گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۶۰-۱۵۴

شناسایی ژنهای اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری در مخمر دهانی

دکتر فریده سیاوشی[1]*، دکتر علی هاتف سلمانیان[2]، فرشته اکبری[3]، دکتر رضا ملک‌زاده[4]، دکتر صادق مسرت[4]

[1]استادیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران

[2]دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[3]پژوهشگر، بخش زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشگاه خاتم

[4]استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران

خلاصه

مقدمه

معده انسان تنها زیستگاه شناخته شده هلیکوباکتر پیلوری (*H. pylori*) است، با این وجود دانشمندان توانسته‌اند با به‌کارگیری روشهای ملکولی، وجود باکتری را در آب و حفره دهانی انسان به اثبات برسانند. بر این اساس راههای انتقال هلیکوباکتر پیلوری، مدفوعی-دهانی یا دهانی-دهانی ذکر می‌شوند. در این بررسی مخمر به‌عنوان یک عامل برای انتقال هلیکوباکتر پیلوری مطرح شده است. به دنبال مشاهده میکروسکوپی اجسام متحرک شبه باکتری درون واکوئول مخمر و عدم کشت‌پذیری این اجسام، از روش PCR برای بررسی طبیعت باکتریایی و هویت آنها استفاده شد و پرایمرهای اختصاصی برای هدف قرار دادن ژنهای 16S rDNA و cagA مربوط به *H. pylori* طراحی شدند.

مواد و روشها

۱۸ مخمر دهانی از ۱۸ بیمار مبتلا به بیماریهای گوارشی مختلف جدا شدند. مطالعات میکروسکوپی برای مشاهده اجسام شبه باکتری درون واکوئول مخمرها انجام شد. استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم صورت گرفت. شرایط PCR، ۳۳ سیکل و درجات حرارت annealing، ۶۳ °C برای 16S rDNA و ۵۱ °C و ۵۲ °C برای ژن cagA، که در دو مرحله هدف قرار داده شد، تعیین شدند. DNAهای استخراج شده از *H. pylori* و *S. cerevisiae* به‌عنوان شاهد استفاده شدند. به منظور تعیین ترادف نوکلئوتیدی، محصولات PCR ژنهای ذکر شده از یک مخمر دهانی و *H. pylori* در پلاسمیدهای pCAP و سپس در پلاسمید pSK+ کلون شدند.

نتایج

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که اجسام متحرک شبه باکتری درون واکوئول تمام مخمرهای دهانی وجود دارند. اندازه محصول PCR ژن 16S rDNA به دست آمده از ۱۸ مخمر دهانی با اندازه همان محصول از *H. pylori* شاهد یکسان بود. از ۱۸ مخمر، ۱۵ مخمر (۸۳٪) واجد ژن cagA مشابه *H. pylori* شاهد بودند. ژن cagA از ۳ مخمر دهانی و *S. cerevisiae* به دست نیامد. ترادف نوکلئوتیدی ژنهای 16S rDNA و cagA به دست آمده از یک مخمر دهانی دارای ۹۸٪ هومولوژی با ژنهای مربوط در *H. pylori* بود.

نتیجه‌گیری

شناسایی ژنهای 16S rDNA و cagA در مخمر نشان می‌دهد که اجسام متحرک شبه باکتری، *H. pylori* می‌باشند. به نظر می‌رسد مخمرها که در طبیعت و سطوح مخاطی بدن انسان به وفور یافت می‌شوند، می‌توانند مخازن *H. pylori* در خارج از معده انسان باشند و باکتری را به معده انسان انتقال دهند. گوارش، ۱۳۸۳؛ سال نهم: ۶۰-۱۵۴

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، راههای انتقال، مخمر دهانی، ژن 16S rDNA، ژن cagA، PCR

مقدمه

همه تلاش دانشمندان در سراسر جهان برای مطالعه هرچه بیشتر *H. pylori* به این منظور است که ناراحتی بیماران گوارشی را تسکین بخشند و امکان بروز زخمهای گوارشی و سرطان معده را به حداقل برسانند. برای رسیدن به این اهداف دانشمندان می‌کوشند رژیمهای درمانی صحیح[1] و واکسنهای مؤثر[2] طراحی نمایند. این کار مستلزم استفاده از روشهای مناسب برای درک نقش عوامل میزبانی و باکتریایی در ایجاد بیماری است[3]. به علاوه تحقیقات در

*نویسنده مسئول: دکتر فریده سیاوشی- تهران، خیابان انقلاب، دانشگاه تهران، دانشکده علوم، بخش میکروب‌شناسی
تلفن: ۶۱۱۱۲۴۶۰ نمابر: ۶۶۴۰۵۱۴۱

E-mail: siavoshi@khayam.ut.ac.ir

زمینه اپیدمیولوژی، شامل تعیین میزان شیوع *H. pylori* در نواحی جغرافیایی مختلف دنیا[۴]، سن ابتلا به عفونت[۵]، و چگونگی انتقال باکتری[۶]، مورد توجه گروههای متعددی است که انتظار می‌رود نتایج مطالعات آنها، اطلاعات با ارزشی را در اختیار قرار دهد تا بتوان عفونت *H. pylori* را در جوامع بشری در سراسر دنیا تحت کنترل در آورد و گستره انتشار آن را محدود کرد.

اگرچه DNA مربوط به *H. pylori* توسط روشهای ملکولی در منابع مختلف مثل آب، شیره معده، مدفوع[۷] و بزاق[۸] یافت شده است، شواهد محکمی دال بر انتقال *H. pylori* از این راهها وجود ندارد و مسیر انتقال *H. pylori* هنوز ناشناخته است. بر اساس گزارشهایی که تا کنون به چاپ رسیده، عقیده بر این است که انتقال *H. pylori* عمدتاً از دو راه مدفوعی-دهانی و دهانی-دهانی صورت می‌گیرد. راه مدفوعی-دهانی در کشورهای در حال توسعه مطرح است که آب آشامیدنی آلوده مصرف می‌کنند؛ در این زمینه عوامل محیطی نقش مهمی ایفا می‌کنند[۹]. راه دهانی-دهانی به‌عنوان مسیر انتقال *H. pylori* در کشورهای توسعه یافته که آب آشامیدنی بهداشتی مصرف می‌کنند ذکر می‌شود. بنابراین تأثیر عوامل دیگری مثل تماس نزدیک مورد توجه قرار می‌گیرد[۱۰].

در این مطالعه، مخمرها که در محیطهای طبیعی و حفره دهان انسان وجود دارند، به‌عنوان مخازن *H. pylori* مطرح می‌شوند. مشاهدات میکروسکوپ نوری نشان داد که اجسام متحرک شبه‌باکتری در واکوئول مخمر وجود دارند. از آنجا که این اجسام در آزمایشگاه قابل کشت نبودند، از روش PCR برای بررسی وجود ژنهای اختصاصی *H. pylori*، 16S rDNA و cagA در مخمر دهانی استفاده شد.

مواد و روشها

در این مطالعه مقطعی، ۱۸ مخمر از دهان ۱۸ بیمار که به‌دلیل ناراحتیهای گوارشی به بخش آندوسکوپی درمانگاه ارس در اردبیل مراجعه کرده بودند، جدا شدند. نمونه‌های دهانی با تماس سواب پنبه‌ای استریل با مخاط دهان، سطح زبان و لثه‌ها تهیه شدند. برای کشت نمونه‌ها، از محیط جامد سابورودکستروز آگار (Merck) واجد کلرامفنیکل استفاده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۷ °C برای ۴۸-۲۴ ساعت، پلیت‌ها برای وجود کلنی‌های مخمر با رنگ سفید و اندازه ۳-۲ mm بررسی شدند. از کلنی‌های مورد نظر گسترش تهیه شد و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. مطالعه میکروسکوپی، اشکال مخمر را که به رنگ بنفش (گرم مثبت) درآمده بودند نشان داد. از هر پلیت چند کلنی مخمر به‌طور تصادفی انتخاب و از آنها گسترش مرطوب تهیه شد. مطالعه سلولهای مخمر با عدسی ۱۰۰× میکروسکوپ نوری، نشان داد که اجسام متحرک شبه‌باکتری در واکوئول تمام سلولهای مخمر وجود دارند. فیلم ویدیو از اجسام متحرک شبه‌باکتری درون واکوئول مخمرها تهیه شد. مخمرهای جدا شده براساس شکل سلولی (blastoconidia) و تشکیل رشته‌های کاذب (pseudomycelium) بر روی محیط سابورودکستروز آگار شناسایی شدند.

از آنجا که تلاش برای کشت اجسام شبه باکتری از مخمرهای تخریب شده بی‌نتیجه ماند، برای بررسی وجود *H. pylori* در مخمر از روش PCR استفاده شد و ژنهای اختصاصی 16 S rDNA و cagA باکتری در DNAهای استخراج شده از مخمرها مورد هدف قرار گرفتند. برای استخراج DNA، مخمرها بیش از ۱۰ بار بر روی محیط سابورودکستروز آگار واجد کلرامفنیکل به‌طور مکرر کشت داده شدند تا آلودگیهای احتمالی باکتریایی حذف شوند. مطالعات میکروسکوپی مخمرها پس از کشتهای مکرر نشان داد که مخمرها همچنان باکتریهای درون واکوئول خود را دارند. DNA از ۱۸ مخمر دهانی و *Saccharomyces. cerevisiae* (به‌عنوان شاهد) با استفاده از مهره‌های شیشه‌ای (۰/۵ mm) و روش فنل-کلروفرم (Sambrook و Russel)[۱۱] استخراج شد. همچنین DNA از سویه استاندارد *H. pylori* (ATCC No. ۴۳۵۰۴) که به‌عنوان شاهد استفاده شد بر اساس روش استاندارد[۱۱] استخراج گردید. به‌طور خلاصه باکتری از روی پلیت به ۵۰۰ µL بافر TSLR (۱۰ mM tris-HCl و pH۸/۰، ۱ mM EDTA) واجد ۵ mg سدیم دودسیل سولفات، ۱/۵ mg لیزوزیم و ۱ µL از RNase (۲ mg/ml) منتقل و به مدت یک ساعت در ۳۷ °C قرار داده شدند. سپس ۴ µL پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) اضافه شد و گرمخانه‌گذاری در ۶۵ °C برای مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. DNA با روش فنل-کلرفروم استخراج گردید و با استات سدیم (۵/۲ pH، ۳ mM) و الکل مطلق رسوب داده شد. برای بررسی طبیعت باکتریایی اجسام شبه‌باکتری، پرایمرها برای هدف قرار دادن ژن 16S rDNA بر اساس مقالات منتشر شده طراحی شدند: پرایمر رفت (F) (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3، مربوط به نوکلئوتید ۳۷-۸) و پرایمر برگشت (R) (5-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3، مربوط به نوکلئوتید ۱۴۸۴-۱۵۰۳)[۱۲]. بررسی وجود ژن cagA با روش Seminested PCR انجام شد. برای طراحی پرایمرها از اطلاعات مربوط به ترادف نوکلئوتیدی ژن cagA در سویه *H. pylori* J99 (با شماره کد: AB090088) استفاده شد: پرایمر رفت (Pri-F) (5-TGGAATTTCTGGCACAAAATAATGCTA-3، مربوط به نوکلئوتید ۱۲۳۹-۱۲۱۰) و پرایمر برگشت (Pri-R1) (5-TTAGAATAACAACAAACATCACGCCAT، مربوط به

نوکلئوتید ۱۴۹۸-۱۵۲۶) و پرایمر (Pri-R2) (CCCTATTA-5-GCGATTGCTCTTGCAT، مربوط به نوکلئوتید ۲۰۰۰-۲۰۲۴).

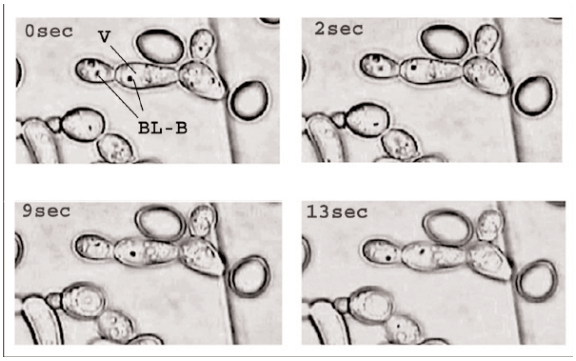
واکنش PCR برای تکثیر ژن 16S rDNA، با اجزای زیر انجام شد: DNA مخمر (۵۰۰ ng)، DNA مربوط به *H. pylori* (۱۰۰ ng)، $MgCl_2$ (۳mM)، هر dNTP (۲ mM)، هر پرایمر (۱۰ pmol)، و یک واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (Fermentas، ۵ u/µL). شرایط بهینه PCR به‌صورت ۳۳ سیکل با درجه حرارت annealing ۶۳ °C تعیین گردید. اندازه محصول PCR ژن 16S rDNA، ۱۴۷۶ bp به دست آمد. تجزیه و تحلیل بیشتر بر روی محصول PCR با استفاده از آنزیمهای محدودگر انجام شد: TaqI (۸۶۰، ۵۵۴ و ۶۲ جفت باز)، HeaIII (۲۷۸، ۳۰۱ و ۸۹۷ جفت باز) و EcoRI (۶۳۴ و ۸۴۲ جفت باز) (آنزیمهای محدودگر از شرکت Roche خریداری شدند).

تکثیر ژن cagA از DNAهای استخراج شده از مخمرها و *H. pylori* در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول از جفت پرایمر Pri-F/Pri-R2 استفاده شد. مخلوط واکنش PCR از اجزای زیر تشکیل شده بود: DNA مخمر (۳۰۰ ng)، DNA مربوط به *H. pylori* (۱۰۰ ng)، $MgCl_2$ (۲/۵ mM)، dNTP (هر کدام ۲/۵ mM)، پرایمر (هر کدام ۱۰ pmol) و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (۵ u/µL). شرایط بهینه واکنش ۳۳ سیکل با دمای annealing ۵۲ °C برای مخمر و ۵۱ °C برای *H. pylori* تعیین شد.

در مرحله دوم (seminested PCR) به منظور کاهش دادن تأثیر مهارکننده‌ها در مرحله اول PCR، محصولات PCR مرحله اول به میزان ۳۰۰ برابر رقیق شدند و به‌عنوان الگو برای واکنش PCR مرحله دوم مورد استفاده قرار گرفتند. در این مرحله از جفت پرایمر Pri-F/Pri-R1 استفاده شد. اجزای واکنش عبارت بودند از: DNA الگوی رقیق شده (۱ µL)، $MgCl_2$ (۳ mM)، ۲/۵ mM از هر dNT، ۱۰ pmol از هر پرایمر و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (۵ u/µL). شرایط بهینه PCR، ۳۳ سیکل با دمای annealing ۵۱ °C تعیین شد. اندازه محصولات PCR از مرحله اول و دوم به ترتیب ۸۱۴ bp و ۳۱۶ bp تعیین شد. محصول PCR ژنهای 16S rDNA (۱۴۷۶ bp) و cagA (۳۱۶ bp) از یک مخمر دهانی و *H. pylori* ابتدا در پلاسمید pCAP (Roche) و سپس در پلاسمید pSK+ (Stratagene) کلون شدند و برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی (sequencing) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تعیین ترادف نوکلئوتیدی محصولات PCR با روش dideoxy chain termination و با استفاده از پرایمرهای استاندارد T3-T7 صورت گرفت. ترادف نوکلئوتیدی محصولات PCR ژنهای مورد مطالعه با اطلاعات موجود در بانک ژنی، با استفاده از نرم‌افزار BLAST، مقایسه شد و میزان تشابه (هومولوژی) تعیین گردید.

نتایج

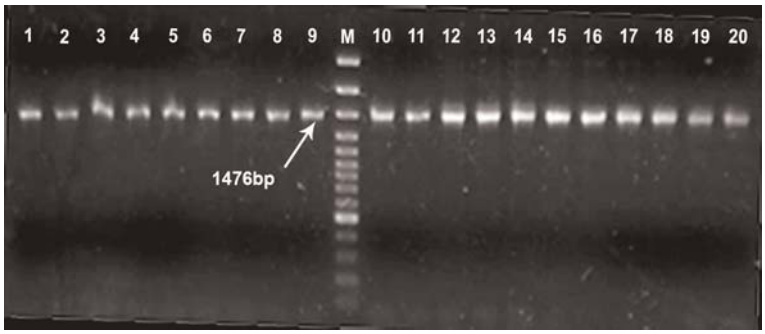
مشاهدات میکروسکوپی ۱۸ مخمر دهانی نشان داد که اجسام متحرک شبه باکتری در واکوئول مخمرها وجود دارد (شکل ۱). مخمرهای دهانی به‌عنوان گونه‌های جنس Candida شناسایی شدند. محصولات PCR ژن 16S rDNA از ۱۸ مخمر دهانی و S. cerevisiae از نظر اندازه (۱۴۷۶ bp) (شکل ۲) و الگوی هضم آنزیمی (نتایج نشان داده نشده) مشابه محصول PCR به دست آمده از *H. pylori* (ATCC ۴۳۵۰۴) بودند. تکثیر ژن 16S rDNA از DNA مربوط به S. cerevisiae که به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد مورد انتظار نبود، بنابراین باید مطالعات بیشتری در این زمینه صورت گیرد. مقایسه محصولات PCR ژن cagA (۳۱۶ bp) به دست آمده از مخمرهای دهانی و *H. pylori* در مرحله دوم PCR نشان داد که ۱۵/۱۸ (۸۳٪) مخمرها واجد ژن cagA مربوط به *H. pylori* بودند (شکل ۳). از سه مخمر باقی مانده (۳/۱۸، ۱۷٪) و S. cerevisiae، ژن cagA تکثیر نشد؛ اگرچه وجود ژن 16S rDNA در این مخمرها می‌تواند نشان‌دهنده وجود سویه‌های *H. pylori* فاقد cagA باشد. ترادف نوکلئوتیدی محصول PCR ژنهای 16S rDNA و cagA یک مخمر دهانی دارای ۹۸٪ تشابه با ژنهای مربوط در *H. pylori* (ATCC ۴۳۵۰۴) بودند.



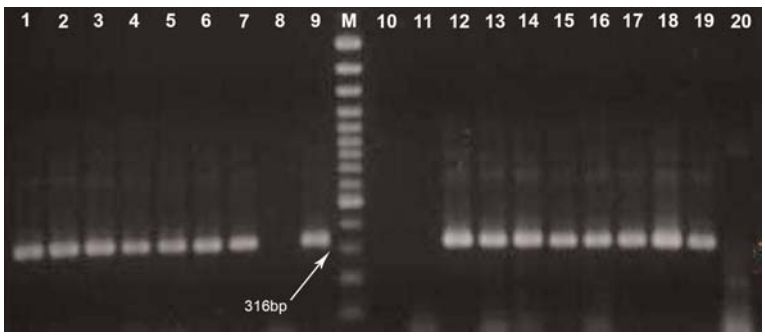
شکل ۱: مشاهده سلول مخمر با میکروسکوپ نوری، وجود اجسام شبه‌باکتری (BLBs) را درون واکوئول مخمر (V) نشان می‌دهد. برای نشان دادن تحرک اجسام شبه‌باکتری، تصاویر در فواصل زمانی مختلف (۰، ۲، ۹ و ۱۳ ثانیه) تهیه شد (بزرگنمایی اولیه ۱۲۵۰×).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که ژنهای اختصاصی *H. pylori*، 16S rDNA و cagA در مخمر دهانی وجود دارند. این اطلاعات، طبیعت باکتریایی اجسام متحرک شبه‌باکتری درون واکوئول مخمر



شکل ۲: شناسایی ژن ۱۶S rDNA در مخمرهای دهانی. هجده مخمر دهانی (ستونهای ۷-۱ و ۲۰-۱۰) و S.cerevisiae (ستون ۸) مشابه *H. pylori* (ATCC ۴۳۵۰۴) (ستون ۹)، واجد ژن ۱۶S rDNA با اندازه bp ۱۴۷۶ بودند. M: شاخص وزن ملکولی bp ۱۰۰ (bp ۱۰۰-۳۰۰۰).



شکل ۳: شناسایی ژن cagA در مخمرهای دهانی. پانزده مخمر دهانی (ستونهای ۷-۱ و ۱۲-۹) مشابه *H. pylori* (ATCC ۴۳۵۰۴) (ستون ۹)، دارای ژن cagA با اندازه bp ۳۱۶ بودند. از سه مخمر دهانی (ستونهای ۱۰، ۱۱ و ۲۰) و S. cerevisiae (ستون ۸) محصول PCR به دست نیامد. M: شاخص وزن ملکولی bp ۱۰۰ (۱۰۰-۳۰۰۰).

را، که با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند، تأیید می‌کند و امکان همزیستی *H. pylori* با مخمر را مطرح می‌کند.

زندگی درون سلولی باکتری با مخمر، اول بار در سال ۱۹۹۶ در پی تکثیر ژن اوره‌آز (ureA) اختصاصی *H. pylori* از مخمرهای متعلق به جنس Candida گزارش شد. از آنجا که در مقایسه با *H. pylori*، مخمر در مقابل شرایط نامساعد محیطی مثل افزایش دما، خشکی، pH اسیدی و وجود بیوسایدها پایداری بیشتری داشت[۱۴ و ۱۳]، بنابراین نتیجه گرفته شد که *H. pylori* درون واکوئول مخمر از فشارهای محیطی در امان می‌ماند. در این گزارش مخمر به عنوان منبع *H. pylori* و وسیله‌ایی برای انتقال آن به دهان انسان معرفی گردید[۱۳].

گزارشهایی که در مورد ارتباط بین باکتریها و قارچها منتشر شده است، عمدتاً در مورد ارتباط سطحی است[۱۵] و زندگی درون سلولی باکتری در قارچ به‌ندرت گزارش شده است؛ که دلیل اصلی آن غیرقابل کشت بودن باکتری درون سلولی است[۱۶]. اگرچه دانشمندان توانسته‌اند با استفاده از روشهای بیولوژی ملکولی به این نتیجه برسند که بسیاری از قارچهای شناخته شده دارای باکتری درون سلولی در واکوئول می‌باشند[۱۷]. یک مثال شناخته شده قارچهایی هستند که به ریشه گیاهان می‌چسبند و ارتباط سطحی برقرار می‌کنند (arbuscular mycorrhizal fungi). جنسهای شناخته شده این قارچها gigosporia و scutellospora، دارای باکتری درون‌سلولی در سیتوپلاسم[۱۷] و یا اسپور[۱۸] می‌باشند. بررسیهای شجره‌شناسی (فیلوژنی) ملکولی بر روی محتویات DNA این قارچها، با استفاده از پرایمرهای Blof-Blofr، صورت گرفته و باکتریهای همزیست درون‌سلولی آنها به‌عنوان گونه‌هایی از جنس Burkholderia شناسایی شده‌اند[۱۸].

گزارشهای متعددی نشان می‌دهد که باکتریها در واکوئول سلول موجودات یوکاریوتی مستقر می‌شوند و رابطه همزیستی درون‌سلولی

(endosymbiont) برقرار می‌نمایند[۱۹]. مطالعه جزئیات چنین ارتباطاتی اطلاعات بسیار با ارزشی در مورد پایداری باکتریهای بیماریزا در محیط و انتقال آنها به انسان در اختیار قرار می‌دهد. بیشترین مطالعات در مورد زندگی درون سلولی Legionella pneumophila با گونه‌های مختلف آمیب آزادزی صورت گرفته است. به نظر می‌رسد که آمیب‌ها مواد غذایی لازم برای تکثیر L. pneumophila را تأمین می‌کنند و باکتری را در مقابل شرایط نامساعد محیطی حفظ می‌کنند[۲۰]. گزارشهای اخیر نشان می‌دهند یک نوع آمیب L. pneumophila (Acanthamoeba castellanii) را از آبهای محیطی که به تشکیلات تهویه هوا وارد می‌شوند، به دستگاه تنفس انسان منتقل می‌کند و باعث ایجاد عفونت تنفسی شدید می‌گردد[۲۱]. تکثیر درون سلولی Pseudomonas aeruginosa درون واکوئول acanthamoeba که از آب آشامیدنی آلوده یک بیمارستان جدا شده، نشان می‌دهد که آمیب‌ها نقش مهمی به عنوان زیستگاه و احتمالاً عامل انتقال باکتریهای بیماریزا، بازی می‌کنند[۲۲]. هنگامی که *H. pylori* به همراه A. castellanii در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد، تعداد باکتری به میزان ۱۰۰ برابر افزایش پیدا کرد. این مشاهده نیز نقش حیاتی آمیب را در بقای *H. pylori* در طبیعت مطرح می‌کند[۲۳].

مخمرها قارچهای تک سلولی با تواناییهای متابولیک بسیار متنوعی می‌باشند که به دلیل خاصیت تخمیرشان، از دیر باز به‌عنوان ابزاری ظریف برای تهیه و ذخیره مواد غذایی مورد استفاده انسان قرار گرفته‌اند. مخمرها میکروارگانیسم‌های آزادزی می‌باشند که در آب، خاک، و مواد غذایی وجود دارند[۲۴]. مخمر candida یک عضو شناخته شده میکروفلور دهان، معده، روده و واژن در افراد سالم است و می‌تواند جمعیت انبوهی را در این جایگاهها به وجود آورد، بدون اینکه سبب عارضه جدی گردد[۲۵]. نشان داده شده که گونه‌های candida می‌توانند مانند *H. pylori* و ویروس Herpes simplex موجب زخم گوارشی شوند[۲۶]. مخمرهای جنس candida مهندسین قابلی در ساخت بیوفیلم‌های ضخیم و چسبنده بر روی سطوح مخاطی و یا وسایل پزشکی که در بدن کار گذاشته می‌شوند، مثل کاتترها، می‌باشند. بدین ترتیب، مخمرها قادرند در مقابل سیستم دفاعی بدن یا قارچ‌کش‌ها مقاومت کنند[۲۷].

با جمع‌بندی مطالب می‌توان گفت مخمر، که به وفور در محیط و بر روی سطوح مخاطی بدن انسان یافت می‌شود، منبع مهم *H. pylori* محسوب می‌شود. به نظر می‌رسد که مخمر *H. pylori* را در مقابل شرایط نامساعد محیطی حفظ می‌کند و آن را به دستگاه گوارش انسان منتقل می‌کند. از آنجا که اولین مواجهه انسان با مخمر می‌تواند زمان تولد و عبور از کانال تولد، پس از تولد، در اثر تماس نوزاد با اطرافیان، و یا در اثر استفاده از مواد غذایی یا وسایل غذاخوری آلوده اتفاق بیفتد[۲۸]، بنابراین می‌توان مخمر را به‌عنوان یک عامل مهم در انتقال *H. pylori* به انسان، در روزهای نخستین زندگی محسوب کرد.

مطالعات آینده جزئیات بیشتری را در مورد نقش مخمر در انتقال *H. pylori* به معده انسان و استقرار در چنین زیستگاه خشن و منحصر به فرد، روشن خواهد کرد. به علاوه، از ارتباط بین *H. pylori* و مخمر می‌توان به‌عنوان یک الگوی ساده و مناسب برای درک بیشتر چگونگی رابطه متقابل بین باکتریهای بیماریزا و میزبانهای یوکاریوتی آنها، از جمله انسان، استفاده کرد.

تشکر و سپاس

از خانم فخری جانشین برای کمکهای ایشان در جمع‌آوری نمونه‌ها و خانم لیلا علمشاهی برای کمک در تنظیم مقاله قدردانی می‌شود.

واژه‌نامه

ژن ۱۶S rDNA: ریبوزوم یک اندامک درون سلولی از جنس پروتئین و RNA است که دارای نقش محوری در تولید پروتئین سلولی می‌باشد. RNAهای تشکیل‌دهنده ریبوزم باکتریایی ۶۵٪ توده ریبوزوم را به وجود می‌آورند و بر اساس ضریب رسوبشان با سانتریفوژ (Svedberg unit) به سه دسته ۲۳S rRNA، ۱۶S rRNA و ۵S rRNA تقسیم‌بندی می‌شوند. ژن رمزکننده ۱۶S rDNA به‌عنوان یک ساعت شمار ملکولی محسوب می‌شود که بر اساس آن می‌توان ارتباط تکاملی (قرابت ژنتیکی) موجودات را تعیین کرد؛ چرا که این ژن در بین موجودات بسیار حفظ شده است و ترادف نوکلئوتیدی آن در بین موجودات مختلف، متفاوت است. در نتیجه می‌توان موجودات را بر اساس ترادف نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA آنها، از یکدیگر متمایز کرد. سویه‌های باکتریایی که دارای بیش از ۷۵٪ تشابه (هومولوژی) در ترادف نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA باشند، اعضای یک گونه محسوب می‌شوند.

ژن cagA: محصول پروتئین ژن cagA (CagA) یکی از عوامل بیماریزایی مهم *H. pylori* است که سیستم ایمنی انسان را به شدت بر می‌انگیزد. ژن cagA در یک مجموعه ژنی در کروموزوم باکتری به نام جزیره بیماریزایی قرار گرفته است. بنابراین وجود ژن cagA نمایانگر وجود جزیره بیماریزایی است. محتویات G+C جزیره بیماریزایی با محتویات G+C بقیه کروموزم باکتری متفاوت

است که نشان می‌دهد این قطعه از موجود دیگری طی انتقال افقی کسب شده است. به نظر می‌رسد که طی تکامل، در یک مقطع زمانی، یک عنصر ژنتیکی متحرک (IS605) به کروموزوم باکتری وارد شده و باعث جداشدن، حذف یا چند نسخه شدن بخشهایی از جزیره بیماریزایی شده است. گفته می‌شود که شدت بیماریزایی *H. pylori* بستگی به وجود جزیره بیماریزایی در باکتری دارد. عفونت سویه‌هایی از *H. pylori* که دارای این جزیره بیماریزایی می‌باشند منجر به زخم دوازدهه، آتروفی و سرطان معده می‌شود. جزیره بیماریزایی دارای ۳۱ ژن است که ۶ ژن آن سیستم ترشحی نوع IV را می‌سازند که پروتئین CagA را به داخل سلول اپیتلیال منتقل می‌کنند. CagA در داخل سلول دستخوش فسفوریلاسیون می‌شود و باعث تغییراتی در فرآیندهای پیام‌رسانی سلول می‌گردد که نتیجه آن گاستریت در اثر برانگیخته شدن سیستم ایمنی و یا تکثیر بی‌رویه سلول اپیتلیال و کارسینوم معده می‌باشد.

pCAP و pSK+: اسامی پلاسمیدهایی است که برای کلون کردن استفاده می‌شوند.

پلاسمید: قطعاتی از DNA که عموماً دو زنجیره، خطی یا حلقوی‌اند و قادر به تکثیر خودبه‌خود می‌باشند. سلولهای پروکاریوتی و یوکاریوتی واجد پلاسمید می‌باشند. پلاسمیدهای باکتریایی اندازه‌ای معادل kb ۳۰۰-۱/۵ دارند و موادی تولید می‌کنند که تواناییهای خاصی را به سلول می‌بخشند؛ مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک یا فلزات سنگین، تولید توکسین یا اندونوکلئازها.

کلون کردن (cloning): روشی که با استفاده از آن می‌توان میلیونها کپی از یک ژن را تولید کرد. کلون کردن یک ژن می‌تواند برای تعیین ترادف ژن یا بیان ژن و به دست آوردن محصول پروتئینی آن باشد.

Seminested PCR: یک نوع PCR است که در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله اول از یک جفت پرایمر (رفت و برگشت) استفاده می‌شود که دو انتهای ژن را شناسایی می‌کنند. در مرحله دوم، محصول PCR مرحله اول به‌عنوان الگو استفاده می‌شود. در این مرحله پرایمر رفت مشابه مرحله اول است ولی پرایمر برگشت یک پرایمر داخلی است و تکثیر قطعه را از وسط ژن شروع می‌کند. استفاده از این نوع PCR برای بالا بردن حساسیت و ویژگی روش PCR است.

بیوفیلم: لایه‌ای متشکل از میکروارگانیسم‌ها و ترشحات خارج سلولی آنها که از جنس پلی ساکارید است. بیوفیلم در روی سطوح مختلف به‌صورت لایه‌ای چسبنده تشکیل می‌گردد. میکروارگانیسم‌ها روی سطوح غوطه‌ور در آبهای محیطی یا سطوح مخاطی بدن انسان بیوفیلم تشکیل می‌دهند.

مراجع

1. Perri F, Qasim A, Marras L *et al.* Treatment of Helicobacter pylori infection. *helicobacter* 2003; **8** (Suppl 1): 53-60.
2. Michetti P, Svennerholm AM. Helicobacter pylori-inflammation, immunity and vaccines. *Helicobacter* 2003; **8** (Suppl 1): 31-5.
3. Lamarque D, Peek RM Jr. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2003; **8** (Suppl 1): 21-30.
4. Taylor DN, Blaser MJ. The epidemiology of Helicobacter pylori infection. *Epidemiol Rev* 1991; **13**: 42-59.
5. Wewer V, Kalach N. Helicobacter pylori infection in pediatrics. *Helicobacter* 2003; **8** (Suppl 1): 61-7.
6. Engstrand L. Helicobacter in water and waterborne routes of transmission. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2001; **30**: 80S-4S.
7. Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA *et al.* PCR identification of Helicobacter pylori in faeces from gastritis patients. *Lancet* 1993; **34**: 447.
8. Li C, Musich PR, Ha T *et al.* High prevalence of Helicobacter pylori in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol* 1995; **48**: 662-6.
9. Hopkins RJ, Vial PA, Ferreccio C *et al.* Seroprevalence of Helicobacter pylori in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. *J Infect Dis* 1993; **168**: 222-6.
10. Brenner H, Rothenbacher D, Bode G *et al.* Active infection with Helicobacter pylori in healthy couples. *Epidemiol Infect* 1999; **122**: 91-5.
11. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual (Vol 1). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
12. Eckloff BW, Podzorski RP, Kline BC *et al.* A comparison of 16S ribosomal DNA sequences from five isolates of Helicobacter Pylori. *Int J Sys Bacteriol* 1994; **44**: 320-3.
13. Siavoshi F, NouraliAhari F, Zeinali S *et al.* Yeast a silent companion of Helicobacter pylori which protects it against the environmental stresses. *Gastroenterol* 1996; **110**: A1015.
14. Gasch AP, Werner-Washburne M. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* 2002; **2**: 181-92.
15. Perotto S, Bonfante P. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 496-501.
16. Scannerini S, Bonfante P. Bacteria and bacteria-like objects in endomycorrhizal fungi. In: Margulis L, Fester R, editors. Symbiosis as a source of evolutionary innovation: Speciation and morphogenesis. Cambridge: MIT Press; 1991. p. 273-87.

17. Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L *et al.* Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 4503-9.
18. Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D *et al.* An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1996; **62**: 3005-10.
19. Garcia-del Portillo F, Finlay BB. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol* 1995; **3**: 373-80.
20. Bozue JA, Johnson W. Interaction of Legionella pneumophila with Acanthamoeba castellanii: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* 1996; **64**: 668-73.
21. Dondero TJ Jr, Rendtorff RC, Mallison GF *et al.* An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *N Engl J Med* 1980; **302**: 365-70.
22. Michel R, Burghardt H, Bergmann H. Acanthamoeba, naturally intracellularly infected with Pseudomonas aeruginosa, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg umweltmed* 1995; **196**: 532-44.
23. Winiecka-Krusnell J, Wreiber K, Von Euler A *et al.* Free - living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori. *Scand J Infect Dis* 2002; **34**: 253-6.
24. Phaff HJ, Starmer WT. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose AH, Harrison JS, editors. The Yeast (Vol 1). 2nd ed. London: Academic Press Limited; 1987. p. 123-80.
25. Soll DR. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop* 2002; **81**: 101-10.
26. Marsh WW. Infectious diseases of gastrointestinal tract in adolescents. *Adolesc Med* 2000; **11**: 263-78.
27. Lecciones JA, Lee JW, Navarro EE *et al.* Vascular catheter-associated fungemia in patients with cancer: analysis of 155 episodes. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 875-83.
28. Waggoner-Fountain LA, Walker MW, Hollis RJ *et al.* Vertical and horizontal transmission of unique Candida species to premature newborns. *Clin Infect Dis* 1996; **22**: 803-8.

Detection of *Helicobacter Pylori*-Specific Genes in the Oral Yeast

Siavoshi F
Department of Microbiology, Faculty of Science, Tehran University

Salmanian AH
National Research Center for Genetic Engineering & Biotechnology, Tehran

Akbari F
Cell and Molecular Department of Khatam University, Tehran

Malekzadeh R
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Massarrat S
Digestive Disease Research Center, Tehran University of Medical Sciences

Corresponding Author:
Farideh Siavoshi Ph.D, Department of Microbiology, Faculty of science, Tehran University, P. O. Box 14155-6455, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 61112460
Fax: +98 21 66405141
E-mail: siavoshi@khayam.ut.ac.ir

ABSTRACT

Introduction and Aims: Until today human stomach is the only recognized habitat of *H. pylori*. However, recruitment of DNA-based methods has made possible the detection of *H. pylori* in water and oral cavity, thus suggesting faecal-oral and oral-oral routes for transmission of *H. pylori*, respectively. In this study yeast has been proposed as a common vector for transmission of *H. pylori*. Thus designed primers were recruited to target 16S rDNA and cagA genes in the oral yeasts by PCR.

Materials and Methods: Eighteen yeasts were examined microscopically for the presence of bacterial-like bodies. DNAs were extracted from oral yeasts using phenol-chloroform method. Amplification conditions were optimized as 33 cycles and annealing temperatures of 63 °C for 16S rDNA and 51 °C and 52 °C for cagA gene which was targetted in two steps. DNAs of *H. pylori* and saccharomyces cerevisiae were used as controls. PCR products of two genes from One yeast and from *H. pylori* were cloned in pCAP and subsequently subcloned in pSK+ and sequenced.

Results: Bacterial-like bodies were observed in all oral yeasts. The amplified products of 16S rDNA from all oral yeasts were homologous in size with those of *H. pylori*. 15/18 (83%) yeasts contained cagA gene, homologous to *H. pylori*. CagA was not amplified from three yeasts and S. cerevisiae. Analysis of sequenced products of 16S rDNA and cagA from one oral yeast showed 98% homology with those of *H. pylori*.

Conclusions: The presence of *H. pylori* inside the yeast was indicated by light microscopy and PCR. It appears that yeasts which are abundant in nature and thrive the mucosal surfaces of human might serve as reservoirs and vehicles of *H. pylori*. *Govaresh* 2004; **9**: 154-60

Keywords: *H. pylori*, Transmission routes, Oral yeast, 16SrDNA, CagA, PCR