

PCR و RFLP ژن ureC (glmM) به منظور تشخیص و تیپ‌بندی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جداشده از نمونه بیوپسی معده بیماران با ناراحتی‌های گوارشی

محمد رضا نفیسی^۱ PhD، محمد علیپور شادباد^۲ MSc، علی کریمی^۱ MSc، قربانعلی رحیمیان^۳ PhD
عباسعلی ایمانی فولادی^{*} PhD

چکیده

اهداف. هلیکوباکتر پیلوری یکی از پاتوژن‌های مهم است که سلول‌های اپی‌تلیال معده را آلوده می‌کند. هدف این مطالعه، بررسی و تیپ‌بندی هلیکوباکتر پیلوری‌های جداشده از نمونه‌های کلینیکی با استفاده از ژن ureC (glmM) بود.

مواد و روش‌ها. به منظور تیپ‌بندی هلیکوباکتر پیلوری از روش مولکولی استفاده شد. برای تعیین هتروژنیسته ژنتیکی ۳۷ نمونه هلیکوباکتر پیلوری جداشده از محیط کشت، از روش PCR-RFLP استفاده شد. قطعه ۸۲۰ جفت‌بازی ژن ureC با آنزیم‌های محدودکننده MboI، HhaI هضم شد.

یافته‌ها. ۱۱ الگوی مختلف با هضم ناشی از آنزیم MboI و ۸ الگوی مختلف از هضم با آنزیم HhaI مشخص شد. مدل‌های حاصل از ترکیب الگوهای هضم دو آنزیم، ۲۱ الگوی متفاوت به وجود آورد.

نتیجه‌گیری. براساس نتایج این مطالعه، ارتباطی بین بیماری‌ها و الگوها وجود ندارد و تنوع ژنتیکی گسترده‌ای بین قطعات مشاهده می‌شود. این موضوع، نویدبخش ایجاد ابزاری کارآمد برای بررسی مولکولی اپیدمیولوژی و بررسی اجداد و پی بردن به منشأ باکتریایی و پراکندگی آن در مناطق مختلف جغرافیایی است.

کلیدواژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، PCR-RFLP، ژن ureC

مقدمه

سویه‌های مختلف، هیچ‌یک از روش‌های تعیین سویه (از قبیل بیوتایپینگ، سروتایپینگ و فاژتایپینگ) که در مورد سایر باکتری‌ها به کار می‌روند، قادر به تفکیک و تمایز دقیق سویه‌های مختلف هلیکوباکتر پیلوری نیستند [۵، ۸]. برای اهداف همه‌گیری‌شناسی و بالینی و همچنین به منظور بررسی انتقال بیمارستانی، خانوادگی، کارآیی درمان، عود و کلونی‌زایی مجدد باکتری، به ژنوتایپینگ و روش‌های دقیق مانیتورینگ عفونت‌های هلیکوباکتر پیلوری نیاز است [۵].

بررسی نتایج تحقیقات مختلف، بیانگر قدرت بالای تیپ‌بندی با روش‌های PCR-RFLP، RAPD، REP-PCR و PCR-RFLP با استفاده از آنزیم *HhaI*، بهترین قدرت تفکیک را برای ژن *ureC* ایجاد می‌کند. روش‌های هضم کروموزومی (ریبوتایپینگ) و الکتروفورز در میدان ضربان‌دار، به دلیل محدودیت در قدرت تیپ‌بندی توصیه نمی‌شوند [۵].

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی، ۳۷ نفر با دامنه سنی ۱۷ تا ۸۵ سال با میانگین سنی ۶۶ سال وارد مطالعه شدند (۲۱ مرد و ۱۶ زن). ابتدا با اخذ رضایت‌نامه از مراجعه‌کنندگان، از هر فرد نمونه ۳-۴ نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم توسط فوق تخصص گوارش و با دستگاه آندوسکوپ (Optic Fiber؛ ژاپن) گرفته شد. یک قطعه حاصل از بیوپسی، برای تشخیص سریع فعالیت اوره‌آزی در لوله حاوی اوره قرار گرفت. ۳ قطعه دیگر، برای آزمایشات میکروبی‌شناسی و مولکولی در ویال‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل به آزمایشگاه‌های مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ارسال شد.

نمونه بیوپسی حاصل از آندوسکوپ معده توسط لبه‌های دو لام استریل درون پلیت استریل تکه‌تکه شد و سوسپانسیون یکنواختی به دست آمد. مقداری از آن توسط لوپ استریل سرد روی محیط کشت BHI غنی‌شده با خون دفیبرینه‌شده گوسفند (۵٪) و انتخابی‌شده با آنتی‌بیوتیک‌های تری‌متوپریم ۵ میلی‌گرم در لیتر، و نکوماپسین ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و پلی‌میکسین B ۲۵۰۰ واحدی و در شرایط میکروآیروفلیک اتمسفر حاوی ۱۰٪ دی‌اکسیدکربن، رطوبت در حد اشباع و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. این شرایط در ظرف بی‌هوازی فاقد پالادیوم و با به‌کارگیری گاز پک و پنبه آغشته به آب فراهم آمد و نمونه‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز انکوبه

هلیکوباکتر پیلوری یکی از پاتوژن‌های موفق است که سلول‌های اپی‌تلیال معده را آلوده می‌کند [۱] و از سوی سازمان بهداشت جهانی به عنوان سرطان‌زای درجه یک طبقه‌بندی شده است. سرطان معده دومین عامل مرگ‌ومیر در بین نئوپلازی‌ها و چهارمین سرطان شایع در دنیاست. هر سال، حدود ۶۵۰ هزار مرگ و ۸۸۰ هزار ابتلای جدید رخ می‌دهد که ۲/۳ موارد آن در کشورهای جهان سوم است [۲، ۳، ۴]. توالی کامل ژنوم هلیکوباکتر پیلوری سویه ۲۶۶۹۵ در سال ۱۹۹۷ توسط انیستیتو TIGR و دو سال بعد، توالی ژنوم سویه J99 منتشر شد [۵]. از فاکتورهای مهم در بیماری‌زایی باکتری، تولید اوره‌آز است و قسمت بزرگی از ژنوم باکتری را تشکیل می‌دهد. ژن‌های ساختمانی *ureAB* و ژن‌های کمکی *ureIEFGH* در این ارتباط شناسایی شده‌اند. ناحیه‌ای ۲/۲ کیلوبازی در قسمت بالادست ژن *ureAB* وجود دارد. این منطقه در هلیکوباکتر پیلوری حاوی دو قالب باز خواندن (ORF) به نام‌های *ureD* و *ureC* است که در تولید اوره‌آز نقشی ندارند. ژن *ureC* حدود ۱/۳۶ کیلوباز طول دارد. در قسمت پایین دست *ureC*، توالی‌های پالیندرومی وجود دارند. بررسی ۶۰ ایزوله هلیکوباکتر پیلوری به وسیله PCR و بررسی توالی DNA، حضور ژن *ureC* را در همه آنها نشان داده است. ژن *ureC* پروتئینی را رمز می‌کند که از لحاظ تکاملی ثابت مانده است. ژن *ureC* در سال ۱۹۹۷ توسط گودوین و همکاران به فسفوگلوکزآمین موتاز (*glmM*) تغییر نام داد. بین این ژن در باکتری/شریشیا کلی و محصول ژن *ureC*، ۴۳٪ هومولوژی وجود دارد. ژن *ureC* فسفوگلوکزآمین موتاز را رمز می‌کند [۶]. تنوع زیاد ژنوم هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با اکثر ارگانیزم‌ها غیرعادی است. این تنوع به کمک اثر هضم‌کننده آنزیم‌های اندونوکلئازی محدودکننده به دست آمده است و می‌تواند ناشی از جابه‌جایی تکه‌های کوچکی از زنجیره تکراری نوکلئوتید، جهش‌های خاموش یا جذب DNA خارجی باشد. شاید جهش‌های خاموش، مکانیزمی باشد که باعث بقای هلیکوباکتر پیلوری در محیط نامناسب معده می‌شود [۶، ۷].

روش‌های مناسبی برای افتراق سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری برپایه تنوع ژنتیکی وجود ندارد؛ علی‌رغم تفاوت آنتی‌ژنیک

کشت‌ها بودند و استخراج طبق دستورالعمل مکتوب در کیت استخراج (*Diatum*; ایران) انجام شد. از کلنی‌های *اشریشیا کلی* به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. به‌منظور تشخیص ژن *ureC*، از آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه استفاده شد (جدول ۱).

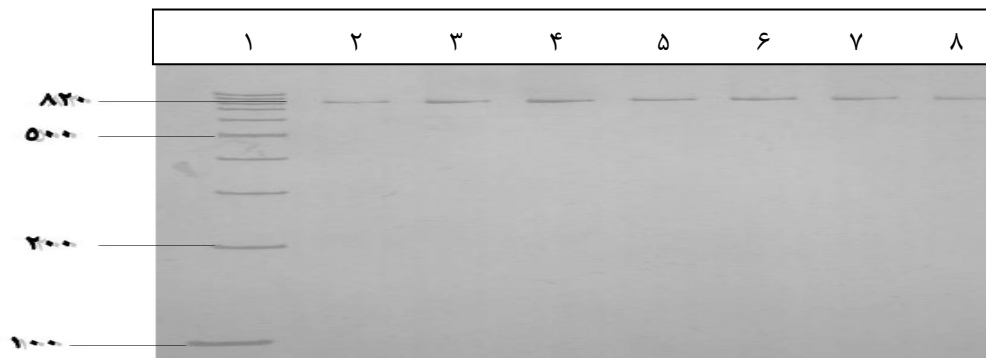
شدند. طی این مدت، کلنی‌های ریزی به قطر ۰/۵ تا ۱ میلی‌متر که صاف، شفاف و محدب بودند ظاهر شدند. باکتری‌ها با رنگ‌آمیزی گرم و انجام آزمون‌های اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز هویت شدند [۹]. برای انجام آزمایش، DNA باید از نمونه‌های مورد آزمایش استخراج شود. نمونه‌های مورد بررسی شامل کلنی‌های حاصل از

جدول ۱) توالی پرایمرهای مربوط به ژن *ureC*

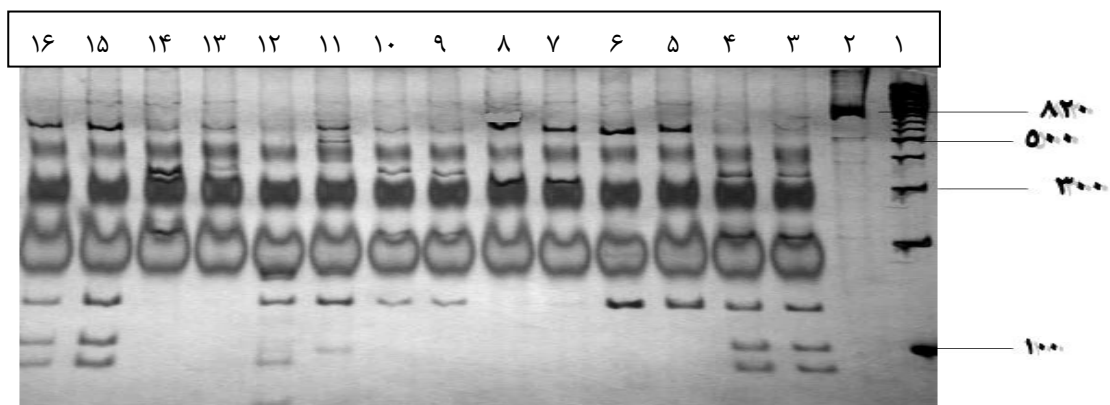
پرایمر	توالی	رفرانس ژن هدف محصول PCR
Forward	5'- TGG GAC TGA TGG CGT GAG GG - 3'	<i>ureC</i> ۱۲
Reverse	5'- AAG GGC GTT TTT AGA TTT TT - 3'	۸۲۰ جفت‌باز

جدول ۲) تعداد مبتلایان به نارسایی‌های مختلف به تفکیک تشخیص اندوسکوپ

نوع بیماری	ازوفازیت	کانسر زخم	دئودنوم زخم	معهده گاستریت عادی
تعداد مبتلایان	۱	۳	۵	۴
				۲۱
				۳



شکل ۱) باندهای ۸۲۰ جفت‌بازی حاصل از PCR نمونه‌های کشت، در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ (ستون ۱، نشانگر اندازه؛ ستون‌های ۲ تا ۸، باندهای حاصل از نمونه‌ها)



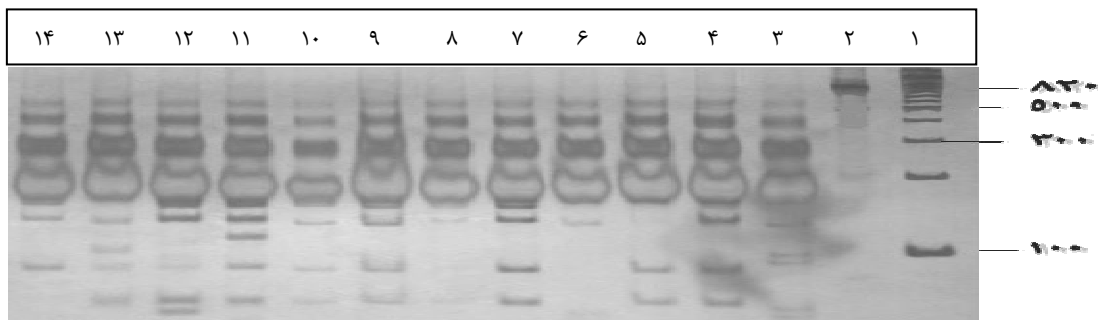
شکل ۲) الگوهای حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از *MboI* (ستون ۱، نشانگر اندازه؛ ستون ۲، ژن *ureC*؛ ستون ۳ و ۴، الگوی *M1*؛ ستون ۵ و ۶، الگوی *M2*؛ ستون ۷ و ۸، الگوی *M3*؛ ستون ۹ و ۱۰، الگوی *M4*؛ ستون ۱۱، الگوی *M5*؛ ستون ۱۲، الگوی *M6*؛ ستون ۱۳ و ۱۴، الگوی *M7*؛ ستون ۱۵ و ۱۶، الگوی *M8*؛ در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪)

در پایان، RFLP با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده *MboI* و *HhaI* بر محصولات PCR به اجرا درآمد [۱۲].

نتایج

نوع بیماری گوارشی بیماران مورد مطالعه در جدول ۲ مشخص شده است. به منظور تشخیص ژن *ureC* از پرایمر استفاده شده توسط شوچی فوجی میتو استفاده شد (جدول ۱). باندهای به دست آمده در ناحیه ۸۲۰ جفت‌بازی قرار گرفتند (شکل ۱). با بررسی محصولات PCR ۳۷ نمونه، با آنزیم‌های محدودکننده *MboI* و *HhaI* به ترتیب ۸ و ۱۱ الگوی هضم آنزیمی متفاوت ایجاد و با نرم‌افزار NTSys آنالیز شد. الگوهای حاصل به ترتیب در اشکال ۲ و ۳ نشان داده است.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با DNA استخراج شده (هدف) به میزان ۱ میکرولیتر (۲۰۰-۱۵۰ نانوگرم)، تک DNA پلیمرز (سیناژن؛ ایران) به میزان ۰/۲ میکرولیتر، بافر 10X (سیناژن؛ ایران) به میزان ۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار به میزان ۱/۵ میکرولیتر، dNTP ۲/۵ میلی‌مولار به میزان ۱ میکرولیتر، پرایمرها ۱۰ میلی‌مولار هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر و DDW به میزان ۱۶/۸ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (BioRad؛ آمریکا) با برنامه C_{95}° به مدت ۲ دقیقه، C_{31}° چرخه C_{95}° به مدت ۱ دقیقه؛ C_{63}° به مدت ۱ دقیقه؛ و C_{72}° به مدت ۱ دقیقه" و در نهایت، C_{72}° به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس، محصول PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ در جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز شد (شکل ۱) [۱۰، ۱۱].



شکل ۳) الگوهای حاصل از هضم آنزیمی با استفاده از *HhaI* (ستون ۱، نشانگر اندازه؛ ستون ۲، ژن *ureC*؛ ستون ۳ و ۴، الگوی *h1*؛ ستون ۵، الگوی *h2*؛ ستون ۶ الگوی *h3*؛ ستون ۷، الگوی *h4*؛ ستون ۸، الگوی *h5*؛ ستون ۹، الگوی *h6*؛ ستون ۱۰، الگوی *h7*؛ ستون ۱۱، الگوی *h8*؛ ستون ۱۲، الگوی *h9*؛ ستون ۱۳، الگوی *h10*؛ ستون ۱۴، الگوی *h11*؛ در ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸٪)

بحث

در مطالعه حاضر، به منظور تایپینگ ایزوله‌های به دست آمده، هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودکننده *MboI* و *HhaI* روی محصولات PCR انجام شد. هلیکوباکتر پیلوری از تنوع ژنتیکی بسیار زیادی برخوردار است و اثر این آنزیم‌ها بر محصول PCR با توجه پرایمر به کار برده شده، می‌تواند تفاوت‌های بین ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری را مشخص کند؛ در این مطالعه، ۲۱ الگوی متفاوت در بین ۳۷ ایزوله به دست آمد که می‌توان ادعا کرد، الگوهای به دست آمده برای بررسی‌های همه‌گیری‌شناسی و درمان مناسب هستند. با آنزیم *MboI*، شایع‌ترین الگو *m3* با فراوانی ۱۴ مورد و با آنزیم *HhaI*، الگوی *h3* با فراوانی ۱۳ مورد بود. مدل‌های حاصل از ترکیب الگوهای هضم دو آنزیم ۲۱ الگوی متفاوت ایجاد کردند که فراوان‌ترین الگوها *m3h5* و *m3h4* به ترتیب با ۷ و ۶ مورد فراوانی بودند. فرشاد و همکاران ژنوتیپ

پس از تعیین الگوها با هضم آنزیمی، فراوانی هر کدام از الگوهای حاصل مشخص شد. در هضم با آنزیم *MboI* الگوهای *m3* و *m4* به ترتیب با ۱۴ و ۱۰ مورد، فراوان‌ترین و الگوهای *m6* و *m8* با ۱ مورد کمترین فراوانی را داشتند. ولی در هضم آنزیمی *HhaI*، الگوهای *h4* و *h5* به ترتیب با ۱۳ و ۹ مورد، بیشترین و الگوهای *h4*، *h5*، *h6*، *h7* و *h11* با ۱ مورد کمترین فراوانی را داشتند. نتایج در جداول ۳ و ۴ آورده شده‌اند. ارتباط بین اختلالات گوارشی و الگوهای حاصل بررسی شد. در الگوهای آنزیم محدودکننده *MboI* در گاستریت، الگوهای *m3* و *m4* با ۷ و ۸ مورد بیشترین فراوانی را داشتند. در الگوهای آنزیم محدودکننده *HhaI* در گاستریت، *h3*، *h4* و *h5* با ۷، ۳ و ۵ مورد و در زخم دئودنوم، *h3* با ۳ مورد بیشترین فراوانی را داشتند. مدل‌های حاصل از ترکیب الگوهای هضم دو آنزیم، ۲۱ الگوی متفاوت ایجاد کردند که فراوان‌ترین الگوها *m3h5* و *m3h4* بودند.

آلی بین افراد خانواده نشان داده شد. چندین مکانیزم از جمله جهش نقطه‌ای، نوترکیبی داخل جنس و گرفتن آلل از خارج موجبات تنوع سویه‌ها در افراد خانواده هستند. همچنین، بررسی DNA در افراد خانواده و افراد دیگر توالی منحصر به فردی را نشان داد. بررسی نقشه فیلوژنتیکی نشان داد که نمونه‌های جدا شده از تنه معده در مقایسه با نمونه‌های جدا شده از آنتروم، تنوع ژنتیکی بیشتری دارند [۱۵].

در مطالعه‌ای عنوان شد که شاید بتوان در جمعیت‌های بزرگتر، بین اختلالات گوارشی و سویه معینی از هلیکوباکتر پیلوری ارتباطی مشاهده کرد [۹]. طی مطالعه‌ای در اصفهان برای تیپ‌بندی، *نواب* و همکاران با استفاده از ژن *ureC* و آنزیم‌های MBO1، ALU1 و CFO1 به ترتیب ۵، ۴ و ۵ الگوی مختلف مشاهده کردند [۱۶].

هلیکوباکتر پیلوری از تنوع ژنتیکی فوق‌العاده‌ای برخوردار است؛ به طوری که در مطالعه حاضر، با بررسی ۳۷ نمونه با استفاده از آنزیم *MboI* ۸ الگو، با استفاده از آنزیم *HhaI* ۱۱ الگو و در مجموع ۲۱ الگوی متفاوت ایجاد شد. علل به وجود آمدن این تنوع و کارایی آن در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در سال ۱۹۹۷، *دان* و همکاران با جمع‌آوری نتایج تحقیقات مختلف، در ایالات متحده به این نتیجه رسیدند که متغیر بودن جایگاه چندین ژن در نقشه ژنتیکی حکایت از نوتریبی زیاد در ژنوم هلیکوباکتر پیلوری دارد. هلیکوباکتر پیلوری تنوع زیادی در ژن‌هایی مثل *اوره‌آز*، ژن‌های کمکی، فلاژلین، سیتوتوکسین واکوئل‌زا و *cagA* نشان می‌دهد. آزمایش آلل‌های مختلف در ۶ ژن به وسیله MLEE، تنوع ژنتیکی در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری را تایید می‌کند. سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری به طور ذاتی قابلیت تراریختی قطعات DNA را دارند، به طوری که تصور می‌شود، نوترکیبی، مکانیزم تنوع ژنتیکی مذکور باشد [۷].

با بررسی توالی ۳ ژن *flaA*، *flab* و *vacA* در ۳۳ نمونه جدا شده از بیماران کانادایی، آلمانی و آفریقای جنوبی مشخص شد که انتقال ژنتیکی افقی در هلیکوباکتر پیلوری به طور مکرر اتفاق می‌افتد. همچنین، نتایج نشان‌دهنده وجود نوترکیبی بسیار بالا در هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با *اشریشیا کلی* و *نایسریا گنوره‌آ* بود [۱۷]. بیشتر تغییرات ژنتیکی، منشاء نوترکیبی هومولوگ دارند [۱۳]. دلیل تنوع ژنتیکی، قابلیت طبیعی باکتری برای تراریختی ژنتیکی و نوترکیبی است [۱۸].

سوش‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده یا بدون زخم معده را بر اساس الگوی RFLP-PCR در ژن‌های *ureAB*، *vacA* و *cagA* بررسی کردند. آنالیز پلی‌مورفیسم‌های *ureAB* ۱۰ الگوی قابل افتراق را مشخص کرد که الگوی *ureAB 5a* شایع‌ترین الگو در تمام سوش‌ها بود (۴۷/۶۱٪). برای ژن‌های *ureAB* و *cagA* هیچ ارتباطی بین الگوهای خاص DNA و حالت کلینیکی بیماری مشاهده نشد [۱۲].

شوحی‌فوجی‌میتو و همکاران با استفاده از ژن *ureC* و آنزیم‌های *MboI*، *AluI* و *HhaI* روی ۲۵ ایزوله کلینیکی هضم آنزیمی انجام دادند و ۲۵ الگوی مختلف به دست آوردند. سپس، از ۱۴ بیمار قبل و بعد از درمان نمونه‌گیری کردند که ۱۲ مورد هلیکوباکتر پیلوری جدا شد. چون از دو ناحیه آنتروم و تنه معده نمونه‌گیری شده بود، در ۱۰ مورد الگوهای RFLP-PCR ایزوله‌های هر دو ناحیه یکسان بودند. ولی در ۲ مورد، الگوی RFLP به دست آمده از ایزوله‌های آنتروم و تنه تفاوت داشت. همچنین آنها تا ۵ ماه پس از درمان بیماران را پیگیری کرده و از این افراد نمونه‌گیری مجدد به عمل آوردند که الگوهای RFLP یکسانی با قبل از درمان به دست آمد. ایشان به این نتیجه رسیدند که این روش تایپینگ قابل اعتماد است و همچنین آلوده بودن فرد با یک سویه یا بیشتر را نشان می‌دهد [۱۳].

گوسن با مطالعه ۱۰۰ نمونه حاصل از کشت قبل و بعد از درمان در ۱۰ کشور اروپایی، الگوهای RFLP یکسانی به دست آورد و گزارش داد که چندین تیپ محدود RFLP در اروپا عفونت ایجاد می‌کنند. همچنین RFLP-PCR با ژن *ureC* روشی کارآمد برای افتراق بین عود عفونت یا کسب عفونت با سویه جدید است و در تشخیص عفونت قابلیت بالایی دارد [۶].

اندرسون با روش PCR-RFLP و با استفاده از ژن *ureC* و آنزیم محدودکننده *HhaI*، تنوع ژنتیکی باکتری‌های جدا شده از روس‌ها و استونیایی‌های مقیم در یک منطقه را یکسان نشان داد. بنابراین، تنوع ژنتیکی با ناحیه جغرافیایی مرتبط است. مکانیزم‌های پیدایش این تنوع بالا، جهش نقطه‌ای، نوتریبی کروموزومی و انتقال افقی ژن‌ها بین سویه‌ها هستند [۱۴]. با مطالعه ۱۵۷ کلون باکتری به دست آمده از افراد خانواده (والدین و فرزندان) و ۱۳۱ بیمار از مناطق مختلف جغرافیایی در اروپا و آفریقا با استفاده از دو ژن *ureC* (gLM) و *hspA*، انتقال

6- Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree F, Olckers A, Botha SJ, et al. Evaluation of a novel semi nested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of *Helicobacter pylori* in saliva and dental plaque. *J Clin Microbiol.* 2002;40:205-9.

7- Reuse HD, Labigne A, Mengin-Lecreulx D. The *H. pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J Bacteriol.* 1997;179(11):3488-93.

8- Shahamat M, Alavi M, Watts JEM, Gonzalez JM, Sowers KR, Maeder DW, et al. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *JCM.* 2004;42(8):3613-9.

۹- سیاوشی فریده، ملک‌زاده رضا، دین‌پرست نوید. تعیین تنوع ژنتیکی سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با روش RAPD-PCR. *مجله گوارش.*

۱۳۸۳؛۹(۹):۱۱-۹.

10- Lairmore TC. Polymerase chain reaction. *Method.* 1990;3(1):1-6.

11- Jack Vanden H. Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and other PCR procedures. Pennsylvania: Pennsylvania State University; 1997.

۱۲- فرشاد شهره، ژاپونی عزیز، البرزی عبدالوهاب، کلانی مهدی. تعیین ژنوتیپ سوش‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده یا بدون زخم معده بر اساس الگوی RFLP-PCR ژن‌های *vacA*، *ureAB* و *cagA*. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان.* ۱۳۸۷؛۱۵(۳):۷-۱۱.

13- Fujimoto S, Marshall B, Blaser MJ. PCR-based restriction fragment length polymorphism typing of *Helicobacter pylori*. *JCM.* 1994;32(2):331-4.

14- Anderson H. Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes in Estonian patients with chronic inflammatory gastric diseases. Tartu: Publication of University of Tartu; 2006.

15- Raymond J, Thiberge JM, Chevalier C, Kalach N, Bergeret M, Labigne A. Genetic and transmission analysis of *Helicobacter pylori* strains within a family. *CDC.* 2004;10(10):1816-21.

۱۶- نواب‌کبر فرح. طرز شناسایی و تفکیک سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش PCR-RFLP بر روی نمونه‌های بیوپسی دستگاه گوارش در منطقه اصفهان [پایان‌نامه دکتری]. اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان؛ ۱۳۸۰.

17- Bjorkholm B, Salama NR. Genomics of *Helicobacter*. *Helicobacter.* 2003;8(1):1-7.

18- Karnholz A, Hoefler C, Odenbreit S, Fischer W, Hofreuter D, Haas R. Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol.* 2006;188(3):882-93.

19- Moore RA, Kureishi A, Wong S, Bryan LE. Categorization of clinical isolates of *Helicobacter pylori* based on restriction digest analyses of polymerase chain reaction amplified *ureC* genes. *J Clin Microbiol.* 1993;31:1334-5.

تنوع زیاد ژنوم هلیکوباکتر پیلوری در مقایسه با اکثر ارگانیزم‌ها غیرعادی است. این تنوع را می‌توان به کمک اثر هضم‌کننده آنزیم‌های آندونوکلئازی محدودکننده به دست آورد. تنوع ژنتیکی ناشی از جابه‌جایی تکه‌های کوچکی از زنجیره تکراری نوکلئوتید، جهش‌های خاموش یا جذب DNA خارجی، نوترکیبی هومولوگ، نوتریبی کروموزومی، انتقال افقی ژن‌ها بین سویه، در جهت سازش باکتری با محیط پرفشار و نامناسب معده حایز اهمیت است [۱۹].

نتیجه‌گیری

در تعیین تنوع ژنتیکی ایزوله‌ها، گرچه شواهدی دال بر ارتباط بین الگوهای حاصل و اختلالات گوارشی مشاهده نشد. با توجه به نتایج مطالعات که الگوهای موجود در هر منطقه را محدود و خاص همان منطقه نشان دادند، شاید بتوان در جمعیت‌های بزرگتر یا با متآنالیز چندین مطالعه صورت‌گرفته در مناطق مختلف، بین اختلالات گوارشی و سویه‌های موجود ارتباطی پیدا کرد و سویه‌های بارز را تعیین نمود. در نهایت، روش PCR-RFLP علاوه بر توانایی شناسایی باکتری به‌طور مستقیم از نمونه‌های بیوپسی قابلیت تیپ‌بندی و شناسایی عود یا عفونت با سویه جدید را دارد.

تشکر و قدردانی: این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی شهرکرد است و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه به انجام رسید.

منابع

1- Kumar S, Kumar A, Kumar DV. Direct detection and analysis of *vacA* genotypes and *cagA* gene of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies by a novel multiplex polymerase reaction assay. *J Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(4):366-73.

2- Quina M. Historical perspective. In: Malfertheiner P, Michetti P. A price *Helicobacter pylori* an atlas. UK: Science Press; 1996.

3- Surebaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med.* 2002;347(15):1175-86.

4- Goto Y, Ando T, Nishio K, Ishida Y, Kawai S, Goto H, et al. The ACE gene polymorphism is associated with the incidence of gastric cancer among *H. pylori* seropositive subjects with atrophic gastritis. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2005;6(4):464-7.

5- Burucoa C, Lhomme V, Fauchere JL. Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: Experimental results and meta-analysis. *JCM.* 1999;37(12):4071-80.

PCR and RFLP of ureC (glmM) gene for identification and typing of *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric biopsy specimens of gastric patients

Nafisi M. R.¹ *PhD*, Alipour Shadbad M.² *MSc*, Karimi A.¹ *MSc*, Rahimian G. A.³ *PhD*,
Imani Fooladi A.* *PhD*

Abstract

Aims. *Helicobacter pylori* is one of the important pathogens that infected epithelial cells of stomach. The aim of this study was to analyze and type *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsy specimens with ureC (glmM) gene.

Materials & Methods. Molecular method was used in order to type *Helicobacter pylori*. PCR-RFLP was used to determine the genetic heterogeneity of 37 specimens of *Helicobacter pylori* isolated from culture. 820bp amplified fragment of ureC gene was digested with the restriction enzymes *HhaI*, *MboI*.

Results. 11 different patterns with *HhaI* and 8 different patterns with *MboI* were identified. In combination, 21 different RFLP patterns were identified.

Conclusion. Based on the results of this study, there is no significant relationship between gastric diseases and different patterns and there is a widespread genetic diversity between the fragments. This is promising the production of effective equipment for molecular analysis of epidemiology and analyzing ancestors and understanding the bacterial origin and its scattering in different geographic regions.

Keywords: *Helicobacter pylori*, PCR-RFLP, ureC Gene

Submission Date: 17/2/2009, Acceptation Date: 12/7/2009

* Correspondence address: Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
imanifooladi.a@gmail.com

1 Research Center of Cell & Molecular Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2 Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Internal Department, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran