مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره دوم، ۱۳۸۸
صفحات ۱۰۰-۹۷

Original Article

ارزیابی شیوع هلیکوباکتر هپاتیکوس با روش PCR در موش های خانگی (*Mus musculus*) استان اصفهان

دکتر عباس دوستی[۱*]، علی ظهور[۲]، مریم باقرنژاد[۳]، صادق قربانی دالینی[۳،۴]

[۱]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، [۲]گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور گلپایگان،
[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، [۴]دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر هپاتیکوس یکی از شایع ترین گونه‌های هلیکوباکتر می‌باشد. این باکتری یکی از عوامل مهم ایجاد بیماری‌های گوناگون گوارشی، صفراوی، و کبدی می‌باشد. موش متداول‌ترین میزبان این باکتری است و نقش مهمی در انتقال بیماری‌های مشترک انسان و حیوان دارد. هدف از این پژوهش تعیین میزان شیوع هلیکوباکتر هپاتیکوس در موش های خانگی سطح استان اصفهان با روش PCR می باشد.

مواد و روش ها: این پژوهش یک بررسی مقطعی ـ توصیفی است که در تابستان ۱۳۸۸ بر روی ۲۶۱ موش جمع آوری شده از سطح استان اصفهان انجام گردید. پس از تشریح موش ها در شرایط استریل، نمونه ها (بافت کبد) جداسازی گردید. سپس از پرایمر های عمومی به منظور شناسایی جنس هلیکوباکتر و از پرایمر های اختصاصی برای شناسایی هلیکوباکتر هپاتیکوس استفاده گردید.

یافته ها: جنس هلیکوباکتر در ۷۲٪ از کل نمونه ها شناسایی گردید. از این میزان ۴۲٪ متعلق به گونه هپاتیکوس بود. با آزمون آماری نسبت ها مشخص شد که ارتباط معنی داری بین جنس هلیکوباکتر و گونه هپاتیکوس در تمام مناطق مورد بررسی وجود دارد.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه منطقه مورد بررسی، یکی از مناطق پرخطر از نظر ابتلا به گونه های مختلف هلیکوباکتر محسوب می‌شود. انجام پایش گسترده و حذف موش‌های خانگی به منظور کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد.

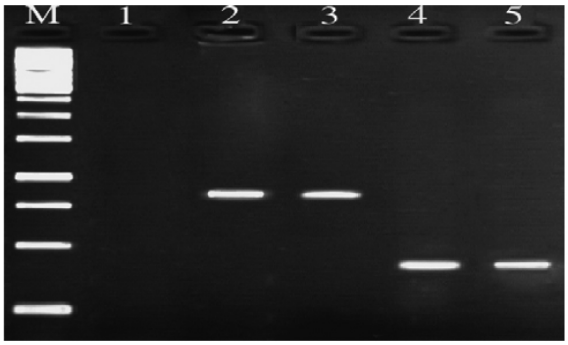
واژگان کلیدی: هلیکوباکتر هپاتیکوس، ژن *16S rRNA*، موش خانگی

دریافت مقاله: بهار ۸۸ پذیرش برای چاپ: تابستان ۸۸

مقدمه

گونه‌های هلیکوباکتر به دو گروه اصلی گونه های هلیکوباکتر معده‌ای و گونه های انتروهپاتیک (هلیکوباکتر غیر معده‌ای) تقسیم می‌شوند. گونه های انتروهپاتیک هلیکوباکتر در دستگاه گوارش تحتانی به ویژه ایلئوم، کلون و مجاری صفراوی انسان‌ها و دیگر پستانداران یافت می شوند. همچنین مزمن شدن عفونت موجب التهاب مزمن و تکثیر بیش از حد سلول اپیتلیال و بیماری‌های نئوپلاستیک می گردد. انتروهپاتیک‌ها شامل گونه‌های متفاوت زیادی هستند که از نظر مورفولوژی، فراساختار و شرایط رشد، وجود و عدم وجود فاکتور ویرولانس و اوره آز متفاوت هستند (۱). گونه های متعددی از این گروه مانند *H. bilis*، *H. hepaticus*، *H. rodentium*، *H. typhlonius* و *H. muridarum* موجب آلودگی جوندگان به ویژه موش می‌گردند. در پژوهش‌های اخیر ارتباط بین این گونه‌ها و بیماری‌های گوارشی، کبدی و صفراوی در انسان نشان داده شده است (۲ و ۳). هلیکوباکتر هپاتیکوس شایع‌ترین گونه ایجاد کننده عفونت در موش و سایر جوندگان می‌باشد. با وجود شناسایی اولیه این باکتری در کبد، محل اولیه استقرار هلیکوباکتر هپاتیکوس ناحیه روده ای است. این باکتری از نظر مورفولوژی شبیه گونه های کمپیلوباکتر است و دو فلاژله دو قطبی غلافدار دارد. تست های بیوشیمیایی اوره آز، کاتالاز و

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰
پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com



شکل۱: انجام PCR با پرایمر های عمومی (برای تشخیص جنس هلیکوباکتر) و اختصاصی (برای تشخیص گونه هپاتیکوس). شماره ۱، کنترل منفی، شماره های ۲و۳ باند ۷۸۱ جفت بازی و نشان دهنده جنس هلیکوباکتر و شماره های ۴و۵ باند ۴۱۷ جفت بازی و نشان دهنده هلیکوباکتر هپاتیکوس می‌باشدM، سایز مارکر (۱kb).

اکسیداز این باکتری مثبت است و بر روی تمام محیط‌های کشت استاندارد هلیکوباکتر پیلوری رشد می کند. همچنین شرایط رشد این باکتری مشابه هلیکوباکتر پیلوری است (۴).

با توجه به نقش مهم موش خانگی در انتقال بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان (zoonotic)، بررسی میزان شیوع آلودگی هلیکوباکتر هپاتیکوس در این حیوان از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. هدف از این پژوهش تعیین میزان شیوع هلیکوباکتر هپاتیکوس در موش های خانگی استان اصفهان با روش PCR است.

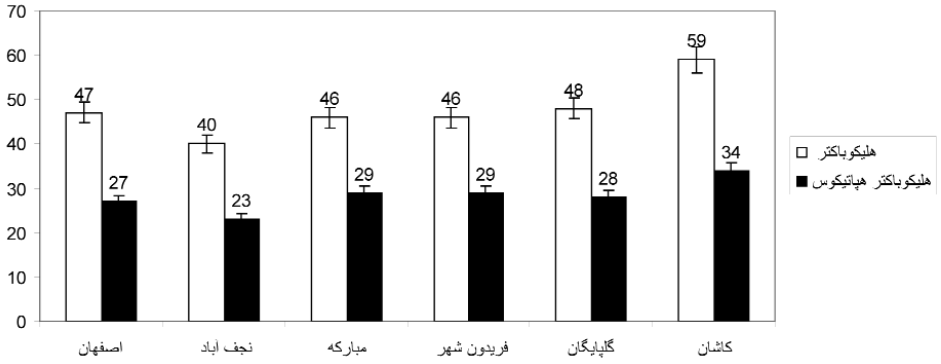
مواد و روش ها

این پژوهش یک بررسی مقطعی ـ توصیفی است که در تابستان ۱۳۸۸ بر روی ۲۶۱ موش جمع آوری شده با روش تصادفی از مناطق مختلف استان اصفهان شامل شهر های اصفهان، نجف آباد، مبارکه، فریدون شهر، گلپایگان و کاشان انجام گردید. پس از تشریح موش‌ها در شرایط استریل، بافت کبد نمونه‌ها جداسازی گردید. به منظور استخراج DNA از کیت استخراج ساخت شرکت سیناژن استفاده گردید و کیفیت DNA استخراج شده توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. از پرایمر های عمومی HU-F و HU-R به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* و شناسایی میزان آلودگی نمونه ها با جنس هلیکوباکتر استفاده گردید و برای شناسایی اختصاصی هلیکوباکتر هپاتیکوس از پرایمرهای F-H-hepa و H-hepa-R استفاده شد (جدول ـ۱) (۵).

روش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf Mastercycler, gradient,) با شرایط: حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (Hotstart)، در ادامه ۳۲ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Denaturation)، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه (Annealing) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (Extension) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (Final Extension) انجام شد. برای این منظور ۲ میکرولیتر از DNA الگو (DNA استخراج شده از بافت کبد)، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۸ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰ میلی مولار) و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز اضافه گردید. ۲ میکرولیتر از محصول PCR یاد شده به عنوان DNA الگو برای دومین واکنش PCR جهت شناسایی اختصاصی هلیکوباکتر هپاتیکوس به کار برده شد. تمام مراحل یاد شده برای دومین واکنش PCR مشابه بود و تنها در مرحله Annealin دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد جایگزین گردید. محصول PCR برای پرایمرهای عمومی و اختصاصی به ترتیب به طول۷۸۱ و ۴۱۷ جفت باز بود (شکل ۱). محصولات PCR بدست آمده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و مشاهده با نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس نتایج حاصل با آزمون نسبت‌ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مرز معنی داری در ۱.۹۶٪ < z در نظر گرفته شد.

ژن	موقعیت آمپلیکون	پرایمر	آمپلیکون(bp)
16S rRNA	۲۵۴–۲۷۱ ۱۰۱۸–۱۰۳۵	HU-F: CTATGACGGGTATCCGGC HU-R: CTCACGACACGAGCTGAC	۷۸۱
16S rRNA	۵۶۹–۵۸۹ ۹۶۹–۹۸۶	Hepa-F:GCATTTGAAACTGTTACTCTG H-hepa-R: CTGTTTTCAAGCTCCCC	۴۱۷

جدول ـ ۱: پرایمر های عمومی و اختصاصی به منظور شناسایی جنس هلیکوباکتر و هلیکوباکتر هپاتیکوس.



نمودار ـ ۱: میزان آلودگی موش های خانگی به جنس هلیکوباکتر و هلیکوباکتر هپاتیکوس مناطق مختلف استان اصفهان.

نتایج

جنس هلیکوباکتر در ۷۲٪ از کل نمونه ها شناسایی گردید. بیشترین شیوع مربوط به کاشان (۷۹٪) و کمترین میزان شیوع مربوط به فریدون شهر (۶۱٪) بود. از مجموع هلیکوباکترهای شناسایی شده، ۴۲٪ آن به گونه هپاتیکوس تعلق داشت. بیشترین میزان هلیکوباکتر هپاتیکوس مربوط به کاشان (۳۴ نمونه) با فراوانی ۴۵٪ و کمترین میزان آن مربوط به نجف آباد (۲۳ نمونه) با فراوانی ۴۲٪ بود.

با آزمون نسبت ها مشخص گردید که ارتباط معنی داری بین جنس هلیکوباکتر و گونه هپاتیکوس در تمام مناطق مورد بررسی شامل اصفهان (z =۲/۳۳)، نجف آباد (z =۲/۵)، مبارکه (z =۲/۴۴)، فریدون شهر (z =۲)، گلپایگان (z=۲/۴۵) و کاشان (z =۲/۴۵) وجود دارد. میزان آلودگی مناطق مختلف به جنس هلیکوباکتر و هلیکوباکتر هپاتیکوس در نمودار ۱ نشان داده شده است.

بحث

از زمان کشف هلیکوباکترپیلوری تا کنون ۳۰ گونه دیگر هلیکوباکتر از دستگاه گوارش و کبد پستانداران و پرندگان جدا گردیده است. هلیکوباکتر هپاتیکوس مهم ترین و فراوان ترین گونه ایجادکننده عفونت در موش و به دنبال آن در انسان می باشد که برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ توسط Fox و همکارانش از کبد موش جدا گردید. این باکتری موجب هپاتیت فعال، فیبروز و سرطان کبد و همچنین اختلالات و التهاب شکمی در موش می‌گردد (۶).

باکتری هلیکوباکتر هپاتیکوس با بیماری‌های گوناگونی در انسان ارتباط دارد. Matsukura و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در ژاپن با روش PCR هلیکوباکتر بیلیس را از نمونه های بیوپسی کیسه صفرای یک فرد مبتلا به سرطان کیسه صفرا جدا سازی نمودند (۷). Kubayashi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با روش PCR هلیکوباکتر هپاتیکوس را از نمونه های کبد و صفراوی افراد مبتلا به سرطان‌های دستگاه صفراوی و کبد جداسازی نمودند (۸). Nilsson و همکارانش در سال ۲۰۰۶ در سوئد با روش PCR گونه‌های گوناگون هلیکوباکتر از جمله هلیکوباکتر هپاتیکوس را از نمونه های بافتی کیسه صفرا و پانکراس بیماران مبتلا به نئوپلازی نورواندوکراین (neuroendocrin)، سرطان پانکراس و کیسه صفرا شناسایی کردند (۳). با توجه به گسترش رو به رشد شیوع انواع گونه‌های هلیکوباکتر به ویژه هلیکوباکتر هپاتیکوس و ارتباط آنها با ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان، شناسایی میزان آلودگی میزبان‌های طبیعی مانند موش خانگی به دلیل نقش مهم آن‌ها در توسعه عفونت امری اجتناب ناپذیر می‌باشد (۶).

Shames و همکارانش در سال ۱۹۹۵ با روش‌های کشت و PCR این باکتری را از موش جدا کردند (۹). Malarkey و همکارانش در سال ۱۹۹۷ با روش PCR-RFLP هلیکوباکتر هپاتیکوس را در کبد ۱۰ تا ۸۰ درصد نمونه های تهیه شده از موش در مناطق مختلف امریکا شناسایی کردند (۱۰). Fox و همکارانش در سال ۱۹۹۸، ۴۴ موش را از نظر میزان آلودگی با این باکتری با دو روش کشت و PCR بررسی کردند. با روش PCR، ۲۱ موش (۴۷٪) و با روش کشت ۱۴ موش (۳۲٪) آلوده به این باکتری بودند (۱۱).

Whary و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با روش‌های PCR و ELISA گونه‌های *H. bilis*، *H. hepaticus* و *H. rodentium* را در موش شناسایی کردند (۱۲). Goto و همکارانش در سال ۲۰۰۰ هلیکوباکتر هپاتیکوس را در ۲۵/۵ درصد از موش‌ها شناسایی کردند (۱۳). در این بررسی جنس هلیکوباکتر در ۷۲٪ از نمونه‌ها شناسایی گردید که از این تعداد ۴۳٪ از گونه ها متعلق به *H. hepaticus* بود.

نتیجه گیری

از آنجایی که ارتباط زیادی بین شیوع گونه‌های مختلف

هلیکوباکتر و بیماری های کبدی و صفراوی در انسان وجود دارد و با توجه به ابتلای اکثر نمونه‌های این منطقه به این گونه ها، حذف موش‌ها جهت از بین بردن مخزن آلودگی و جلوگیری از انتشار بیماری‌های گوناگون پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل پشتیبانی اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می‌دارند.

References

1. Kusterrs JG , Vliet AHM and Kuipers EJ . Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection . Clin Microbio Rev . 2006. 19(3):449-490.
2. Ananieva O, Nilsson I, Vorobjova T, Uibo R, and Wadstrom T. Immune responses to bile-tolerant *Helicobacter* species in patients with chronic liver diseases, a randomized population group, and healthy blood donors. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002. 9:1160-1164.
3. Nilsson I, Kornilovs'ka I, Lindgren S, Ljungh A. and Wadstrom T. Increased prevalence of seropositivity for non-gastric *Helicobacter* species in patients with autoimmune liver disease. J. Med. Microbiol. 2003. 52:949-953.
4. Kusters JG and Kupier EJ. Non- *pylori Helicobacter* Infection in Human .Eur J Gastroentrol Hepatol. 1998. 10:239-241.
5. Zenner L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 1999. 22:41-61.
6. Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ. Gorelick JPL and Ward JM. *Helicobacter hepaticus sp.* nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. J Clin Microbiol. 1994; 32:1238-1245.
7. Matsukura N, Yokomura S, Yamada S, Tajiri T, Sundo T, Hadama T, Kamiya S, Natio Z, Fox JG. Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant disease in the biliary tract. Jpn J Cancer Res. 2002. 93:842-847.
8. Kobayashi T, Harada K, Miwa K, Nakanuma Y. *Helicobacter* genus DNA fragments are commonly detectable in bile from patients with extrahepatic biliary disease and associated with their pathogenesis. Dig Dis Sci. 2005. 50:862-867.
9. Shames B, Fox JG, Dewhirst F, Yan L, Shen Z, Taylor NS. Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. J Clin Microbiol. 1995. 33:2968-2972.
10. Malarkey DE, Ton TV, Hailey JR. and Devereux. A PCR-RFLP method for the detection of *Helicobacter hepaticus* in frozen or fixed liver from B6C3F1 mice. Tox Pathology. 1997. 25(6):606-612.
11. Fox JG, Macgregor JA, Shen Z. and Li X. Comparison of methods of identifying *Helicobacter hepaticus* in B6C3F1 mice used in a carcinogenesis bioassay. J of Clin Microbiol. 1998. 36(5):1382-1387.
12. Whary MT, Cline JH, King AE, Hewes KM, Chojnacky D, Salvarrey A, Fox JG. Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium*, and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. Comp Med. 2000. 50:436-443.
13. Goto K, Ohashi H, Takakura A, and Itoh T. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils and hous musk shrew in Japan. Current Microbiology. 2002. 41:161-166.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 2, 2009

Evaluation the rate of Helicobacter hepaticus in Mus musculus in Esfahan province by PCR

Abbas Dooosti[1], Ali Zohur[2], Maryam Baghernejad[3], Sadegh Ghorbani-Dalini[3,4]

[1]Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
[2]Department of Biology, Payame Noor University, Golpayegan Branch, Golpayegan, Iran
[3]Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
[4]Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran, Young Researcher's Club

Abstract

Background and Objective: Various *Helicobacter* species causes contamination of birds, human and other mammals. *H.hepaticus* infection associated with intestinal, biliary and hepatic disorders such as liver, gall bladder and pancreas cancers. Mus musculus is the most common host of this bacteria that play an important role in transmission of zoonotic infection. The aim of this study was determination of the rate of *H.hepaticus* in Mus musculuses of Esfahan province by PCR.

Material and methods: This was a cross-sectional study, which was done on 261 Mus musculuses isolated in Esfahan in 2009. Following the description of mice in steril condition hepatic samples isolated. Then for identification Helicobacter genus and *H.hepaticus*, general and specific primers were used respectively.

Results: *Helicobacter* genus identified in 72% of tatal samples. Out of all Helicobacter genus 42% was be *H.hepaticus*.

Conclusion: According high rate of *Helicobacter* species infection, it sounds that the widespread surveillance of Mus musculuses in studied area was be necessary.

Keywords: H.hepaticus, 16SrRNA, Mus musculus

Correspondence to: Dr. Abbas Doosti
Tel: (+98)913 383 8830
Email: abbasdoosti@yahoo.com
Journal of Microbial world 2009, 2(2), 97-100