دوره ۲۰، شماره ۶۴، زمستان ۱۳۹۶، صفحات: ۳۳-۲۴

مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتیپ‌های ژن‌های *vacA* و *cagA* در سوش‌های *هلیکوباکترپیلوری* در بزاق و مدفوع کودکان شهر اصفهان

معین صابری[۱]، حسن ممتاز[۲*]، زهرا بم‌زاده[۳]

[۱] دانش‌آموخته ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۲] استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
[۳] استادیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۶/۰۶/۰۹

چکیده

مقدمه: هلیکوباکترپیلوری (*Helicobacterpylori*) از عوامل به‌وجودآورنده بیماری‌های گوارشی می‌باشد. مطالعاتی که بر روی این باکتری انجام گرفته‌اند، حاکی از آن هستند که پلی‌مورفیسم فاکتورهای حدت در این باکتری (*cagA* و *vacA*) می‌توانند تعیین‌کننده توانایی آن در ایجاد بیماری‌های گوارشی متفاوت باشند. در این راستا، هدف از پژوهش حاضر تعیین ژنوتیپ‌های ژن‌های *vacA* و *cagA* در سوش‌های هلیکوباکترپیلوری در بزاق و مدفوع کودکان شهر اصفهان بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی- توصیفی تعداد ۵۲ نمونه بزاق و مدفوع از کودکان زیر ۱۰ سال شهر اصفهان که دارای سابقه اختلالات گوارشی به‌ویژه رفلاکس معده بودند، در فاصله زمانی اسفند ماه ۱۳۹۴ تا تیر ماه ۱۳۹۵ گرفته شد. این کودکان از نظر آنتی‌بادی IgM ضدهلیکوباکترپیلوری در آزمایش الایزا مثبت بودند. شایان ذکر است که استخراج DNA از نمونه‌های بزاق و مدفوع انجام شد و وجود آلل‌های ژن‌های *vacA* و *cagA* به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR: Polymerase Chain Reaction) تعیین گردید.

یافته‌ها: متعاقب انجام آزمایش PCR روی نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که تعداد ۷ نمونه بزاق (۱۳/۴۶ درصد) و ۱ نمونه مدفوع (۱/۹۲ درصد) واجد ژن *ureC* هلیکوباکترپیلوری بودند. همچنین تمام نمونه‌های مثبت‌شده واجد ژن *cagA* بودند. علاوه‌براین در نمونه‌های بزاق و مدفوع مثبت‌شده از نظر هلیکوباکترپیلوری، تمام ۸ نمونه (۷ نمونه بزاق و ۱ نمونه مدفوع) دارای ژنوتیپ s_2/m_2 از نظر ژن *vacA* بودند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به‌دست‌آمده، ژنوتیپ s_2/m_2 از نظر ژن *vacA* می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای پیش‌بینی بیماری‌های شدید گوارشی در این منطقه در نظر گرفته شود. برای اطمینان از این موضوع، انجام مطالعات مولکولی وسیع‌تر در سایر جمعیت‌ها پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: ژنوتیپ‌های *vacA* و *cagA*، کودکان، هلیکوباکترپیلوری

* **نویسنده مسئول:** حسن ممتاز، گروه میکروبیولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۶۴؛ ایمیل: hamomtaz@yahoo.com

مقدمه

هلیکوباکترپیلوری باسیل گرم منفی و میکروآئروفیلی است که در مخاط معده اغلب به‌صورت مارپیچی و در محیط کشت به‌صورت خمیده مشاهده می‌شود. این باکتری عامل بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم‌های گوارشی، سرطان معده و سرطان غدد لنفاوی دستگاه گوارش است. عفونت با این باکتری در سراسر جهان گسترده می‌باشد؛ به‌طوری که در کشورهای درحال توسعه به بیش از ۸۰ درصد می‌رسد (۳-۱)؛ اما بیماری‌های مربوط به *هلیکوباکترپیلوری* تنها در ۲۰-۱۰ درصد از این جمعیت‌ها مشاهده می‌شود. پژوهشگران این تفاوت در بیماری‌زایی را مربوط به ۲ عامل می‌دانند: ۱. عواملی که به میزبان وابسته است و شامل ویژگی‌های ژنتیکی و ایمونولوژیک افراد، مصرف سیگار و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی و غیره می‌باشد که آن را خطری برای ابتلا به بیماری می‌نامند و ۲. عواملی که به باکتری وابسته هستند و *هلیکوباکترپیلوری* را با توجه به تفاوت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی به سویه‌ها و تیپ‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌کنند. لازم به ذکر می‌باشد که بیماری‌زایی هر سویه با توجه به میزان تبادل علائم بین باکتری و سلول‌های پوششی میزبان متفاوت است. مهم‌ترین تفاوت‌های بین سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری*، دو ژن *vacA* (کدکننده سیتوتوکسین واکوئل‌زا) و *cagA* (کدکننده پروتئین وابسته به سیتوتوکسین) می‌باشد (۴،۵). ژن *vacA* که سیتوتوکسین واکوئل‌زا را کد می‌کند، در تمامی سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* وجود دارد؛ اما سم آن تنها در ۵۰ درصد از سویه‌ها بیان می‌شود که این امر به دلیل تنوع در توالی اسیدهای آمینه ژن *vacA* در سویه‌های مختلف می‌باشد (۶). آلل‌های *vacA* دارای نوعی تنوع ژنتیکی موزائیک هستند؛ به‌طوری که در میان توالی سیگنال آن‌ها ۴ ناحیه *s1a*، *s1b*، *s1c* و *s2* و در توالی میانی آن‌ها تاکنون ۳ ناحیه *m1a*، *m1b* و *m2* کشف شده است. براساس گزارش‌های به‌دست‌آمده، سویه‌هایی با ژنوتیپ‌های s_1/m_1 و s_1/m_2 دارای حداکثر فعالیت سیتوتوکسیک و سویه‌هایی با ژنوتیپ s_2/m_2 و s_2/m_1 دارای حداقل فعالیت سیتوتوکسیک بوده و یا بدون فعالیت می‌باشند (۷،۸). ژن *cagA* فاکتور ویرولانس غیرمحافظت‌شده است و در ۶۰ تا ۹۰ درصد از سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* وجود دارد. این ژن در ناحیه I از جزیره بیماری‌زایی *cag* (*cag PAI*) قرار دارد و یکی از ژن‌های شاخص جزیره بیماری‌زایی می‌باشد (۷،۹). *cag PAI* یک مکان ۴۰ کیلو بازی است که درصد گوانین- سیتوزین آن (۳۵ درصد) با دیگر نواحی ژنوم متفاوت بوده و طی انتقال افقی به برخی از سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* منتقل شده است. بر مبنای مطالعات، *CagA* یکی از پروتئین‌های سطحی غشایی *هلیکوباکترپیلوری* می‌باشد که از قدرت ایمنی‌زایی بالایی برخوردار است و پس از ورود به سلول‌های پوششی معده، منجر به دوکی‌شدن سلول میزبان می‌شود. به نظر می‌رسد که شدت بیماری‌های گوارشی ناشی از *هلیکوباکترپیلوری* با وجود جزیره بیماری‌زایی *cag* در ارتباط باشد (۱۰،۱۱). از سوی دیگر برخی از مطالعات نشان داده‌اند که سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* $cagA^+$ با توان بیشتری در مقایسه با سویه‌های $cagA^-$ مرگ برنامه‌ریزی‌شده را در سلول‌های AGS القا می‌نمایند؛ بنابراین به نظر می‌رسد که حضور ژن *cagA* یک عامل کلیدی در تعامل باکتری و میزبان باشد که منجر به اختلالات گوارشی می‌گردد (۱۲،۱۳). مطالعات اخیر حاکی از آن هستند که ژن *cagA* به‌تنهایی نمی‌تواند به‌عنوان یک شاخص برای پیش‌بینی بیماری‌های گوارشی در نظر گرفته شود. هنگامی که پروتئین *CagA* توسط سیستم ترشحی تیپ *IV* وارد سلول میزبان می‌گردد، به وسیله کینازهای خانواده *Src* در جایگاه‌های تیروزین خاصی فسفوریله می‌شود. *CagA* فسفوریله‌شده باعث به‌وجودآمدن یک کمپلکس فیزیکی با فسفاتاز *SHP-2* شده و بر سیگنال‌های درون سلولی تأثیر می‌گذارد. شایان ذکر است که هرچه اتصال *CagA* با *SHP-2*

محکم‌تر باشد، شدت علائم بالینی بیشتر خواهد بود. براساس توالی‌های آمینو اسیدی در قسمت اتصال *SHP-2* می‌توان بنیان‌های *cagA* را به ۳ دسته A، B و C تقسیم نمود (۱۴،۱۵). امروزه براساس ویژگی‌های واکوئله‌کنندگی و نیز حضور ژن *cagA*، *هلیکوباکترپیلوری* به تیپ‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شود: تیپ I که شامل سویه‌های دارای ژن *cagA* و فعالیت سیتوتوکسیک توسط *vacA* است؛ تیپ II که شامل سویه‌های فاقد ژن *cagA* و فعالیت سیتوتوکسین می‌باشد؛ تیپ III که دارای ژن *cagA* بوده و فاقد فعالیت سیتوتوکسین است؛ تیپ IV که فاقد ژن *cagA* بوده و دارای فعالیت سیتوتوکسیک می‌باشد. ذکر این نکته ضرورت دارد که سوش‌ها و عوامل حدت *هلیکوباکترپیلوری* در نواحی مختلف جغرافیایی متفاوت هستند (۵،۱۶).

هدف از این پژوهش، بررسی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های ژن‌های *vacA* و *cagA* در سوش‌های *هلیکوباکترپیلوری* در بزاق و مدفوع کودکان زیر ۱۰ سال شهر اصفهان بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی- توصیفی در فاصله زمانی اسفند ماه ۱۳۹۴ تا تیر ماه ۱۳۹۵، ۵۲ نمونه بزاق و مدفوع از کودکان ۱۰-۵ سال (با کسب رضایت از والدین بیماران) که به علت مشکلات گوارشی در بیمارستان‌های شهر اصفهان بستری بودند و آلودگی سرمی به *هلیکوباکترپیلوری* در آن‌ها به اثبات رسیده بود (*H.pylori*- Ig M^+) اخذ گردید. نمونه‌های به‌دست‌آمده در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گشت و به روش PCR مورد آزمایش قرار گرفت.

پس از استخراج DNA ژنومی از نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (DNP™, DNA Extraction Kit, CinnaGen, Iran) آزمایش PCR در ۳ مرحله جهت تشخیص حضور هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های مورد مطالعه (با ردیابی ژن *ureC*) و تعیین ژنوتیپ‌های ژن *cagA* و *vacA* طبق روش ارائه‌شده توسط ممتاز و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت (۱۷). مشخصات پرایمرهای مورد استفاده و شرایط انجام آزمایش PCR در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.

آزمایش PCR به‌صورت جداگانه برای هر کدام از ژن‌های مورد مطالعه در دستگاه ترموسایکلر (Flex²Cycler, Germany) انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه (۱۷)

نام ژن	توالی پرایمر (۵-۳)	اندازه محصول (جفت باز)
ureC	GGA TAA GCT TTT AGG GGT GTT AGG GG GCT TAC TTT CTA ACA CTA ACG CGC	۲۹۶
vacA s1a	CTC TCG CTT TAG TAG GAG C CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	۲۱۳
vacA s1b	AGC GCC ATA CCG CAA GAG CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	۱۸۷
vacA s1c	CTC TCG CTT TAG TGG GGY T CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	۲۱۳
vacA s2	GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	۱۹۹
vacA m1a	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	۲۹۰
vacA m1b	GGC CCC AAT GCA GTC ATG GAT GCT GTT AGT GCC TAA AGA AGC AT	۲۹۱
vacA m2	GGA GCC CCA GGA AAC ATT G CAT AAC TAG CGC CTT GCA C	۳۵۲
cagA	GGA ATA CCA AAA ACG CAA AAA CCA CCC CAC AAT ACA CCA GCA AAA CT	۳۰۰

جدول ۲: شرایط واکنش PCR جهت ردیابی ژن‌های مورد مطالعه (۱۷)

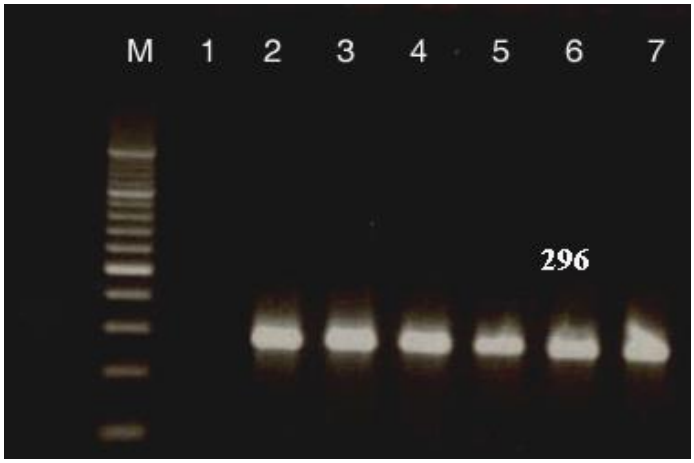
نام ژن	اجزای واکنش (حجم واکنش= ۲۵ میکرولیتر)	برنامه حرارتی
ureC	PCR Buffer 10X= 5µL Mgcl2 50mM= 1.5 mM dNTP Mix 10mM= 200µM Primer F 25µM= 0.4µM Primer R 25µM= 0.4µM Taq DNA Polymerase= 1.5U DNA= 2µl	۱ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ ۵ دقیقه) ۴۰ سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ ۴۵ ثانیه ۵۹ درجه سانتی‌گراد؛ ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۴۵ ثانیه) ۱ سیکل (۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۶ دقیقه)
vacA* genotypes, *cagA	PCR Buffer 10X= 5µL Mgcl2 50mM= 2mM dNTP Mix 10mM= 200µM Primer F 25µM= 0.4µM Primer R 25µM= 0.4µM Taq DNA Polymerase= 1U DNA= 2µl	۱ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ ۵ دقیقه) ۳۵ سیکل (۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ ۴۵ ثانیه ۵۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۴۵ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۴۵ ثانیه) ۱ سیکل (۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ ۶ دقیقه)

در هر مرحله از انجام آزمایش، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاس، لیتوانی) الکتروفورز گردید و توسط دستگاه UV- ترانس لومیناتور مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

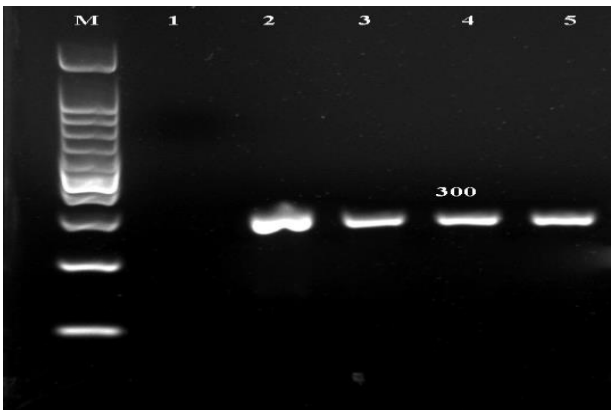
در مطالعه حاضر تعداد ۵۲ نمونه بزاق و مدفوع از کودکان زیر ۱۰ سال که دارای سابقه اختلالات گوارشی به‌ویژه رفلاکس معده بودند گرفته شد. این کودکان از نظر آنتی‌بادی IgM ضد*هلیکوباکترپیلوری* در آزمایش الایزا مثبت بودند. متعاقب انجام آزمایش PCR روی نمونه‌های مورد مطالعه، تعداد ۷ نمونه بزاق و ۱ نمونه مدفوع واجد ژن *ureC هلیکوباکترپیلوری* بودند که این نمونه مدفوع مربوط به کودکی بود که بزاق وی نیز مثبت شده بود. در شکل ۱ ژل حاصل از الکتروفورز مربوط به ردیابی این ژن در نمونه‌های مورد بررسی ارائه شده است.

تمام نمونه‌های مثبت‌شده واجد ژن *cagA* بودند. در شکل ۲ نتیجه PCR مربوط به ردیابی این ژن نشان داده شده است.

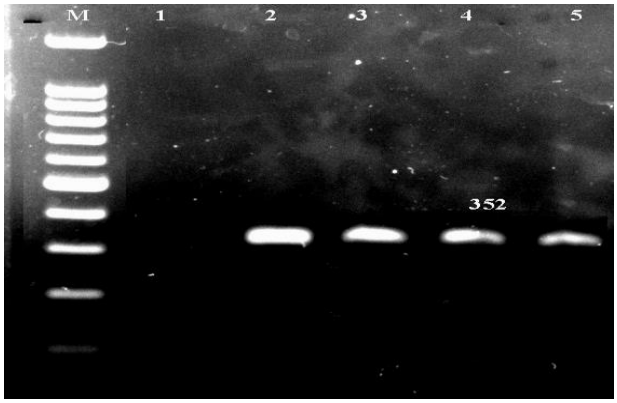


شکل ۱: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *ureC* در نمونه‌های بزاق و مدفوع مورد مطالعه (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون ۱= نمونه کنترل منفی؛ ستون ۷-۲= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۲۹۶ جفت بازی)

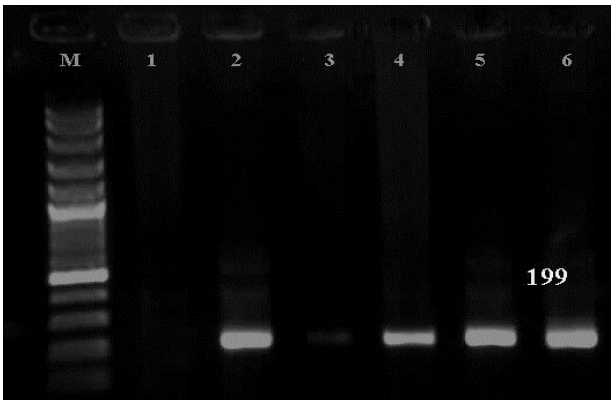
در ژنوتایپینگ نمونه‌های مثبت‌شده و تعیین انواع آلل‌های ژن *vacA* در نمونه‌های بزاق و مدفوع مثبت‌شده از نظر *هلیکوباکترپیلوری*، تمام ۸ نمونه (۷ نمونه بزاق و ۱ نمونه مدفوع) دارای ژنوتیپ *s2/m2* به لحاظ ژن *vacA* بودند. در شکل ۳ و ۴ ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ژنوتیپ‌های ژن *vacA* نشان داده شده است (جدول ۳).



شکل ۲: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *cagA* در نمونه‌های مثبت *هلیکوباکترپیلوری* (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون ۱= نمونه کنترل منفی؛ ستون ۵-۲= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۳۰۰ جفت بازی)



شکل ۳: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *vacA/m2* در نمونه‌های مثبت *هلیکوباکترپیلوری* (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون ۱= نمونه کنترل منفی؛ ستون ۵-۲= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۳۵۲ جفت بازی)



شکل ۴: ژل حاصل از الکتروفورز محصول PCR مربوط به ردیابی ژن *vacA/s2* در نمونه‌های مثبت *هلیکوباکترپیلوری* (ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA؛ ستون ۱= نمونه کنترل منفی؛ ستون ۶-۲= نمونه‌های مورد مطالعه واجد قطعه ۱۹۹ جفت بازی)

جدول ۳: ژنوتیپ‌های *cagA* و *vacA* در *هلیکوباکترپیلوری* ردیابی‌شده در بزاق و مدفوع کودکان شهر اصفهان

نوع و تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت *H. pylori*	*cagA*	*s1a*	*s1b*	*s1c*	*s2*	*m1a*	*m1b*	*m2*
بزاق/۵۲	۷	۷	–	–	–	۷	–	–	۷
مدفوع/۵۲	۱	۱	–	–	–	۱	–	–	۱

بحث

هلیکوباکترپیلوری یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در انسان تلقی می‌شود؛ زیرا عفونت آن بیش از ۵۰ درصد از مردم دنیا را درگیر کرده است. البته شیوع آن در کشورهای مختلف با توجه به موقعیت اقتصادی، فرهنگی و اجتماعی متفاوت می‌باشد؛ برای مثال در ژاپن، آمریکای جنوبی، ترکیه و پاکستان شیوع آن بیش از ۸۰ درصد است؛ درحالی که در کشورهایی مانند کشورهای اسکاندیناوی و انگلستان شیوع آن بین ۲۰ تا ۴۰ درصد متغیر می‌باشد. شیوع این باکتری در ایران بین ۶۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است که نشان می‌دهد ایران نسبت به این عفونت ریسک‌پذیر می‌باشد. میزان شیوع این باکتری در پژوهش حاضر با سایر گزارشات ارائه‌شده در ایران همخوانی داشت (۱۸،۱۹).

شواهد بسیاری در ارتباط با حضور این باکتری در بزاق، مدفوع و پلاک‌های دندانی علاوه بر معده انسان وجود دارد. در پژوهش حاضر موفق به شناسایی باکتری در ۱۳/۴۶ درصد از نمونه‌های بزاق و ۱/۹۲ درصد از نمونه‌های مدفوع شدیم. دلایل زیادی برای کم گزارش‌شدن میزان باکتری در ناحیه دهان وجود دارد. نخست اینکه دارودرمانی ممکن است باکتری را در ناحیه گوارشی ریشه‌کن کند؛ درحالی که بر روی باکتری‌های دهان اثری نداشته باشد؛ در نتیجه نتایج گزارش‌شده مربوط به باکتری‌هایی باشد که به‌عنوان مثال ریشه‌کن شده‌اند (۱۸). در ارتباط با مورد دوم باید گفت که ممکن است باکتری‌هایی که در ناحیه دهانی به‌عنوان فلور نرمال وجود دارند، جلوی رشد و تکثیر باکتری را با ترشح موادی مانند باکتریوسین بگیرند (۸). سومین نظریه این است که *این باکتری* ممکن است بتواند درون یک نوع مخمر از خانواده *کاندیدا* در حفره‌های دهانی زندگی کند که براساس مطالعات قبلی این راه باعث می‌شود که به راحتی بتواند به میزبان‌های دیگر انتقال پیدا کند (۲۰)؛ بنابراین این نوع مخمر می‌تواند آن را از استرس‌های محیطی محافظت کرده و به مجرای گوارشی میزبان‌های دیگر انتقال دهد (۲۱).

براساس گزارش Gatti و همکاران از برزیل (۲۲) و Bindouynoi و همکاران از هندوستان (۲۰)، ارتباط مستقیمی بین ژن *cagA* و التهاب نواحی گوارشی وجود دارد. شیوع ژن *cagA* در مطالعه آن‌ها به‌ترتیب ۷۹ و ۵۹ درصد بود؛ اما Kangsadalampai و همکاران از تایلند (۲۳)، Cirak و همکاران از ترکیه (۲۴) و Gutierrez و همکاران از کوبا (۲۵) هیچ رابطه‌ای را بین این ژن و علائم گوارشی مشاهده نکردند. شیوع ژن *cagA* در تایلند ۳۱ درصد، در ترکیه ۷۱ درصد و در کوبا ۸۸/۵ درصد بود. در بررسی‌هایی که در ناحیه گوارشی صورت گرفت، به دلیل شیوع بالای این ژن، ما نیز در پژوهش حاضر موفق به یافتن ارتباط بین این ژن و بیماری‌های گوارشی نشدیم که این امر ممکن است به این دلیل باشد که تغییراتی در سوش‌های *هلیکوباکترپیلوری* جمعیت ایران به وجود آمده و یا اینکه ما ناحیه نادرستی از ژن *cagA* را مورد هدف قرار داده باشیم.

براساس یافته‌های Lopez-Vidal از مکزیک (۲۶) *vacA s1b/m1*، Linpisarn از تایلند (۲۷) *vacA s1a/m1* و *vacA s1c/m1* و احمد و همکاران از پاکستان (۲۸) *vacA* s_1b/m_2 و *vacA* s_1a/m_1a سوش‌های غالب *هلیکوباکترپیلوری* در

کشورشان بودند. در پژوهش حاضر ما *vacA* s_2/m_2 را سوش غالب در منطقه خود یافتیم که این امر با موارد گزارش‌شده در کشورهای آلمان، لیتوانی، ترکیه، عراق و عربستان صعودی همخوانی داشت؛ اما با کشورهای مکزیک، تایلند و پاکستان کاملاً متفاوت بود. در این راستا، Medina و همکاران از آرژانتین (۲۹) *هلیکوباکترپیلوری* را در ۱۸/۴ درصد از نمونه‌های بزاق، Fernandez و همکاران از مکزیک (۳۰) در ۱۷ درصد از نمونه‌های پلاک دندانی و Czesnikiewicz و همکاران از هلند (۱۸) در ۵۴ درصد از نمونه‌های بزاق و ۴۸/۳ درصد از پلاک‌های دندانی نیافتند؛ درحالی که Iamaroon از تایلند اصلاً موفق به یافت این باکتری در حفره‌های دهانی نشد (۳۱). در پژوهش حاضر ما موفق به شناسایی باکتری در ۱۳/۴۶ درصد از نمونه‌های بزاق و ۱/۹۲ درصد از نمونه‌های مدفوع شدیم که این امر ممکن است به دلیل پایین‌بودن سن افراد در جمعیت مورد مطالعه باشد.

از سوی دیگر براساس یافته‌های Tanahashi و همکاران در استرالیا ۹۳/۷ درصد از نمونه‌های مدفوع، *هلیکوباکترپیلوری* مثبت بودند (۳۲)؛ درحالی که Parsonnet و همکاران (۱۹) این باکتری را در ۸۸ درصد از نمونه‌های مدفوع یافتند. شایان ذکر است که در هر دو پژوهش از تست PCR برای شناسایی بهره برده شد. ما نیز در پژوهش حاضر از همین تست استفاده نمودیم و در ۱/۹۲ درصد از نمونه‌ها قادر به شناسایی باکتری بودیم. شیوع پایین‌تر این باکتری در نمونه‌های مدفوع نسبت به نمونه‌های بزاق می‌تواند ناشی از باکتری‌های نرمال فلورای موجود در روده باشد. داده‌های ما نشان‌دهنده ۵۸ درصد هموژی بین ژنوتیپ‌های *vacA* در نمونه‌های بزاق و معده بود. این درحالی است که Wang و همکاران (۲۱) قادر به یافتن ۶۴ درصد هموژی بودند که نتایج تا حدودی همخوانی دارند. این یافته‌ها این فرضیه را که بزاق می‌تواند به‌عنوان یک منبع عفونت *هلیکوباکترپیلوری* باشد، تقویت می‌کنند. تفاوت اصلی بین نمونه‌های معده، مدفوع و دهان این است که نمونه‌های معده تنها برگرفته از بخشی از نمونه‌های کل می‌باشند؛ درحالی که نمونه‌های بزاق از کل حفره‌های دهانی گرفته می‌شوند. جالب‌تر آن است که *هلیکوباکترپیلوری‌های* جداشده از نمونه‌های بیوپسی معده تنوع بیشتری نسبت به نمونه‌های مدفوعی و دهانی دارند که این امر نشان‌دهنده خاستگاه اصلی این باکتری است که بر مبنای آن انواع سوش‌ها قادر هستند در یک بیمار و در یک مکان کنار هم، هم‌زیست باشند. در مجموع، شباهت بسیاری بین سوش‌های باکتری جداشده از بزاق، مدفوع و نمونه‌های بیوپسی معده وجود دارد. این موضوع نشان‌دهنده آن است که بزاق و مدفوع نیز می‌توانند به‌عنوان منابع عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در نظر گرفته شوند. تنوعی که بین سوش‌های *هلیکوباکترپیلوری* موجود در بیوپسی معده، بزاق و مدفوع در یک بیمار وجود دارد، می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که ممکن است بیش از یک سوش *هلیکوباکترپیلوری* در یک فرد وجود داشته باشد که این امر ممکن است به دلیل عفونت همزمان و با تنوع ژنتیکی در درون بدن باشد.

نتیجه‌گیری

براساس مطالعات انجام‌شده در این منطقه می‌توان ژنوتیپ s_2/m_2 از نظر ژن *vacA* را غالب در نظر گرفت. همچنین می‌توان گفت که ژنوتیپ s_2/m_2 احتمالاً بیشترین ارتباط را با بیماری‌های شدید گوارشی در کودکان دارد. از سوی دیگر، حضور ژن *cagA* به‌تنهایی شاخصی برای بیماری‌زایی این باکتری نمی‌باشد؛ اما همراه با آلل *vacA* s_2/m_2 می‌تواند بیماری‌زایی را تشدید کند. شایان ذکر است که سوش *هلیکوباکترپیلوری* ایرانی از نوع غربی بوده و با سوش‌های شناسایی‌شده در کشورهای اروپایی و آمریکایی تشابه دارد. به همین دلیل است که

بیماری‌هایی نظیر زخم‌های گوارشی در ایران شیوع بیشتری داشته و شیوع سرطان معده کمتر می‌باشد. ذکر این نکته ضرورت دارد که در این بررسی قادر به شناسایی ژنوتیپ خاصی از *هلیکوباکترپیلوری* به‌عنوان شاخصی برای ایجاد سرطان معده نبودیم. به‌منظور کسب اطمینان از این موضوع، انجام مطالعات مولکولی وسیع‌تری در سایر نقاط ایران در گروه‌های سنی مختلف پیشنهاد می‌گردد.

حمایت مالی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی است و با حمایت مالی حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

نمونه‌ها با هماهنگی بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و با رضایت کامل والدین کودکان اخذ شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافع بین نویسندگان وجود ندارد و مطالعه با اطلاع و هماهنگی بین نویسندگان ارسال شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از زحمات مدیریت محترم بخش عفونی بیمارستان‌های مورد مطالعه و کارشناس محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد؛ جناب آقای مهندس محمد ربیعی تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

1. Mohammadi M, Oghalaei A, Mohajerani N, Massarrat S, Nasiri M, Bennedsen M, et al. Prevalence of Helicobacter pylori vaculating cytotoxin and its allelic musaism as a predictive marker for Iranian dyspeptic patients. Bull Soc Pathol Exot. 2003; 96(1):3-5.
2. Jang KM, Choe BH, Choe JY, Hong SJ, Park HJ, Chu MA, et al. Changing prevalence of helicobacter pylori infections in Korean children with recurrent abdominal pain. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr. 2015; 18(1):10-6.
3. Soltani1 J, Nikkhoo B, Khormehr J, Ataee P, Hakhamaneshi M, Gharibi F. Breastfeeding and Helicobacter pylori infection in early childhood. Iran J Pediatr. 2014; 24(6):745-52.
4. Łazowska-Przeorek I, Kotowska M, Banasiuk M, Karolewska-Bochenek K, Banaszkiewicz A, Gawrońska A, et al. Value of antral nodularity for the diagnosis of Helicobacter pylori infection in children. Med Sci Monit. 2015; 21:1827-30.
5. Çınar A, Sadıç M, Atılgan Hİ, Baskın A, Koca G, Demirel K, et al. Prevalence of Helicobacter pylori infection in school and pre-school aged children with C-14 urea breath test and the association with familial and environmental factors. Mol Imaging Radionucl Ther. 2015; 24(2):66-70.
6. Momtaz H, Dabiri H, Souod N, Gholami M. Study of Helicobacter pylori genotype status in cows, sheep, goats and human beings. BMC Gastroenterol. 2014; 14:61.
7. Razavi A, Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Shirzad M, Rahimian G, Rafieian-Kopaei M, et al. Comparative immune response in children and adults with H. pylori infection. J Immunol Res. 2015; 2015:315957.
8. Kargar M, Souod N, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Rezaian AA. Evaluation of cagA tyrosine phosphorylation DNA motifs in Helicobacter pylori isolates from gastric disorder patients in West of Iran. Sci Res Essays. 2011; 6(31):6454-8.
9. Karimi A, Fakhimi-Derakhshan K, Imanzadeh F, Rezaei M, Cavoshzadeh Z, Maham S. Helicobacter pylori infection and pediatric asthma. J Inf Pediatr. 2013; 5:132-5.
10. Khalifehgholi M, Shamsipour F, Ajhdarkosh H, Ebrahimi Daryani N, Pourmand MR, Hosseini M, et al. Comparison of five diagnostic methods for Helicobacter pylori. Iran J Microbiol. 2013; 5(4): 396-401.
11. Monzon H, Forne M, Esteve M, Rosinach M, Loras C, Espinos JC, et al. Helicobacter pylori infection as a cause of iron deficiency anaemia of unknown origin. World J Gastroenterol. 2013; 19(26):4166-71.
12. Tamadon MR, Saberi Far M, Soleimani A, Ghorbani R, Semnani V, Malek F, et al. Evaluation of noninvasive tests for diagnosis of Helicobacter pylori infection in hemodialysis patients. J Nephropathol. 2013; 2(4):249-53.
13. Pourakbari B, Ghazi M, Mahmoudi S, Mamishi S,

Azhdarkosh H, Najafi M, et al. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by invasive and noninvasive tests. Braz J Microbiol. 2013; 44(3):795-8.
14. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Peek RM Jr, Wilson KT, Loh JT, et al. Non-invasive genotyping of Helicobacter pylori cagA, vacA, and hopQ from asymptomatic children. Helicobacter. 2012; 17(2):96-106.
15. McMillan M, Mackay WG, Williams CL, Shepherd AJ, Malcolm C, Weaver LT. Interfamilial genotyping of Helicobacter pylori from Faecal DNA. Gastroenterol Res Pract. 2011; 2011:491035.
16. Roman-Roman A, Giono-Cerezo S, Camorlinga-Ponce M, Martinez-Carrillo DN, Loaiza-Loeza S, Fernandez-Tilapa G. vacA genotypes of Helicobacter pylori in the oral cavity and stomach of patients with chronic gastritis and gastric ulcer. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013; 31(3):130-5.
17. Momtaz H, Souod N, Dabiri H. Comparison of the virulence factors of Helicobacter pylori isolated in stomach and saliva in Iran. Am J Med Sci. 2010; 340(5):345-9.
18. Czesnikiewicz-Guzik M, Karczewska E, Bielanski W, Guzik TJ, Kapera P, Targosz A, et al. Association of the presence of Helicobacter pylori in the oral cavity and in the stomach. J Physiol Pharmacol. 2004; 55(2):105-15.
19. Parsonnet J, Shmuely H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults. JAMA. 1999; 282(23):2240-5.
20. Bindayna KM, Al Baker WA, Botta GA. Detection of Helicobacter pylori cagA gene in gastric biopsies, clinical isolates and faeces. Indian J Med Microbiol. 2006; 24(3):195-200.
21. Wang J, Chi DS, Laffan JJ, Li C, Ferguson DA, Litchfield P, et al. Comparison of cytotoxin genotypes of Helicobacter pylori in stomach and saliva. Dig Dis Sci. 2002; 47(8):1850-6.
22. Gatti LL, Labio R, Silva LC, Smith Mde A, Payao SL. cagA positive Helicobacter pylori in Brazilian children related to chronic gastritis. Braz J Infect Dis. 2006; 10(4):254-8.
23. Kangsadalampai S, Rojpibulstit P, Ratanavalachai T, Tomtitchong P. cagA-positive Helicobacter pylori and gastroduodenal pathology. Thamasat Int J Sci Technol. 2005; 10(1):1-5.
24. Cirak MY, Ozdek A, Yilmaz D, Bayiz U, Samim E, Turet S. Detection of Helicobacter pylori and its cagA gene in tonsil and adenoid tissues by PCR. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003; 129(11):1225-9.
25. Gutierrez B, Vidal T, Valmana CE, Camou-Juncas C, Santos A, Megraud F, et al. Helicobacter pylori infection in Havana, Cuba. Prevalence and cagA status of the strains. VacciMonitor. 2005; 14(2):15-9.
26. Lopez-Vidal Y, Ponce-de-León S, Castillo-Rojas G, Barreto-Zuniga R, Torre-Delgadillo A. High diversity of vacA and cagA Helicobacter pylori genotypes in patients with and without gastric cancer. PLoS One. 2008; 3(12):e3849.
27. Linpisarn S, Suwan W, Lertprasertsuk N, Koosirirat C, Steger HF, Prommuangyong K, et al. Helicobacter pylori cagA, vacA and iceA genotypes in northern Thai patients with gastric disease. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38(2):356-62.
28. Ahmad T, Sohail K, Rizwan M, Mukhtar M, Bilal R, Khanum A. Prevalence of Helicobacter pylori pathogenicity associated cagA and vacA genotypes among Pakistani dyspeptic patients. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 55(1):34-8.
29. Medina ML, Medina MG, Martin GT, Picon SO, Bancalari A, Merino LA. Molecular detection of Helicobacter pylori in oral samples from patients suffering digestive pathologies. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010; 15(1):e38-42.
30. Fernandez-Tilapa G, Axinecuilteco-Hilera J, Giono-Cerezo S, Martinez-Carrillo DN, Illades-Aguiar B, Roman-Roman A. vacA genotypes in oral cavity and Helicobacter pylori seropositivity among adults without dyspepsia. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011; 16(2):e175-80.
31. Iamaroon A, Chaimano S, Linpisarn S, Pongsiriwet S, Phornphutkul K. Detection of Helicobacter pylori in recurrent aphthous ulceration by nested PCR. J Oral Sci. 2003; 45(2):107-10.
32. Tanahashi T, Kita M, Kodama T, Sawai N, Yamaoka Y, Mitsufuji S, et al. Comparison of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and PCR-direct sequencing methods for differentiating Helicobacter pylori ureB gene variants. J Clin Microbiol. 2000; 38(1):165-9.

Volume 20, Issue 64, Winter 2018, Pages: 24-33

Original Article

Genotyping of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* Strains in Saliva and Feces of Isfahan's Children

Moein Saberi[1], Hassan Momtaz[2*], Zahra Bamzadeh[3]

[1] Post Graduated of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[2] Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
[3] Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 11 May 2017 **Accepted:** 31 Aug 2017

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* is a factor causing digestive diseases. The studies have been done on this disease revealed that polymorphism of acute factors of this bacteria (*vacA* and *cagA*) can determine its ability in creating different types of digestive diseases. This research aimed to determine the genotypes of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* strains in saliva and stool of Isfahan's children.

Materials and Methods: In this cross-sectional study, 52 sample, from March 2015 to July 2016, for were taken from saliva and stool of Isfahan's children under 10 years old suffered from gastrointestinal disorders, especially gastric reflux. These children were positive of anti-*Helicobacter pylori* IgM in ELISA test. DNA was extracted from saliva and stool samples the alleles of *vacA* and *cagA* were determined by PCR.

Results: Following the PCR test on the studied samples, 7 samples of saliva (13.46%) a 1 sample of stool (1.92%) had *ureC* of *Helicobacter pylori* and all of the positive samples, had *cagA*. In addition, all of 8 positive samples to *Helicobacter pylori* had the genotype of s_2/m_2 from the viewpoint of *vacA*.

Conclusion: According to the results, genotype of s_2/m_2 from the viewpoint of *vacA* should be considered as an index for prediction of severe digestive diseases in this region. To be sure, doing wider molecular studies in other populations is recommended.

Keywords: Children, *cagA*, Genotypes, *Helicobacter pylori*, *vacA*

*** *Corresponding Author:*** Hassan Momtaz, Department of Microbiology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Tel : 03833361064; Email: hamomtaz@yahoo.com