۱-علی عبدالکریمی، کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان
۲- آرتادخت توکلی، استاد یار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی

جداسازی و تعیین هویت مولکولی ژن‌های حدت هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران آلوده و مصرف کننده سیگار

هلیکوباکتر پیلوری، یک باسیل مارپیچی گرم منفی است که در حفره دهان و معده انسان کلونیزه می‌شود. این باکتری اوره‌آز مثبت، ساکن مخاط اپی‌تلیالی معده بیش از ۵۰ درصد جمعیت دنیا است و عامل سرطان معده است. از آنجایی‌که باکتری سخت رشد است و در آزمایشگاه نیاز به محیط کشت‌های پیچیده جهت رشد دارد، روش‌های مولکولی برای بررسی وحضور و شناسایی آن در افراد مبتلا و مشکوک بسیار حائز اهمیت است. با استفاده از مولتیپلکس پی‌سی‌ار می‌توان به طور همزمان از چندین پرایمر برای تشخیص حضور ژن‌های بیماری‌زا این باکتری در نمونه بیوپسی افراد استفاده کرد. در این پژوهش هدف بررسی شیوع ژن‌های بیماری‌زای (vacA, cagA, cagT, cagE, hrgA) موجود در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از افراد بیمار و سیگاری شهر کرمان با روش مولتیپلکس پی‌سی‌ار است. از مجموع ۵۰ نمونه بیوپسی، ۴۴ نمونه (۸۸ درصد) از نظر وجود ژن‌های بیماری‌زا هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند و برخی از نمونه‌ها چند ژن را همزمان داشتند. فراوانی ژن‌های بیماری‌زای vacA، cagA، cagT، cagE و hrgA در ۵۰ نمونه، به ترتیب برابر با ۸ (۱۶ ٪)، ۱۰ (۲۰ ٪)، ۱۴ (۲۸ ٪)، ۱۵ (۳۰ ٪)، ۳ (۶ ٪) بود که کمترین و بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن hrgA (در ۳ نمونه، ۶ ٪) و cagE (در ۱۵ نمونه، ۳۰ ٪) بود. با توجه به فراوانی پایین ژن‌های بیماری‌زا، مشخص شد ارتباطی بین سیگار و عفونت هلیکوباکتر پیلوری وجود ندارد.

هلیکوباکتر پیلوری، از سوی انجمن بین‌المللی تحقیقات سرطان، عامل باکتریایی سرطان‌زای تیپ ۱ و به عنوان عامل اصلی بسیاری از بیماری‌های گوارشی تعریف شده است. شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری در کشورهای پیشرفته ۵۰ درصد و در کشورهای در روند پیشرفت ۸۰ درصد است. ارتباط یا وقوع همزمان عفونت توسط این باکتری با سایر بیماری‌ها مانند بیماری شریان کرونر، میگرن، گلوکوم و سرطان سر و گردن، بیماری‌های مختلف دستگاه تنفسی (بیماری‌های برونش، سیستم تنفس فوقانی، پولیپ بینی، سل ریوی و سرطان ریه) گزارش شده است (صمیمی و همکاران، ۱۴۰۱).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 cagA و سیتوتوکسین واکوئله کننده vacA است.ژن cagA یک پروتئین ۱۲۰ کیلودالتونی را بیان می‌کند که در ۶۰ تا ۷۰ درصد از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری یافت می‌شود (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸).

هلیکوباکتر پیلوری با توانایی تولید آمونیاک و خنثی کردن اسید معده، به‌طور طبیعی در موکوس معده ساکن می‌شود. این باکتری اگرچه معمولا به شکل مارپیچی است، ولی در صورت قرار گرفتن در شرایط آزمایشگاهی و یا در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها به شکل کوکوئید و غیر قابل کشت درمی‌آید. هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری سخت رشد است و برای رشد نیاز به محیط‌های کشت پیچیده‌ای دارد. به‌طوری‌که در شرایط میکروآئروفیلیک، اکسیژن کاهش یافته ۲-۵ درصد، دی‌اکسیدکربن ۵-۱۰ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت بالا رشد می‌نماید (میلانی و همکاران، ۱۳۹۷).

بقایی و همکاران در سال ۱۳۸۹ شیوع ژن‌های cagA و cagE

موجود در هلیکوباکتر پیلوری در بیماران با مشکلات معده بررسی کردند که به ترتیب ۶۶/۷ درصد و ۳۹ درصد از نمونه‌ها این ژن‌ها را داشتند. روش تشخیص، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده است. گودرزی و همکاران در سال ۱۳۹۱ فراوانی ژن cagA موجود در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده را بررسی کردند. حضور ژن cagA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن به روش PCR تعیین شد. ۶۳/۹ درصد سویه‌های باکتری، دارای این ژن بودند. شاهی و همکاران در سال ۱۳۹۳ ارتباط بین تراکم شدید هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های بیوپسی معده با مصرف سیگار و سن در افراد سیگاری آلوده به این باکتری را بررسی کردند. پژوهش به صورت مقطعی – تحلیلی بر روی ۲۴۷ بیمار صورت گرفت. بیماران از نظر آلوده بودن به باکتری از طریق تست اوره‌آز و وجود ژن srRNA ۱۶ و glmM به روش PCR بررسی شد. نتایج نشان داد ۶۷/۶۱ درصد از بیماران آلوده به باکتری و ۳۲/۳۹ درصد فاقد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری بودند. از میان تمام بیماران، ۵۷/۰۹ درصد سیگاری بودند که در این بین ۷۸/۰۱ درصد آلوده به این باکتری بودند. تراکم شدید هلیکوباکتر پیلوری در سیگاری‌ها بیشتر است. در نهایت این تنیجه به دست آمد، تراکم بالای هلیکوباکتر پیلوری در بافت معده می‌تواند در ارتباط با مصرف سیگار و سن باشد.

چمن‌رخ و همکاران در سال ۱۳۹۵ فرم‌های کوکوئید هلیکوباکتر پیلوری را در نمونه‌های آب توسط روش‌های کشت و PCR شناسایی کردند. کشت نمونه‌ها بر روی محیط بروسلا بلاد آگار صورت گرفت و جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ژن glmM تکثیر گشت. حساسیت روش PCR جهت تشخیص فرم‌های کوکوئیدی در ماه اول آزمون و دوم از روش کشت بیشتر بوده است.هاشمی و همکاران در سال ۱۳۹۵ سه باکتری مایکوپلاسما پنمونیه، استرپتوکوکوس پنمونیه و هموفیلوس آنفلوآنزا را در بیماران مبتلا به پنمونیه با روش مولتیپلکس پی‌سی‌ار (M-PCR) بررسی کردند. احمدی و همکاران در سال ۱۳۹۶ فراوانی ژن‌های cagA، cagT، cagE و hrgA در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرج را بررسی کردند. شیوع این ژن‌ها به ترتیب برابر با ۳۲درصد، ۱۶ درصد، ۲۶ درصد، ۱۴درصد و ۳۴درصد بوده است. در این پژوهش مشخص شد بین عواملی همچون جنسیت، کشیدن سیگار و زخم معده با بروز بعضی ژن‌ها ارتباط وجود دارد. اما سابقه خانوادگی و گروه سنی با هیچ‌کدام از ژن‌ها ارتباط معنی‌داری نداشت.

توکلی و پورتقی درسال ۱۳۹۶ تشخیص ژن‌های بیماریزا در باکتری اشرشیاکولی را با استفاده از روش M-PCR انجام دادند. برای هر ژن یک پرایمر جداگانه طراحی شد.خوش‌بین و همکاران در سال ۱۳۹۸ تشخیص مولکولی هلیکوباکتر پیلوری در مایع منی مردان نابارور را با استفاده از روش مولکولی (PCR) انجام دادند که شیوع باکتری در نمونه‌ها ۱۰ درصد بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژنوم باکتری هلیکوباکتر پیلوری جهت تکثیر ناحیه ۲۹۴ جفت باز ژن فسفوگلوکزآمین موتاز بوده است.حیدری و همکاران در سال ۱۳۹۸ فراوانی ژن‌های بیماری‌زای cagA و vacA را در جدایه‌های هلیکوباکتر پیلوری بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی بررسی کردند. این تحقیق برروی ۱۲۰ بیوپسی معده مبتلایان به بیماری‌های گوارشی در شهر گرگان انجام شد. فراوانی ژن cagA در افراد مبتلا به سرطان معده ۶۷/۵درصد، در زخم پپتیک ۶۰ درصد و در بیماران بدون زخم و سرطان معده ۴۵درصد گزارش شد. فراوانی ژن vacA در بیماران سرطان معده و زخم پپتیک و همچنین بیماران بدون زخم و سرطان معده به ترتیب ۵۵ درصد، ۴۰درصد و ۲۷/۵ درصد بوده است.باقری و همکاران در سال ۱۴۰۰ حضور هلیکوباکتر پیلوری در شیر آب مصرفی بیمارستان‌های منتخب شهر تهران را با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی کردند و با این روش، شیوع باکتری ۱۰/۳ درصد گزارش شد.

راسی-بناب و همکاران در سال ۱۴۰۰الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و فراوانی ژن‌های بیماری‌زای cagA و vacA در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در بیماران شهر تبریز را بررسی کردند. بررسی ۲۲۱ نمونه بیوپسی در ۳ روز نشان از مثبت بودن ۴۵/۲۵ درصد از نمونه‌ها بود. شیوع ژن cagA (۶۳ درصد) و شیوع ژن vacA (۸۱درصد) بوده است. دهکنکیوی و دولت‌خواه در سال ۱۴۰۰ تاثیر سیگار و هلیکوباکتر پیلوری بر سرطان معده رو در یک مقاله مروری بررسی کردند. نقش مثبت سیگار در بروز سرطان معده به دلیل اثر مستقیم و غیرمستقیم اجزای ترکیبات سیگار در افزایش خطر ماندگاری هلیکوباکتر پیلوری در معده است. در این پژوهش مشخص شد، غلظت هلیکوباکتری پیلوری در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سیگاری از افراد غیر سیگاری بیشتر بوده است. ناکامورا و همکاران در سال ۲۰۰۲ این پژوهشگران مشخص کردند کشیدن سیگار باعث افزایش ورم معده آتروفیک در افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌شود.

راتلین و همکاران در سال ۲۰۰۳ به روش‌های شناسایی هلیکوباکتر پیلوری اشاره کرده‌اند و به طور ویژه به اهمیت و دقت روش‌های مولکولی مانند مولتیپلکس پی‌سی‌ار و Real-Time پی‌سی‌ار در شناسایی این باکتری تاکید نموده‌اند. چاتوپادهای و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از مولتیپلکس پی‌سی‌ار تشخیص سریع ژنوتایپینگ ژن‌های cagA و vacA هلیکوباکتر پیلوری را در نمونه بیوپسی از معده انجام دادند. مِنگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ هلیکوباکتر پیلوری را از منابع

غذایی با استفاده از مولتیپلکس پی‌سی‌ار انجام دادند. در این روش ۱۰ قطعه DNA از ۵ لوکوس ژن به طور همزمان تکثیر یافت. ۳۶ درصد از نمونه‌های غذایی مورد آزمون از نظر وجود هلیکوباکتور پیلوری و ژن‌های آن مثبت بودند. شیکاتا و همکاران در سال ۲۰۰۸: تاثیر کشیدن سیگار و عفونت هلیکوباکتر پیلوری در سرطان معده در یک جمعیت را بررسی کردند. نتایج نشان از افزایش میزان سرطان معده در افراد سیگاری مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری بود.

فدیلاح و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از M-PCR، تست سریع اوره‌آز، بافت شناسی و کشت، عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری را نمونه‌های بیوپسی از معده افراد بیمار را بررسی کردند. ۶۰درصد افراد مورد آزمون، هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند. از این ۶۰ درصد، ۹/۶ درصد توسط کشت، ۱۷ درصد توسط تست اوره‌آز، ۱۲/۶ درصد توسط بافت شناسی و ۶۰ درصد توسط M-PCR شناسایی شد. بنابراین مشخص شد در روش M-PCR، ۱۰۰ درصد نمونه‌های آلوده تشخیص داده شدند. ایدوو و همکاران در سال ۲۰۱۹ در ارتباط با تشخیص هلیکوباکتر پیلوری و ژن‌های بیماری‌زای آن (cagA, dupA, vacA) در میان بیماران دارای مشکلات گوارشی مطالعه کردند. پژوهش انجام شده در یک بیمارستان در جنوب آفریقا بود. ۲۵/۹ درصد از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری توسط محیط کشت‌ها و ۴۸/۹ درصد توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شناسایی شد. همچنین در ۶۲ درصد از نمونه‌ها ژن cagA، ۵۳/۱ درصد ژن dupA و ۹۰/۶ درصد ژن vacA شیوع داشتند.

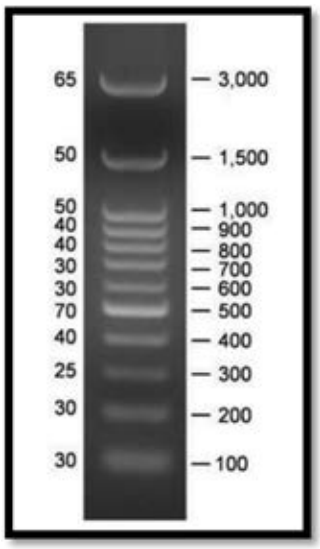
این باکتری دارای ژن‌های بیماری‌زایی که است که ایجاد بیماری‌های متعدد از جمله سرطان را در شخص آلوده و بیمار می‌کند. تشخیص باکتری با استفاده از روش‌های بیوشیمایی باکتریولوژی زمان‌بر است و با توجه به بیماری‌زا بودن باکتری، تشخیص سریع و دقیق آن حائز اهمیت است. در روش مولتی‌پلکس پی‌سی‌ار یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه، می‌توان از چندین پرایمر جهت تشخیص چندین ژن استفاده کرد. بنابراین می‌توان با استفاده از این روش حضور ژن‌های بیماری‌زا باکتری هلیکوباکتر پیلوری را در نمونه بیوپسی معده افراد به راحتی و در کمترین زمان تشخیص داد که قطعا به دنبال تشخیص زود هنگام می‌توان در ارتباط با درمان و تجویز دارو نیز سریع‌تر اقدام کرد. از این جهت در این پژوهش به بررسی حضور ۵ ژن بیماری‌زا موجود در هلیکوباکتر پیلوری در بیوپسی معده افراد بیمار و سیگاری پرداخته شده است. در این پژوهش، ۵ژن بیماری‌زا در هلیکوباکتر پیلوری با نام‌های vacA, cagA, cagT, cagE, hrgA مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

روش کار

آنزیم استفاده شده در این پژوهش، Taq DNA polymeras است که از شرکت سیناژن (ساخت ایران) خریداری شد. جهت استخراج DNA در این پژوهش، از کیت استخراج Cinapure PR881613 (شرکت سیناژن/ساخت ایران) استفاده شد.

۱.روش تهیه محلول‌ها و معرف‌ها

جهت تهیه بافر، ۱/۵۷ میلی‌لیتر اسید استیک خالص به اضافه ۲۴۲ گرم Tris base و ۳۷/۲ گرم EDTA را در ظرفی ریخته و با افزودن آب مقطر حجم کل آن به ۱ لیتر رسانیده شد. جهت تهیه بافر ۱X در تانک الکتروفورز یا ساخت ژل، بافر ۵۰X با استفاده از آب مقطر ۵۰ بار رقیق شد. لودینگ بافر ترکیبی رنگی است که دو عملکرد مهم دارد. از یک طرف افزودن آن به محصول DNA آن را سنگین‌تر می‌کند تا به خوبی در چاهک‌ها قرار بگیرد و از طرف دیگر به دلیل رنگی بودن این ترکیب و حرکت آن به همراه DNA بر روی ژل، می‌توان محل نسبی باندهای DNA را بر روی ژل تعیین و در زمان مناسب، الکتروفورز را متوقف کرد. جهت تهیه لودینگ بافر، ۰/۰۵ گرم پودر برمو فنول بلو درون ظرف مناسب ریخته و پس از افزودن ۵۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۵۰ میلی‌لیتر TAE به خوبی مخلوط می‌گردد. برای دانسیته مناسب محلول می‌توان یک قطره از محلول ساخته شده را در یک ظرف آب ریخته، لودینگ بافر باید سریعا در ظرف جای بگیرد. در صورتی‌که رنگ ته نشین نشد، با افزودن گلیسرول قابل تنظیم است. حرکت چنین رنگی در الکتروفورز، معادل یک قطعه DNA به اندازه ۵۰ جفت باز است. البته این مقدار تقریبی است و بر اساس مقدار گلیسرول می‌توان حرکت رنگ کمی سریعتر یا کندتر از این باشد. در این پژوهش، از مارکرهای وزنی شناخته شده برای اندازه‌گیری باندهای حاصل استفاده شد. این مارکرها محدوده اندازه ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز دارند (شکل ۱).



شکل ۱: مارکر وزنی ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز

روش نمونه‌گیری و کشت

در این پژوهش، ۵۰ نمونه بیوپسی

از افراد سیگاری مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری مراجعه کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان‌های شهر کرمان به عمل آمد.ابتدا از هر فرد بیمار که در پرونده آن سیگاری بودنش توسط پزشک متخصص ذکر شده بود، یک نمونه بیوپسی معده بسته به نوع بیماری از ناحیه آنتروم و یا ناحیه کورپس برای تشخیص بیماری و جهت کشت باکتری گرفته شد. نمونه‌های گرفته شده، درون محیط انتقالی تیوگلی‌کولات قرار داده شد و توسط آزمایشگاه بیمارستان، آلوده بودن آنها به هلیکوباکتر پیلوری تائید شد. مراحل انجام شده بر روی نگهداری باکتری هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیوپسی معده، به ترتیب زیر است:

- استریل کردن میکروتیوب‌ها جهت نگهداری باکتری‌ها به وسیله اتوکلاو
- انتقال باکتری‌ها به میکروتیوب‌های حاوی محیط کشت
- نگهداری میکروتیوب‌های حاوی باکتری در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام مراحل بعدی

روش استخراج DNA از باکتری

برای استخراج DNA از باکتری، از کیت (Cinna Pure-DNA) با شماره PR881613 استفاده شد.جهت شروع کار، ابتدا ویال‌های حاوی باکتری پس از خروج از فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد، در محیط بیرون قرار داده شدند تا کاملا ذوب شوند. سپس توسط میکروسانترفیوژ، آن‌ها را سانترفیوژ کرده (۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) و ادامه کار بر روی رسوب به دست آمده طبق دستور کیت انجام شد:

ابتدا، به میکروتیوب‌های حاوی رسوب باکتری، ۱۰۰ میکرولیتر از Prelysis Buffer و ۱۰ میکرولیتر از Ributinase اضافه گشت. میکروتیوب به خوبی وورتکس شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل پلی‌پروپیلین انتقال داده شد. ۴۰۰ میکرولیتر از لیزیز بافر اضافه شد و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گشت. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول Precipa-tion اضافه شد و به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد.محلول را از میکروتیوب ۱/۵ استریل پلی‌پروپیلین خارج کرده و به درون میکروتیوب Spin Colum انتقال داده شد.میکروتیوب فیلتردار با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ شد و بعد میکروتیوب حاوی محلول را دور ریخته و فیلتر بالایی به یک میکروتیوب جدید انتقال یافت. ۴۰۰ میکرولیتر از محلول Wash buffer I به فیلتر اضافه شده و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱دقیقه سانترفیوژ گشت. مایع زیری با میکروتیوبش دور ریخته شد. فیلتر به یک میکروتیوب استریل جدید انتقال داده شد و با Wash Buffer II شستشو شد. سپس به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و بعد از سانتریفیوژ محلول زیری دور ریخته شد. مرحله ۷ دوباره تکرار گردید. فیلتر را در میکروتیوب جدید گذاشته و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شد. با دقت فیلتر را به یک میکروتیوب استریل جدید انتقال داد ه و ۵۰ میکرولیتر از محلول گرم (۶۰ درجه سانتیگراد) Elution Buffer به مرکز فیلتر اضافه شد و در بن ماری ۶۵ درجه سانتگراد به مدت ۳ تا ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ شد و محلول زیری که حاوی DNA باکتری است را نگه داشته و فیلتر دور انداخته شد.

برای تعیین غلظت DNA در استوک تهیه شده، لازم است یک رقت ۱:۱۰۰ از استوک DNA ساخته شود. برای این‌کار ۱۰ میکرولیتر از نمونه DNA را به ۹۹۰ میکرولیتر میکرولیتر آب مقطر اضافه کرده و پس از هم‌زدن میکروتیوب، میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شود. نسبت میزان جذب نوری ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر نشانه کیفیت DNA نمونه است. جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بیانگر غلظت DNA در نمونه و در طول ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده غلظت پروتئین در نمونه است. در صورتی‌که نسبت OD=260 به OD=280 بیش از ۱/۸ نانومتر باشد، DNA از کیفیت کافی جهت انجام PCR برخوردار است. با این‌حال، امکان استفاده از نمونه‌های DNA با نسبت پایین‌تر از ۱/۶ نیز وجود دارد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

توالی پرایمرهای استفاد شده جهت شناسایی ژن‌های بیماری‌زای vacA، cagA، cagT، cagE و hrgA در جدول (۱) آورده شده است (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸؛ احمدی و همکاران، ۱۳۹۶).

Primer	Oligonuceotide Sequence (5′- 3′)	Amplicon size (bp)
vacA	Forward: 5′ - ATGGAAATACAACAAACACAC - 3′ Reverse: 5′ - CTGCTTGAATGCGCCAAAC - 3′	259
cagA	Forward: 5′ - GATAACAGGCAAGCTTTTGA - 3′ Reverse: 5′ - CTGCAAAAGATTGTTTGGCA - 3′	499
cagT	Forward: 5′ - ATGAAAGTGAGAGCAAGTGT - 3′ Reverse: 5′ - TCACTTACCACTGAGCAAAC - 3′	842
cagE	Forward (27F): 5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3′ Reverse (1492R): 5′ TACGYTACCTTGTTACGACTT - 3′	۳۲۹
hrgA	Forward: 5′ - TCTCGTGAAAGAGAATTTCC - 3′ Reverse: 5′ - TAAGTGTGGGTATATCAATC - 3′	594

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی

ژن‌های بیماری‌زا در مولتیپلکس پی‌سی‌اربرای انجام واکنش Multiplex PCR، از پرایمر هر ۵ ژن بیماری‌زای vacA، cagA، cagT، cagE و hrgA در هلیکوباکتر پیلوری، در یک برنامه PCR استفاده شد. مواد استفاده شده جهت انجام PCR در جدول (۲) و برنامه زمانی و دمایی واکنش PCR در جدول (۳) آورده شده است.

نام ماده	مقدار (میکرولیتر)
H2O	7/2
Buffer	2
Mgcl2	1
dNTP	1
Primer Forward	۰/۸ (۵)
Primer Reverse	۰/۸ (۵)
Taq Polymerase	۰/۳
DNA	5
حجم نهایی	۲٤/۵

جدول ۲. مواد استفاده شده جهت انجام واکنش PCR

مراحل	دما (°C)	زمان	تعدادسیکل
۱-واسرشت	۹٤	٤ دقیقه	۳۰
۲- جداسازی دو رشته	۹٤	٤٥ ثانیه	
۲-اتصال پرایمر ها	٦۰	۳۰ ثانیه	
۳- طویل‌سازی	۷۲	۹۰ ثانیه	
٤- گسترش نهایی	۷۲	٤ دقیقه	

جدول ۳. برنامه زمانی و دمایی PCR

الکتروفورز

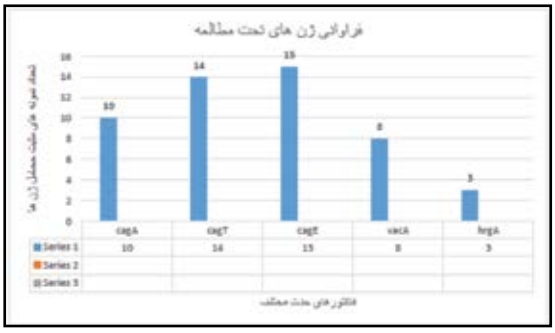
با توجه به محصول پی‌سی‌ار، ژل با غلظت ۱/۵ درصد آگارز ساخته شد. برای این منظور، ۱/۰۵ پودر آگارز را درون یک ارلن کوچک ریخته و ۱/۴ میلی‌لیتر بافر X۵۰ به آن اضافه و حجم نهایی آن با آب مقطر به ۷۰ میلی‌لیتر رسانیده شد. ارلن را در مایکروویو گذاشته تا برای چند دقیقه بجوشد و آگارز آن حل شود. محلول شفاف به دست آمده را به آرامی در سینی ژل حاوی شانه ریخته تا اینکه ژل ببندد. سپس بفر درون تانک ریخته شده تا جاییکه وری تمامی چاهک‌ها بپوشاند. ژل آگارز با تعداد چاهک‌های مورد نیاز تهیه و در داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE (به‌طوری که چاهک‌ها در قطب منفی قرار بگیرند) قرار داده شد. سپس به وسیله یک سمپلر ۱۰ میکرولیتری، ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر محلول لودینگ بافر مخلوط شد و در درون هر چاهک به میزان ۱۰ لاندا ریخته شد. همچنین در یک چاهک نیز محلول مارکر وزنی جهت تشخیص وزن مولکولی باند ایجاد شده اضافه گردید. سپس منبع تغذیه متصل به تانک را روشن کرده و الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ تا حداکثر ۱۲۰ میلی‌ولت به مدت ۱ ساعت انجام شد. سطح بافر در تانک باید ۱ تا میلی‌متر بالاتر از سطح ژل باشد (شکل ۳-۲). در صورتی که سطح بافر از ژل خیلی بالاتر باشد حرارت زیادی ایجاد می‌شود. بعد از انجام الکتروفورز، منبع تغذیه خاموش و ژل برای بررسی و عکسبرداری در دستگاه ژل داک قرار داده شد و از ژل عکس گرفته شد و بندهای ایجاد شده مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته ها

با توجه به نتایج به دست آمده از مجموع ۵۰ نمونه بیوپسی، ٤٤ نمونه (۸۸ درصد) از نظر وجود ژن‌های حدت (بیماری‌زا) مختلف هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند و برخی از نمونه‌ها چند ژن حدت را همزمان دارا بودند. آنالیز مولکولی ژن‌های تحت مطالعه نشان داد فراوانی ژن‌های بیماری‌زای vacA، cagA، cagT، cagE و hrgA در ۵۰ نمونه به ترتیب برابر با ۸ (۱۶ درصد)، ۱۰ (۲۰ درصد)، ۱۴ (۲۸ درصد)، ۱۵ (۳۰ درصد)، ۳ (۶ درصد) بود. این نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین فراوانی ژن‌ها به ترتیب مربوط به ژن hrgA (در ۳ نمونه، ۶ درصد) و cagE (در ۱۵ نمونه، ۳۰ درصد بوده است). در جدول (۵)فراوانی ژن‌های بیماری‌زا در نمونه‌های بیوپسی تحت مطالعه آورده شده است. در شکل (۲) فراوانی ژن‌های تحت مطالعه آورده شده است.

ژن حدت	vacA	cagA	cagT	cagE	hrgA
تعداد (درصد) نمونه‌های حامل ژن‌ها	۸ (% ۱۶)	(%۲۰) ۱۰	(%۲۸) ۱٤	(%۳۰) ۱۵	۳ (% ٦)

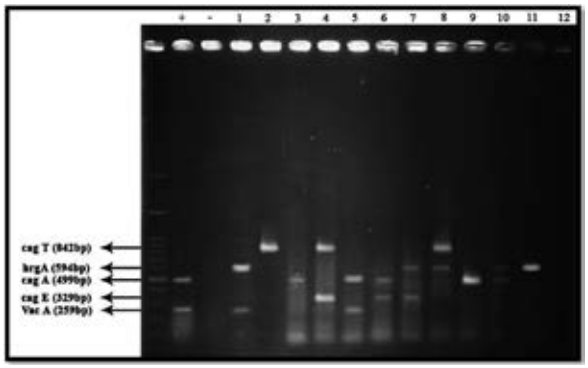
جدول٤. فراوانی ژن‌های بیماری‌زا در نمونه‌های بیوپسی تحت مطالعه



شکل ۲: فراوانی ژن‌های بیماری‌زا در نمونه‌های بیوپسی تحت مطالعه

در شکل (۳)نتیجه آزمایش M-PCR بر روی نمونه‌های بیوپسی معده افراد سیگاری آلوده به هلیوباکتر پیلوری آورده شده است.

طول باند ژن‌های cagA، cagT، cagE، vacA و hrgA به ترتیب برابر با ۴۹۹، ۸۴۲، ۳۲۹، ۲۵۹ و ۵۹۴ جفت باز بود.



شکل ۳: ژل الکتروفورز به دست آمده از نمونه‌های بیوپسی معده افراد سیگاری آلوده به هلیوباکتر پیلوریچاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ bp، کنترل مثبت، کنترل منفی

بحث

با توجه به گزارش سازمان جهانی گوارش بیش از نیمی از جمعیت جهان، مبتلا به باکتری هلیکوباکتر پیلوری هستند. ابتلا به این باکتری، به آب و هوای منطقه و شرایط اجتماعی و اقتصادی وابسته است. روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص حضور و عفونت با هلیکوباکتر پیلوری موجود است و روش هیستوپاتولوژی یک روش حساس به شمار می‌رود. در مطالعات مختلفی نشان داده شده است که روش PCR به عنوان روش حساس‌تری نسبت به اوره‌آز سریع و آنتی‌ژن مدفوعی است که برای تشخیص وجود هلیکوباکتر پیلوری و آلودگی به آن استفاده می‌شود. مناسب‌ترین روش‌های مولکولی که برای تایید حضور باکتری انجام می‌شود بر پایه روش PCR با پرایمرهای srRNA۱۶ و glmM است (شاهی و همکاران، ۱۳۹۴).از آنجایی‌که اساس مبارزه با عوامل عفونی تشخیص سریع بیماری و به دنبال آن درمان کامل بیمار است، تاکید عمده بر روی دستیابی به روش‌های هر چه سریع‌تر و دقیق‌تر تشخیصی برای این بیماران می‌باشد. امروزه به منظور غلبه بر محدویت‌های مربوط به کشت، روش‌های مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توسعه یافته و برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بالینی و محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از مزایای روش‌های مبتنی بر DNA شناسایی سریع‌تر و امکان تشخیص مقدار کم DNA باکتری در نمونه‌های استفاده شده است. برای تشخیص مولکولی هلیکوباکتر پیلوری، عموما از ژن‌های هدف مانند srRNA ۱۶، توالی‌های تصادفی کروموزوم، SSA، ureA، ureC با نام جدید فسفوگلوکوموتاز (glmM) استفاده می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که در روش‌های مولکولی، شناسایی ژن glmM مطمئن‌ترین راه تشخیص هلیکوباکتر پیلوری است (چمن‌رخ و همکاران، ۱۳۹۵).

در پژوهش حاضر از مجموع ۵۰ نمونه بیوپسی، ٤٤ نمونه (۸۸ درصد) از نظر وجود ژن‌های حدت (بیماری‌زا) مختلف هلیکوباکتر پیلوری مثبت بودند و برخی از نمونه‌ها چند ژن حدت را همزمان دارا بودند.آنالیز مولکولی ژن‌های مورد مطالعه نشان داد فراوانی ژن‌های بیماری‌زای vacA، cagA، cagT، cagE و hrgA در ۵۰ نمونه به ترتیب برابر با ۸ (۱۶ درصد)، ۱۰ (۲۰ درصد)، ۱۴ (۲۸ درصد)، ۱۵(۳۰ درصد)، ۳ (۶ درصد) بود. نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین فراوانی ژن‌ها به ترتیب مربوط به ژن hrgA (در ۳ نمونه، ۶ درصد) و cagE (در ۱۵ نمونه، ۳۰ درصد بوده است).چادوپادهای و همکاران (۲۰۰۴)، مانند پژوهش حاضر با استفاده از مولتیپلکس پی‌سی‌ار تشخیص سریع ژنوتایپینگ ژن‌های cagA و vacA هلیکوباکتر پیلوری را در نمونه بیوپسی از معده انجام دادند. نتایج پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد عفونت با سویه‌های دارای ژن بیماری‌زا cagA باعث افزایش خطر علاوم کلینیکی به ویژه در افراد مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۶).مولایی و همکاران (۲۰۱۰) فراوانی ژن cagA را ۷۹/۶ درصد در بیماران گزارش نمودن که با پژوهش حاضر مغایرت دارد که می‌تواند به دلیل نوع بیماری و سیگاری بودن افراد باشد. دوستی و همکاران (۱۳۸۷) در شهرکرد و دورقی و همکاران (۱۳۸۸) در تهران میزان فراوانی ژن cagA را به ترتیب ۸۳/۵ و ۸۲/۲ درصد بیان کردند که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی ندارد.

از جمله دلایل عدم همخوانی می‌توان به سیگاری بودن افراد، تفاوت جغرافیایی، سال مطالعه، نوع نمونه جمع‌آوری شده و اختلاف در پرایمرهای استفاده شده جهت جستجوی قطعه ژن مورد نظر باشد.عبدالهی و همکاران (۲۰۱۳) در تهران فراوانی ژن cagA را ۳۵/۱۸ درصد گزارش کردند که تقریبا نزدیک به فراونانی این ژن در پژوهش حاضر است. بقایی و همکاران (۱۳۸۹) شیوع ژن‌های cagA و cagE را در هلیکوباکتر پیلوری با مشکلات معده بررسی و میزان آن به ترتیب ۶۶/۷ درصد و ۳۹ درصد بود که با فراوانی ژن cagE در پژوهش حاضر همخوانی دارد. گودرزی و همکاران (۱۳۹۱) فراوانی ژن cagA موجود در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده را بررسی و برابر با ۶۳/۹ درصد بوده است که با پژوهش حاضر در یک راستا قرار ندارد.احمدی و همکاران (۱۳۹۶) فراوانی ژن‌های cagA، cagT، cagE و hrgA در هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرج را بررسی و شیوع این ژن‌ها به ترتیب برابر با ۳۲ درصد، ۱۶ درصد، ۲۶ درصد، ۱۴ درصد و ۳۴ درصد بود که تقریبا و با اختلاف اندکی با پژوهش حاضر در یک راستا قرار دارد.

حیدری و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند فراوانی ژن vacA

در بیماران مبتلا به سرطان معده و زخم معده بیشتر است. مطالعه راسی‌بناب و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی ۲۲۱ نمونه بیوپسی نشان داد ۴۵/۲۵ درصد نمونه‌ها از نظر وجود هلیکوباکتر پیلوری مثبت بوده است. شیوع ژن cagA (۶۳ درصد) و vacA (۸۱ درصد) بوده است که بسیار بیشتر از شیوع ژن‌ها در مطالعه حاضر بوده است و نتایج با یکدیگر همخوانی ندارند. همچنین در مطالعه مروری دهکنویکی و دولت‌خواه (۱۴۰۰) که در ارتباط با تاثیر سیگار و هلیکوباکتر پیلوری بر روی سرطان معده بوده است مشخص شد سیگار در بروز سرطان معده به دلیل نقش خود ترکیبات سیگار و همچنین نقش ترکیبات سیگار در افزایش خطر ماندگاری هلیکوباکتر پیلوری در معده است. غلظت هلیکوباکتری پیلوری در بیماران مبتلا به سرطان معده و افراد سیگاری از افراد غیر سیگاری بیشتر است.به طوری‌که ناکامورا و همکاران (۲۰۰۲) مشخص کردند کشیدن سیگار باعث افزایش ورم معده آتروفیک در افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌شود.ایدو و همکاران (۲۰۱۹) شیوع ژن‌های بیماری‌زای آن (cagA, dupA, vacA) در میان بیماران دارای مشکلات گوارشی را بررسی که در ۶۲ درصد از نمونه‌ها ژن cagA، ۵۳/۱ درصد ژن dupA و ۹۰/۶ درصد ژن vacA شیوع داشتند که نسبت به پژوهش حاضر میزان شیوع بیشتر بوده است.

ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری یک رخداد جهانی است و به محل زندگی شخص بستگی ندارد چرا که گزارش‌های متعدد از شهرهای مختلف در ایران و جهان در ارتباط با شیوع ژن‌های باکتری و خود باکتری وجود دارد. شیوع آن به جنسیت ارتباط ندارد و مصرف الکل، سیگار، داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی موجب افزایش ابتلا به عفونت باکتری نمی‌شود. کشیدن سیگار خود عامل ایجاد سرطان معده و مشکلات مربوط به آن است و زمانی که با عفوت پیلوری همراه شود بیماری تشدید می‌گردد (شیکاتا و همکاران، ۲۰۰۸)، اما ارتباطی بین کشیدن آن و ژن‌های بیماری‌زای باکتری وجود ندارد چرا که در پژوهش حاضر مشخص شد درصد شیوع ژن‌های بیماری‌زای هلیکوباکتر پیلوری در افراد سیگاری پایین است.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین فراوانی ژن‌ها به ترتیب مربوط به ژن hrgA (در ۳ نمونه، ۶ درصد) و cagE (در ۱۵ نمونه، ۳۰ درصد بوده است). با توجه به فراوانی شیوع ژن‌ها در این افراد، ارتباطی بین کشیدن سیگار و عفونت هلیکوباکتری پیلوری وجود ندارد یا خیلی کم است، چراکه درصد شیوع ژن‌های بیماری‌زا در افراد سیگاری پایین بوده است. با توجه به بیماری‌زایی هلیکوباکتر پیلوری پیشنهاد می‌شود الگوی مقاومت یا حساسیت این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مورد سنجش قرار بگیرد. شیوع این باکتری در مناطقی که آب سالم و تصفیه شده در دسترس ندارند مورد بررسی قرار گیرد. درصد ژن‌های بیماری‌زای باکتری در افرادی‌که دچار سرطان معده شده‌اند را در مناطق مختلف بررسی کرد.نقش گیاهان مختلف بر روی بیان ژن‌های بیماری‌زا را بررسی کرد.

منابع

۱-احمدی ا، امینی ک، ساده م. ۱۳۹۶. فراوانی ژن‌های cagA،cagT،cagE، vacA و hrgA جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرج طی سال ۱۳۹۵. دو ماهنامه فیض، ۲۱(۶): ۵۶۲-۵۷۰.

۲- باقری ن، کاشی گ، تشیعی ح. ۱۴۰۰. بررسی حضور هلیکوباکتر پیلوری در شیر آب مصرفی بیمارستان‌های منتخب شهر تهران با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در سال ۱۳۹۹. فصلنامه پژوهش در بهداشت محیط، ۷(۳): ۲۴۴-۲۵۶.

۳-بقایی ک، شکرزاده ل، جعفری ف، بلفیون م، مشایخی ر، زجاجی ه، زالی م. ۱۳۸۹. بررسی ارتباط ژن‌های cagA و cagE موجود در هلیکوباکتر پیلوری با مشکلات معده در بیماران ایرانی. پژوهنده، ۱۵(۴): ۱۳۷-۱۴۲.

۴-توکلی م، پورتقی ه. ۱۳۹۶. تشخیص مولکولی ژن‌های حدت و الگوی مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی در باکتری اشرشیا کولی(STEC) در موارد ورم پستان بالینی: استان البرز، ایران. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، ۱۸(۳): ۲۰۸-۲۱۱.

۵-چمن‌رخ پ، شاه حسینی م ح، مظاهری‌اسدی م، نژادستاری ط، اسماعیلی د. ۱۳۹۵. ارزیابی میزان بقای فرم‌های غیر قابل کشت هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های آب. مجله دنیای میکروب‌ها، ۹(۴): ۳۳۷-۳۴۵.

۶-حیدری خ، کابوسی ح، جمالی آ، قائمی ع، پیروی قادیکلایی ف. ۱۳۹۸. بررسی فراوانی ژن‌های بیماری‌زای cagA و vacA را در جدایه‌های هلیکوباکتر پیلوری بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، ۱۳(۱): ۸۱-۹۰.

۷-خوش‌بین م، شاه‌حسینی م ح، پاکنژادی م. ۱۳۹۸. تشخیص مولکولی هلیکوباکتر پیلوری در مایع منی مردان نابارور. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، ۹(۳۶): ۶۷-۷۷.

شاهی ح، مقنی م، شیرزاد ه. ۱۳۹۴. ارتباط بین تراکم شدید هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های بیوپسی معده با مصرف سیگار و سن در افراد سیگاری آلوده به این باکتری. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، ۹(۱): ۱-۷.

۸-صمیمی ر، پیمانی ا، روحی س، نعمتی ش، احمدی س. ۱۴۰۱. بررسی همزمانی ابتلا به اختلالات مجاری تنفسی فوقانی با عفونت‌های گوارشی هلیکوباکتر پیلوری در بیمارن: یک مرور نظام‌مند و فراتحلیل. مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۸۰(۳): ۲۱۷-۲۲۹.

۹-گودرزی ح، رضایی ه، رفیع‌زاده م، تقوی ا، میرصمدی ا. بررسی فراوانی ژن cagA هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده در استان تهران طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۹. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ۱۵(۵): ۴۲-۴۸.

۱۰-میلانی م، صومی م، اکبرزاده ا. ۱۳۹۷. شیوع ژن‌های babB, babA2, oipA در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از مبتلایان به علائم گوارشی. مجله پزشکی ارومیه، ۲۹(۴): ۲۵۵-۲۶۳.