Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Prevalence of Pathogenic Genes *cagA* and *vacA* of *Helicobacter pylori* Isolated in Patients with Digestive Disorders

Khatoon Heidari[1], Hami Kaboosi[2]*, Ailar Jamali[3], Ezzat Allah Ghaemi[4], Fatemeh Peyravii Ghadikolaii[5]

1. PhD Student, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Ayatollah Amoli branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
4. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
5. Assistant Professor. Department of Biology, Ghaemshahr branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran

Article Information

Article Subject:
Medical Microbiology

DOI: 10.30699/ijmm.13.1.80

Corresponding author:

Dr. Hami Kaboosi,
Department of Microbiology, Ayatollah Amoli branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Email:
hkaboosi@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Helicobacter pylori* is the main cause of various gastroduodenal diseases. It is estimated that app roximately, more than half of the adult population in developed countries and 90% of people in developing countries infected with *H. pylori*. *H. pylori* infection may be related to Genetic of virulence factors and environmental factors. The aim of this study was to assess of frequency *cagA* and *vacA* genes of *H. pylori* isolated from patients with Gastrointestinal Disorders.

Materials and Methods: This cross-sectional descriptive study carried out on 120 patients with gastrointestinal diseases in Gorgan city in 2017. (40 patients of gastric cancer, 40 patients of peptic ulcer, 40 patients of without cancer and ulcer). After genomic DNA extraction PCR was carried out using specific *H.pylori* primers.

Results: Overall, 120 *H.pylori* strains were isolated. The frequency of *cagA* was %67.5 in gastric cancer, %60 in peptic ulcer and %45 in patiens without ulcer and gastric cancer. Also frequency of *vacA* gene was detected %55 in gastric cancer, %40 in peptic ulcer and %27.5 in patiens without ulcer and gastric cancer.

Conclusion: Based on our findings it seems that the *cag A* and *vac A* genes were virulence among *H. pylori* isolated from studied patients. The frequency of *cagA* and *vacA* genes *H. pylori* were than in gastric cancer and peptic ulcer patients.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *cagA*, *vacA*, Peptic Ulcer, PCR

Received: 2018/11/24 Accepted: 2019/06/18 Available online: 2019/06/20

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Heidari K, Kaboosi H, Jamali A, Ghaemi E A, Peyravii Ghadikolaii F. Prevalence of Pathogenic Genes cagA and vacA of Helicobacter pylori Isolated in Patients with Digestive disorders from 5 Azar Hospital in Gorgan city in 2017.. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (1) :80-88

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ - شماره ۱ - فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی فراوانی ژن‌های بیماریزای *cagA* و *vacA* در جدایه‌های *هلیکوباکترپیلوری* بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی

خاتون حیدری[۱]،حامی‌کابوسی[۲]*، آیلر جمالی[۳]، عزت الله قائمی[۴]، فاطمه پیروی قادیکلایی[۵]

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۳. استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴. استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان ، گرگان، ایران
۵. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد قائمشهر، قائمشهر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۹/۳
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۸
انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۳/۳۰
موضوع:
باکتری شناسی پزشکی
IJMM1398;13(1): 80-88

نویسندهٔ مسئول:
دکتر حامی کابوسی
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد آیت الله آملی، آمل، ایران

پست الکترونیک:
hkaboosi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *هلیکوباکترپیلوری* عامل اصلی بیماری‌های گوارشی است. بیش از نیمی‌از جمعیت افراد بالغ درکشورهای توسعه یافته و۹۰٪ افراد در کشورهای در حال توسعه آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* هستند. عفونت ناشی از*هلیکوباکتر پیلوری* ممکن است با عوامل محیطی و ژنتیکی مرتبط باشد. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن‌های *cagA* و *vacA* در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بیماران دچار مشکلات گوارشی بوده است.

مواد و روش کار: این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی ۱۲۰ بیوپسی معده بیماران مبتلا به بیماریهای گوارشی (شامل ۴۰بیمار سرطان معده و ۴۰ بیمار زخم پپتیک و۴۰ بیمار بدون زخم و سرطان معده) شهر گرگان در سال ۱۳۹۶ انجام شد. پس از استخراج DNA با استفاده پرایمرهای اختصاصی دو ژن مورد نظر و ازمون PCR بررسی فراوانی صورت گرفت.

یافته‌ها: از مجموع ۱۲۰ نمونه *هلیکو باکتر پیلوری* جداشده از بیوپسی بیماران، فراوانی ژن *cagA* در سرطان معده ۶۷/۵ درصد، در زخم پپتیک ۶۰ درصد و در بیماران بدون زخم و سرطان معده ۴۵ درصد گزارش شده است. همچنین فراوانی ژن *vacA* در بیماران سرطان معده وزخم پپتیک وبدون زخم و سرطان معده به ترتیب ۵۵ درصد ،۴۰ درصد و۲۷/۵ درصد گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: ژن‌های *cagA* و*vacA* شایع ترین فاکتورهای بیماریزای باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بیماران تحت بررسی در این مطالعه می‌باشند. در این مطالعه فراوانی ژن‌های *cagA* و *vacA* *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران مبتلا به سرطان معده و زخم پپتیک بیشتراز گروه بدون زخم وسرطان معده گزارش شد.

کلمات کلیدی: *زخم پپتیک، هلیکوباکتر پیلوری، واکنش زنجیره ای پلی مراز، vacA، cagA*

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری میکروارگانیسم گرم منفی و میکروآئروفیل است که توسط سازمان بهداشت جهانی WHO به عنوان عامل باکتریایی سرطان‌زا تیپ I معرفی شده است (۱). این باکتری در موکوس و لایهٔ مخاطی معده کلونیزه شده و به عنوان عامل مهم زخم معده، زخم دوازدهه، التهابات معده و فاکتور خطر برای ابتلا به سرطان معده محسوب می‌شود (۲). این باکتری به علت توانایی در ایجاد تطابق با محیط برای مدت طولانی در معده زنده می‌ماند. فاکتورهای بیماریزای متعددی در این باکتری یافت شده است که از مهمترین این فاکتورها سیتوتوکسین مرتبط با ژن A (*cagA*) و سیتوتوکسین واکوئله کننده (*vacA*) می‌باشند. ژن *cagA* یک پروتئین ۱۲۰ کیلودالتون است که در ۶۰ تا ۷۰ درصد از سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* یافت می‌شود (۳، ۴).

این ژن به عنوان اصلی ترین فاکتور درگیر در بیماریزایی ژن‌های متعلق به جزیره پاتوژنیسیته *cag* می‌باشد. یکی از عملکردهای مهم عناصر کد شونده توسط جزیره پاتوژنیسیته *cag*، فعال کردن و تحریک واکنش‌های ایمنی است که از آن

جمله می‌توان به فعال شدن فاکتورهای رونویسی اشاره کرد. فعال شدن این فاکتورهای رونویسی باعث بیان ژن‌های متعددی شامل ژن‌های سرطان زا، ژن‌های کد کننده کموکاین‌ها و نیز ژن‌های فعال کننده چرخه آنتی آپوپتوزیس می‌گردد (۵، ۶).

طبق بررسی‌های انجام شده برخی از ژن‌های جزیره پاتوژنیسیته *cag* پروتئین‌های مربوط به سیستم‌های ترشحی را کد می‌کنند. سویه‌های حاوی ژن *cagA* توانایی بالایی در استقرار، تخریب و التهاب بافتی دارند. ژن *cagA* *هلیکوباکتر پیلوری* به عنوان مارکر خطر بروز زخم معده و سرطان معده محسوب می‌شود (۷). یکی دیگر از فاکتورهای بیماریزای *هلیکوباکترپیلوری* سیتوتوکسین واکوئله کننده A (*vacA*) است که محصول بیان ژن *vacA* در *هلیکوباکتر پیلوری* است. این توکسین قادر به تخریب سلول‌های اپیتلیال معده و اولسراسیون موکوزال معده است (۸، ۹).

این توکسین عملکرد پروتئین‌های غشاء درون سلولی را مختل و موجب تشکیل واکوئل درون سلول و التهاب می‌گردد. بعد از اتصال به سلول میزبان از طریق آندوسیتوز وابسته به گیرنده اینترنالیزه شده و تولید واکوئل را تحریک و در نهایت سبب مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس می‌شود (۱۰، ۱۱).

مطالعات نشان داده است که در ۵۰ تا ۸۰ درصد بیماران مبتلا به زخم معده که باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* در آن‌ها کلونیزه شده است خطر ابتلا به سرطان با احتمال بالایی وجود دارد. به طوری که تقریباً ۱۰ درصد بیماران مبتلا به گاستریت آتروفیک مزمن در طی ۱۵ سال دچار سرطان معده می‌شوند که چهارمین بدخیمی شایع در جهان و دومین عامل مرگ و میر در ایران است (۱۲، ۱۳).

هدف از این مطالعه باتوجه به اهمیت بالای این باکتری و عفونت ناشی از آن و آمار بالای سرطان معده در استان گلستان، بررسی فراوانی ژن‌های *cagA* و *vacA* در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از بیماران دچار ناراحتی‌های گوارشی است. همچنین در این مطالعه ما ارتباط شیوع ژن‌های ویرولانس *cagA* و *vacA* *هلیکوباکتر پیلوری* با فاکتورهای دموگرافیک (سن، جنس، قومیت، نوع بیماری) نیز بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جمع آوری نمونه و بررسی هیستوپاتولوژی

برای انجام این مطالعه توصیفی – مقطعی تمام بیمارانی که از ابتدای فروردین تا انتهای شهریور ۱۳۹۶ به درمانگاه گوارش یا بخش آندوسکوپی بیمارستان پنجم آذر شهر گرگان مراجعه کرده و سن بیشتر از ۲۵ سال داشتند, مورد بررسی قرار گرفتند. بیمارانی که دارای علائم دیسپپسی شامل درد شکم ، ترش کردن، نفخ شکم و تهوع بودند وارد مطالعه شدند. تمام بیماران با رضایت شخصی و آگاهانه تحت آندوسکوپی قرار گرفتند. اطلاعات دموگرافیک و پاتولوژیک بیماران که شامل سن، جنس، قومیت و نوع بیماری توسط پرسنل بیمارستان از بایگانی بخش پاتولوژی جمع آوری شد. نوع بیماری توسط متخصص گوارش تشخیص داده شد. قبل از نمونه برداری، برای جلوگیری از هر آلودگی دستگاه آندوسکوپ کاملا ضد عفونی شد و در ادامه نمونه بیوپسی معده از ناحیه دیواره خلفی و یا قدامی‌آنتروم معده گرفته شد. ابتدا از تست اوره آز سریع (Rapid urease test) برای تشخیص *سریع هلیکوباکتر پیلوری* استفاده شده است و در صورت مثبت بودن، نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده و پس از قرار دادن در پارافین و تهیه بلوک‌های پارافینه، در قطعات ۶-۵ میکرونی با دستگاه میکروتوم شرکت لیکا (Leica کشور آلمان) برش داده شدند. از هر بلوک پارافینه حاوی بافت معده سه اسلاید تهیه شد، یکی از اسلایدها جهت انجام رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و دو اسلاید دیگر برای رنگ آمیزی گیمسا و ایمونوهیستوشیمی جهت تایید *هلیکوباکتر پیلوری*، طبق پروتکل کیت شرکت داکو (Dako) کشوردانمارک، استفاده شد. یک نمونه بافتی سرطان معده آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* به عنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

استخراج DNA ژنومیک

استخراج DNA ژنومیک از بلوک‌های پارافینه بیوپسی‌های معده طبق پروتکل کیت (شرکت کیاژن، کشور سازنده آلمان با شماره کیت ۵۱۳۰۴ -) انجام شد. کیت استخراج DNA از بافت شامل Wash Buffer، lysis Elution Buffer، Proteinase می‌باشد. پس از انجام مراحل استخراج DNA , نمونه‌ها تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. کمیت و کیفیت درجه خلوص DNA استخراج شده باروش‌های اسپکتوفتو متری بررسی شد.

آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های *cagA* و *vacA*

برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی *cagA* و *vacA* استفاده شد که از مطالعات قبلی استخراج شده بود، استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR ژن *cagA* با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل PCR master mix (دانمارک، Ampliqon), یک میکرو مولار از هر پرایمر Forward و Reverse و DNA الگو و نیز آب مقطر دیونیزه شده تحت شرایط دمایی شامل واسرشت اولیه در

۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه و واسرشت ثانویه دردمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر (Anneling) در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) در۳۴ سیکل انجام گرفت.

همچنین شرایط دمایی واکنش PCR برای ژن *vacA* در ۳۶ سیکل شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس بمدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر (Anneling) دردمای ۵۹ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه انجام شد.

جدول ۱. توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

پرایمر	توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرها(۳→۵)	طول قطعه(bp)	منبع
vacA	5-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3 5-GCGTCAAAATAATCCCAAGG-3	642	28
cagA	5-GATAACAGGCAAGCTTTTGA-3 5-CTGCAAAAGATTGTTTGGCA-3	499	**25**

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد (مرک، آلمان) به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۶۰ الکتروفورز گردید. از ژل تحت نور uv عکس گرفته شد و تصاویر باندها با نمونه سویه *هلیکوباکتر پیلوری* تهیه شده از بانک میکروبی ATCC43504 (کنترل مثبت) بررسی و تایید شدند. برای تایید صحت PCR انجام شده یک نمونه از محصول تکثیر شده از هر یک ژن‌های *cagA* و *vacA* برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال شد. پس از انجام واکنش PCR، شیوع ژن‌های *cagA* و *vacA* و ارتباط این ژن‌ها با جنسیت ، سن و قومیت به صورت فراوانی و درصد نشان داده شد (جدول ۲).

آنالیز آماری

برای بررسی‌های آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و آزمون chi-square و برای آمارهای توصیفی از میانگین، انحراف استاندارد، فراوانی و درصد و برای سطوح متغیرهای کیفی از آزمون کای دو سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده گردید.

یافته‌ها

مطالعه حاضر بر روی ۱۲۰ بیمار (۴۰ بیمار سرطان معده، ۴۰ بیمار زخم پپتیک و ۴۰ بیمار بدون زخم و سرطان معده) مبتلا به مشکلات گوارشی صورت گرفته است. در این مطالعه دامنه سنی بیماران ۷۴-۲۵ سال و میانگین سنی کل بیماران در ۳ گروه مورد مطالعه ۱۲/۱۶ ± ۴۸/۹۵ سال بود. از مجموع ۱۲۰ بیمار شرکت کننده در این مطالعه، ۶۶ نفر مرد و ۵۴ نفر زن بودند. نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که فراوانی ژن *cagA* در گروه سرطان معده ۶۷/۵ درصد ، در زخم پپتیک ۶۰ درصد و در بیماران بدون زخم و سرطان معده ۴۵ درصد می‌باشد.

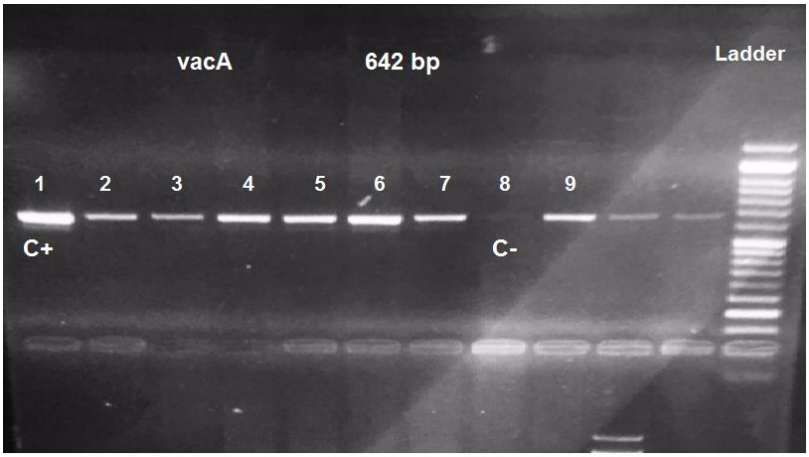
همچنین فراوانی ژن *vacA* در ۳ گروه مورد مطالعه به ترتیب ۵۵ درصد (سرطان معده) و ۴۰ درصد (زخم پپتیک) و ۲۷/۵ درصد (بیماران بدون زخم و سرطان) گزارش گردید .همه ۱۲۰ بیمار شرکت کننده در این مطالعه بر اساس مطالعات بیوشیمیو پاتولوژی شامل تست اوره آز, هیستوپاتولوژی, رنگ آمیزی گیمسا و روش ایمونوهیستوشیمی‌آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* بودند. . فراوانی ژن *cagA* در ۶۹ بیمار (۵۷/۵ درصد) و ژن *vacA* در ۴۹ بیمار (۴۰/۸ درصد) گزارش شد (جدول شماره ۲).

در این مطالعه ژن‌های *cagA* و *vacA* در نمونه‌های دارای سرطان معده با فراوانی بیشتری یافت شد. بین فراوانی ژن‌های *vacA* و *cagA* با بیماریهای گوارشی ارتباط معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲). (P=۰/۵۶ و P=۰/۱۰۲).

جدول ۲. فراوانی ژن‌های cagA و vacA *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران گوارشی

ژن	بیماری‌های گوارشی		
	سرطان معده تعداد(درصد)	زخم پپتیک تعداد(درصد)	بدون زخم و سرطان معده تعداد(درصد)
$CagA^+$	۲۷ (٪۶۷/۵)	۲۴ (٪ ۶۰)	۱۸ (٪ ۴۵)
$CagA^-$	۱۳ ٪۳۲/۵(٪۵)	۱۶ (٪۴۰)	۲۲ (٪۵۵)
مجموع	۴۰ (٪ ۱۰۰)	۴۰ (٪ ۱۰۰)	۴۰ (٪ ۱۰۰)
$VacA^+$	۲۲ (٪ ۵۵)	۱۶ (٪ ۴۰)	۱۱ (٪ ۲۷/۵)
$VacA^-$	۱۸ (٪ ۴۵)	۲۴ (٪ ۶۰)	۲۹ (٪ ۷۲/۵)
مجموع	۴۰ (٪ ۱۰۰)	۴۰ (٪ ۱۰۰)	۴۰ (٪ ۱۰۰)

فراوانی ژن *cagA* در مردان بیمار ۴۳ مورد (٪۶۴/۲) و در زنان بیمار ۲۶ مورد (٪۴۹/۱) و فراوانی ژن *vacA* در مردان بیمار ۳۲ مورد (٪۴۷/۸) و در زنان بیمار ۱۷ مورد (٪۳۲/۱) گزارش گردید. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه میزان فراوانی ژن‌های *cagA* و *vacA* درمردان بیشتر از زنان نشان داده شد. ارتباط معنی داری بین فراوانی ژن‌ها و جنسیت یافت نشد (P=۰/۹۶ و P=۰/۸۳). همچنین دراین پژوهش میزان فراوانی ژن *cagA* در بیماران با سنین بالای ۵۰ سال ۴۱ مورد (٪۶۰/۳)٪۶۰/۳ و در سنین زیر ۵۰ سال ۲۸ مورد (٪۵۳/۸) مشاهده شد. همچنین فراوانی *vacA* در بیماران با سنین زیر ۵۰ سال ۲۲ مورد (٪۴۲/۳) و بالای ۵۰ سال ۲۷ مورد (٪۳۹/۷) گزارش گردید. بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده ابتلا به عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* ممکن است با بالا رفتن سن افزایش یابد. در بررسی قومیت بیماران نیز، فراوانی ژن‌های بیماریزای *cagA* و*vacA* در گروه ترکمن و سیستانی بیشتر از گروه فارس بود. فراوانی ژن *cagA* در گروه ترکمن شامل ۲۵ بیمار (٪۴۹) از ۶۹ بیمار cagA مثبت در گروه سیستانی شامل ۲۷ بیمار (٪۶۷/۵) از۶۹ بیمار cagA مثبت و در گروه فارس شامل ۱۷ بیمار (٪۵۷/۵) از ۶۹ بیمار نشان داده شد. همچنین ژن *vacA* در گروه ترکمن شامل ۲۳ بیمار (٪۴۵/۱) از ۴۹ بیمار vacA مثبت در گروه سیستانی شامل ۱۴ بیمار (٪۳۵) از ۴۹ بیمار vacA مثبت و در گروه فارس شامل ۱۲ بیمار از۴۹ بیمار (٪۴۱/۴) گزارش گردید. آنالیزهای آماری نشان داد که بین سن و جنس و قومیت بیماران و فراوانی ژن‌های *cagA* و *vacA* ارتباط معنی داری وجود ندارد و خصوصیات دموگرافیک بیماران و متغیرها ارتباط معنی داری با جایگاه‌های ژنی ندارند (P>0.05) (جدول شماره۳).



شکل ۱. ژل الکتروفورز محصول مربوط به باند ژن vacA *هلیکوباکتر پیلوری*.چاهک ۸ مربوط به کنترل منفی فاقد DNA .چاهک ۲ تا ۷ نمونه‌های حامل *هلیکوباکتر پیلوری* واجد ژن vacA و چاهک ۱ مربوط به سویه ATCC43504 *هلیکوباکتر پیلوری* (Positive vacA)کنترل مثبت وچاهک L مربوط بهLadder 100bp

نتایج الکتروفورز برای روز بیستم استخراج نشان‌دهندهٔ بیان ژن *16S rRNA* در هر دو تیمار BHI براث و FB بود. ژن *hly* و *ilnA* در هیچ‌کدام از تیمارها بیان نشد (شکل ۴).

از مقایسه نتایج بررسی بیان ژن با نتایج شمارش کلنی در محیط کشت غنی‌شده BHI آگار، می‌توان به این نتیجه رسید باکتری موجود در هر سه محیط طی شوک انجماد زنده است و

خاصیت بیماری‌زایی خود را از طریق بیان ژن *hly* در دو محیط شرایط مغذی (BHI، FB) در روز دوم حفظ کرده است. از آنجا که در شمارش باکتری‌ها در محیط کشت غنی شاهد رشد باکتری‌ها بودیم، می‌توان نتیجه گرفت باکتری وارد فاز VBNC نشده است، اما بر اثر شوک دمایی وارده ضعیف شده است.

نتیجه بررسی کشت در بلاد آگار در انتهای دورهٔ انجماد

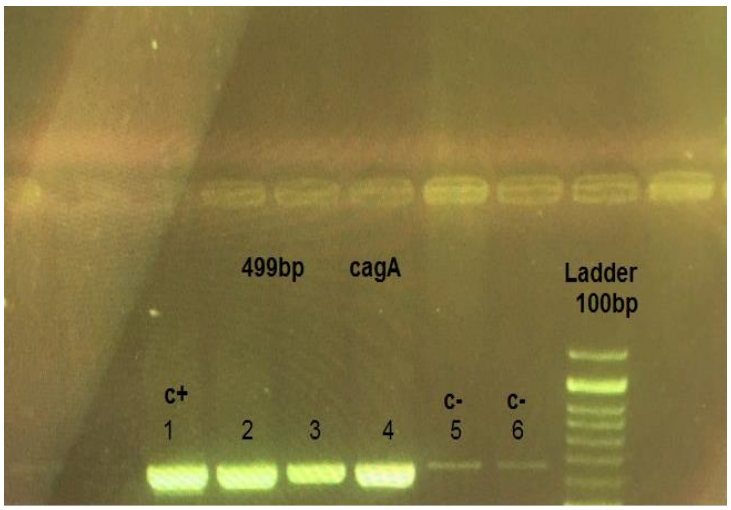
نتایج نشان‌دهندهٔ رشد باکتری تلقیح‌شده از محیط FB در روز شصتم و همولیز مثبت آن در محیط آگار خون‌دار بود.

نتایج بررسی بیان ژن محیط FB در محیط بلاد آگار

نتایج نشان‌دهندهٔ بیان ژن *16S rRNA* و بیان مجدد ژن *hly* بود. در مورد ژن *inlA* هیچ‌گونه بیانی مشاهده نشد (شکل ۵).

جدول ۳. ارتباط خصوصیات دموگرافیک بیماران گوارشی و ژن‌های cagA , vacA

	cagA مثبت	*cagA* منفی	P-*value*	*vacA* مثبت	*vacA* منفی	P-*value*
جنس	(٪۶۴/۲)۴۳	(٪۳۵/۸)۲۴	P=۰/۹۶	(٪۴۷/۸)۳۲	(٪۵۲/۲)۳۵	P=۰/۸۳
مرد	(٪۴۹/۱)۲۶	(٪۳۹/۷)۲۷		(٪۳۲/۱)۱۷	(٪۶۷/۹)۱۷	
زن	(٪۵۷/۵)۶۹	(٪۴۲/۵)۵۱		(٪۴۰/۸)۴۹	(٪۵۹/۲)۷۱	
کل						
جمع	۱۲۰			۱۲۰		
سن	(٪۵۳/۸)۲۸	(٪۴۶/۲)۲۴	P=۰/۴۷	(٪۴۲/۳)۲۲	(٪۵۷/۷)۳۰	P=۰/۷۷۴
کمتراز۵۰	(٪۶۰/۳)۴۱	(٪۳۹/۷)۲۷		(٪۳۹/۷)۲۷	(٪۶۰/۳)۴۱	
بیشتراز۵۰	(٪۵۷/۵)۶۹	(٪۴۲/۵)۵۱		(٪۴۰/۸)۴۹	(٪۵۹/۲)۷۱	
کل						
جمع	۱۲۰			۱۲۰		
قومیت	(٪۴۹)۲۵	(٪۵۱)۲۶	P=۰/۲۰	(٪۴۵/۱)۲۳	(٪۵۴/۹)۲۸	P=۰/۶۲۲
ترکمن	(٪۶۷/۵)۲۷	(٪۳۲/۵)۱۳		(٪۳۵)۱۴	(٪۶۵)۲۶	
سیستانی	(٪۵۸/۵)۱۷	(٪۴۱/۴)۱۲		(٪۴۱/۴)۱۲	(٪۵۸/۶)۱۷	
فارس	(٪۵۷/۵)۶۹	(٪۴۲/۵)۵۱		(٪۴۰/۸)۴۹	(٪۵۹/۲)۷۱	
کل						
جمع	۱۲۰			۱۲۰		



شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول مربوط به باند ژن cagA *هلیکوباکتر پیلوری*.چاهک۵ و ۶ مربوط به کنترل منفی فاقد DNA چاهک ۲-۴ نمونه‌های حامل *هلیکوباکتر پیلوری* واجد ژن cagA و چاهک ۱ مربوط به سویه *هلیکوباکتر پیلوری* ATCC43504 Positive cagA به عنوان کنترل مثبت و چاهک L مربوط به Ladder 100bp

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در انسان تحت تاثیر فاکتورهای میزبانی ، ژنتیکی و باکتریایی قرار دارد. در این مطالعه با توجه به نتایج بدست آمده از مجموع ۱۲۰ بیمار شرکت کننده در این مطالعه ۶۹ بیمار (۵۷/۵٪) واجد ژن ویرولانس *cagA* و ۴۹(۴۲,۵٪) بیمار واجد ژن *vacAA* بودند. آنالیز مولکولی ژنهای ویرولانس *cag A* و *vacA* *هلیکوباکترپیلوری* نشان داد که بیشترین فراوانی *vacA* و *cag A* در بیماران مبتلا به سرطان معده و زخم پپتیک بوده است.

فراوانی ژن *cag A* در سرطان معده ۶۷/۵ درصد، در زخم پپتیک ۶۰ درصد و در بیماران بدون زخم و سرطان معده ۴۵ درصد بود که با مقادیر فراوانی این ژن‌ها در سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از کشورهای مختلف متفاوت می‌باشد. Podzorski و همکاران در آمریکا گزارش کرده اند که ۶۶ درصد از سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* حامل ژن *cag A* می‌باشند. همچنین Chen و همکاران نشان داده اند که ۹۴ درصد از سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم‌های پپتیک و سرطان معده دارای ژن *cag A* می‌باشند (۱۴). سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* که دارای ژن *cag A* و *Vac Av* هستند نسبت به سویه‌های فاقد ژن‌های بیماریزا شیوع بیشتری دارند. شیوع سویه‌های دارای ژن *cagA* و *vacA* در نواحی جغرافیایی گوناگون متفاوت است. به عنوان مثال فراوانی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* در بیماران مبتلا به گاسترودئودنال در کره ۹۷ درصد، در چین ۹۳/۴ درصد در مالزی ۹۴ درصد در هلند ۴۶ درصد، در آلمان ۸۷/۲ درصد است (۱۵). بنابراین به نظر می‌رسد که از جمله دلایل اختلاف نتایج مطالعات مختلف موقعیت جغرافیایی، سیستم ایمنی میزبان، فاکتورهای محیطی و ژنتیکی، گروه سنی افراد بیمار مورد مطالعه و حجم نمونه جمع آوری شده می‌باشد (۱۶، ۱۷).

مشاهدات ما با گزارش‌های Molaei و همکاران، Mohammadi و همکاران و Shirazi و همکاران مطابقت دارد بطوریکه فراوانی سویه‌های *cag A* مثبت و *vacA* مثبت در بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی بیشتر است (۱۸). مطالعات نشان داده است که شیوع ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* و گاستریت مزمن فعال در سنین پایین تر بیشتر است که با افزایش سن شیوع ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* افزایش یافته و عوارض ناشی ازآن بیشتر خواهد بود (۱۹). Abdollahi و همکاران در تهران در مطالعه ای دیگر فراوانی ژن *cag A* را در بیماران مبتلا با زخم معده را ۳۵/۱ درصد گزارش کردند که تقریبا مشابه فراوانی گزارش شده در مطالعه حاضر می‌باشد (۲۰).

با توجه به خطر بالای ابتلا به بیماریهای گوارشی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته، بررسی عوامل ایجاد کننده بیماری‌های گوارشی مانند زخم معده، سرطان معده و زخم دوازدهه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با توجه به اهمیت باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* در بروز این بیماری‌ها، افزایش شیوع ژن‌های *cag A* و *vac A* و اثرات آنها بر روی بافت معده و ایجاد التهاب در روند مزمن شدن این بیماری‌ها قابل توجه می‌باشد (۲۱، ۲۲).

مطالعه ای تحت عنوان بررسی ژن های ویرولانس *هلیکوباکتر پیلوری* در گاستریت، زخم پپتیک و سرطان معده درلائوس درسال ۲۰۱۴ بر روی ۳۲۹ بیمار با عارضه دیسپپسی انجام شده، آنها گزارش کردند که از ۱۱۹ بیمار آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* ۸۳ نفر آنها مبتلا به گاستریت، ۲۰ نفر دارای زخم پپتیک و ۳ نفر مبتلا به سرطان معده می‌باشند. آنها فراوانی ژن *cagA* را ۹۹/۲ درصد گزارش کردند. این محققین نتیجه گرفتند که ژن *cag A* تقریباً در تمامی ۱۱۹ بیمار لائوسی وجود داشته و ژن‌های *cagA* و *vacA* مهمترین فاکتورهای ویرولانس در عفونت ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* می‌باشند (۲۳). ژن‌های بیماریزای مشهور *هلیکوباکتر پیلوری* ممکن است در اثر میانکش باکتری– میزبان در طی استقرار باکتری درآنتروم معده انسان گسترش یابد (۲۴). به نظر می‌رسد که این فاکتورهای بیماریزا به بقای باکتری در محیط اسیدی و سازگاری آن با شرایط نامناسب محیط اطراف باکتری در معده و نیز مقابله با سیستم ایمنی میزبان کمک کرده و بدین ترتیب باعث تخریب بافتی و پیامدهای بالینی می‌شود (۲۵، ۲۶). نتایج گزارش شده توسط محققان ایرانی درمورد ارتباط بین ژن *vacA* و بیماریهای گوارشی متفاوت است. به عنوان مثال احمدی و همکاران درکرج نشان دادند که فراوانی ژن‌های *vacA* و *cagA* در بیماران مبتلا به سرطان معده به ترتیب ۳۲ درصد و ۱۴ درصد می‌باشد که مقادیر ان از فراوانی گزارش شده در مطالعه حاضر کمتر بوده است (۲۷). اختلاف درصدهای ارایه شده در مورد شیوع این ژن‌ها را می‌توان به انتشار جغرافیایی و عوامل محیطی مرتبط دانست (۲۸). در مطالعه مشابهی که توسط طالبی و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد در ۱۲۸ بیمار مبتلا به سرطان معده، زخم معده و گاستریت که آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* بودند، فراوانی *cagA* در سرطان معده ۵۷/۵٪ گزارش گردید که بانتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۹). در یک مطالعه Palframan و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که ژن بیماریزای *vacA* ایجاد کننده یک توکسین کلیدی در آسیب بافتی می‌باشد و باعث آسیب به سلولهای اپیتلیال معده و زخم معده می‌شود (۳۰). در نهایت می‌توان این طور نتیجه گیری کرد که عوامل بیماریزای *هلیکوباکتر پیلوری* با وجود خاصیت بیماریزایی و

مرتبط بودن با سرطان‌های دستگاه گوارش موجب کلونیزاسیون بیشتر باکتری و ایجاد التهاب بافتی و پاسخ ایمنی شدیدتری در نمونه‌های بافتی معده می‌شوند.

سپاسگزاری

ااین مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دکتری بـه شـماره و کـد اخلاق ۲۳۹۳۰۵۰۷۹۷۱۰۰۱ مصوب شـورای تحصـیلات تکمیلـی و شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحـد آیـت الله آملـی در سـال ۱۳۹۷ می‌باشد. نویسندگان این مقالـه از پرسـنل میکـروب شناسـی دانشگاه علوم پزشکی گلستان و واحـد توسـعه حمایـت از تحقیقـات بالینی مرکز آموزش درمانی بیمارسـتان پـنجم آذر گرگـان بـه علـت همکاری صمیمانه در اجرای ایـن پـروژه کمـال تشـکر و قـدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

References

1. Kraft C, Stack A, Josenhans C, Niehus E, Dietrich G, Correa P, Fox JG, Falush D, Suerbaum S. Genomic changes during chronic Helicobacter pylori infection. Journal of bacteriology. 2006 Jan 1;188(1):249-54.
2. Essawi T, Hammoudeh W, Sabri I, Sweidan W, Farraj MA. Determination of Helicobacter pylori Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR.ISRN Gastroenterology 2013;4:1-4
3. Nahari M,sharifi Y,Taghi Akhi M,Ashghaczade M,Nahayei M,Fatahi E.Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes and their relationship to peptic ulcer disease and nonnuclear dysplasia .Rese J Microbiol 2008;3(5):386-94.
4. Kienesberger S, Cox LM, Livanos A, Zhang XS, Chung J, Perez-Perez GI, Gorkiewicz G, Zechner EL, Blaser MJ. Gastric Helicobacter pylori infection affects local and distant microbial populations and host responses. Cell reports. 2016 Feb 16;14(6):1395-407.
5. Talebkhan Y, Mohammadi M, Mohaghehi MA, Vaziri HR, Eshagh Hosseini M, Mohajerani N, et al. cog A gene and protein status among Iranian Helicobacter pylori status.Dig Dis Sci. 2008, (4)3: 925-32.
6. Vannarah S, Vilaichone Rk, Rasa chak B, Yamaoka Y, shiotas, et al. Virulence genes of helicobacter in gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in laoe Asion pacj cancer prev. 2014;15(20):9027-31.
7. Yin lui S, chuah S, Goh H, Lee KY, Lee Vs, Ho B, et al. Different CagA and VacA polymorphisms are found in the Chinese versus the malay and Indian populations an analysis of helicobacter pylori virulence genes in Singapore. Proceedings of Singapore healthcare 2010; 19:12-18.
8. Kargar M, Souod N, Doosti A, Ghorbani- Dalin S. prevalence of Helicobacter pylori Vacuolating cytotoxin A gene as apredicitve marker for different gastrodoudenal diseases Iran & clin Infect dis 2011; 6(2):85-9.
9. Khayat A, Soweid A, Katter M, Tahwil A, EI Hajj A, Azar C, et al, prevalence and clinical relevance of helicobacter pylori CagA and VacA genes in Lebanese patients with gastritis and peptic ulcer disease & infect Developing countries 2007;1(1):55-61.
10. Salehi Z, Jelodar MH, Rassa M, Ahaki M, Mollasalehi H, Mashayekhi F. Helicobacter pylori cagA status and peptic ulcer disease in Iran. Digestive diseases and sciences. 2009;54(3):608-13.
11. Hammaond CE, Beeson C, Sualez G, Peek RM, Smol Ka AJ. Helicobacter pylori virulence factors affecting gastric proton pump expression and acid serrection Am & physiol Gastrointest liver physiol. 2015; 309(3):G193-201.
12. Hosseini E, Pousina F, Van de Wiele TV, Ghasemian safaei HG, Adibi P. Helicobacter pylori in Iran A systematic review on the association of genotypes and gastro duodenal diseases JRes Med Sci. 2012; 17(3):280-92.
13. Chomrarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, et al. prevalence of helicobacter pylori VacA, CagA, CagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients int. J infect dis. 2008; 12(1):30-6.
14. Podzorski RP, Podzorski Ds, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the cagA, vacA, cagE, iceA and babA2 gene in helicobacter pylori from sixty-one pediatric patients from the mid wertern United States. diagn microbial infect dis. 2003 ;46(2):83-8.
15. Chen XJmYan j, Shen YF. Dominant cagA/vacA genotypes and coinfection frequency of h.pylori in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang province and correlation among different genotype coinfection and severity of the disease.Chin Med (Engl). 2005;118(6):460-7.
16. Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K,Yamaka Y,Zojaji h,et.al.vacA genotypes of helicobacter pylori in relation to cagAstatusand clinical outcomes in Iranian population.Jpn J Infect dis. 2008;61(4):290-3.
17. Icli F, Ak bulut H, Yalcin B, Ozdemir F, Isikdogan A, Hagran M, et al. Education, economic status and other risk factors in gastric cancer a case-control study of Turkish oncology Group Med oncol. 2011; 28(1):112-20.
18. Molaei M, Foroughi F, Mashayekhi R, Haghazali M, zojaji H, Jafari F, et al, cag A status and Vac subtypes of helicobacter pylori in relation to histopathologic findings in iranian population indian & patholmicrobial. 2010; 53(1):24-7.
19. Obayashi N,Ohtsuka Y, Hosoi k, Ikuse T, Jimbo K, aoyagi y,et al. comparison of gene expression between pediatric and adult gastric mucosa with Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2016;21(2):114-23.
20. Abdollahi H, Shokohi M, Savari M. The prevalence of helicobacter pylori babA2,iceA1 and iceA2 genes and their association with clinical outcomes in patients with chronic gastritis, ulcerative diseases and non –ulcer dyspepsia in south east of Iran.jundishapur j Microbiol. 2013;6(4);e4739
21. Graham Dy. Helicobacter pylori update: gastri cancer, yeliable therapy, and possible benefits gastroenterology . 2015;148(4):719-31

22. Baswick EJ, Sua rez G, Reges Ve. H pylori and host interactions that influence pathogenesis world & Gastro enteral. 2006; 21:12(35):5599-605.

23. Vannarath S, Vilaichone RK, Rasachak B, Mairiang P, Yamaoka Y, Shiota S, et al. Virulence genes of Helicobacter pylori in gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in Laos. Asian Pac J Cancer Prev. 2014; 15(20): 9027-31

24. Suriani R, Colozza M, Cardesi E, Mazzucoo VacA helicobacter pylori antibodies in gastric cancer can J Gastro enteral. 2008; 22(3):255-8.

25. Ahmadi E, Amini K, Sadeh M. Prevalence of cagA, cagT, cagE, vacA and hrgA genes in Helicobacter pylori strains isolated from patients with gastric cancer in Karaj city, 2016. Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2018;21(6):562-8.

26. Matteo Mj, Armitano RI, Granadose G Wonaga AD, Sanches C, Olmos M , et al. Helicobacter pylori oipA, VacA and dupA genetic diversity in individual hosts. & med microbial . 2010; 59(1):89-95.

27. Talebi Bazmin Abadi A, Radiei A, Ajami A, Hosseini N, Taghyei T, Jones KR, Merrell DS, Helicobacter pylori homB, But not CagA, Is associated with Gastric cancer in Iran J clin Microbial. 2011; 49(9):3191-7.

28. Anisha S, Saikia L,Gogoi M. Molecular characterisation of virulent gene *vacA* in *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients with gastroduodenal diseases in Assam, India. Official Publication of Indian Association of Medical Microbiologists 2018; 36(2): 178-185.

29. Belda S, Saez J, Santibanez M, Rodriguez JC, Sola-Vera J, Ruiz-Garcia M, et al. Relationship between bacterial load, morbidity and cagA gene in patients infected by Helicobacter pylori. Clin Microbiol Infect. 2012;18(7):E251-3.

30. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (vacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:92.