

## Prevalence of *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* and *hrgA* genes in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastric cancer in Karaj city, 2016

Ahmadi E<sup>1</sup>, Amini K<sup>1\*</sup>, Sadeh M<sup>2</sup>

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I. R. Iran.

2- Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received November 13, 2016; Accepted September 25, 2017

### Abstract:

**Background:** It is estimated that approximately half of the planet's population is infected with *Helicobacter pylori* and 70%-60% of the infections in the Western countries are caused by *cagA*-positive strains. The aim of this study was to determine the frequency of *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* and *hrgA* genes in *H. pylori* isolated from patients with gastric cancer.

**Materials and Methods:** A total of 50 non-repetitive biopsy samples were collected from patients undergoing endoscopy in the endoscopic center of the Shahid Fayaz Hospital in Karaj. The presence of *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* and *hrgA* genes was determined using the multiplex PCR method.

**Results:** Of the 50 gastric biopsies, 44 samples (88%) were positive for the presence of various virulence genes. The molecular analysis of virulence factors showed that the prevalence rates of *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* and *hrgA* genes were 16 (32%), 8 (16%), 13 (26%), 7 (14%) and 17 (34%), respectively. There was a significant relationship between sex, smoking and gastric ulcer with some genes, but no significant relationship was found between the family history and age group with any of the genes.

**Conclusion:** The presence of various pathogenic genes has a significant effect on gastric ulcer, duodenal ulcer and gastric cancer. The effects of other genes, such as *hrgA*, are important in tissue damage and inflammatory responses.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA*, *hrgA*

\* Corresponding Author.

Email: dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

Tel: 0098 912 545 4074

Fax: 0098 8642 241 511

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 562-568

Please cite this article as: Ahmadi E, Amini K, Sadeh M. Prevalence of *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* and *hrgA* in *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastric cancer using Multiplex PCR. Feyz 2018; 21(6): 562-8.

# فراوانی ژن‌های *cagA*, *cagT*, *cagA*, *cagE*, *cagT*, *cagA* و *vacA* در هلیکوپاتر پلوری جدا شده از بیماران

متلا به سرطان معده در شهر کرج طی سال ۱۳۹۵

الهام احمدی<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲\*</sup>، مجتبی ساده

خلاصه:

سابقه و هدف: تخمین زده می‌شود که تقریباً نیمی از مردم کره زمین با هلیکوپاتر پلوری آلوهه هستند و ۶۰-۷۰ درصد عفونت‌ها در کشورهای غربی توسط سویه‌های *cagA*-مثبت ایجاد می‌شود. هدف اصلی این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های *cagE*, *cagT*, *cagA*, *vacA* و *hrgA* در هلیکوپاتر پلوری جدا شده از بیماران متلا به سرطان معده بود.

مواد و روش‌ها: در مجموع ۵۰ نمونه بیوبسی غیرتکراری از بیماران تحت اندوسکوپی در مرکز اندوسکوپی بیمارستان شهید فیاض بخش کرج به دست آمد. حضور ژن‌های *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* و *hrgA* با استفاده از روش Multiplex PCR تعیین شد.

نتایج: از ۵۰ بیوبسی معده، ۴۴ نمونه (۸۸ درصد) برای وجود ژن‌های مختلف ویرولانس مثبت بود. آتاژیز مولکولی فاکتورهای ویرولانس نشان داد که فراوانی ژن‌های *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA* و *hrgA* به ترتیب برابر ۱۶ (۳۲ درصد)، ۸ (۱۶ درصد)، ۷ (۱۴ درصد) و ۱۷ (۳۴ درصد) است. بین عواملی چون جنسیت، کشیدن سیگار و زخم معده با بروز بعضی ژن‌ها ارتباط معنی دار وجود داشت، اما سابقه خانوادگی و گروه سنی با هیچ کدام از ژن‌ها ارتباط معنی دار نداشت.

نتیجه‌گیری: وجود ژن‌های پاتوزنیک مختلف دارای اثرات قابل توجهی در بروز زخم معده، زخم دوازدهه و سرطان معده هستند. اثرات دیگر ژن‌ها مانند *hrgA* در آسیب بافتی و پاسخ‌های التهابی حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: هلیکوپاتر پلوری، *hrgA*, *vacA*, *cagE*, *cagT*, *cagA*

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۶۸-۵۶۲

## مقدمه

هلیکوپاتر پلوری در میان باکتری‌های انتریک بیشترین ناهمگونی ژنتیکی را نشان می‌دهد؛ علاوه بر این، بسیاری از سویه‌های این باکتری از لحاظ محتوای ژنتیکی و توالی ژن‌های حفاظت شده دارای نوع می‌باشند؛ بنابراین ابتلا به هلیکوپاتر پلوری به عوامل مختلفی از قبیل شرایط محیطی، سطح بهداشت اجتماعی و نژاد افراد مبتلا و همچنین ویژگی‌های خود این ارگانیسم مانند حضور ژن‌های ویرولانس مختلف از جمله *dupA*, *iceA*, *vacA*, *cagA*, *babA* و *homB* بستگی دارد [۱]. در میان فاکتورهای ویرولانس، *CagA* (یک سیتوتوکسین مرتبط با ژن A) و *VacA* (یک سیتوتوکسین واکوئله کننده A) در ۶۰-۷۰ درصد از سویه‌های هلیکوپاتر پلوری دیده می‌شوند [۲]. نتایج تحقیقات گذشته حاکی از این است که عفونت با سویه‌های دارای ژن ویرولانس *CagA* باعث افزایش خطر علائم کلینیکی بهخصوص در افراد مبتلا به ناراحتی‌های گوارشی می‌گردد [۳]. ژن *VacA* فاکتور مهم بیماری‌زای دیگری را کد می‌نماید که سبب ایجاد واکوئل در سطح سلول‌های یوکاریوت در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد [۴]. *CagA* یک پروتئین سطحی بوده، از قدرت اینمی-زاویی بالایی برخوردار است و پس از ورود به سلول‌های اپی‌تلیال معده منجر به دوکی شدن سلول میزبان می‌گردد [۵]. بنابراین، پروتئین *cagA* می‌تواند به طور مستقیم پس از ورود به سلول‌های

هلیکوپاتر پلوری باکتری گرم منفی، مارپیچی شکل و میکروآرروفیلیکی است که توسط انجمن بین‌المللی تحقیقات سرطان (International agency for research on cancer; IARC) یکی از زیر مجموعه‌های سازمان جهانی بهداشت (WHO)، به عنوان عامل باکتریایی سرطان‌زای تیپ یک شناسایی می‌شود [۶]. این باکتری به عنوان عامل اصلی بسیاری از بیماری‌های گوارشی همانند التهاب معده، التهاب دوازدهه، زخم معده، زخم دوازدهه، لنفومای MALT و بهویژه سرطان معده معرفی شده است [۷]. با توجه به تحقیقات اپیدمیولوژیک شیوع این باکتری بسیار بالا می‌باشد؛ به طوری که گفته می‌شود بیش از نیمی از مردم جهان به آن مبتلا می‌باشند [۸].

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۳. متخصص باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیبد بهشتی، تهران، ایران

\***نشانی نویسنده مسئول:** دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۲۵۴۵۰۷۴ - ۰۸۶۴۲۲۴۱۵۱۱

پست الکترونیک: dr\_kumarss\_amini@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۷/۳ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۲۳

باکتری و عفونت ناشی از آن، هدف اصلی این مطالعه تعیین فراوانی ژن‌های *cagA*, *cagT*, *cagE* و *vacA* در هلیکوپاکتر پلوری جدا شده از بیماران مبتلا به سرطان معده در شهر کرج می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه مقطعی تمام بیمارانی که از ابتدای خرداد لغایت انتهای اسفند ۱۳۹۵ به درمانگاه گوارش یا بخش آندوسکوپی بیمارستان شهید فیاض بخش شهر کرج مراجعه کرده یا ارجاع داده شده بودند و سن بیشتر از ۲۴ سال داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. تنها بیمارانی که حداقل بیش از ۲ ماه از علائم دیسپیسی (درد شکم، ترش کردن، باد گلو، احساس نفخ شکم، تهوع و استفراغ) شکایت داشتند، وارد مطالعه شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه و پر کردن پرسشنامه‌هایی که حاوی سن، جنس و بیماری زمینه‌ای بود، توسط متخصص گوارش مورد مطالعه کامل بالینی قرار گرفتند. در این مرحله بیمارانی که طی ۱ ماه گذشته از آنتی‌بیوتیک استفاده نکرده بودند و سابقه عمل جراحی روی لوله گوارش (واگوتومی، بیلروت و ...) یا بیماری‌های زمینه‌ای دیگر به جز دیسپیسی نداشتند، بدون توجه به شغل، میزان تحصیلات، وضعیت اقتصادی و اجتماعی و عادات غذایی، تحت مطالعه مقدماتی قرار گرفتند. این مطالعه شامل معاینه بالینی و شرح حال: ارزیابی عادات و وضعیت سلامت و بیماری فرد، انجام معاینات بالینی و بررسی پاراکلینیک: شمارش کامل سلول‌های خونی (تعداد گلبول‌های قرمز خون، گلبول‌های سفید خون و پلاکت‌ها، میزان هموگلوبین)، آزمون گایاک (بررسی وجود خون پنهان در مدفوع)، آزمون بلع باریم، آندوسکوپی فوکانی، نمونه‌برداری و سی‌تی‌اسکن بود. بیماران انتخاب شده با معیارهای فوق تحت معاینه کامل آندوسکوپی فوکانی قرار گرفتند؛ برای این کار از آندوسکوپ اولیمپوس (GIF-V) استفاده شد و برای جلوگیری از هر نوع آلودگی هربار دستگاه و سوزن بیوپسی میکروب‌زدایی می‌شدند. در تمام موارد از سوزن بیوپسی با قدرت یکسان استفاده شد. شرایط آندوسکوپی برای تمامی بیماران یکسان بود. در این مرحله بیمارانی که زخم پیتیک داشتند، از مطالعه حذف شدند. برای انجام بیوپسی، از هر ناحیه یک نمونه از دیواره قدامی و خلفی آنر و بدنه معده گرفته می‌شد. تمام نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شده و پس از قرار دادن در پارافین در قطعات ۵ میکرونی برش داده می‌شدند. برای تشخیص هلیکوپاکتر پلوری و یافته‌های بافت‌شناسی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین استفاده شد. در صورت لزوم جهت اثبات حضور ارگانیسم رنگ‌آمیزی به روش

هدف و تداخل با سیستم‌های پیام‌رسانی سلول سبب افزایش بیماری‌زایی باکتری و بیان ژن‌های جزایر بیماری‌زایی PAI شود [۱۰]. ژن *cagA* نقش مهمی در پیام‌رسانی سلول داشته و سبب تغییرات مورفو‌لوژیکی متعددی مانند تکثیر باکتری و آپوپتوز در سلول‌های میزبان می‌شود. وجود ژن *cagA* با بروز بیماری‌هایی نظیر زخم دوازده، آتروفی مخاط و سرطان معده مرتبط است [۱۱]. سویه‌های حاوی ژن *cagA* با ایجاد *cagA* syndrome توانایی بالایی در بروز آپوپتوز در سلول‌های ترشحی معده را دارند. به عنوان مثال، حضور ژن *cagA* در بسیاری از جمعیت‌های انسانی در ارتباط با بیماری‌های گوارشی (Peptic ulcer disease; PUD) گزارش شده است. سویه‌های دارای این ژن توانایی بیشتری جهت لانه‌گزینی، تخریب و التهاب یافته دارند. شیوه عفونت با هلیکوپاکتر پلوری در ایران تقریباً ۸۲–۹۲ درصد گزارش شده است. براساس تحقیقات گذشته سوشهای تولید کننده ژن‌های ویرولانس *vacA* و *ureAB*, *cagA* و *IL-8* بیماران با علائم کلینیکی مختلف مانند گاستریت، زخم معده، زخم دئودنوم و التهاب مری همراه با رفلکس شیوع بیشتری دارند. همچنین، بیان ژن *cagE* در تشدید تولید *IL-8* موثر است و این سایتوکاین در جذب نوتروفیلی دخالت دارد. *CagT* که نام دیگر آن *virB4* است، در ساختار نوک سیستم ترشحی نوع ۴ (T4SS) و در نتیجه صدور مواد به خارج سلول باکتریایی و ورود آن به سلول میزبان شرکت می‌کند [۱۲]. ژن *hrgA* سبب افزایش التهاب در افراد مبتلا به عفونت به هلیکوپاکتر پلوری می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که حضور این ژن در کشورهای غربی بیشتر از افراد آسیایی می‌باشد. مطالعات انجام شده در نواحی جغرافیایی مختلف جهان نشان داده است که حضور فاکتورهای ویرولانس مختلف با افزایش بیماری‌زایی و ایجاد زخم یا بیماری بدون زخم و یا ایجاد کارسینومای معده ثابت شده است. *Essawi* و همکاران نشان داده‌اند که ژن‌های *cagA* و *vacA* فاکتورهای ویرولانس اصلی در پاتولوژی معده در افراد مبتلا به سرطان معده هستند [۱۳]. پیش از ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم دئودنوم حامل این ارگانیسم هستند که خطر ایجاد زخم را ۵۱ برابر افزایش می‌دهد. ۵۰ تا ۸۰ درصد بیماران مبتلا به زخم معده با هلیکوپاکتر پلوری کلونیزه شده‌اند و خطر ایجاد بدخیمی به علت عفونت با این میکروب در حد ۶۰ تا ۸۰ درصد می‌باشد؛ به طوری که تقریباً ۱۰ درصد بیماران مبتلا به گاستریت آتروفیک مزمن در طی ۱۵ سال چار بدخیمی معده می‌شوند که دومین بدخیمی شایع در دنیا است. لذا، با توجه به اهمیت بالای این

میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل انجام گرفت. با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، مرحله جداسازی دو رشته در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و تعداد سیکل‌ها ۳۰ عدد بود. در نهایت مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه انجام شد. در پایان Multiplex PCR در ژل آگاروز ۱ درصد محصولات واکنش PCR این پژوهش از سوی هلیکوپاکتر پیلوری ATCC 43504 به عنوان کنترل مثبت و سالمونولا تایفی موریوم ATCC 14028 به عنوان کنترل منفی (تهیه شده از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران) استفاده شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، برای تعیین درصد و فور ژن‌های مورد بررسی در نمونه‌های مورد مطالعه و نیز بررسی ارتباط وفور ژن‌ها با عواملی چون جنسیت، کشیدن سیگار، زخم معده، سابقه بیماری در خانواده و سن با استفاده از آزمون مجذور کای، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ استفاده گردید.

گیمسا صورت می‌گرفت. گزارش حداقل ۵ باسیل در هر میدان میکروسکوپی ضرورت داشت.

#### واکنش زنجیره ای پلیمراز:

جهت انجام واکنش PCR ابتدا پرایمرها به شرکت پیشگام سفارش داده شده و سپس مراحل استخراج از DNA نمونه بافتی با استفاده از کیت اسخراج بافت شرکت پیشگامان انتقال ژن با شماره cad. N: F7884 طبق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت و در نهایت PCR انجام گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده جهت شناسایی ژن‌های VacA، *cagE*، *cagT*، *cagA* و *hrgA* در جدول شماره ۱ آورده شده است [۱۵]. جهت تایید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفوتومتر (Bio- Basic (Rad, USA) استفاده گردید. پس از بررسی صحت آغازگرهای Local Alignment Search Tool (BLAST) انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش PCR master حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase mix ۵X (سیناکلرون، ایران) حاوی ۱ dNTPs (۰.۴ mM)، (۳ mM) MgCl<sub>2</sub>، (۰.۰۵ U/µl) و میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱

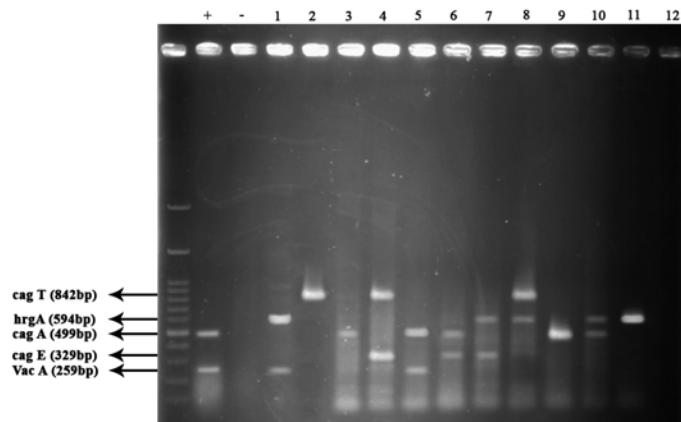
جدول شماره ۱- توالی الیکونوکلتوتیدی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

پرایمر	توالی الیکونوکلتوتیدی پرایمرها (۵' → ۳')	طول قطعه (bp)
vacA	Forward: 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC - 3' Reverse: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC - 3'	259
cagA	Forward: 5'-GATAACAGGCAAGCTTTGA - 3' Reverse: 5'-CTGAAAAGATTGTTGGCA - 3'	499
hrgA	Forward: 5'-TCTCGTAAAGAGAATTCC - 3' Reverse: 5'-TAAGTGTGGGTATATCAATC - 3'	594
cagT	Forward: 5'-ATGAAAGTGAGAGCAAGTGT - 3' Reverse: 5'-TCACTTACCACTGAGCAAAC - 3'	842

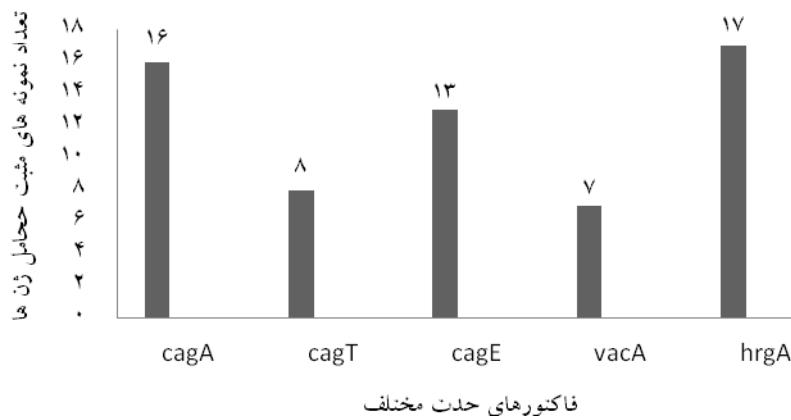
برابر ۱۶ (۳۲ درصد)، ۸ (۱۶ درصد)، ۱۳ (۲۶ درصد)، ۷ (۱۴ درصد) و ۱۷ (۳۴ درصد) بود (نمودار شماره ۱). این نتایج نشان داد که کمترین و بیشترین فراوانی ژن‌ها مربوط به *cagE* نمونه: ۱۴ درصد) و *hrgA* (در ۱۷ نمونه: ۳۴ درصد) بود. همچنین، با بررسی ارتباط وفور ۵ ژن مورد مطالعه با عواملی چون جنسیت، کشیدن سیگار، زخم معده، سابقه بیماری در خانواده و سن مشخص شد که سابقه بیماری در خانواده و سن هیچ گونه ارتباط معنی داری با هیچ یک از جایگاه‌های ژنی ندارند ( $P > 0.05$ ). ارتباط جنسیت با بروز ژن *cagE* و وجود زخم معده با بروز ژن *cagA* در سطح ۵ درصد معنی دار بود. کشیدن سیگار نیز به طور معنی داری با بروز ژن *hrgA* در ارتباط بود ( $P < 0.01$ ).

#### نتایج

در مطالعه حاضر میانگین سنی کل بیماران  $49 \pm 1/34$  سال بود. میانگین سنی بیماران مرد و زن به ترتیب  $44 \pm 1/23$  و  $44 \pm 1/23$  سال بود. دامنه سنی بیماران  $22-73$  سال بود. از مجموع ۵۰ فرد شرکت کننده در این مطالعه، نفر ژن (۳۴ درصد) و ۳۳ نفر (۶۶ درصد) مرد بودند. تعداد ۱۰ نفر (۲۰ درصد) از بیماران هیچ گونه سابقه ناراحتی و دردی در ناحیه معده خود نداشتند. همچنین، استعمال دخانیات در ۲۱ بیمار (۴۲ درصد) منفی بود. با توجه به نتایج بدست آمده از مجموع ۵۰ نمونه بیوپسی، ۴۴ نمونه (۸۸ درصد) از نظر وجود ژن‌های ویرولانس مختلف هلیکوپاکتر پیلوری مثبت بودند (تصویر شماره ۱). آنالیز مولکولی نشان داد که فراوانی ژن‌های *vacA*، *cagE*، *cagT*، *cagA* و *hrgA* به ترتیب



تصویر شماره ۱- نتیجه آزمایش M-PCR انجام شده روی نمونه‌های بیوپسی معده افراد مبتلا به سرطان معده در مطالعه حاضر، به ترتیب از چپ به راست: مارکر، کنترل مثبت (هلیکوبکتر پیلوئی ATCC 43504)، کنترل منفی (سالمونلا تایفی موریوم ATCC 14028)، طول باند ژن‌های *cagA*, *cagT*, *cagE*, *vacA*, *hrgA* به ترتیب برابر ۵۹۴، ۳۲۹، ۸۴۲، ۴۹۹ و ۲۵۹ جفت باز بود.



نمودار شماره ۱- فروانی ژن‌های حدت در نمونه‌های تحت مطالعه

سرطان) باشد. دوستی و همکاران در شهرکرد و دورقی و همکاران در تهران میزان فراوانی ژن *cagA* را به ترتیب ۸۳/۵ و ۸۲/۲ درصد گزارش نموده‌اند [۱۹, ۱۸]. از جمله دلایل مخالفت نتایج مطالعه پیش رو با مطالعات دیگر، تفاوت جغرافیایی، سال انجام مطالعه، نوع نمونه جمع‌آوری شده و اختلاف در پرایمرهای استفاده شده جهت جستجوی قطعه ژنی مورد نظر می‌باشد. این مطالعه علی‌رغم استفاده از پرایمرهای مشابه با مطالعه دورقی و همکاران نتیجه یکسانی نداشت که این امر می‌تواند به علت استفاده از نمونه‌های بلوک شده پارافینه در مطالعه کنونی باشد. عبداللهی و همکاران در تهران در مطالعه‌ای مشابه فراوانی ژن *cagA* را ۳۵/۱۸ درصد گزارش نموده‌اند [۲۰]. طالبی و همکاران با غربال‌گری ژن‌های ویرولانس در هلیکوبکتر پیلوئی جدا شده از ۱۳ بیمار مبتلا دریافتند که حضور ژن *babA2* با عارضه سرطان معده بی ارتباط است و پیش‌داوری در این مورد با توجه به حجم کوچک جامعه مورد پژوهش محدود نمی‌باشد [۲۱]. Vannarath و همکاران در

## بحث

باتوجه به نتایج بدست آمده، از مجموع ۵۰ نمونه بیوپسی، ۴۴ نمونه (۸۸ درصد) از نظر وجود ژن‌های ویرولانس مختلف هلیکوبکتر پیلوئی مثبت بودند. آنالیز مولکولی ژن‌های تحت مطالعه نشان داد که فراوانی ژن‌های *cagE*, *cagT*, *cagA*, *vacA* و *hrgA* به ترتیب برابر ۱۶، ۸، ۱۳، ۷ و ۱۷ درصد می‌باشد. این نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین فراوانی ژن‌ها مربوط به *cagE* (در ۷ نمونه؛ ۱۴ درصد) و *hrgA* (در ۱۷ نمونه؛ ۳۴ درصد) می‌باشد. آقاجانی و عباسی با بررسی همراهی عفونت مزمن هلیکوبکتر پیلوئی و سوش *CagA*<sup>+</sup> آن با بیماری عروق کرونر در ۷۰ نفر از مبتلایان به این باکتری دریافتند که هیچ ارتباط معنی‌داری بین عفونت مزمن و سوش *CagA*<sup>+</sup> آن با بیماری عروق کرونر وجود ندارد [۱۶]. مولایی و همکاران فراوانی ژن *cagA* را ۷۹/۶ درصد گزارش نموده‌اند [۱۷] که با مطالعه فعلی مغایرت دارد و این می‌تواند در نتیجه نوع بیماری (زخم معده در مقایسه با

کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بررسی عوامل ایجاد کننده این قبیل بیماری‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در هلیکوباکتر پیلوری عامل باکتریایی ایجاد کننده زخم معده، زخم دوازده و سرطان معده، افزایش شیوع ژن‌های پر اهمیت از قبیل *cagA* و *vacA* موتیف‌های تاثیرگذار آن قابل توجه می‌باشد. تاثیر این ژن و ژن‌های دیگر همچون *hrgA* و *dupA* در پیش‌برد تخریب بافتی و ایجاد التهاب در روند مزمن شدن بیماری امروزه بسیار گزارش می‌گردد. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان با بررسی ژنوتیپ *hrgA* و انواع موتیف *cagA* قدرت مزمن شدن بیماری را پیش‌بینی نموده و از الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی مرتبط جهت طراحی پروتوكل درمانی مناسب بهره برد؛ به صورتی که شکست درمانی در مرحله اول کاهش یافته و با تشخیص به موقع بیماری و سویه ایجاد کننده می‌توان با استفاده از برنامه دارویی مناسب جهت ریشه‌کنی بیماری اقدام نموده و مانع ورود عفونت به مرحله مزمن شد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، با وجود اینکه به نظر می‌رسد تنوع زیادی در فاکتورهای ویرولانس موجود در سوش‌های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، اما حضور هم‌زمان سه ژن (*cag*, *vacA*, *hrgA*) با بیماری زخم معده و سرطان معده مرتبط بوده و سوش‌های جدا شده از بیماران که دارای این سه ژن باشند، حاکی از افزایش حدت بیماری و از عوامل اصلی بالا رفتن میزان ویرولانس باکتری Multiplex و ایجاد التهاب در معده می‌باشد. همچنین، روش PCR روش مناسبی برای تشخیص ژنوتایپ‌های مختلف (از لحاظ حضور فاکتورهای ویرولانس) این باکتری با سرعت و هزینه کمتر می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه پرسنل محترم بخش میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در انجام این پژوهه یاری نمودند، کمال تشکر را داریم. این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب شورای تحصیلات تکمیلی و شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه در سال ۱۳۹۵ است.

### References:

- [1] Huang JY, Sweeney EG, Sigal M, Zhang HC, Remington SJ, Cantrell MA, et al. Chemodetection and destruction of host urea allows *Helicobacter pylori* to locate the epithelium. *Cell Host Microbe*

لائوس با مطالعه روی ۳۲۹ بیمار دارای عارضه دیس‌پیسی دریافتند ۱۱۹ بیمار آلوده با هلیکوباکتر پیلوری بوده که ۸۳ نفر آنها مبتلا به گاستریت، ۱۳ نفر گاستریک مزمن، ۲۰ نفر زخم دئودنال بوده و ۳ بیمار سرطان معده داشتند. ژن *cagA* در ۹۹/۲ درصد از سویه‌ها وجود داشت. این محققین نتیجه گرفتند که ژن *cagA* تقریباً در تمامی بیماران لائوسی وجود داشته و ژن‌های *cagA* و *vacA* مهم‌ترین فاکتورها در بروز عفونت هلیکوباکتر پیلوری هستند [۲۲]. Koehler و همکاران با بررسی ژنوم هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از ۹۲ نمونه بافت پارافینی مربوط به بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم معده و لنفوامی MALT دریافتند که شیوع ژن‌های *iceA1* و *iceA2* در بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم ۶/۵ برابر بیشتر است [۲۳]. در سال ۲۰۰۳ Ye و همکاران از ۱۱۱ نمونه بیوپسی به دست آمده از بیماران مبتلا به لنفوامی MALT درصد ژنوم هلیکوباکتر پیلوری را تشخیص دادند [۲۴]. در مطالعه‌ای که توسط حسینی و همکاران انجام شد، شیوع *cagA* برابر ۵۸ درصد بوده است. در تمام مطالعات انجام شده درصد مثبت بودن سوش‌های دارای فاکتور ویرولانس *CagA* و *VacA* در بیماران مبتلا به زخم معده بیشتر بوده که در برخی موارد در مقابسه با گروه فاقد زخم این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار شده است، اما در برخی دیگر این تفاوت معنی‌دار نبوده است. در بیماران فاقد زخم درصد مثبت بودن ژن‌های *CagA* و *VacA* به ترتیب ۳۷ تا ۸۹/۷ [۲۲، ۲۰، ۱۸] و ۳۳/۳ تا ۷۳ درصد [۲۵، ۲۰، ۱۸] گزارش گردیده است [۲۵]. نشان داده شده است که شیوع ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری و گاستریت مزمن فعل در سنین پایین‌تر بیشتر است که با افزایش سن افزایش یافته و پس از دهه پنجم از شیوع آن کاسته می‌شود، اما شیوع گاستریت مزمن و متاپلازی روده‌ای در سنین پایین‌تر کمتر است و با افزایش سن افزایش می‌یابد. از سوی دیگر درصد موارد منفی هلیکوباکتر پیلوری در گاستریت مزمن و متاپلازی روده‌ای بیشتر از موارد مثبت آن است. ابتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری یک رخداد جهانی است و به محل زندگی شخص بستگی ندارد. شیوع آن به جنس ارتباط نداشته و مصرف الكل، سیگار و داروهای ضدالتعبی غیراسترتوئیدی موجب افزایش ابتلا به آن نمی‌شود. هر چه ابتلا به ارگانیسم در سنین پایین‌تر رخدده، عوارض مخاطی ناشی از آن نیز بیشتر خواهد بود [۲۶]. با توجه به خطر بالا و روزافزون ابتلا به بیماری‌های گوارشی در

2015; 18(2):147–56.

- [2] Sigal M, Rothenberg ME, Logan CY, Lee JY, Honaker RW, Cooper RL, Passarelli B et al. *Helicobacter pylori* activates and expands Lgr5+

- stem cells through direct colonization of the gastric glands. *Gastroenterology* 2015; 148 (7):1392–404.
- [3] Müller SA, Pernitzsch SR, Haange SB, Uetz P, von Bergen M, Sharma CM, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture based proteomics reveals differences in protein abundances between spiral and coccoid forms of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Proteomics* 2015; 126:34–45.
- [4] De Bruyne E, Ducatelle R, Foss D, Sanchez M, Joosten M, Zhang G, et al. Oral glutathione supplementation drastically reduces *Helicobacter*-induced gastric pathologies. *Sci Rep* 2016; 6:20169.
- [5] Hammond CE, Beeson C, Suarez G, Peek RM, Backert S, Smolka AJ. *Helicobacter pylori* virulence factors affecting gastric proton pump expression and acid secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(3): G193–201.
- [6] Zhang L, Wu WK, Gallo RL, Fang EF, Hu W, Ling TK, et al. Critical role of antimicrobial peptide cathelicidin for controlling *Helicobacter pylori* survival and infection. *J Immunol* 2016; 196(4): 1799–809.
- [7] Jung SW, Lee SW. The antibacterial effect of fatty acids on *Helicobacter pylori* infection. *Korean J Intern Med* 2016; 31(1): 30–5
- [8] Gaddy JA, Radin JN, Cullen TW, Chazin WJ, Skaar EP, Trent MS, et al. *Helicobacter pylori* resists the antimicrobial activity of calprotectin via lipid A modification on and associated biofilm formation. *MBio* 2015; 6(6):e01349-15.
- [9] Pachathundikandi SK, Lind J, Tegtmeyer N, El-Omar EM, Backert S. Interplay of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* with toll-like receptors. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 192420.
- [10] Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, Jiménez Abreu JA, Uchida T, Mahachai V, et al. Toll-like receptor 10 in *Helicobacter pylori* infection. *J Infect Dis* 2015; 212(10):1666–76.
- [11] Pachathundikandi SK, Backert S. Differential expression of IL-1 $\beta$  during *Helicobacter pylori* infection of TLR2-and TLR10-expressing HEK293 cell lines. *J Infect Dis* 2016; 214(1): 166–7.
- [12] Obayashi N, Ohtsuka Y, Hosoi K, Ikuse T, Jimbo K, Aoyagi Y, et al. Comparison of gene expression between pediatric and adult gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2016; 21(2): 114–23.
- [13] Kienesberger S, Cox LM, Livianos A, Zhang XS, Chung J, Perez-Perez GI, et al. Gastric *Helicobacter pylori* infection affects local and distant microbial populations and host responses. *Cell Rep* 2016; 14(6):1395–1407.
- [14] Essawi T, Hammoudeh W, Sabri I, Sweidan W, Farraj MA. Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR. *ISRN Gastroenterology* 2013; 4: 1-4.
- [15] Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008; 12(1): 30-6.
- [16] Aghajani M, Abbasian M. Association of helicobacter pylori infection and its cagA-positive strains with Coronary heart disease (CHD). *Iran South Med J* 2002; 5(1): 56-62.
- [17] Molaei M, Foroughi F, Mashayekhi R, Haghazali M, Zojaji H, Jafari F, et al. CagA status and VacA subtypes of *Helicobacter pylori* in relation to histopathologic findings in Iranian population. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53(1): 24-7.
- [18] Dousti A, Rahimian Gh, Nasiri J, Yavari Foroshani P. Identification the frequency of cytotoxin associated gene in *H. pylori* strain isolated from biopsy samples in Shahrekord. *J Armaghan Danesh* 2007; 29(1):12-21.
- [19] Douraghi M, Mohamadi M, Shirazi M.H, Esmaili M. Evaluation of cytotoxin associated gene with gastric disorders in *H. pylori* infected patients. *Iran J Med Microbiol* 2008; 2(1): 31-36. [In Persian]
- [20] Abdollahi H, Shokoohi M, Savari M. The prevalence of *Helicobacter pylori* babA2, iceA1 and iceA2 genes and their association with clinical outcomes in patients with chronic gastritis, ulcerative diseases and non-ulcer dyspepsia in south east of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2013; 6(4): e4739.
- [21] Talebi Bezmin Abadi A, Taghvaei T, Mohabbati Mobarez A, Vaira G, Vaira D. High correlation of babA 2-positive strains of *Helicobacter pylori* with the presence of gastric cancer. *Intern Emerg Med* 2013; 8(6): 497–501.
- [22] Vannarath S, Vilaichone RK, Rasachak B, Mairiang P, Yamaoka Y, Shiota S, et al. Virulence genes of *Helicobacter pylori* in gastritis, peptic ulcer and gastric cancer in Laos. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(20): 9027-31.
- [23] Koehler CI, Mues MB, Dienes HP, Kriegsmann J, Schirmacher P, Odenthal M. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol* 2003; 56(1): 36–42.
- [24] Ye H, Liu H, Attygalle A, Wotherspoon AC, Nicholson AG, Charlotte F, et al. Variable frequencies of t(11;18)(q21;q21) in MALT lymphomas of different sites: significant association with CagA strains of *H. pylori* in gastric MALT lymphoma. *Blood* 2003; 102(3):1012-8.
- [25] Hosseini E, Poursina F, Van de Wiele TV, Ghasemian Safaei HG, Adibi P. *Helicobacter pylori* in Iran: A systematic review on the association of genotypes and gastroduodenal diseases. *J Res Med Sci* 2012; 17(3): 280–92.
- [26] Fakher Yasseri H. Determination of *Helicobacter pylori* Prevalence in Histologic Gastritis And Intestinal Metaplasia and Related to Age and Sex Study on 576 Patients with Nonulcer Dyspepsia at Endoscopy Department of Firozgar Hospital. *J Iran Univ Med Sci* 2002; 9(30): 379-88. [in Persian]