



ژنوتایپینگ سویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه های بیوپسی در شهرستان شهرکرد به روش RAPD PCR

حسین آقاجانی^{۱*}، حسین خداپنده^۱

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
هلیکوباکتر پیلوری از عوامل مهم بیماری های گوارشی می باشد. از آن جا که تنوع ژنتیکی درون جمعیت هلیکوباکتر پیلوری به میزان زیاد رخ می دهد، با روش هایی مانند RAPD-PCR رابطه ی احتمالی بین ژنوتیپ های ویژه ی هلیکوباکتر پیلوری و بیماری های مختلف معده را تعیین کرد. در این تحقیق الگوی ژنتیکی سویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مختلف دچار سوهاضمه با روش RAPD-PCR بررسی شدند. طی این مطالعه نمونه های بیوپسی ۴۰ بیمار شامل ۲۰ بیمار طبیعی، ۱۶ بیمار دچار زخم و ۴ بیمار دچار سرطان، با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن، استخراج DNA آن ها صورت گرفت و در حضور پرایمر 16srRNA تشخیص قطعی سویه ها انجام شد و ژنوتایپینگ سویه ها به روش RAPD-PCR صورت گرفت. در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری تمامی نمونه ها با داشتن باند ۱۰۹ جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند. در دندروگرام به دست آمده در آزمون RAPD-PCR در ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی در نمونه های بیوپسی به طور کلی قرابتی بین ۵۴ تا ۹۸ درصد در میان جدایه ها مشهود است. تمامی جدایه ها در ۹ خوشه اصلی از یکدیگر متمایز شدند. در ضریب تشابه ۸۰ درصد مجموعاً ۳۰ پروفایل شامل ۹ خوشه و ۲۱ نقطه جداگانه شناسایی شد. در بررسی قطعات DNA الکتروفورتیک اشکال زیر مشاهده گردید که نتایج به دست آمده از نظر ژنتیکی متنوع و ناهمگن است. نتایج به دست آمده بر روی ۲۰ سویه جدا شده از بیماران طبیعی نشان داد که هر یک از سویه ها الگوی انگشت نگاری ژنتیکی مخصوص به خود را دارند.	تاریخچه مقاله: دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۸ چاپ: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵ DOI: کلمات کلیدی: بیوپسی، ژنوتایپینگ، هلیکوباکتر پیلوری، RAPD-PCR * نویسنده مسئول: Email bardiyaaghajaninezaki@gmail.com

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باسیل گرم منفی و میکروآتروفیلی است که در مخاط معده اغلب به صورت مارپیچی و در محیط کشت به صورت خمیده دیده می‌شود. این باکتری پاتوژنی با پتانسیل بالای تغییرات ژنتیکی است که می‌تواند میلیون‌ها انسان را به صورت مزمن در سراسر جهان آلوده کند. این باکتری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی، سرطان معده و سرطان غدد لنفاوی دستگاه گوارش است. آنالیز ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان داده است که ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری درجه‌ی بالایی از تغییرات ژنتیکی را نشان می‌دهند. گوناگونی ژنتیکی بسیار زیادی میان سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از فردی در مقایسه با سویه‌ی جدا شده از فرد دیگر وجود دارد. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که تفاوت‌های ژنتیکی ممکن است نقش مهمی را در نتایج کلینیکی عفونت بازی کند (۱-۳).

عفونت با این باکتری در سراسر جهان گسترده است به طوری که در کشورهای در حال توسعه به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد؛ اما بیماری‌های مربوط به هلیکوباکتر پیلوری تنها در ۲۰-۱۰ درصد این جمعیت‌ها دیده می‌شود. محققان این تفاوت در بیماری‌زایی را مربوط به دو عامل می‌دانند:

۱) عواملی که به میزبان وابسته است و شامل خصوصیات ژنتیکی و ایمونولوژیک افراد، مصرف سیگار و داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی و غیره است که آن‌را خطری برای ابتلا به بیماری دانند.

۲) عواملی که به باکتری وابسته است که هلیکوباکتر پیلوری را با توجه به تفاوت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی به سویه‌ها و تیپ‌های مختلفی تقسیم بندی می‌کند. بیماری‌زایی هر سویه با توجه به میزان تبادل علائم بین باکتری و سلول‌های پوششی میزبان متفاوت است. مهم‌ترین تفاوت‌های بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری، دو ژن *vacA* (کد کننده ی سیتوتوکسین واکوئل زا) و ژن *cagA* (کد کننده ی پروتئین وابسته به سیتوتوکسین) است (۴-۶).

روش‌های گوناگونی بر اساس استفاده از DNA برای تشخیص و شناسایی گوناگونی ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری تا کنون به کار رفته است. نوعی از PCR که مبتنی بر تکثیر تصادفی یا رندوم DNA است اولین بار توسط ویلیام و همکارانش در دهه ۱۹۹۰ معرفی گردید و این روش را به اختصار^۱ RAPD-PCR می‌نامند. در این روش یک پرایمر غیر اختصاصی به طول ۸ تا ۱۲ نوکلئوتید برای واکنش

^۱ - Random Amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

PCR استفاده می‌گردد. پس از الکتروفورز محصول PCR واکنش در نمونه‌های مختلف برای هر نمونه یک پروفایل نسبتاً منحصربه‌فردی به دست می‌آید که می‌توان از آن برای شناسایی سریع بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی استفاده کرد. این روش برای مطالعه ی گوناگونی و انتقال ژنتیکی هلیکوباکتر پیلوری بسیار ارزشمند است. این روش بسیار حساس و با کارایی و سرعت بالا می‌باشد. تقریباً ۳ تا ۱۰ قطعه ی مشخص DNA به ازای هر سویه هلیکوباکتر پیلوری به دست می‌آید. هر ایزوله از هلیکوباکتر پیلوری به طور مشخص یک الگوی مشخص تولید می‌کند که به طور قابل تکراری از ایزوله های دیگر متفاوت است. تعیین ژنوتیپ این پاتوژن تاثیر مناسبی در روشن سازی نقشه های ژنومیک و درمان آنتی بیوتیکی به همراه خواهد آورد.

مواد و روش کار:

طی این مطالعه ی مقطعی نمونه های بیوبسی ۴۰ بیمار شامل ۲۰ بیمار طبیعی (که به علت سوءهاضمه آندوسکپی شده بودند)، ۱۶ بیمار دچار زخم و ۴ بیمار دچار سرطان توسط پزشک

متخصص گرفته شد. نمونه ها در سال ۱۴۰۳ از بیمارستان آیت الله کاشانی شهر کرد تهیه شدند و در محیط‌های انتقال به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهر کرد منتقل شدند. نمونه های بیوبسی سریعاً بر روی محیط های بروسلا آگار و کمپیلوباکتر آگار حاوی ۱۰ درصد خون گوسفند و آنتی-بیوتیک‌های ونکومايسين، تریمتوپریم و آمفوتريسين B کشت داده شدند. کلونی‌های به دست آمده که حاوی باسیل‌های S شکل، کاتالاز، اوره آز و اکسیداز مثبت بودند، به عنوان نمونه های هلیکوباکتر پیلوری تشخیص داده شدند و با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن، استخراج DNA صورت گرفت (۷).

به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری از ردیابی توالی ژن *16srRNA* استفاده گردید. آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری در حضور زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول (۱) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تنظیم گردید.

در سویه های هلیکوباکتر پیلوری *16srRNA* توالی پرایمرهای مربوط به ردیابی ژن

ژن

توالی پرایمر (۳-۵)

(bp) اندازه محصول

16srRNA

HP 1F CTGGAGAGACTAAGCCCTCC
HP 1R ATTACTGACGCTGATTGTGC

۱۰۹

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن *16srRNA* به صورت

زیر بود:

۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، ۶۰ سیکل تکراری ۹۴

درجه ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه ۶۰ ثانیه و ۶۲ درجه ۶۰ ثانیه و یک

سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۳ دقیقه. مشاهده باند ۱۰۹ جفت بازی

نشان دهنده مثبت بودن تست است.

جهت انجام تکنیک RAPD-PCR روی ایزوله‌های

هلیکوباکتر پیلوری مورد مطالعه از تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی

۱۲۸۱ با توالی AACGCGCAAC معرفی شده توسط

Akopyanz و همکاران استفاده شد. واکنش PCR در حجم

۲۵ میکرولیتر واجد ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer و ۲

میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۵۰ میکرومول dNTP Mix، ۲ میکرومول

از تک پرایمر، ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵

میکرولیتر از DNA مربوط به هر نمونه تنظیم گردید.

چرخه دمایی مورد استفاده جهت تکثیر قطعات پلی

مورفیک DNA در این آزمایش عبارت بود از: یک سیکل ۹۴

درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۴۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه

سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰

ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی

۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (۸).

جدایه‌های مورد بررسی ۳ نوبت با شرایط فوق به روش

PCR آزمایش شد تا از تعداد و الگوی بانندی ایجاد شده در هر

نمونه اطمینان حاصل شود. بعد از RAPD-PCR محصول به

دست آمده در ژل آگارز ران شد و با استفاده از UV ترانس

المنیتور باندهای حاصله مشاهده گردید. در تکنیک RAPD-

PCR روی جدایه‌های مورد مطالعه سه نوبت انجام و پس از

اطمینان تعداد اندازه باندهای ایجاد شده در هر جدایه با نشان گر

RAPD، الگوی بانندی حاصله به کمک نرم افزار Gel J آنالیز

و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد، ژنوتیپ‌های

(پروفایل‌های) مربوط با روش شباهت Dice و پیوند

UPGMA شناسایی و دندوگرام مربوط به هر نشان گر ترسیم

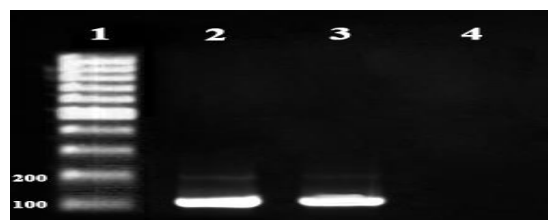
گردید.

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور

تشخیص قطعی باکتری *16srRNA* هلیکوباکتر پیلوری و

حضور توالی ژن *16srRNA*، تمامی نمونه‌ها با داشتن باند ۱۰۹

جفت بازی مثبت تشخیص داده شدند.



شکل (۱): ژل حاصل از PCR ژن *16srRNA* هلیکوباکتر پیلوری
ستون ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون های ۲ و ۳ نمونه های
مثبت از نظر ژن *16srRNA*. ستون ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی
(فرمتناز).

ترسیم گردید. در این الگوریتم ایزوله‌هایی با ضریب تشابه
بالای ۸۰ درصد در یک کلاستر (پروفایل = تیپ) قرار گرفتند.

در دندروگرام به دست آمده در آزمون RAPD-PCR

در تکنیک RAPD-PCR روی ایزوله‌های مورد مطالعه

سه نوبت انجام و پس از اطمینان تعداد اندازه باندهای ایجاد شده

در هر ایزوله با هر نشان گر، الگوی باندهای حاصله به کمک نرم

افزار Gel J آنالیز و با در نظر گرفتن قرابت بالای ۸۰ درصد،

ژنوتیپ‌های (پروفایل‌های) مربوط با روش شباهت Dice و

پیوند UPGMA شناسایی و دندوگرام مربوط به هر نشان گر

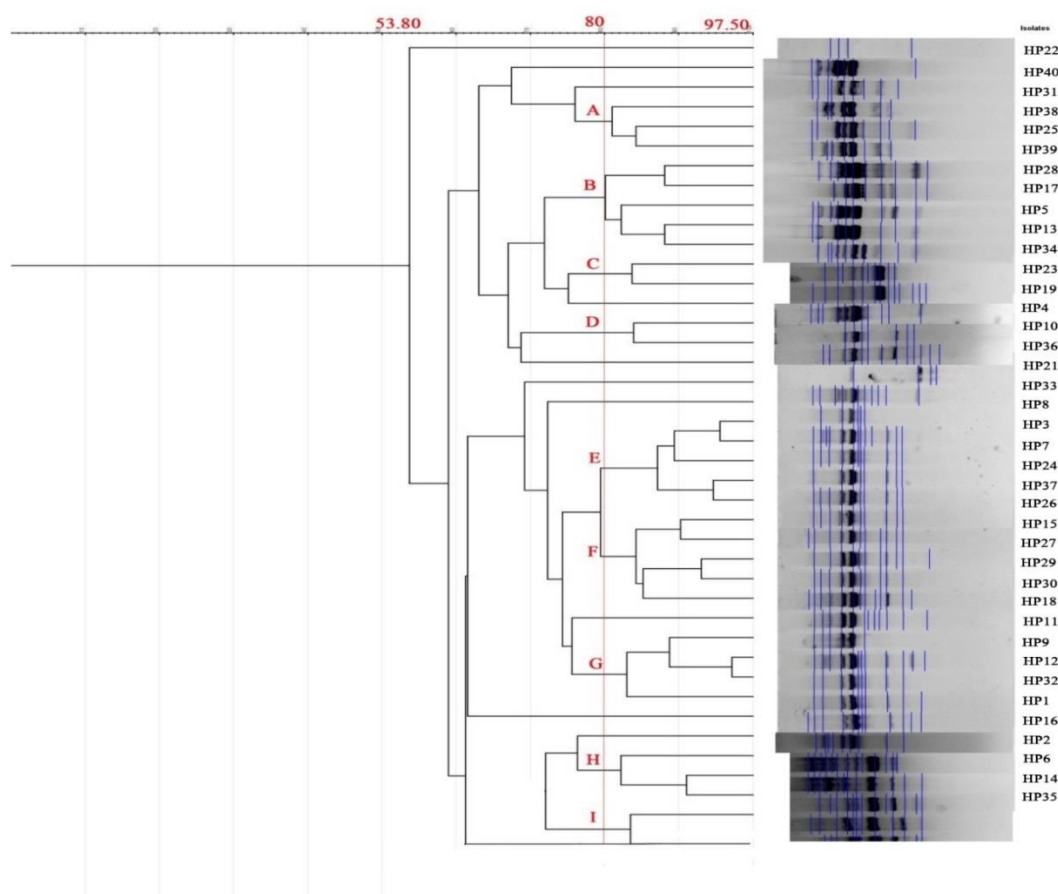
در ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی در نمونه های

بیوپسی به طور کلی قرابتی بین ۵۴ تا ۹۸ درصد در میان جدایه‌ها

مشهود است. تمامی جدایه‌ها در ۹ خوشه اصلی از یکدیگر

متمایز شدند. در ضریب تشابه ۸۰ درصد مجموعاً ۳۰ پروفایل

شامل ۹ خوشه و ۲۱ نقطه جداگانه شناسایی شد.



دندوگرام RAPD-PCR در سویه های هلیکوباکتر پیلوری

الکتروفوریتیک DNA در بررسی قطعات

دست آمده از ۱۶ سویه ی جدا شده از بیماران مبتلا به زخم

گوارشی ۲ تا ۱۲ باند با اندازه ی بین ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بار

بودند (نمونه های ۳۶-۲۱). الگوی انگشت نگاری ژنتیکی ۴

سویه ی جدا شده از موارد سرطان معده شامل ۶ تا ۸ باند به

اندازه ی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جهت باز تعیین شد (نمونه های ۴۰-۳۷).

اشکال زیر مشاهده گردید که نتایج به دست آمده از نظر ژنتیکی

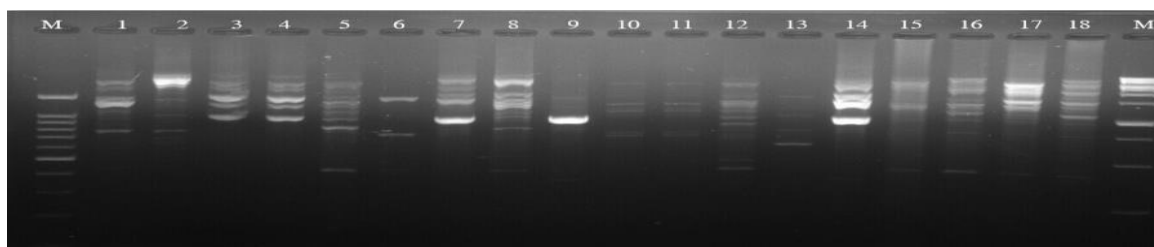
متنوع و ناهمگن است. نتایج به دست آمده بر روی ۲۰ سویه

جدا شده از بیماران طبیعی نشان داد که هر یک از سویه ها

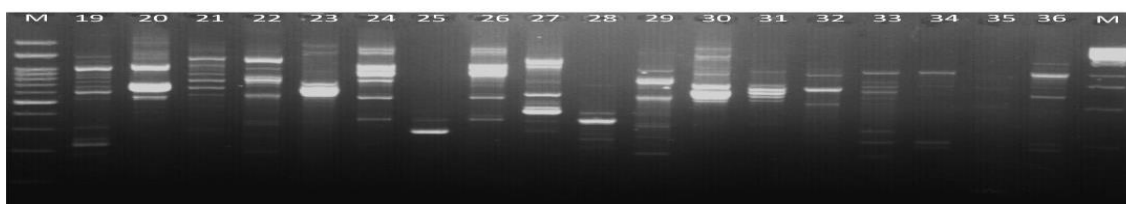
الگوی انگشت نگاری ژنتیکی مخصوص به خود را دارند. تعداد

و اندازه ی باندها بین ۲۵۰ تا DNA باندها از ۲ تا ۱۳ قطعه

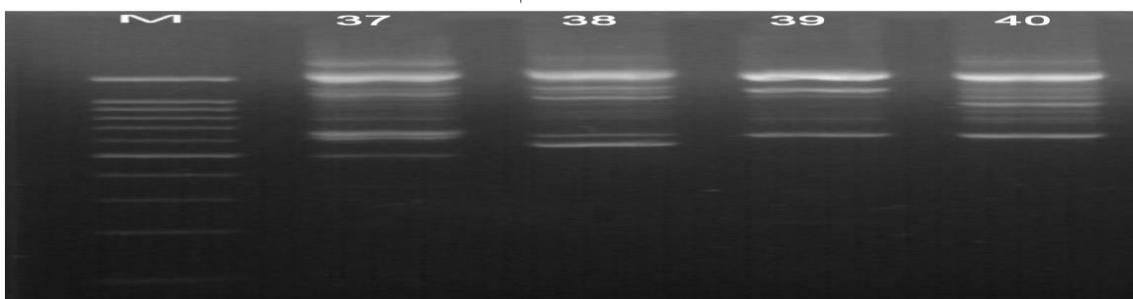
به PCR ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود (نمونه های ۲۰-۱). نتایج



شکل (۲): الگوی ژنتیکی سویه های طبیعی جدا شده با روش RAPD-PCR نمونه های ۲۰-۱.



شکل (۳): الگوی ژنتیکی سویه های جدا شده از بیماران دچار زخم گوارشی با روش RAPD-PCR نمونه های ۳۶-۲۱.



شکل (۴): الگوی ژنتیکی سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان با روش RAPD-PCR نمونه های ۴۰-۳۷.

بحث

عفونت هلیکوباکتر پیلوری شایع ترین بیماری باکتریال معده-روده‌ای در سرتاسر جهان است. این عفونت در ۹۵ درصد از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه و در ۸۰-۷۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم معده دیده می‌شود. تقریباً ۱۷ درصد از افراد هلیکوباکتر پیلوری مثبت، مبتلا به زخم معده می‌شوند و هر ساله ۱-۲ درصد از این افراد مبتلا به خونریزی، سوراخ شدگی و یا انسداد خروجی معده می‌شوند. در سوراخ شدگی بدون زخم حدود ۵۰ درصد از بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری می‌باشند. مطالعات نشان داده که عفونت هم‌زمانی با هلیکوباکتر پیلوری در ۹۰ درصد موارد سرطان معده شامل لنفوم‌های معده وجود دارد (۹).

هریک از عوامل ناشی از عفونت هلیکوباکتر پیلوری یک روند چند عاملی است که به ویژگی‌های خاص ارگانیزم، میزبان و محیط بستگی دارد. عوامل وابسته به میزبان شامل خصوصیات ژنتیکی و ایمونولوژیکی افراد، مصرف سیگار، داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی و غیره است که آن‌ها را خطری برای ابتلا به بیماری می‌دانند. عوامل مربوط به باکتری شامل خصوصیات ژنوتیپی و فنوتیپی باکتری است (۱۰).

بر اساس منابع معتبر موجود بررسی هیستولوژیکی نمونه‌ی بیوپسی و کشت نمونه‌ی بیوپسی به همراه آزمون سریع

اوره‌از از جمله روش‌های تشخیصی تهاجمی به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص این میکروارگانیزم عنوان شده است. هلیکوباکتر پیلوری دارای فاکتورهای بیماری‌زایی زیادی است که باعث بقاء آن در محیط اسیدی معده می‌شود و همچنین اجازه می‌دهد تا باکتری در مخاط معده کلونیزه شود و با سیستم ایمنی میزبان مقابله کند و باعث تخریب بافتی شود. گسترش جغرافیایی ژنوتیپ‌های مختلف باکتری بین شرق آسیا و کشورهای اروپایی متفاوت است و بررسی اپیدمیولوژیک در ایران به دلیل قرار گرفتن در محل ارتباطی این کشورها دارای اهمیت فراوانی است که به نظر می‌رسد گسترش بیماری به فاکتورهای بیماری‌زایی سویه‌ی باکتری، حساسیت میزبان و فاکتورهای کمکی محیط بستگی دارد. مهم‌ترین تفاوت بین سویه‌های مختلف هلیکوباکتر پیلوری حضور یا عدم حضور ژن *cagA* و ژنوتیپ‌های مختلف ژن *vacA* است. به نظر می‌رسد حضور هم‌زمان ژن‌های *cagA* و آللهایی از *vacA* که دارای خاصیت واکوئله‌کنندگی هستند، باعث افزایش بیماری‌زایی باکتری می‌شود که در تیپ I طبقه‌بندی شده‌اند. تنها سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت تیپ II و III بوده‌اند (۱۱).

میزان شیوع عفونت در نقاط مختلف جهان، متفاوت است. در کشورهای غربی گاستریت و بیماری‌های خفیف

گوارشی و در کشورهای آسیای شرقی بیماری‌های گوارشی خطرناک‌تر از جمله سرطان معده رواج بیشتری دارند. از آن‌جا که ایران در خاور میانه واقع شده و از لحاظ اقتصادی و فرهنگی هم با کشورهای آسیای شرقی و هم با کشورهای غربی در ارتباط است، بررسی شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* و فاکتورهای ویروالانس در این کشور جهت درمان و کنترل بیماری ضروری به نظر می‌رسد. شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در ایران مانند بسیاری از کشورها بالا است. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهند که عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با بیماری‌های دستگاه گوارش فوقانی ارتباط نزدیک دارد. از طرف دیگر نشان داده شده که عفونت با همه‌ی سویه‌های این باکتری منجر به بیماری نمی‌شود. با این‌که نقش عوامل بیماری‌زایی مثل *vaccA* و *cagA* در باکتری مورد بحث است؛ هنوز تفاوت‌های موجود بین باکتری‌هایی که در انسان ایجاد زخم یا سرطان می‌کنند با آن‌هایی که بیماری خفیف تولید می‌کنند یا عفونت آن‌ها با عارضه‌ای همراه نیست، مشخص نشده است. در این زمینه تأثیر عواملی مثل خصوصیات میزبانی انسان، موقعیت جغرافیایی و همچنین نوع سویه باکتریایی بر عواقب عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* به صورت گسترده‌ای در حال بررسی است. گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی^۲ قابل توجهی در

جمعیت *هلیکوباکتر پیلوری* در نقاط مختلف دنیا وجود دارد. این تنوع ژنتیکی منجر به گوناگونی در خصوصیات بیماری‌زایی باکتری مثل مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ویژگی چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال و حتی تولید توکسین می‌گردد. به نظر می‌رسد زمانی که *هلیکوباکتر پیلوری* از یک میزبان انسانی به میزبان دیگری انتقال می‌یابد برای سازگاری با شرایط جدید ناگزیر دچار تغییرات و در نتیجه تنوع می‌شود. دلیل تنوع زیاد *هلیکوباکتر پیلوری* را مربوط به پدیده نوترکیبی می‌دانند که به طور مکرر در ساختار ژنوم باکتری صورت می‌گیرد. هم‌چنین وجود عفونت‌های مخلوط (وجود بیش از یک سویه در یک میزبان انسانی)، امکان تبادل ژنتیکی را بین سویه‌های مختلف فراهم می‌کند.

به دلیل میزان بالای تغییرات ژنتیکی در بین سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری*، روش‌های مولکولی متعددی برای تمایز سویه‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها شامل RFLP، Ribotyping، REP-PCR، PFGE و RAPD-PCR می‌باشند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به بیماری‌های گوارشی با روش RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفته است. روش RAPD-PCR یکی از روش‌های

حساس و کارآمد مولکولی است که برای تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در جوامع مختلف استفاده می‌شود. هم‌چنین این روش در مطالعات اپیدمیولوژیک از جمله بررسی امکان انتقال هلیکوباکتر پیلوری بین زوجها یا از طریق آشامیدن آب چاه، تشخیص آلوده بودن یک فرد با بیش از یک سویه باکتریایی و طراحی درخت فیلوژنی (دندروگرام) برای نمایش میزان قرابت ژنتیکی سویه‌های متفاوت یک گونه به کار می‌رود. در این روش از یک تک پرایمر چند نوکلئوتیدی (اغلب ۱۰ نوکلئوتیدی) استفاده می‌شود که ترادف‌های خاصی (ترادف‌های تکراری معکوس) را در ژنوم باکتری شناسایی و تکثیر می‌کند. با داشتن اطلاعات مربوط به محصولات PCR می‌توان الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی^۳ یک باکتری را به دست آورد. با تجزیه و تحلیل الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های به دست آمده از بیماران مختلف، می‌توان درخت فیلوژنی را رسم و سویه‌های باکتریایی را در دسته‌های معین تقسیم‌بندی کرد. در این مطالعه بر اساس اطلاعات به دست آمده از درخت فیلوژنی، امکان ارتباط بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با الگوی انگشت‌نگاری خاص و ایجاد بیماری گوارشی معین، بررسی گردید (۱۲).

در سال‌های اخیر هلیکوباکتر پیلوری به عنوان یک عامل مهم در ایجاد بیماری‌های گوارشی از جمله زخم و سرطان معده مطرح شده است. بنابراین یکی از اقدامات اساسی در جهت پیشگیری از عواقب شدید عفونت این باکتری، شناسایی سویه‌های بیماری‌زا و تمایز آن‌ها از سویه‌های غیر بیماری‌زا و پی‌آمد آن به کارگیری فرمول‌های درمانی مناسب است. بررسی خصوصیات فتوتیپیک سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری مثل فعالیت اوره‌آز اطلاعات مفیدی در مورد طبیعت و شدت بیماری‌زایی آن‌ها در اختیار قرار نمی‌دهد، به همین دلیل دانشمندان هنوز با موشکافی‌های ظریف‌تر در جست و جوی شاخص‌هایی اختصاصی‌تر و دقیق‌تر هستند. الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی یک موجود مانند باکتری، حاوی اطلاعاتی است که الزاما به صورت صفات فتوتیپیک خاصی ظاهر نمی‌شود، ولی می‌تواند به عنوان یک شاخص ژنتیکی برای تمایز دقیق سویه‌های مورد استفاده قرار گیرد. RAPD-PCR یکی از روش‌هایی است که توسط آن می‌توان الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های باکتریایی را مشخص کرد. این روش امروزه کاربرد مهمی در تقسیم‌بندی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مختلف پیدا کرده است.

Smith و همکاران قدرت تمایز روشهای RFLP، RAPD و آنالیز ساترن بلات وجود ژن *ureA* یا *ueCD* را روی ۳۳ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از افراد نیجری بررسی کردند و نتیجه گرفتند که قدرت تمایز و دسته‌بندی کردن^۴ و سادگی RAPD نسبت به دیگر روش‌ها بیشتر است. (۸).

در این مطالعه تعداد ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران طبیعی و مبتلا به زخم و سرطان با روش RAPD-PCR از بیماران طبیعی و مبتلا به زخم و سرطان با روش RAPD-PCR مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار گرفتند و الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی آن‌ها تعیین شد. در این بررسی با به کارگیری یک تک پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی، باندهای مخصوص به سویه تا ۱۳ قطعه مشاهده شد.

Akopyanz و همکاران در سال ۱۹۹۲ با به کارگیری تک پرایمرهای ۱۰ نوکلئوتیدی از جمله تک پرایمر ۱۲۸۱ نشان دادند که باندهای مخصوص به سویه تا ۱۵ قطعه بارز را تشکیل می‌دادند.

نتایج این مطالعه بر روی ۴۰ سویه هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران ایرانی نشان داد که هر یک از سویه‌ها الگوی مختص خودشان را دارند. Akopyanz و همکاران نیز با

استفاده از روش RAPD توانستند سویه‌های جدا شده از ۵۳ بیمار طبیعی، دو بیمار مبتلا به زخم معده و یک بیمار مبتلا به متاپلازی روده‌ای را از هم متمایز سازند. نتایج مطالعه مذکور نیز نشان داد که هر کدام از سویه‌ها الگوی مختص خودشان را دارند. نتایج این مطالعات میزان بالای تنوع ترادف‌های خاص DNA را در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری نشان می‌دهد.

در این بررسی بر اساس نتایج به دست آمده، سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری در ۹ گروه شامل دو گروه مربوط به سویه-های جدا شده از بیماران طبیعی و دو گروه مربوط به سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند. به دلیل این که باندهای مشابه در هر دو گروه سرطانی و طبیعی دیده نشد، گروه سویه‌های جدا شده از بیماران سرطانی شاخه جداگانه‌ای را در دندروگرام اشغال کردند. به دلیل وجود باند مشترک در بین سویه‌های مربوط به هر دو گروه بیماران طبیعی و دارای زخم بعضی از سویه‌های طبیعی هم در بین سویه‌های بیماران مبتلا به زخم قرار گرفتند.

با مطالعاتی که در آفریقای جنوبی روی ۱۶ سویه جدا شده از بیماران طبیعی، ۲۶ سویه از موارد زخم گوارشی و ۱۵ سویه از موارد سرطان معده با روش RAPD-PCR انجام گرفت، نشان داده شد که الگوی انگشت‌نگاری ژنتیکی سویه‌های

^۴ -Typeability

هلیکوباکتر پیلوری از ۷-۱ باند مجزا به اندازه ۴۶۰۰-۱۰۰ جفت باز متغیر است. تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی در مطالعه مذکور نشان داد که تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد و سویه‌ها با ضریب شباهت $43 \pm 64/2\%$ در دو گروه مجزا قرار می‌گیرند (۱۳).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر و مطالعات مشابه نشان می‌دهند که روش RAPD-PCR یک روش مناسب برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی در بین سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری است. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری آن قدر گسترده است که نمی‌توان سویه‌های مربوط به بیماران طبیعی، دارای زخم و سرطان را در گروه‌های معین و جداگانه قرار داد. در عین حال این نتیجه‌گیری زمانی قابل استناد است که تعداد گزارش‌ها افزایش یابد و تعداد سویه‌های بیشتری از هلیکوباکتر پیلوری و با پرایمرهای بیشتری در هر مطالعه بررسی شوند. اعضای گونه هلیکوباکتر پیلوری به دلیل قرار گرفتن در میزبان‌های انسانی متفاوت و مواجهه با شرایط محیطی مختلف ممکن است دستخوش تغییراتی شوند که نتیجه سازگاری مطلوب با میزبان و ظهور زیرگونه‌های جدید است. تعیین این زیرگونه‌ها از نظر اپیدمیولوژی و تعیین منشأ آلودگی و راه انتقال مهم است.

مراجع

1. Israel DA, Salama N, Arnold CN, Moss SF, Ando T, Wirth HP, Tham KT, Camorlinga M, Blaser MJ, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. J Clin Invest 2001; 107: 611-620
2. Yakoob J, Hu GL, Fan XG, Yang HX, Liu SH, Tan DM, Li TG, Zhang Z. Diversity of *Helicobacter pylori* among Chinese persons with *H pylori* infection. APMIS 2000; 108: 482-486.
3. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM, Atherton JC, Falkow S, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Roc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 14625-14630.
4. Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K, Yamaoka Y, Zojaji H, Molaei M, Zali MR. *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in relationship to *cagA* status and clinical outcomes. Jpn J Infect Dis. 61(7): 2008; 290-293
5. Mohammadi M, Oghalaei A, Mohajerani N, Masserat S, Nasiri M, Colding H, Anderson LP. Prevalance of *Helicobacter pylori* vaculating cytotoxin and its allelic musaism as a predictive marker for Iranian dyspeptic patients. Bull Soc Pathol Exot. 2003; 96 (1): 31-38.
6. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: areview. Helicobacter. 2004; 9 (7):115-23.
7. Konno M, Fujii N, Yokota S, Sato K, Takahashi M, Sato K et al. Five-year follow up study of mother-to-child transmission of *Helicobacter pylori* infection detected by a random amplified polymorphic DNA fingerprinting method. J Clin Microbiol. 2005; 43(5)2246-2250
8. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1992; 20: 5137-42
9. Mansour-Ghanaei F, Yousefi M, Joukar F. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children in Rasht, Northern Iran. Mid East j dig dis. 2009;1(2): 84-88.
10. Govorun VM, Lokhov PG, Moshkovskii SA, Momynaliev KT, Selesnyova OV, Kudryavtseva LV et al. Comparative analysis of different typing methods for *Helicobacter pylori* clinical isolates. Biochemistry. 2004; 69(5):536-4111.
11. Zhou L, Sung JJ, Lin S. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after *H. pylori* eradication. Chin Med J. 2003; 116: 11-4.

12. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 1990; 24: 7213-7218.

13. Kidd M, Atherton JC, Lastovica AJ et al. Clustering of South African *Helicobacter pylori*

isolates from peptic ulcer disease patients is demonstrated by repetitive extragenic palindromic-PCR. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1833-1839.

Genotyping of *Helicobacter pylori* strains isolated from biopsy samples in Shahrekord city by RAPD PCR

Hossein Aghajani*1, Hossein Khodabandeh1

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

* Corresponding author: bardiyaaghajanidezaki@gmail.com

Absteract:

Helicobacter pylori is an important cause of gastrointestinal diseases. Since genetic diversity within the *Helicobacter pylori* population occurs in large quantities, methods such as RAPD-PCR were used to determine the possible relationship between specific *Helicobacter pylori* genotypes and various gastric diseases. In this study, the genetic pattern of *Helicobacter pylori* strains isolated from different patients with dyspepsia was investigated by RAPD-PCR.

During this study, biopsy samples from 40 patients, including 20 normal patients, 16 ulcer patients, and 4 cancer patients, were extracted using a DNA extraction kit manufactured by Cinagene Company, and the strains were identified in the presence of *16srRNA* primers.

In this study, after performing the determined in the presence of specific primers and the strains were genotyping was performed by RAPD-PCR. PCR test for the definitive diagnosis of *Helicobacter pylori*, all samples were detected positive with a band of 109 base pairs. The *vacA* gene was detected in 30 samples (70%) and the *cagA* gene in 2 samples. In the dendrogram obtained in the RAPD-PCR test in 40 *Helicobacter pylori* strains examined in biopsy samples, a general affinity between 54 and 98% among the isolates is evident. All isolates were distinguished from each other in 9 main clusters. At a similarity coefficient of 80%, a total of 30 profiles including 9 clusters and 21 separate points were identified.

In the examination of electrophoretic DNA fragments, the following patterns were observed, indicating that the results obtained are genetically diverse and heterogeneous. The results obtained on 20 strains isolated from normal patients showed that each of the strains has its own genetic fingerprint pattern.

Keywords: Biopsy, Genotyping, *Helicobacter pylori*, RAPD-PCR.

