جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۱ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۶، صفحات ۲۱- ۲۵

تعیین ژنوتیپ ایزوله های هلیکوباکترپیلوری جداشده از بیماران مبتلا به زخمهای پپتیک ، سرطان معده و سوء هاضمه های بدون زخم با روش RAPD-PCR

امیر قاسمی[۱]، محمد حسن شیرازی[۱]، محمد رضا پورمند*[۱]، جواد زعیمی یزدی[۲]، نورخدا صادقی فرد[۳]، سحر باقرزاده[۱]، سولماز آقا امیری[۱]

۱) بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲) بخش میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یزد
۳) بخش میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
نویسنده رابط: محمدرضا پورمند، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۰ همراه: ۰۹۱۲۵۱۶۸۵۲۰ mpourmand@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۵/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۲

چکیده:

زمینه و اهداف: هلیکوباکترپیلوری پاتوژنی با پتانسیل بالای تغییرات ژنتیکی است. این باکتری می تواند میلیون ها انسان را بصورت مزمن در سراسر جهان آلوده کند. هلیکوباکترپیلوری از عوامل مهم زخم های پپتیک و سرطان معده در بیماران مبتلا است. هدف از این مطالعه تعیین ژنوتیپ هر یک از سویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک، سرطان معده و سوء هاضمه های بدون زخم با استفاده از روش RAPD-PCR می باشد.

روش بررسی: ۸۰ بیوپسی از بیماران با مشکلات معدی که توسط پزشک متخصص تشخیص داده شده بود از بخش آندوسکوپی بیمارستان ها بدست آمد. نمونه های بیوپسی بر روی محیط اختصاصی تحت شرایط میکروآئروفیلیک طی ۳ الی ۵ روز کشت داده شد. سپس ژنوم باکتری استخراج گردید و RAPD-PCR برای تعیین ژنوتیپ مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: ۶ الگوی مختلف (A-F) با استفاده از این روش بدست آمد. این الگوها عبارتند از: الگوی A: ۱۰ ایزوله (۱۶/۹۸٪)، B:۶ ایزوله (۱۱/۳۳٪)، C: ۵ ایزوله (۹/۴۳٪)، D: ۳ ایزوله (۵/۶۶٪)، E: ۲ ایزوله (۳/۷۷٪) و F:۲ ایزوله (۳/۷۷٪). ضمنا ۲۶ ایزوله (۴۹/۰۶٪) باقیمانده از ۵۴ ایزوله دارای الگوی واحد و مشابه ای با یکدیگر و با شش الگوی دیگر نبودند. ارتباط معنی داری بین هیچ کدام از الگوهای RAPD و بیماری خاص معدی در این مطالعه دیده نشد ($P>0.05$).

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان می دهد که تغییرات ژنومی زیادی در سویه های هلیکوباکترپیلوری مورد بررسی در این مطالعه وجود دارد و بهتر است تعیین ترادف ژنومی بعنوان روش مکملی همراه باروش RAPD-PCR بکار رود.

کلید واژه ها: هلیکوباکترپیلوری، RAPD-PCR، ژنوتایپینگ

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

هلیکوباکترپیلوری باکتری گرم منفی و مارپیچی است که به طور مزمن بیشتر از نیمی از ساکنان جهان را آلوده کرده است. عفونت با هلیکوباکترپیلوری همراه با گاستریت مزمن، زخم های پپتیک، سرطان معده و (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) MALT می باشد (۳-۱). آنالیز ژنتیکی سویه های هلیکوباکترپیلوری نشان داده است که ایزوله های هلیکوباکترپیلوری درجه بالایی از تغییرات ژنتیکی را نشان می دهند(۴).

گوناگونی ژنتیکی گسترده ای میان سویه های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از فردی در مقایسه با سویه جدا شده از فرد دیگری وجود دارد (۵،۶). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد تفاوت های ژنتیکی ممکن است نقش مهمی را در نتایج کلینیکی عفونت بازی کنند (۹-۷). روش های گوناگونی بر اساس استفاده از DNA برای تشخیص و شناسایی گوناگونی ژنتیکی هر سویه هلیکوباکترپیلوری تاکنون بکار رفته است. این روش ها شامل بررسی اندازه پلاسمید، الگوهای بدست آمده حاصل از برش کروموزوم، ساترن بلاتینگ و RFLP می باشد. ایزوله های متفاوت معمولا با این روش ها مورد شناسایی قرار نمی گیرند که خود می تواند یا نشان دهنده ساختار جمعیتی کلون های حاصل از هلیکوباکترپیلوری شبیه به باکتری های دیگر و یا محدودیت در روش بکار رفته در شناسایی هر یک از سویه ها باشد (۱۰) RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) روشی است که برای مطالعه گوناگونی و انتقال ژنتیکی هلیکوباکترپیلوری بسیار قابل ارزش است. این روش بسیار حساس و با کارایی و سرعت بالا می باشد (۱۲-۱۰). بطور تیپیک تقریبا ۳ تا ۱۰ قطعه مشخص DNA به ازاء هر سویه هلیکوباکتر پیلوری بدست می آید (۱۰)، و هر ایزوله هلیکوباکترپیلوری بطور تیپیک یک الگو مشخص تولید می کند که بطور قابل تکراری از ایزوله های دیگر متفاوت است. متاسفانه تاکنون مطالعه خاصی در ارتباط با بکارگیری این روش در ایران صورت نگرفته است. به دلیل تغییرات بیشمار ژنتیکی از سویه ای به سویه دیگر همچنین تعیین وضعیت ژنومیک سویه های منتشره در بیماران ایرانی لزوم بکارگیری روشهایی از این دست حائز اهمیت است. بی شک تعیین ژنوتیپ این پاتوژن ها تاثیر مناسبی در روشن سازی نقشه های ژنومیک و درمان آنتی بیوتیکی بهمراه خواهد آورد. بدین لحاظ هدف از این مطالعه تعیین ژنوتیپ سویه های هلیکوباکترپیلوری بدست آمده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک، سرطان معده و سو هاضمه های بدون زخم با استفاده از روش RAPD-PCR و بررسی وجود ارتباط میان الگوی منحصر بفرد ژنتیکی با بیماری حاصله از این الگوها می باشد.

مواد و روش ها:

جداسازی و کشت: با توجه به مطالعات قبلی حجم نمونه تعداد ۸۰ نمونه در نظر گرفته شد و نمونه های بیوپسی از بیماران با مشکلات معدی که توسط پزشک متخصص تشخیص داده شده بود از بخش های آندوسکوپی بیمارستان شریعتی و مطب پزشک متخصص تهیه گردید. این بیوپسی ها برای کشت با استفاده از سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد. نمونه های بیوپسی سریعا بر روی محیط های بروسلا آگار و کمپیلوباکتر آگار حاوی ۱۰ درصد خون گوسفند و آنتی بیوتیک های وانکومایسین، تریمتوپریم و آمفوتریسین B، تلقیح گردیدند. کلنی های بدست آمده که حاوی باسیل گرم منفی، S شکل، کاتالاز، اوره از و اکسیداز مثبت بودند، بعنوان کلنی های هلیکوباکترپیلوری تشخیص داده شدند. سپس کلنی های مورد نظر در آب مقطر استریل جمع آوری می گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد برای انجام کارهای مولکولی نگهداری می شد.

آماده سازی DNA و RAPD-PCR :

ابتدا از نمونه های نگهداری شده در ۲۰- استخراج DNA بعمل آمد. بمنظور استخراج DNA در این مطالعه از کیت استخراج DNA (Qiagen , Hilden, Germany) استفاده شد که مطابق با دستورالعمل کارخانه استخراج DNA انجام گردید. ژنوم حاصل ازهر نمونه تا انجام PCR در فریزر۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

پرایمرهای بکاررفته در این مطالعه شامل:

1281: 5´-AACGCGCAAC-3´
1290: 5´-GTGGATGCGA-3´

بودند.

PCR برای ۵۰ میکرولیتر محصول شامل: ۳۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر Mg^{+2}، ۱ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر از مخلوط پرایمر، ۰/۳ میکرولیتر Super Tag polymerase و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. تکثیر قطعات در دستگاه ترموسایکلر با استفاده از برنامه: ۴ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۶ درجه سانتیگراد

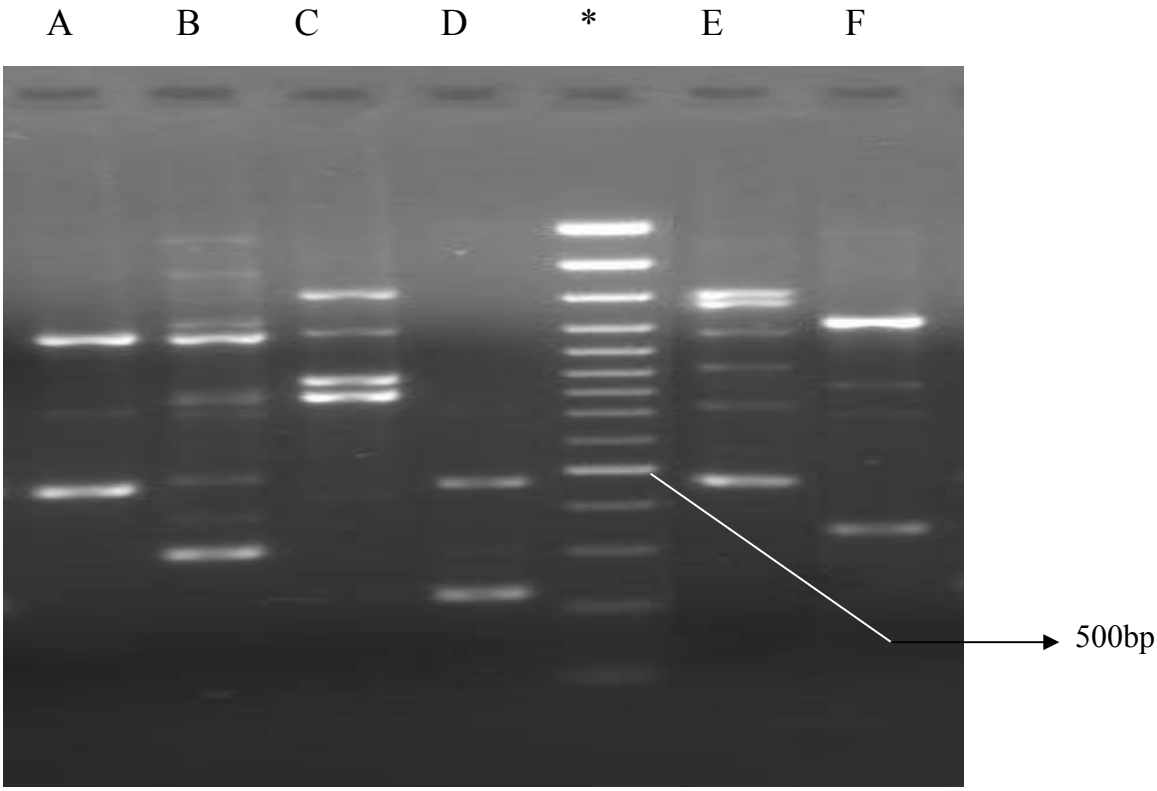
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

به مدت ۵ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه، ۳۶ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه بمدت ۲ دقیقه انجام گردید. بعد از RAPD-PCR محصول بدست آمده در ژل آگارز ران شد و با استفاده از UV ترانس المینیتور باندهای حاصله مشاهده گردید (شکل ۱).

یافته ها:

از ۸۰ نمونه بیوپسی، ۵۴ کشت مثبت متعلق به ۲۸ مرد و ۲۶ زن بدست آمد که ۱۴ نمونه مربوط به افراد مبتلا به سوءهاضمه، ۲۴ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم اثنی عشر، ۱۰ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم معده و ۶ نمونه مربوط به افراد مبتلا به سرطان معده بود. الگوی متفاوت RAPD در بیشتر از یک ایزوله مشاهده گردید که عبارتست از: الگو A: ۱۰ ایزوله (۱۶/۹۸٪)، B:۶ (۱۱/۳۳٪)، C: ۵(۹/۴۳٪)، D: ۳(۵/۶۶٪)، E: ۲(۳/۷۷٪) و F:۲(۳/۷۷٪). ۲۶ ایزوله (۴۹/۰۶٪) از ۵۴ نمونه، دارای الگوی واحد و مشابه ای نه با همدیگر و نه با شش الگوی دیگر بودند. ارتباط معنی دار میان یک الگو RAPD و یک بیماری معدی خاص در این مطالعه دیده نشد ($P>0.05$).

شکل ۱: الگوهای شش گانه حاصل از RAPD-PCR ایزوله های هلیکو باکتر پیلوری بروی ژل آگاروز ۲درصد(علامت ستاره بیانگر Ladder100bpمی باشد)



بحث:

امروزه شناخته شده است که انگشت نگاری DNA ایزوله های کلینیکی هلیکوباکترپیلوری بسیار متنوع است (۱۰و۱۱) و پروفایل انگشت نگاری حتی برای ایزوله جدا شده از قسمت های متفاوت معده یک شخص بسیار متغییر است. راندوم پرایمر ابتدا بوسیله Akopyanz و همکاران (۱۰) برای انگشت نگاری توصیه شد. آنها پیشنهاد کردند چون پرایمر دارای نسبت بالایی GC است می تواند برای تمایز ایزوله های هلیکوباکترپیلوری متفاوت بکار رود. در واقع وقتی این نوع پرایمر بکار گرفته شود امکان بسیار زیادی خواهد داشت که قطعات تکثیر شده زیادی بدست آید ولی تنها تعداد کمی از آنها برروی ژل آگارز بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل دیدن است. این موضوع ارتباط زیادی با نحوه اتصال پرایمر با DNA دارد. اگر دقیقا متصل شده باشد باندهای قابل دیدن و اگر بصورت نسبی متصل شده باشد باندها غیر قابل دیدن است. در PCR های بکار رفته معمولی، ویژگی بطور عمده ارتباط با مشخصات پرایمرها و دمای آنالینگ دارد. با این وجود، در

RAPD-PCR پرایمر تصادفی فقط دارای ۱۰ نوکلئوتید است و دمای آنالینگ ۳۶ درجه. بنابراین، ویژگی تکثیر نسبتا پایین است. در مطالعه ای که توسط Han و همکاران در سال ۲۰۰۳ در سنگاپور انجام گرفت، نشان دادند که سویه های جداشده از افراد مختلف دارای الگوهای متفاوتی هستند. آنها همچنین نشان دادند که RAPD برای ژنوتایپ کردن در یک مقیاس وسیع مفید می باشد (۱۲). در این مطالعه نیز ما توانستیم ۶ الگوی متفاوت تکراری و ۲۶ الگوی بدون تکرار از ایزوله های متفاوت بدست بیاوریم. با این حال بنظر می رسد که این روش نتواند قطعات کوتاه را تکثیر کند همچنین باندهایی که بدلیل کوچک بودن نمی توانند در ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ بگیرند. Govorun نیز در مطالعه خود نشان داد که اطلاعات حاصل از RAPD سویه های هلیکوباکترپیلوری هیچ ارتباطی با اطلاعات بدست آمده از بررسی ژنومی ندارد (۱۳). در مطالعه ما نیز هیچ ارتباطی میان نوع خاصی از بیماری یافت نگردید. همچنین در این مطالعه ما به این تجربه دست یافتیم که RAPD وابستگی زیادی به کیفیت و کمیت DNA الگو دارد. اگر ما مقایسه ای میان الگوهای حاصل از RAPD یک ایزوله مشخص هلیکوباکترپیلوری انجام بدهیم، غلظت ، خلوص DNA الگو را باید مد نظر داشت. نتایج RAPD نسبتا متفاوت خواهد بود اگر DNA ژنومی بوسیله دو روش متفاوت بدست آمده باشد. کاربرد دیگر این روش ردیابی سویه ها می باشد. در مطالعه ای که توسط Konno و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش RAPD صورت گرفت نشان داده شد که با استفاده از این روش آنها توانستند انتقال هلیکوباکتر پیلوری را از مادر به فرزند بعد از سال اول زندگی نشان دهند (۱۴).

نتیجه گیری:

اگرچه ما در این مطالعه الگوهای اختصاصی از سویه های متفاوت را بدست آوردیم اما استفاده از این روش را برای بررسی تغییرات ژنومی میان سویه های مختلف برای یافتن ارتباط میان سویه و بیماری خاص را پیشنهاد نمی کنیم. در عوض تکنیک هایی مانند Sequencing می تواند انتخاب بهتری و یا مکمل روش RAPD در این مورد باشد و نیز می توان روش RAPD را بمنظور ردیابی سویه ها همانطور که در مطالعات متفاوت بکار رفته است بکار برد.

فهرست مراجع:

1. Israel DA, Peek RM. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1271-1290
2. Sanders MK, Peura DA. *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4: 448-454
3. Dawsey SM, Mark SD, Taylor PR, Limburg PJ. Gastric cancer and *H pylori*. *Gut* 2002; 51: 457-458
4. 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
5. 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
6. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 14625-14630
7. Labigne A, de Reuse H. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity . *Infect Agents Dis* 1996; 5:191 –202.
8. Blaser MJ. Intrastrain difference s in *Helicobacte r pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 1995; 27:559 –63.
9. Mobley HL. De. Ning *Helicobacter pylori* as a pathogen: strain Heterogenecity and virulence. *Am J Med* 1997; 100:2S –11S.
10. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(19):5137–5142.
11. 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
12. Han FC, Ng HC, Ho B. Stability of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting in genotyping clinical isolates of *Helicobacter*

pylori. *World J Gastroenterol* 2003; 9(9):2021-2024

13. 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):536-41
14. 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