PCR. J Clin Microbiol 2002; 40 (7):2675-6.

8.Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler JP, Bollen A, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by PCR: Comparison with other invasive techniques and detection of CagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1995; 33 (10): 2752-6.

9.Mobley HLT, Mends GL, Hazell SL. Helicobacter pylori physiology and genetics.1st ed. Washington: ASM Press; 2001; 112-33.

10.Sadeghi H, editor. cagA genotype and variants in Helicobacter pylori strains and relationship to gastroduodenal desease. The 5th Helicobacter Pylori Seminar (HPS-2005): 2005 June. 16:Tehran, Iran.

11.Talebkhan Y, editor. Detection of Helicobacter pylori cagA gene in gastric biopsies. The 5th Helicobacter Pylori Seminar (HPS-2005): 2005 June. 16:Tehran, Iran.

12.Olivera AG, Santos A, Guerra JB, Rocha AM, Olivera CA, Cabral MM, et al. babA2- and cagA-positive Helicobacter pylori strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. J Clin Microbiol 2003; 41(8):3964-6.

13.Mieshlkes S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Gunther T, Lehn N, Malfertheiner P, et al. The Helicobacter pylori vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. Int J Cancer 2000; 87(3):322-7.

14.Shimoyama T, Fukuda S, Tanaka M, Mikami HT, Saito Y, Munaakata A. High prevalence of the CagA-positive Helicobacter pylori srains in Japanese asymptomatic patients and gastric cancer patients.Scand. J Gastrol 1997; 32 (5):465- 8.

15.Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta – analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. Gastrol 2003; 125(6):1636-44.

Archive of SID

www.SID.ir