مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۱۹۷/هفته سوم شهریورماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۳۰ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۵/۴

چندشکلی‌های ژنتیکی vacA و cagA در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران گوارشی در استان چهارمحال و بختیاری

عباسعلی رضاییان[۱]، دکتر محمد کارگر[۲]، نگار صعود[۳]، صادق قربانی دالینی[۳]

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی بیماری‌های مختلف گوارشی می‌باشد. مطالعات نشان داده است که دلایل تنوع پیامدهای عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری ممکن است که با اختلاف در ژنوتیپ یا بیان فاکتورهای بیماری‌زایی وابسته به باکتری و همچنین فاکتورهای محیطی و میزبان مرتبط باشند. هدف از این مطالعه، بررسی انواع ژنوتیپ‌های اصلی بیماری‌زایی cagA و vacA در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران گوارشی بود.

روش‌ها: این مطالعه به صورت مقطعی-توصیفی بر روی ۲۰۰ نمونه‌ی بیوپسی معده انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌های بیوپسی انجام گرفت و به‌وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) وجود ژن ureC و هفت آلل از ژن vacA و ژن cagA تعیین گردید. سپس بررسی‌های آماری برای یافتن ارتباط بین انواع این ژنوتیپ‌ها و بیماری‌های گوارشی صورت گرفت.

یافته‌ها: از ۲۰۰ نمونه‌ی مورد بررسی در ۱۶۴ نمونه (۸۲ درصد) هلیکوباکتر پیلوری شناسایی گردید. در سویه‌های جدا شده، فراوانی ژنوتیپ‌های vacA: s1a/m1a، s1a/m1b، s1a/m2، s1b/m1a، s1b/m1b، s1b/m2، s1c/m1a، s1c/m1b، s1c/m2، s2/m1a، s2/m1b و s2/m2 به ترتیب ۱۶/۶، ۴/۳، ۲۸/۰۴، ۳/۷، ۲/۵، ۶/۱، ۷/۴، ۲/۵، ۱۱، ۳/۷، صفر و ۱۳/۵ درصد بود. همچنین فراوانی ژن cagA ۹۲ درصد بود. نتایج نشان داد که آل‌های مختلف s1/m1 با بیماری‌های گوارشی ارتباط بیشتری دارند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که حضور ژن cagA به همراه آلل vacA s1a می‌تواند با بیماری‌های شدید گوارشی در ارتباط باشد، اما هیچ کدام به‌تنهایی نمی‌توانند مارکری برای بروز بیماری‌ها در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، vacA، cagA، بیماری‌های گوارشی

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی بیماری گاستریت، زخم معده و دوازدهه، سرطان معده، دوازدهه و لنفوم بافت لنفوییدی می‌باشد (۲-۱). چندین عامل حدت برای این باکتری شناسایی شده است که هنوز به درستی ارتباط بین این ژن‌ها و بروز نوع بیماری گوارشی مشخص نیست. این ژن‌ها شامل جزیره‌ی بیماری‌زایی cag (cag PAI) می‌باشد که سیستم ترشحی نوع ۴ را کد می‌کند (۵-۳). ژن cagA در انتهای جزیره‌ی بیماری‌زایی cag واقع شده است و به‌عنوان یک نشانگر برای وجود این جزیره به‌کار می‌رود. به نظر می‌رسد سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن cagA، با بیماری‌های شدید گوارشی ارتباط بیشتری داشته باشند (۷-۶).

یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل حدت هلیکوباکتر پیلوری ژن vacA می‌باشد که موجب آسیب به

[۱] مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، جهرم، ایران
[۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، جهرم، ایران
[۳] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان، جهرم، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد کارگر
Email: mkargar@jia.ac.ir

www.mui.ac.ir

سلول‌های اپی‌تلیال معده می‌شود. ژن vacA به تقریب در تمامی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و حداقل از دو واحد متغیر، ناحیه‌ی سیگنال (S) و ناحیه‌ی میانی (m)، تشکیل شده است (۸). ناحیه‌ی سیگنال به ترتیب شامل دو زیر واحد s1 و s2 و ناحیه‌ی میانی نیز شامل دو زیر واحد m1 و m2 می‌باشد. واحد s1 خود به سه زیر واحد s1a، s1b و s1c و واحد m1 نیز به دو زیر واحد m1a و m1b طبقه‌بندی شده است (۱۰-۹). ساختار موزاییک و ترتیب قرارگیری واحدهای s و m در کنار هم می‌تواند در تولید سیتوتوکسین ترشحی متفاوت و در ایجاد ژنوتیپ‌های مختلف در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نقش داشته باشد. بنابراین تمامی عوامل اشاره شده، با بیماری‌زایی باکتری در ارتباط می‌باشند. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که سویه‌های دارای زیر واحدهای vacA s1/m1 مقدار بالایی از توکسین را ترشح می‌نمایند. این در حالی است که سویه‌های دارای زیر واحدهای vacA s1/m2 میزان متوسط و سویه‌های دارای زیر واحدهای vacA s2/m2 یا مقدار ناچیزی از توکسین را به وجود می‌آورند و یا توکسینی را تولید نمی‌کنند (۱۱، ۸).

در بیشتر مطالعات سویه‌های دارای vacA s1a نسبت به سویه‌های دارای vacA s1b و vacA s2 بیشتر در بیماران دارای زخم‌های گوارشی شناسایی شده‌اند (۱۳-۱۲). البته در برخی از مواقع خلاف این موضوع نیز گزارش شده است (۱۵-۱۴). همچنین سویه‌های دارای آلل m1 نسبت به سویه‌های دارای آلل m2، آسیب‌های بیشتری را به اپی‌تلیال معده وارد می‌کنند (۱۴).

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که شیوع سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در مناطق گوناگون جغرافیایی متفاوت است (۱۵، ۹). برای نمونه، سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای آلل s1a بیشتر در شمال اروپا، آلل s1b در جنوب آمریکا، اسپانیا و پرتقال، آلل‌های s1a و s1b در آمریکا و آلل s1c در شرق آسیا غالب می‌باشند (۹). این تغییرات باعث شیوع انواع مختلف بیماری‌های گوارشی در نقاط متفاوت جغرافیایی می‌شود. از آن جا که اطلاعات در دسترس بیانگر نقش اصلی هلیکوباکتر پیلوری در گسترش بیماری‌های متفاوت گوارشی نیست، بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی هلیکوباکتر پیلوری در استان چهارمحال و بختیاری به عنوان یک منطقه‌ی پر خطر بیماری‌های گوارشی ضروری به نظر می‌رسد.

هدف از این مطالعه، شناسایی ژن cagA و آلل‌های مختلف ژن vacA در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران دچار ناراحتی‌های گوارشی بود. همچنین بررسی ژنوتیپ‌های غالب cagA و vacA در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از این ناحیه مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر روی ۲۰۰ بیمار مراجعه‌کننده به بیمارستان هاجر شهرکرد از بهمن ۱۳۸۹ تا مرداد ۱۳۹۰ پس از کسب موافقت کمیته‌ی اخلاق دانشگاه انجام شد. اطلاعات دموگرافیک بیماران توسط پرسنل بیمارستان جمع‌آوری گردید و نوع بیماری توسط متخصص آندوسکوپی تشخیص داده شد. تمامی بیماران رضایت‌نامه‌ای مبنی بر استفاده از نمونه‌ی بیوپسی معده‌ی خود را امضا کردند. از هر بیمار ۲ نمونه‌ی بیوپسی معده از ناحیه‌ی آنتروم به‌وسیله‌ی آندوسکوپ

www.mui.ac.ir

استریل گرفته شد. یکی از نمونه‌ها بلافاصله توسط تست اوره‌آز سریع (Rapid urease test یا RUT) برای تشخیص سریع هلیکوباکتر پیلوری مورد استفاده قرار گرفت و در صورت مثبت بودن، نمونه‌ی دوم بیمار به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انتقال داده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن ایران) و طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت.

واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر با مقادیر بافر PCR X ۱، ۲۰۰ میکرومول از هر دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر (جدول ۱)، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز Taq و ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری انجام شد.

برنامه‌ی چرخه‌ی حرارتی PCR شامل یک مرحله‌ی دناتوره کردن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۵ چرخه با شرایط زیر انجام شد:

برای ژن ureC، یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۵۰ درجه و دو دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ برای ژن cagA، ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۵۰ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد؛ برای آلل‌های vacA s1a/s1b/s1c/s2 یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۵۷ درجه و دو دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای آلل‌های vacA m1a/m1b/m2 یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۵۹ درجه و ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد.

تکثیر DNA توسط دستگاه ترموسیکلر (اپندرف آلمان) انجام شد. از نمونه‌ی DNA هلیکوباکتر پیلوری سویه‌ی D0008 (Genekam, Germany) به‌عنوان شاهد مثبت و از آب مقطر استریل نیز به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

برای بررسی نتایج حاصل از PCR، از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده گردید. آزمون‌های آماری χ^2 و Fisher's exact برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای آنالیز ژن های ureC، vacA و cagA.

آلل	پرایمر	توالی پرایمر (۳'→۵')	اندازه‌ی محصول (جفت بازی)	محل اتصال
ureC	GlmM1-R GlmM1-F	GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG	۲۹۶	۷۸۰-۱۳۳۸
vacA s1a	vacA s1a-F VA1-R	CTCTCGCTTTAGTAGGAGC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۲۱۳	۸۴۳-۱۰۵۵
vacA s1b	SS3-F VA1-R	AGCGCCATACCGCAAGAG CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۱۸۷	۸۶۹-۱۰۵۵
vacA s1c	vacA s1c-F VA1-R	CTCTCGCTTTAGTGGGGYT CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۲۱۳	۸۴۳-۱۰۵۵
vacA s2	SS2-F VA1-R	GCTAACACGCCAAATGAT CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۱۹۹	۴۳۳-۶۳۱
vacA m1a	VA3-F VA3-R	GGTCAAAATGCGGTCATGG CCATTGGTACCTGTAGAAAC	۲۹۰	۲۷۴۱-۳۰۳۰
vacA m1b	VAm-F3 VAm-R3	GGCCCCAATGCAGTCATGGA GCTGTTAGTGCCTAAAGAAGCAT	۲۹۱	۲۷۴۱-۳۰۳۱
vacA m2	VA4-F VA4-R	GGAGCCCCAGGAAACATTG CATAACTAGCGCCTTGCA	۳۵۲	۹۷۶-۱۳۲۷
cagA	cagA-U cagA-L	GGAATACCAAAAACGCAAAAACCA CCCCACAATACACCAGCAAAACT	۲۷۸	۴۱۶۸-۴۴۴۵

www.mui.ac.ir

یافته‌ها

با استفاده از تست‌های اوره‌آز سریع و PCR، از مجموع ۲۰۰ نمونه بیوپسی معده‌ی مورد بررسی، در ۱۶۴ نمونه (۸۲ درصد) هلیکوباکتر پیلوری شناسایی شد که از این تعداد ۷۹ نفر مرد (۴۸/۱۷ درصد) و ۸۵ نفر زن (۵۱/۸۳ درصد) و با میانگین گروه سنی ۴۷ سال (بین ۱۵ تا ۸۸ سال) بودند. به علاوه اطلاعات تکمیلی و صورت گرفته در ارتباط با نوع بیماری و ارتباط آن با ژن‌های مورد بررسی نشان داد که در میان جمعیت مورد مطالعه، ۱۶ بیمار (۹/۷۶ درصد) مبتلا به زخم معده، ۲۲ بیمار (۱۳/۴۱ درصد) مبتلا به زخم دوازدهه، ۳ بیمار (۱/۸۳ درصد) سرطان معده، ۱۴۸ بیمار (۹۰/۲۴ درصد) مبتلا به گاستریت، ۳ بیمار (۱/۸۳ درصد) مبتلا به دئودنیت، ۳۴ بیمار (۲۰/۷۳ درصد) مبتلا به ندولاریتی معده و ۴۹ بیمار (۲۹/۸۸ درصد) نیز مبتلا به اروزیون معده بودند.

با ارزیابی آلل‌های S و m ژن vacA مشخص شد که ۶۳ نمونه (۳۸/۴۱ درصد) ژنوتیپ vacA s1/m1، ۷۳ نمونه (۴۴/۵۱ درصد) ژنوتیپ s1/m2، ۲۲ نمونه (۱۳/۴۱ درصد) ژنوتیپ s2/m2 و ۶ نمونه (۳/۶۶ درصد) ژنوتیپ s2/m1 را داشتند. از ۱۶۴ سویه‌ی هلیکوباکتر پیلوری ۱۳۵ سویه (۸۲/۳۲ درصد) آلل s1، ۷۹ نمونه (۴۸/۱۷ درصد) آلل s1a، ۲۱ نمونه (۱۲/۸۰ درصد) آلل s1b و ۳۵ نمونه (۲۱/۳۴ درصد) آلل s1c را داشتند. از بین سویه های یاد شده، ۲۹ نمونه (۱۷/۶۸ درصد) نیز آلل s2 را دارا بودند. همچنین فراوانی آلل‌های m1a، m1b و m2 به ترتیب ۳۱/۷، ۹/۱۴ و ۵۸/۵ درصد بود.

آنالیزهای آماری نشان داد که بین بیماری زخم دوازدهه و ژنوتیپ‌های s1a/m1a، s1a/m2 و s2/m2 ارتباط معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب P = ۰/۰۴، P = ۰/۰۲ و P = ۰/۰۵). همچنین بین بیماری ندولاریتی معده با ژنوتیپ s1c/m1a (P = ۰/۰۳)، بیماری اریتم معده با ژنوتیپ s1c/m1a (P = ۰/۰۱) و

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپ‌های ژن vacA و انواع بیماری‌های گوارشی.

ژنوتیپ	vacA	بیماری‌های گوارشی						
	جمع تعداد (درصد)	زخم معده تعداد (درصد)	زخم دوازدهه تعداد (درصد)	سرطان معده تعداد (درصد)	گاستریت تعداد (درصد)	دئودنیت تعداد (درصد)	ندولاریتی تعداد (درصد)	اروزیون معده تعداد (درصد)
s1a/m1a	۲۷ (۱۶/۴۶)	۱ (۰/۶۱)	۴ (۲/۴۴)	۱ (۰/۶۱)	۲۷ (۱۶/۴۶)	۰ (۰)	۶ (۳/۶۶)	۳ (۱/۸۳)
s1a/m1b	۸ (۴/۸۸)	۲ (۱/۲۲)	۲ (۱/۲۲)	۰ (۰)	۷ (۴/۲۷)	۰ (۰)	۲ (۱/۲۲)	۲ (۱/۲۲)
s1a/m2	۴۵ (۲۷/۴۴)	۶ (۳/۶۶)	۲ (۱/۲۲)	۰ (۰)	۴۱ (۲۵)	۱ (۰/۶۱)	۱۱ (۶/۷۱)	۱۳ (۷/۹۳)
s1b/m1a	۷ (۴/۲۷)	۲ (۱/۲۲)	۲ (۱/۲۲)	۰ (۰)	۶ (۳/۶۶)	۰ (۰)	۰ (۰)	۳ (۱/۸۳)
s1b/m1b	۵ (۳/۰۵)	۰ (۰)	۱ (۰/۶۱)	۰ (۰)	۴ (۲/۴۴)	۰ (۰)	۰ (۰)	۳ (۱/۸۳)
s1b/m2	۱۰ (۶/۱۰)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۳ (۱/۸۳)	۳ (۱/۸۳)
s1c/m1a	۱۲ (۷/۳۲)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۰ (۰)	۱۲ (۷/۳۲)	۰ (۰)	۰ (۰)	۳ (۱/۸۳)
s1c/m1b	۴ (۲/۴۴)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۰ (۰)	۴ (۲/۴۴)	۰ (۰)	۰ (۰)	۱ (۰/۶۱)
s1c/m2	۱۸ (۱۰/۹۷)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۰ (۰)	۱۸ (۱۰/۹۷)	۰ (۰)	۴ (۲/۴۴)	۸ (۴/۸۸)
s2/m1a	۶ (۳/۶۶)	۰ (۰)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)	۶ (۳/۶۶)	۰ (۰)	۱ (۰/۶۱)	۱ (۰/۶۱)
s2/m1b	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
s2/m2	۲۲ (۱۳/۴۱)	۱ (۰/۶۱)	۶ (۳/۶۶)	۰ (۰)	۲۲ (۱۳/۴۱)	۱ (۰/۶۱)	۷ (۴/۲۷)	۹ (۵/۴۹)

www.mui.ac.ir

بیماری اروزیون معده با ژنوتیپ s1a/m1a (P = ۰/۰۱) ارتباط معنی‌داری وجود داشت؛ اما بین بیماری زخم معده، سرطان معده، دئودنیت و گاستریت معده با ژنوتیپ‌های مختلف vacA ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲).

از مجموع سویه‌های شناسایی شده‌ی هلیکوباکتر پیلوری، در ۱۵۱ نمونه (۹۲/۰۷ درصد) ژن cagA وجود داشت. از ۱۲۸ نمونه‌ی دارای آلل vacA S1 در ۷۸/۰۴ درصد، ژن cagA نیز وجود داشت، اما تنها در ۲۳ سویه‌ی (۱۴/۰۲ درصد) دارای ژنوتیپ vacA s2، ژن cagA وجود داشت. این مسأله نشان‌دهنده‌ی ارتباط ژن cagA با vacA s1 بود (P = ۰/۰۰۴). در کل ۹۵/۵ درصد از سویه‌های دارای ژنوتیپ s1/m2، ژن cagA نیز داشتند، اما بین حضور ژن cagA و علایم بالینی بیماران مورد بررسی ارتباط معنی‌داری شناسایی نشد (جدول ۳).

جدول ۳. فراوانی حضور ژن cagA در افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری در انواع بیماری‌های گوارشی

بیماری‌های گوارشی	cagA مثبت تعداد (درصد)	cagA منفی تعداد (درصد)
زخم معده	۱۴ (۸/۵۴)	۲ (۲/۴۴)
زخم دوازدهه	۲۰ (۱۲/۱۹)	۲ (۲/۴۴)
سرطان معده	۲ (۲/۴۴)	۱ (۰/۶۱)
گاستریت	۱۴۷ (۸۹/۶۳)	۱۲ (۷/۳۲)
دئودنیت	۳ (۱/۸۳)	۰ (۰)
ندولاریتی	۲۸ (۱۷/۰۷)	۶ (۳/۶۶)
اروزیون معده	۵۱ (۳۱/۱۰)	۱ (۰/۶۱)

بحث

عفونت هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین بیماری باکتریایی معده‌ای- روده‌ای در سراسر جهان است که می‌تواند باعث ایجاد انواع مختلف بیماری‌های گوارشی در بیماران گردد. پراکندگی جغرافیایی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری و شیوع ژنوتیپ‌های مختلف این باکتری در افراد مختلف تاکنون ناشناخته باقی‌مانده است (۱۶).

ژنوتیپ‌های vacA در نواحی جغرافیایی گوناگون متفاوت می‌باشند (۱۷). نتایج ما در این پژوهش نشان داد که ۸۰ درصد از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری ژنوتیپ vacA s1a,s1b,s1c/m2 را دارند و سویه‌ی غالب در منطقه‌ی مورد پژوهش ژنوتیپ vacA s1a/m2 را داشت. این نتایج با یافته‌های به‌دست آمده از اروپا و شمال آمریکا که در آن‌ها نیز ژنوتیپ غالب vacA s1a,s1b/m2 گزارش شده است، هم‌خوانی دارد. اما در کشورهای یاد شده ژنوتیپ vacA s1c به‌ندرت شناسایی شده است. همچنین یافته‌های ما با کشورهای جنوب غربی آسیا که ژنوتیپ غالب آن‌ها vacA s1c است نیز شباهت داشت (۱۸).

مطالعات ما نشان داد که سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در ایران بسیار متنوع هستند و از آن جا که ایران در منطقه‌ی خاورمیانه واقع شده است، دارای ترکیبی از سویه‌های غربی و شرقی می‌باشد.

سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای ژن cagA، نسبت به سویه‌های فاقد این ژن بیماری‌زایی بیشتری دارند (۶). شیوع سویه‌های دارای ژن cagA نیز در نواحی جغرافیایی گوناگون متفاوت است. به عنوان نمونه فراوانی این سویه‌ها در کره ۹۷ درصد، در مالزی ۹۴ درصد، در چین ۹۰ درصد، در ترکیه ۷۸ درصد و در کویت ۵۳ درصد گزارش شده است (۱۹). در این پژوهش، ژن cagA در ۹۲ درصد از سوش‌ها شناسایی شد. با توجه به شیوع قابل توجه این ژن، نمی‌توان از آن به‌عنوان یک نشانگر ارزیابی بیماری‌زایی سویه‌های

www.mui.ac.ir

باکتری استفاده نمود. این یافته‌ی ما با گزارش‌های کشورهای آسیای شرقی مطابقت داشت.

همچنین ارتباط مستقیمی بین ژن‌های cagA و vacA و انواع زخم‌های گوارشی گزارش شده است (۲۰). بر اساس گزارش Beil و همکاران، مکانیسم احتمالی که سبب افزایش خطر ابتلای به زخم معده در بین بیماران مبتلا به سوش‌های $cagA^+$ می‌شود، اثر محدودکنندگی این سویه‌ها بر روی ساخت موسین معده می‌باشد (۱۸). Gzyl و همکاران نشان دادند که ژن cagA ارتباط مستقیمی با بروز بیماری گاستریت حاد معده در بین کودکان و بزرگسالان دارد. به علاوه مطالعات آن‌ها نشان داد که اغلب سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای ژنوتیپ vacA s1/m2، میزان بالاتری از سیتوتوکسین را تولید می‌کنند (۹). مشاهدات ما نیز با گزارش‌های Beil و همکاران (۱۸) و Gzyl و همکاران (۹) مطابقت دارد و به نظر می‌رسد که سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری $cagA^+$ دارای آلل vacA s1، ارتباط بیشتری با بیماری‌های گوارشی شدیدتر دارند.

نتایج گزارش شده توسط محققان ایرانی در مورد ارتباط بین ژنوتیپ‌های vacA و بیماری‌های گوارشی متفاوت است. به عنوان نمونه، پژوهش‌های جعفری و همکاران در تهران نشان داد که بین ژن vacA و بیماری‌های گوارشی ارتباطی وجود ندارد (۶)، اما مولایی و همکاران (۱۶) و محمدی و همکاران (۲۱) ارتباط مستقیمی را بین s1a و التهابات گوارشی گزارش نمودند. در کشورهای تایلند، ژاپن، کره، کلمبیا و آمریکا بین ژنوتیپ‌های vacA و بیماری‌های گوارشی هیچ ارتباطی گزارش نشده است (۲۲)؛ اما در کشورهای کوبا، لبنان، هنگ کنگ، انگلیس و کشورهای اروپایی ارتباط معنی‌داری بین آلل s1 و بیماری زخم معده (Peptic ulcer disease یا PUD) گزارش شده است (۲۶-۲۳). نتایج ما در این پژوهش نشان داد که بین چند ژنوتیپ و چند بیماری گوارشی ارتباط قابل ملاحظه‌ای وجود دارد، اما هنوز به‌درستی نمی‌توان آلل یا ژنوتیپ خاصی را به‌عنوان شاخص بیماری‌ها معرفی کرد. در برخی از پژوهش‌ها نشان داده شده است که سویه‌های دارای ژنوتیپ vacA s1/m2 غیربیماری‌زا هستند، اما در برخی دیگر ارتباط زیادی بین این ژنوتیپ و بیماری‌هایی مانند بیماری‌های غیر زخمی گزارش شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بین این ژنوتیپ و بیماری زخم دوازدهه افراد مورد پژوهش ارتباط قابل توجهی وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که غالب‌ترین ژنوتایپ هلیکوباکتر پیلوری در منطقه‌ی مورد پژوهش vacA s1/m2 و $cagA^+$ می‌باشند. همچنین نتایج نشان داد که احتمال دارد ژن cagA به‌تنهایی با بیماری‌های گوارشی شدید رابطه‌ی نزدیک نداشته باشد، اما سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری دارای vacA s1 در بیماران دارای بیماری‌های شدید گوارشی بیشتر وجود دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که ماهیت بیماری بیشتر مرتبط با عوامل میزبانی، محیطی و باکتریایی باشد. با توجه به پیچیدگی ماهیت بیماری‌های ناشی از هلیکوباکتر پیلوری، ضرورت شناسایی عوامل حدت جدیدتر و پایش گسترده‌تر آن‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج طرح پژوهشی مصوب

www.mui.ac.ir

دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم با شماره‌ی ۲۱۱ می‌باشد. نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های مالی و همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت‌های اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Ahmad T, Sohail K, Rizwan M, Mukhtar M, Bilal R, Khanum A. Prevalence of Helicobacter pylori pathogenicity-associated cagA and vacA genotypes among Pakistani dyspeptic patients. FEMS Immunol Med Microbiol 2009; 55(1): 34-8.
2. Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Souod N. Real-time PCR assay using allele-specific TaqMan probe for detection of clarithromycin resistance and its point mutations in Helicobacter pylori. Journal of Isfahan Medical School 2011; 29(126): 65-73.
3. Iamaroon A, Chaimano S, Linpisarn S, Pongsiriwet S, Phornphutkul K. Detection of Helicobacter pylori in recurrent aphthous ulceration by nested PCR. J Oral Sci 2003; 45(2): 107-10.
4. Peach HG, Pearce DC, Farish SJ. Helicobacter pylori infection in an Australian regional city: prevalence and risk factors. Med J Aust 1997; 167(6): 310-3.
5. Kargar M, Souod N, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Rezaeian AA. Evaluation of cagA tyrosine phosphorylation DNA motifs in Helicobacter pylori isolates from gastric disorder patients in West of Iran. Sci Res Essays 2011; 6(31): 6454-8.
6. 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(4): 290-3.
7. Li C, Ha T, Ferguson DA, Jr., Chi DS, Zhao R, Patel NR, et al. A newly developed PCR assay of H. pylori in gastric biopsy, saliva, and feces. Evidence of high prevalence of H. pylori in saliva supports oral transmission. Dig Dis Sci 1996; 41(11): 2142-9.
8. Oshowo A, Gillam D, Botha A, Tunio M, Holton J, Boulos P, et al. Helicobacter pylori: the mouth, stomach, and gut axis. Ann Periodontol 1998; 3(1): 276-80.
9. Gzyl A, Berg DE, Dzierzanowska D. Epidemiology of cagA/vacA genes in H. pylori isolated from children and adults in Poland. J Physiol Pharmacol 1997; 48(3): 333-43.
10. Blaser MJ. Heterogeneity of Helicobacter pylori. Eur J Gastroenterol Hepatol 1997; 9(Suppl 1): S3-S6.
11. Kargar M, Souod N, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Prevalence of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin A gene as apredictive marker for different gastrodoudenal diseases. Iran J Clin Infect Dis 2011; 6(2): 85-9.
12. Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, Bebear CM, Lamouliatte H, Megraud F. Macrolide resistance in Helicobacter pylori: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41(12): 2724-8.
13. Enroth H, Bjorkholm B, Engstrand L. Occurence of resistance mutation and clonal expansion in Helicobacter pylori multiple-strain infection: a potential risk in clarithromycin-based therapy. Clin Infect Dis 1999; 28(6): 1305-7.
14. Li C, Ha T, Chi DS, Ferguson DA, Jr., Jiang C, Laffan JJ, et al. Differentiation of Helicobacter pylori strains directly from gastric biopsy specimens by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis without culture. J Clin Microbiol 1997; 35(12): 3021-5.
15. Jiang C, Li C, Chi DS, Ferguson DA, Ha T, Laffan JJ, et al. Combination of single- and double-stranded conformational polymorphism for direct discrimination of gastric Helicobacter pylori. J Microbiol Methods 1998; 34(1): 1-8.
16. Molaei M, Foroughi F, Mashayekhi R, Haghazali M, Zojaji H, Jafari F, et al. CagA status and VacA subtypes of Helicobacter pylori in relation to histopathologic findings in Iranian population. Indian J Pathol Microbiol 2010; 53(1): 24-7.
17. Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, et al. Distinct diversity of vacA, cagA, and cagE genes of Helicobacter pylori associated with peptic ulcer in Japan. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3906-16.
18. Beil W, Enss ML, Muller S, Obst B, Sewing KF, Wagner S. Role of vacA and cagA in Helicobacter pylori inhibition of mucin synthesis in gastric mucous cells. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2215-8.
19. Nahaei M, Sharifi Y, Taghi Akhi M, Ashghaezade M, Nahayei M, Fatahi E. Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes and their relationship to peptic ulcer disease and non ulcer dysplasia. Rese J Microbiol 2008; 3(5): 386-94.
20. Wong BC, Yin Y, Berg DE, Xia HH, Zhang JZ, Wang WH, et al. Distribution of distinct vacA, cagA and iceA alleles in Helicobacter pylori in

www.mui.ac.ir

Hong Kong. Helicobacter 2001; 6(4): 317-24.
21. Mohammadi M, Oghalaie A, Mohajerani N, Massarrat S, Nasiri M, Bennedsen M, et al. 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.
22. Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon AT, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of cagA and vacA genotypes in Helicobacter pylori gastritis. J Clin Pathol 1998; 51(1): 55-61.
23. Torres LE, Melian K, Moreno A, Alonso J, Sabatier CA, Hernandez M, et al. Prevalence of vacA, cagA and babA2 genes in Cuban Helicobacter pylori isolates. World J Gastroenterol 2009; 15(2): 204-10.
24. Khayat A, Soweid A, Kattar M, Tahwil A, El 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. J Infect Developing Countries 2007; 1(1): 55-61.
25. Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA, Jr., Litchfield P, et al. Comparison of cytotoxin genotypes of Helicobacter pylori in stomach and saliva. Dig Dis Sci 2002; 47(8): 1850-6.
26. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2274-9.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 197, 3rd week, September 2012 Received: 19.5.2012 Accepted: 25.7.2012

Genetic Polymorphisms of *CagA* and *VacA* Genes in *Helicobacter Pylori* Isolates from Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran

Abbas Ali Rezaeian MSc[1], Mohammad Kargar PhD[2], Negar Souod MSc[3], Sadegh Ghorbani Dalini MSc[3]

Abstract

Background: *Helicobacter pylori* is the main cause of various gastroduodenal diseases. The consequences of *H. pylori* infection may be related to differences in genotype or expression of virulence factors of bacteria as well as host and environmental factors. The aim of this study was to assess *cagA/vacA* genotypes of *H. pylori* strains isolated from patients with gastric disorder.

Methods: In this cross-sectional study, gastric biopsy specimens were taken from 200 patients with gastroduodenal diseases. The specimens were processed for DNA extraction. The presence of *ureC*, *vacA* subtypes, and *cagA* genes were tested by polymerase chain reaction (PCR). Statistical analyses were performed to investigate the relationships between genotypes and gastric disorders.

Findings: Overall, 164 *H. pylori* strains were isolated from 200 specimens. The frequency of the *vacA* alleles, *sa1/m1a*, *s1a/m1b*, *s1a/m2*, *s1b/m1a*, *s1b/m1b*, *s1b/m2*, *s1c/m1a*, *s1c/m1b*, *s1c/m2*, *s2/m1a*, *s2/m1b,* and *s2/m2* were 16.60%, 4.30%, 28.04%, 3.70%, 2.50%, 6.10%, 7.40%, 2.50%, 11.00%, 3.70%, 0%, and 13.50%, respectively. The prevalence of *cagA* gene was 92%. Different alleles of *s1*/*m1* had the strongest relationship with gastric disorders.

Conclusion: Based on our findings, it seems that the presence of *cagA* gene with *vacA s1* genotypes is associated with severe gastric disorders. However, none of studied variables can be considered as an independent marker for the onset of disease.

Keywords: *Helicobacter pylori*, *VacA*, *CagA*, Gastrointestinal diseases

[1] Lecturer, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2] Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3] Department of Microbiology, Young Researchers Club, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
Corresponding Author: Mohammad Kargar PhD, Email: mkargar@jia.ac.ir