تشخیص وجود هلیکوباکترپیلوری و شاخص‌های بیماریزایی آن از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

نویسندگان: دکتر مرجان محمدی[1]*، نازنین مهاجرانی[1]، اکبر عقلایی[1]، دکتر صادق مسرت[2]، دکتر محسن نصیری[3]، دکتر لایف اندرسون[4]

۱ - بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
۲ - بخش گوارش، بیمارستان شریعتی تهران
۳ - بخش اندوسکوپی بیمارستان امام خمینی
۴ - بخش میکروبیولوژی پزشکی دانشگاه دانمارک

چکیده:

هلیکوباکترپیلوری (Hp) یک عامل بیماریزای معدی است که نیمی از جمعیت جهان را آلوده می‌کند و موجب ایجاد گاستریت آنتر معده و زخم‌های گوارشی می‌شود. آلودگی به Hp همچنین موجب افزایش خطر ابتلاء به بدخیمی‌های معدی می‌گردد. شیوع بالای عفونت Hp به خصوص در کشورهای در حال توسعه موجب شده است که دانشمندان در پی تعیین شاخص‌های بیماریزایی باشند که توأم با عوارض شدیدتر بیماری از جمله زخم‌های معده و سرطان هستند.

در طی این رویکرد تحقیقاتی سیتوتوکسین و محصولات وابسته به آن (cagA) شناسایی شدند. شیوع عفونت Hp در ایران، به ۹۰٪ می‌رسد در حالی که درصد کمی از این افراد از سوءهاضمه (دیس‌پپسی) شکایت دارند.

به منظور تعیین میزان شیوع شاخص cagA در سوش‌های ایرانی، سوش‌های جدا شده از بیماران ایرانی تحت بررسی ژنوتیپی به وسیله PCR قرار گرفتند.

نتیجه این مطالعه نشان داد که:

۱- سوش‌های Hp ایرانی از نظر ژنتیکی با سوش‌های غربی تفاوت بارزی دارند.

۲- میزان شیوع ژن cagA بسته به نوع آغازگر (پرایمر) مورد استفاده، تفاوت می‌کند.

۳- شیوع ژن cagA در سوش‌های Hp ایرانی ارتباط معنی‌داری با زخم‌های گوارشی ندارد.

Detection of *Helicobacter pylori* and its virulence markers by polymerase chain reaction

M. Mohammadi[1], N. Mohajerani[1], A. Oghalaie[1], S. Massarrat[2], M. Nasiri[3], and L. Andersen[4]

1 - Biotechnology Department, Pasteur Institute Of Iran.
2 - Shariati Hospital, Tehran, Iran
3 - Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran
4 - National University of Denmark, Copenhagen, Denmark

Helicobacter pylori is a gastric pathogen which infects half the world population and causes antral gastritis, duodenal ulcers and enhances the risk of gastric malignancies. The high prevalence of *H. pylori* infection particularly in the developing countries has prompted scientists in the field to look for specific virulence markers which may be associated with more severe *H. pylori*-induced gastrointestinal disorders including duodenal ulcers and gastric cancer. Along this line of investigation, the *Helicobacter pylori* cytotoxin and its associated gene product have been identified as having close correlation with severity of disease. The rate of *H. pylori* infection in Iran approaches 90% of the population but a small percentage of these subjects manifest dyspepsia. In order to determine the frequency of these potential virulence markers in the Iranian *H. pylori* strains, we have isolated *H. pylori* from dyspeptic patients and performed genotyping by polymerase chain reaction. The results of this study demonstrate that: 1) Iranian *H. pylori* strains are genotypically different from Western strains. 2) Frequency of cytotoxin associated gene product (cagA) vary depending on the use of primer sets reported in the literature. 3) Prevalence of cagA in Iranian *H. pylori* strains does not correlate with peptic ulcer disease.

مقدمه:

تعداد بسیار زیادی از جمعیت جهان آلوده به Hp هستند. Hp یک عامل مسبب گاستریت آنتر معده[۱۷] است و هم چنین موجب گرفتاری‌های شدیدی مثل زخم پپتیک[۱] و بد خیمی‌های معدی[۴] می‌شود.

عفونت Hp در صورتی که درمان نشود مدت‌های طولانی در معده باقی می‌ماند. شیوع بالای این عفونت در سطح جهان موجب شده است که دانشمندان شاخص‌های بیماریزائی را که با عوارض شدیدتر گوارشی همراه هستند مورد شناسایی قرار دهند. در این راستا نشان داده شد که پنجاه درصد سوش‌های Hp[۷] سیتوتوکسینی را تولید می‌کنند که موجب واکوئولیزه شدن سلول‌های مخاطی معده می‌شود[۶، ۱۱، ۱۵] و به همین دلیل vacA نامیده شد. یک پروتئین ۱۲۰ kd که همزمان با vacA بیان می‌شود و به این دلیل پروتئین مرتبط با سیتوتوکسین نامیده شد. (cytotoxin associated gene product A, cagA)

آنتی‌بادی علیه پروتئین cagA در اکثر بیماران مبتلا به زخم دوازدهه یافت می‌شود[۸]. از زمان کشف این پروتئین و تعیین ارتباط آن با بیماران مطالعات وسیعی جهت جدا کردن، شناسایی و بررسی ژن‌های تولیدکننده cagA[۵] و vacA[۲ و ۳] صورت گرفته است.

نتایج بررسی این ژن‌ها در جوامع مختلف متغیر بوده است[۱۶،۲۱و۲۲]. Yamaoka و همکاران[۲۶] با تکثیر ناحیه '۳ ژن cagA توسط PCR، نشان دادند که حداقل چهار زیرگونه cagA در سوش‌های ژاپنی وجود دارند که با سوش‌های غربی تفاوت می‌کنند. همچنین نشان دادند که زیرگونه‌های مختلف cagA با بیماری‌های مختلف ناشی از Hp مرتبط هستند.

از طرف دیگر Figura و همکاران[۱۰] نشان دادند که سوش‌های دارای cagA و بدون آن همزمان افراد مبتلا به زخم پپتیک را آلوده می‌کنند. در یک مطالعهٔ موازی در بیماران برزیلی و بیماران آمریکایی (هیوستن) نشان داده شد که در بیماران برزیلی cagA ارتباط مستقیم با بیماری دارد ولی در بیماران آمریکایی چنین ارتباطی مشاهده نشد[۹].

با این وجود یک مطالعه مشابه[۲۴] در دو گروه بیماران آلمانی و پرتغالی ارتباط تنگاتنگی بین وجود ژن cagA و زخم پپتیک و سرطان معده دیده شد. در مطالعات دیگر ارتباط مستقیمی بین میزان سوش‌های حاوی cagA در دوازدهه و پیدایش زخم دوازدهه دیده شد[۱۴]. از طرف دیگر در یک مطالعه چندملیتی[۲۰] نشان داده شد که سوش‌های حاوی cagA در جوامع مختلف توزیع متفاوتی دارند. مطالعه گروه Eurogast نشان داد که توزیع میان cagA با شیوع سرطان در جوامع مختلف همخوانی ندارد[۲۵]. نتایج متفاوتی که از غربالگرهای سوش‌های Hp جهت ارزیابی ژن cagA به عنوان یک شاخص بیماریزایی در جوامع مختلف به دست آمد بیانگر وجود یک ناهمگونی وسیع در سوش‌های Hp جوامع مختلف بود[۱۲،۱۳و۱۸]. لذا جهت ارزیابی یک فاکتور بیماریزایی در یک جامعه نیاز است که رابطهٔ آن شاخص با بیماریزایی در همان جامعه مورد بررسی قرار گیرد.

لذا در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای (پرایمرهای) متعدد ژن cagA در سوش‌های Hp جدا شده از بیماران گوارشی از طریق PCR ارزیابی شد و ارتباط آن به بیماری حاصله مورد بررسی قرار گرفت.

جدول - میزان شیوع ژن cagA در سوش‌های مختلف Hp با استفاده از آغازگرها و ارتباط آن با زخم گوارشی

Primers	NUD n = 144	PUD n = 46	Total	P value
cagA-350	75%	67%	73%	0.67
cagA-570	24%	35%	31%	0.07

گاستریت بدون زخم = NonUlcer Dyspepsia (NUD)

زخم گوارشی = Peptic Ulcer Dyspepsia (PUD)

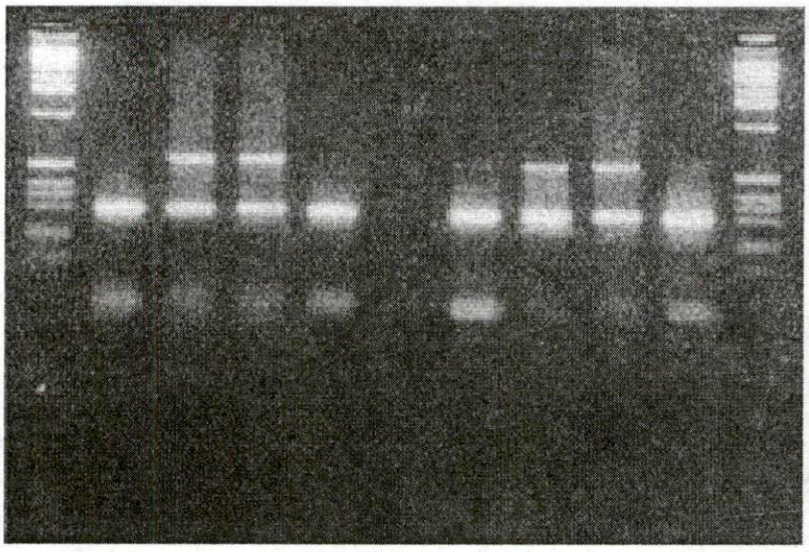
روش‌ها

بیماران گوارشی که به واحدهای اندوسکوپی بیمارستان شریعتی و بیمارستان امام خمینی ارجاع شده بودند در این مطالعه لحاظ شدند. بیماران در بدو ورود مورد مصاحبه قرار گرفتند و اطلاعات به دست آمده در پرسشنامه وارد شد. تشخیص بالینی بیماری توسط متخصصان گوارش در حین اندوسکوپی صورت گرفت. بیماران در دو گروه دارای زخم گوارشی PUD و گاستریت بدون زخم NUD طبقه‌بندی شدند.

نمونه‌های بیوپسی معده در محلول انتقال اوره‌آز قرار گرفتند و به بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور تهران منتقل شدند. آلودگی به Hp با روش‌های مختلف اوره‌آز، کشت و بافت‌شناسی تشخیص داده و تأیید شد.

نمونه‌های مورد نظر در محیط آگار خونی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد توأم با ۷٪ CO2 به مدت ۳ الی ۵ روز کشت داده شد. وجود Hp در ظروف کشت با آزمایش‌های اوره‌آز، اکسیداز و کاتالاز مورد تأیید قرار گرفت. سوش‌های جدا شده Hp توسط کیت Qiagene مورد تخلیص DNA ژنومی قرار گرفت. DNA تخلیص شده توسط آغازگرهای اختصاصی ژن‌های محافظت شده Hp (ژن‌های hspA و ureC) مورد تکثیر از طریق PCR قرار گرفتند و هویت آنها به عنوان Hp از طریق ملکولی تأیید شد. جهت تکثیر ژن

شناسایی ژن cagA به همراه ژن UreC در Multiplex PCR



ردیف‌های ۳، ۴، ۸ و ۹ = سوش‌های حاوی ژن cagA

ردیف‌های ۲، ۵ و ۷ = سوش‌های فاقد ژن cagA

ردیف ۶ = کنترل منفی

ردیف ۱ و ۱۱ = مارکر DNA

cagA از دو جفت آغازگر اختصاصی نواحی مختلف این ژن استفاده شد[۱۹،۲۳]. نتایج PCR بر روی ژل آگارز و از طریق الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی ارتباط بین وجود ژن cagA و بیماری توسط روش regression و نرم‌افزار Statview انجام گرفت. عدد P کمتر از ۰/۵ به عنوان پاسخ آماری معنی‌دار و قابل قبول در نظر گرفته شد.

بحث و نتایج:

سوش‌های Hp حاصله از بیماران گوارشی با روش‌های معمول میکروبیولوژی مورد شناسایی قرار گرفتند و هویت آنها تأیید شد. علاوه بر این DNA ژنومی استخراج یافته از این سوش‌ها توسط تکثیر ژن‌های محافظت شده hspA و UreC نیز مورد تأیید قرار گرفت.

ژن cagA توسط دو جفت آغازگر مورد بررسی قرار گرفت. جفت آغازگری که توسط Peek[۱۸] و همکاران گزارش شده بود موجب شد که ۷۳٪ سوش‌های Hp ایرانی تحت PCR مورد تکثیر این ژن قرار گیرند در حالی که جفت آغازگری که توسط Vander Ende[۲۳] و همکاران گزارش شده بود موجب تکثیر تنها ۳۱٪ از سوش‌های Hp مورد مطالعه برای ژن cagA شد.

اندازه قطعه مورد تکثیر در ژن cagA تناسب معکوسی با میزان تکثیر سوش‌های Hp نشان داد. علاوه بر این در هر دو مورد هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین تکثیر ژن cagA و وجود زخم گوارشی در بیماران مشاهده نشد $P > ۰/۰۵$.

مطالعات متعدد با استفاده از آغازگرهای مختلف برای تعیین وجود ارتباط بین ژن cagA و شدت علائم گوارشی با وجود زخم‌های گوارشی و یا سرطان معده به نتایج بسیار ضد و نقیض رسیده‌اند و در بسیاری از مطالعات ارتباطی بین این دو پدیده مشاهده نشده است. ناهمگونی وسیع در میان سوش‌های مختلف Hp به خوبی شناخته نشده است. مطلب جالب توجه این است که در عموم مطالعات یک قطعه از ژن cagA توسط PCR و با استفاده از تنها یک جفت آغازگر مورد تکثیر و بحث و بررسی قرار گرفته است. اما در این مطالعه استفاده از دو جفت آغازگر که قطعات مختلفی از ژن cagA را تکثیر می‌کنند موجب پیدایش تواترهای بسیار متفاوت از لحاظ وجود ژن cagA در سوش‌های Hp ایرانی شده است. علاوه بر این در هر دو مورد ارتباط میان وجود ژن cagA و زخم گوارشی مشاهده نشد.

لذا از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت:

۱ – جهت بررسی ژن cagA و ارزیابی آن به عنوان یک شاخص بیماریزایی بایستی قطعات مختلف این ژن را مورد تکثیر و بررسی قرار داد.

۲ – تفاوت فاحش بین دو قطعه از یک ژن نمایانگر ناهمگونی فاحش بین سوش‌های Hp ایرانی و سوش‌های غربی می‌باشد.

۳ – پیرو مشاهدات کشورهای در حال توسعه، در ایران نیز ژن cagA را نمی‌توان به عنوان شاخص بیماریزایی و عامل غربالگری بیماران گوارشی قرار داد.

در کشوری چون ایران که میزان شیوع Hp به مرز ۹۰٪ جمعیت می‌رسد تعیین شاخص‌های بیماریزایی که بتوان در غربالگری بیماران گوارشی و تعیین پیش‌آگهی آنها به کار برد قطعاً مورد نیاز است. اما تنها گزارش‌های جوامع غربی و معرفی یک شاخص به عنوان شاخص بیماریزایی کافی نیست و قطعاً باید سوش‌های بومی این مشاهدات را تأیید کنند تا بتوان در ارزیابی کلینیکی از آنها استفاده کرد.

* - Correspondence: Dr. Marjan Mohammadi, Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran. Tel: 6480780, Fax: 6465132, E-mail: marjan@institute.pasteur.ac.ir

References

1. Ateshkadi, A. et al. 1993. Helicobacter pylori and peptic ulcer disease. Clinical Pharmacy. 12:34-40.
2. Atherton, J. et al. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori. Gastroenterology. 112:92-99.
3. Atherton, J. et al. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. The Journal of Biological Chemistry. 270:17771-17777.
4. Clarkson, K. S., and K. P. West. 1993. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. Journal of Clinical Pathology. 46:997-999.
5. Covacci, A. et al. 1993. Molecular characterization of the 120 kDa immunodominant antigen of Helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proceedings of the National Academy of Sciences, U. S. A. 90:5791-5795.
6. Cover, T. L. et al. 1993. Correlation between vacuolating cytotoxin production by Helicobacter pylori isolates in vitro and in vivo. Infection and Immunity. 61:5008-5012.
7. Cover, T. L. et al. 1990. Characterization of and human serologic response to proteins in Helicobacter pylori broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect. Immun. 58:603-610.
8. Crabtree, J. et al. 1991. Mucosal IgA recognition of Helicobacter pylori 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. The Lancet. 338:332-335.
9. Evans, D. et al. 1998. Helicobacter pylori cagA status and s and m alleles of vacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori-associated gastric diseases. Journal of

Clinical Microbiology. 36:3435-3437.

10. Figura, N. et al. 1998. cagA positive and negative Helicobacter pylori strains are simultaneously present in the stomach of most patients with non-ulcer dyspepsia: relevance to histological damage. Gut. 42:772-8.

11. Ghiara, P. et al. 1995. Role of Helicobacter pylori virulence factors vacuolating cytotoxin, cagA, and urease in a mouse model of disease. Infection and Immunity. 63:4154-4160.

12. Gibson, J. et al. 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of Helicobacter pylori. Journal of Clinical Microbiology. 36:2580-2585.

13. Go, M. et al. 1996. Population genetic analysis of Helicobacter pylori by multilocus enzyme electrophoresis: Extensive allelic diversity and recombinational population structure. Journal of Bacteriology. 178:3934-3938.

14. Hamlet, A., A. Thoreson, O. Nilsson, A. Svennerholn, and O. Lars. 1999. Duodenal Helicobacter pylori infection differs in cagA genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. Gastroenterology. 116:259-268.

15. Harris, P. et al. 1996. Helicobacter pylori cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells. Infection and Immunity. 64:4867-4871.

16. Ito, S. et al. 1998. Full-length analysis of the vacA gene from cytotoxic and noncytotoxic Helicobacter pylori. Journal of Infectious Diseases. 178:1391-1397.

17. Marshall, B. et al. 1985. Attempt to fulfill Koch's postulate for pyloric Campylobacter. Medical Journal of Australia. 142:436-439.

18. Owen, R. J., and S. E. Gibson J. 1998. Progress in the development of Helicobacter pylori strain typing methods. Commun Dis Public Health. 1:129-31.

19. Peek, R.M. et al. 1995. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ Helicobacter pylori strains. Lab Invest 73: 760-70.

20. Stone, G. et al. 1997. PCR-RFLP typing of ureC from Helicobacter pylori isolated from gastric biopsies during a European multi-country clinical trial. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 40:251-256.

21. Strobel, S. et al. 1998. Identification and analysis of a new vacA genotype variant of Helicobacter pylori in different patient groups in Germany. Journal of Clinical Microbiology. 36:1285-1289.

22. Telford, J. et al. 1994. Gene structure of the Helicobacter pylori cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. Journal of Experimental Medicine. 179:1653-1658.

23. van der Ende et al. 1996. Heterogeneous Helicobacter pylori isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. Gastroenterology 111: 638-47.

24. van Doorn, L. et al. 1998. Typing of Helicobacter pylori vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. Journal of Clinical Microbiology. 36:1271-1276.

25. Webb, P. et al. 1999. Gastric cancer, cytotoxin-associated gene A-positive Helicobacter pylori, serum pepsinogens: An international study. Gastroenterology. 116:269-276.

26. Yamaoka, Y. et al. 1998. Variants of the 3' region of the cagA gene in Helicobacter pylori isolates from patients with different H. pylori-associated diseases. J Clin Microbiol. 36:2258-63.

فراخوان مقاله و ثبت نام دوازدهمین کنگرهٔ جامعه پزشکان متخصص داخلی ایران

جامعهٔ پزشکان متخصص داخلی ایران دوازدهمین کنگرهٔ خود را از ۱۰ تا ۱۴ اردیبهشت سال ۱۳۸۰ در تهران برگزار خواهد کرد. فرصت ارسال مقاله و ثبت نام تا پایان اسفند ماه امسال تعیین شده است و کسانی که مایلند با ارسال مقاله در این کنگره شرکت کنند باید مقالات خود را با توجه به نکات زیر ارسال نمایند:

۱ – خلاصه مقالات باید حداکثر تا پانزدهم بهمن‌ماه به دبیرخانه کنگره ارسال شود.

۲ – خلاصه مقالات جنبه پژوهشی و تحقیقاتی داشته و در تنظیم آنها چهار بخش اصلی مقاله (عنوان – مقدمه و اهداف – روش تحقیق – یافته پژوهش و نتیجه‌گیری) به تفکیک ارائه شود.

۳ – خلاصه مقالات پیشنهادی در یک صفحه کاغذ A4 و الزاماً به صورت تایپ‌شده به همراه دو نسخه کپی و فرم تکمیل شده ثبت‌نام و فیش واریز وجه ثبت نام ارسال شود.

۴ – از نوشتن اسامی نویسنده یا نویسندگان بر روی خلاصه مقالات خودداری شود.

۵ – از ارسال مقالات تکراری یا مقالاتی که در سایر کنگره‌های داخلی ارائه و قبلاً منتشر شده و همچنین مقالاتی که از نظر محتوایی فاقد جنبه تحقیقاتی و پژوهشی می‌باشند جداً خودداری شود.

۶ – خلاصه مقالاتی که فاقد فرم ثبت نام و فیش واریز وجه ثبت نام باشند جهت بررسی به کمیته علمی کنگره ارائه نخواهند شد.

علاقه‌مندان می‌توانند برای اطلاع بیشتر به آدرس زیر مراجعه کنند:

دفتر جامعه پزشکان متخصص داخلی ایران :

ساختمان شماره ۲ نظام‌پزشکی / خیابان طالقانی / خیابان شهید حق‌پرست

تله فاکس : ۸۹۶۹۷۴۰ / فاکس : ۸۰۵۴۴۱۴