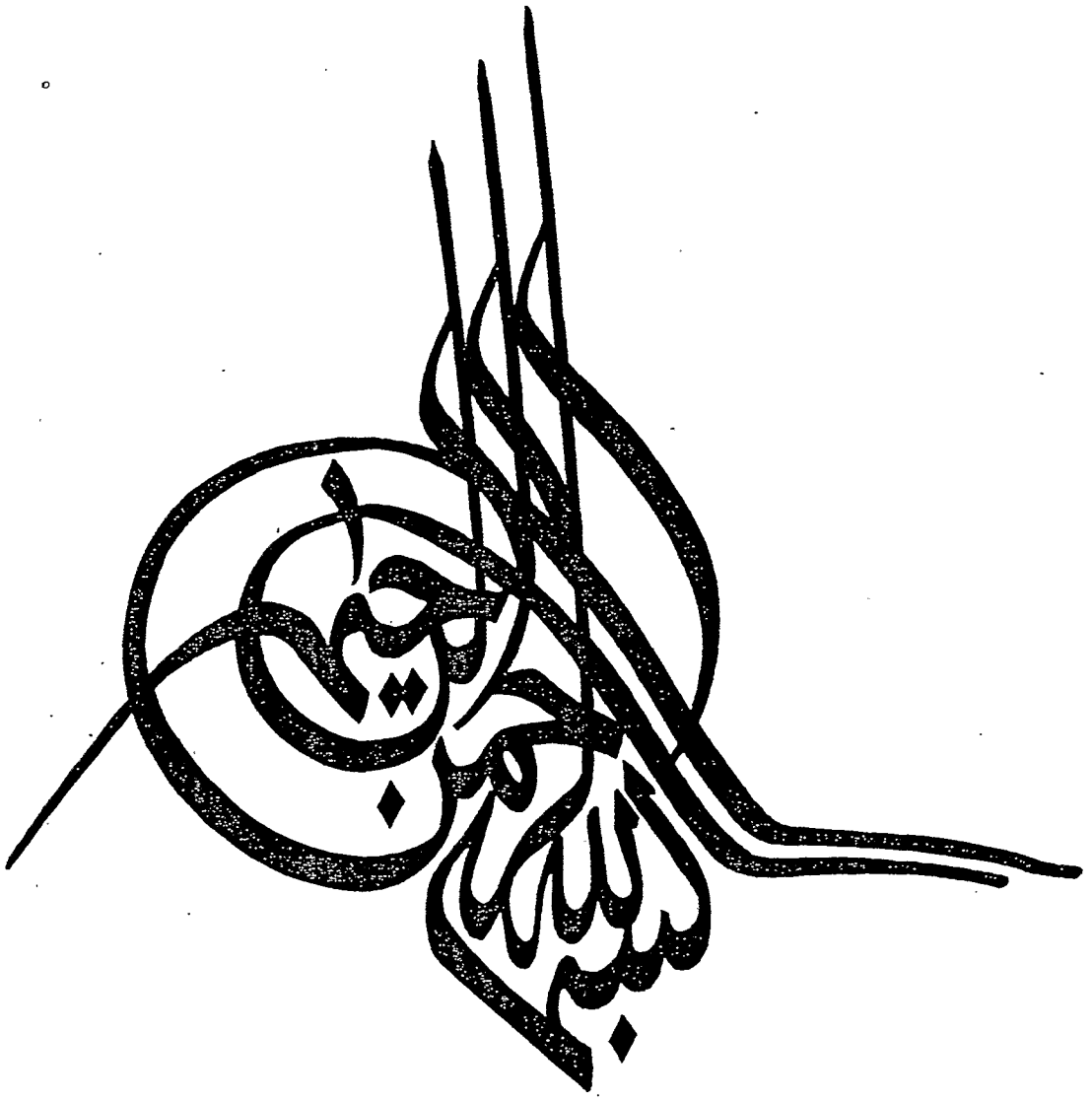

١٠٧٩٩٤

۸۷/۱/۱۰۱۱۶٤
۸۷/۱۰/۸

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد
رشته‌ی زیست شناسی ـ میکروبیولوژی

بررسی شدت التهابات دستگاه گوارشی ناشی از *H.pylori* و ارتباط آن با ژن‌های *CagA* و *VacA* به کمک PCR

استادان راهنما:
دکتر رسول روغنیان
دکتر طالب آزرم

استادان مشاور:
دکتر سید حمید زرکش اصفهانی
دکتر حامد دقاق زاده

پژوهشگر:
محمد مبارکی

تیر ماه ۱۳۸۷

۱۳۸۷/۹/۲۳

۱۰۷۹۹۴

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است

۱۳۸۷ /۹/ ۲۳

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی آقای

محمد مبارکی تحت عنوان

بررسی شدت التهابات دستگاه گوارشی ناشی از *H. pylori* و ارتباط آن با حضور ژن‌های *CagA* و *VacA* به روش PCR

در تاریخ ۸۷/۴/۲۲ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با ..عالی..به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه دکتر رسول روغنیان با مرتبه ی علمی استادیار.....امضاء

۲- استاد راهنمای دوم پایان نامه دکتر طالب آزرم با مرتبه ی علمی استاد.....امضاء

۳- استاد مشاور اول پایان نامه دکتر سید حمید زرکش با مرتبه ی علمی استادیار.....امضاء

۴- استاد مشاور دوم پایان نامه دکتر حامد دقاق زاده با مرتبه ی علمی استادیار.....امضاء

۳- استاد داور داخل گروه دکتر مجید بوذری با مرتبه ی علمی استادیار.....امضاء

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر فرح تاج نواب اکبر با مرتبه ی علمی استادیار.....امضاء

امضای مدیر گروه

منت خدای بلند مرتبه‌ای که توفیق علم آموزی را در همه حال به بنده خویش عطا نمود و در این وادی پر راز و رمز یاری‌ام کرد.
آنچه در این پایان نامه تقدیم حضورتان می گردد حاصل راهنمایی‌ها و تذکرات اساتید بزرگواری است که از هیچ کمکی در طول دوران تحصیل و تحقیق دریغ ننمودند و با راهنمایی‌های ارزشمند خود در به نتیجه رسیدن این تحقیق نقش اساسی داشتند.
از استاد ارجمند و مهربان‌ام جناب آقای دکتر رسول روغنیان، استاد صبور و دوست داشتنی که در تمام مراحل این تحقیق بنده را یاری نمود بسیار سپاسگزارم.
از استاد عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر طالب آزرم که به رغم مشغله فراوان کاری در طول این تحقیق از راهنمایی‌هایشان بهره بردم بسیار ممنونم.
از استاد علم و اخلاق جناب آقای دکتر سید حمید زرکش که مشاوره این پایان نامه بر عهده داشتند و با تذکرات و توصیه های به موقع یاری گر من بودند بسیار سپاسگزارم.
از جناب آقای دکتر حامد دقاق زاده مشاور مهربان و با حوصله به دلیل قبول زحمت در تهیه نمونه بیوپسی نهایت تشکر دارم. برای تمام این عزیزان آرزوی سلامتی و توفیق دارم.
از سرکار خانم دکتر نواب اکبر و جناب آقای دکتر بوذری به دلیل تقبل داوری این پایان نامه ممنونم.
از اساتید بزرگوار گروه زیست شناسی سرکار خانم دکتر امتیازی، سرکار خانم دکتر کرمانشاهی، جناب آقای دکتر نحوی، دکتر گلبانگ و دکتر بوذری که طی این دوره سه ساله در محضرشان توفیق شاگردی داشتم بسیار سپاسگزارم.
از زحمات و توصیه های کارشناس مهربان جناب آقای محمد رضا دباغ، کارشناسان رایانه سرکار خانم روحانیان و جناب آقای حیدری و کارشناس تحصیلات تکمیلی جناب آقای انتشاری تشکر و قدردانی می کنم.

از دوستان و همکلاسی‌هایم آقایان میلاد محکم، سامان ملکی، حنیف خداوردی، احد مختارزاده، مجتبی اسدالهی ،امیر مرشدی، مهدی حسن شاهیان، خاشعی و خانم ها ماندانا لک، زهرا مرتضایی، عاطفه علیپوریان و شراره حریرچی صمیمانه تشکر می کنم و برای ایشان در تمام مراحل زندگی آرزوی موفقیت دارم.

تقدیم به

پدرم، مادرم، همسر و فرزندانم، برادران و خواهرانم

چکیده:

هلیکو باکتر پیلوری *(Helicobacter pylori)* باسیل گرم منفی، میکروآئروفیلیک، پاتوژن مهم انسانی است و حدود ۵۰ در صد مردم دنیا به این باکتری آلوده می باشند. این باکتری تحت شرایط استرس مانند انکوباسیون طولانی مدت و تماس با آنتی بیوتیک ها به حالت کوکوئیدی ترانسفورمه می گردد. در واقع این فرمی است که به زیستای غیر قابل کشت یا فرم (VBNC) معروف است. باکتری واجد خصوصیات منحصر به فردی است که آن را قادر ساخته تا در لومن اسیدی معده استقرار یابد، با وجود این که اسیدوفیل نمی باشد. آلودگی با این میکروب در اکثر موارد بدون هر گونه علائم بالینی بوده و تنها در گروهی از افراد به صورت التهاب معده، زخم معده-دوازدهه می باشد. در این میان فقط ۱ تا ۲ درصد بیماران بدخیمی‌هایی مانند آدنوکارسینومای معده (Gastric adenocarcinoma) و لنفومای معده (Gastric MALT lymphoma) بروز می دهند.

چنین تصور می شود که عوامل متعددی بر شدت بروز اختلالات گوارشی مرتبط با *H. Pylori* موثر باشند، که از آن جمله می توان به ژنتیک میزبان، عوامل محیطی و فاکتورهای ویرولانس باکتری اشاره نمود. این فاکتورها که در پاتوژنز و بقای میکروارگانیسم موثرند شامل ژن های *CagA*، *VacA*، *BabA* و *dupA* می باشند.

مطالعات در جوامع غربی نشان داده که حضور ژن *CagA* همراه با اشکال S_1M_2 با شدت بالاتری از التهابات دستگاه گوارش همراه بوده و همچنین شانس ابتلا به بدخیمی‌ها را افزایش می دهد. ژن *CagA* مارکری جهت حضور جزیره بیماریزای Cag، یا Cag-Pathogenesity Island می باشد. این ژن کد کننده پروتئینی به همین نام با وزن مولکولی ۴۰ کیلو دالتون بوده و در ۵۰ تا ۷۰ در صد سویه های باکتری مشاهده می گردد. ژن *VacA* نیز در تمام سویه‌ها به صورت پلی مورفیسم آللی وجود دارد. این ژن از دو ناحیه سیگنالینگ (S) و ناحیه میانی (M) تشکیل شده است. ناحیه S به تایپ های S_1 و S_2 و ناحیه M به تایپ های M_1و M_2 تقسیم بندی می شوند. هرکدام از این نواحی دارای ساب تایپ هایی می باشند. این دو ژن از لحاظ مکان استقرار بر روی کروموزوم و بیان به یکدیگر وابستگی ندارند.

در این تحقیق نمونه بیوپسی معده بیماران مراجعه کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان نور وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که تست سریع اوره آز(Rapid Urease Test) آنها مثبت گردید بر روی محیط کشت مناسب تلقیح شدند. دو نوع محیط کشت به کار برده شده در این تحقیق بروسلا آگار و کلمبیا بیس آگار بودند که از سه آنتی بیوتیک ونکومایسین، تری متوپریم، آمفوتریسین، خون تازه گوسفندی و سرم جنینی گاوی به عنوان مکمل استفاده گردید. بعد از انکوباسیون ۳-۵ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط میکروآئروفیلیک در صورت مشاهده رشد کلنی باکتری ابتدا تست های بیوشیمیایی اوره آز، کاتالاز و اکسیداز انجام شد. سپس استخراج DNA با متد جوشاندن انجام گردید و محلول استخراج شده حاوی قطعات DNA در فریزر ۲۰ – درجه سانتی گراد تا زمان انجام PCR نگه داری شد. از تعداد ۶۶ نمونه اوره آز مثبت کشت داده شده، ۲۱ مورد رشد و تشکیل کلنی مشاهده شد. به عبارتی میزان بازیابی حدود ۳۰ در صد بود. متعاقبا PCR انجام گردید و بر اساس باند های موجود بر روی ژل آگارز حضور یا عدم حضور ژن های مورد مطالعه مشخص شد.

از این تعداد فراوانی ژن *CagA* بدون درنظر گرفتن شدت التهابات ۷۱ درصد بود. در ۸ نمونه از ۱۰ نمونه با التهابات منتشر معده این ژن وجود داشت. حضور این ژن در اکثر موارد با شکل آللی S_1M_2 بود. بر اساس باند های مشاهده شده بر روی ژل دو مورد آلودگی همزمان با بیش از یک سویه یا اصطلاحا آلودگی مخلوط مشاهده گردید.

از چهار ترکیب آللی احتمالی مربوط به ژن *VacA* بیشترین شکل ژنوتیپی S_1M_2. بود. ضمن اینکه شکل آللی S_2M_1 در این مطالعه مشاهده نگردید.

کلیدواژه: هلیکوباکتر پیلوری، التهابات دستگاه گوارش، ژن *CagA*، آلل‌های ژن *VacA* و PCR.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول مقدمه

۱-۱هلیکوباکتر پیلوری..... ۱

۱-۱-۱تاریخچه و معرفی جنس هلیکوباکتر..... ۱

۱-۱-۲همه گیری و انتقال..... ۳

۱-۱-۳مورفولوژی باکتری..... ۴

۱-۱-۴جنبه های بیوشیمیایی..... ۴

۱-۱-۴-۱اوره‌آز..... ۴

۱-۱-۴-۲جزیره بیماری زای Cag (Cag-PaI)..... ۵

۱-۱-۴-۳کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز..... ۶

۱-۱-۴-۴سیتوتوکسین واکوئله کننده(VacA)..... ۷

۱-۱-۴-۵ پروتئین فعال کننده نوتروفیلها NAP..... ۱۰

۱-۱-۴-۶ آرژیناز..... ۱۰

۱-۱-۵ استقرار (کلونیزاسیون) باکتری در معده..... ۱۰

۱-۱-۶ ادهسین هاو پروتئین های غشاء خارجی..... ۱۱

۱-۱-۶-۱ HopS (BabA)..... ۱۲

۱-۱-۶-۲ OipA (HopH)..... ۱۲

۱-۱-۶-۳ SabA (HopP)..... ۱۲

۱-۱-۷ نیازهای تغذیه‌ای هلیکوباکتر پیلوری..... ۱۳

۱-۱-۸ پاسخ ایمنی میزبان به باکتری..... ۱۴

۱-۱-۸-۱ پاسخ ایمنی ذاتی..... ۱۴

۱-۱-۸-۱-۱ فعال شدن پاسخ ایمنی ذاتی..... ۱۵

۱-۱-۸-۲ پاسخ ایمنی اکتسابی..... ۱۶

۱-۱-۸-۲-۱ پاسخ ایمنی اکتسابی وابسته به مولکول های MHC..... ۱۶

۱-۱-۸-۲-۲ پاسخ های ایمنی اکتسابی هومورال..... ۱۶

۱-۱-۸-۲-۲-۱ ایمنی اکتسابی و آنتی بادی ها..... ۱۶

۱-۱-۹ فرار از سیستم ایمنی..... ۱۷

۱-۱-۹-۱ فرار از سیستم ایمنی ذاتی..... ۱۷

عنوان | صفحه

۱-۱-۹-۱-۱ اجتناب از عوارض ناشی از تولید RNIS و ROIS ۱۷
۱-۱-۹-۱-۲ مقاومت به پدیده بیگانه خواری ۱۷
۱-۱-۹-۲ فرار از سیستم ایمنی اکتسابی ۱۷
۱-۱-۹-۱-۱ اجتناب از عوارض ناشی از تولید RNIS و ROIS ۱۸
۱-۱-۹-۱-۲ مقاومت در مقابل بیگانه خواری ماکروفاژها ۱۹
۱-۱-۹-۲ فرار از پاسخ های ایمنی اکتسابی ۱۹
۱-۱-۹-۲-۱ تداخل با عرضه آنتی ژنی ۱۹
۱-۱-۹-۲-۲ تعدیل عملکرد لنفوسیت های T ۲۰
۱-۱-۹-۲-۲ اثرات بر روی سلول های B ۲۱
۱-۱-۱۰ تعدیل ایمنی ۲۱
۱-۱-۱۱ نقش ژنتیک میزبان ۲۱
۱-۱-۱۱-۱ IL-1 ۲۲
۱-۱-۱۱-۲ TNF-α ۲۳
۱-۱-۱۱-۳ IL-10 ۲۳
۱-۱-۱۲ بیماری های مرتبط با هلیکوباکتر پیلوری ۲۳
۱-۱-۱۲-۱ بیماری های مرتبط با دستگاه گوارش ۲۳
۱-۱-۱۲-۱-۱ التهاب حاد معده ۲۳
۱-۱-۱۲-۱-۲ التهاب مزمن معده ۲۴
۱-۱-۱۲-۱-۳ زخم های دستگاه گوارش ۲۵
۱-۱-۱۲-۱-۴ سوء هاضمه غیر زخمی ۲۵
۱-۱-۱۲-۱-۵ التهابات آتروفیک معده، متاپلازی روده ای و سرطان معده ۲۵
۱-۱-۱۲-۱-۶ لنفومای معده ۲۶
۱-۱-۱۲-۱-۷ نقش باکتری در التهاب خود ایمن معده ۲۸
۱-۱-۱۳ مکانیسم های احتمالی القای التهابات خود ایمن معده ۲۸
۱-۱-۱۳-۱ عرضه آنتی ژن ها که در نتیجه التهاب افزایش می یابد ۲۸
۱-۱-۱۳-۲ بیان اپی توپ هایی در باکتری که از نظر ساختاری مشابه اپی توپ های آنتی ژن های خودی هستند ۲۸
۱-۱-۱۲-۲ بیماری های خارج دستگاه گوارش ۲۹

عنوان | صفحه

۱-۱-۱۴ راههای تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری ۲۹
۱-۱-۱۴-۱ روش های تهاجمی ۳۰
۱-۱-۱۴-۱-۱ تست سریع اوره‌آز ۳۰
۱-۱-۱۴-۱-۲ تشخیص بافت شناسی ۳۰
۱-۱-۱۴-۱-۳ کشت ۳۰
۱-۱-۱۴-۱-۴ PCR ۳۱
۱-۱-۱۴-۱-۱-۵ هیبریداسیون درجا ۳۱
۱-۱-۱۴-۲ روش های غیر تهاجمی ۳۲
۱-۱-۱۴-۲-۱ تست های بر پایه خون ۳۲
۱-۱-۱۴-۲-۱-۱ سنجش های ایمنواسی آنزیمی جهت تشخیص آنتی بادی ها ۳۲
۱-۱-۱۴-۲-۱-۲ ایمونوبلات (وسترن بلات) ۳۲
۱-۱-۱۴-۲-۱-۳ تست خونی اوره C^{13} ۳۲
۱-۱-۱۴-۲-۲ تست های تنفسی اوره (UBT) ۳۳
۱-۱-۱۴-۲-۲-۱ روش های مختلف ۳۳
۱-۱-۱۴-۲-۲-۲ کاربرد های کلینیکی UBT ۳۳
۱-۱-۱۴-۲-۳ تست های مدفوعی ۳۳
۱-۱-۱۴-۲-۳-۱ تست های بررسی آنتی ژن باکتری در مدفوع ۳۳
۱-۱-۱۴-۲-۳-۲ PCR نمونه مدفوع ۳۳
۱-۱-۱۴-۲-۴ تست های ادراری ۳۳
۱-۱-۱۵ پیشینه و اهداف این تحقیق ۳۴

فصل دوم مواد و روش ها

۲-۱ جداسازی و کشت باکتری *Helicobacter pylori* ۳۵
۲-۱-۱ تهیه نمونه ۳۵
۲-۱-۱-۱ فرم مشخصات بیماران آندوسکوپی شده ۳۶
۲-۱-۱-۲ طریقه تلقیح ۳۶
۲-۱-۱-۳ طریقه استفاده از گازپک ها ۳۶
۲-۱-۱-۴ چگونگی ایجاد شرایط میکروآئروفیلیک توسط گازپک ها ۳۷
۲-۱-۲ دستگاه‌ها و وسایل مورد استفاده ۳۷

عنوان | صفحه

۲-۱-۳ مواد و محیط‌های کشت ۳۸
۲-۱-۴ روش تهیه محیط‌های کشت مورد استفاده ۳۸
۲-۱-۴-۱ محیط کشت اختصاصی *Helicobacter pylori* ۳۸
۲-۱-۴-۱-۱ تهیه خون تازه دفیبرینه ی گوسفند ۳۸
۲-۱-۴-۱-۲ تهیه رقت از آنتی بیوتیک ونکومایسین ۳۹
۲-۱-۴-۱-۳ تهیه رقت از آمفوتریسن B ۳۹
۲-۱-۴-۱-۴ تهیه رقت از آنتی بیوتیک تری متوپریم ۳۹
۲-۱-۴-۲ محیط کشت کلمبیا بیس آگار (Columbia base Agar) ۴۰
۲-۱-۵ شناسایی باکتری *Helicobacter pylori* ۴۰
۲-۱-۵-۱ رنگ آمیزی گرم ۴۰
۲-۱-۵-۲ بررسی واکنش اوره‌آز ۴۰
۲-۱-۵-۳ بررسی واکنش اکسیداز ۴۱
۲-۱-۵-۳-۱ آزمایش اکسیداز ۴۱
۲-۱-۵-۳-۲ روش کار ۴۱
۲-۱-۵-۴ بررسی واکنش کاتالاز ۴۱
۲-۱-۶ استخراج DNA از کلنی باکتری ۴۲
۲-۱-۶-۱ روش فنل کلروفرم ۴۲
۲-۱-۶-۲ روش جوشاندن ۴۲
۲-۱-۶-۲-۱ بافر سالین فسفات (PBS) ۴۲
۲-۱-۶-۲-۲ نحوه تهیه بافر سالین فسفات ۴۲
۲-۱-۶-۱ روش فنل کلروفرم ۴۳
۲-۱-۶-۱-۱ محلول ها ۴۴
۲-۱-۷ چگونگی انجام PCR ۴۴
۲-۱-۷-۱ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق ۴۴
۲-۱-۷-۱-۱ توالی و مشخصات پرایمر ژن CagA ۴۴
۲-۱-۷-۱-۲ توالی و مشخصات پرایمر ژن VacA آلل های S_1/S_2 ..... ۴۵
۲-۱-۷-۱-۳ توالی و مشخصات پرایمر ژن VacA آلل های M_1/M_2 ..... ۴۶
۲-۱-۷-۲ برنامه دهی ترموسایکلر PCR برای تعداد ۳۴ سیکل ۴۶

عنوان | صفحه

۲-۱-۷-۳ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام PCR ۴۷
۲-۱-۷-۳-۱ حجم مواد مورد نیاز جهت تکثیر آللهای S_1/S_2 مربوط به ژن VacA ۴۷
۲-۱-۷-۳-۲ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام PCR از آللهای M_1/M_2 مربوط به ژن VacA ۴۷
۲-۱-۷-۳-۳ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام PCR از ژن CagA ۴۸
۲-۱-۷-۳-۴ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام همزمان PCR از آلل های M_1/M_2 و S_1/S_2 مربوط به ژن VacA جهت بررسی پلی مورفیسم آللی ۴۸
۲-۱-۷-۳-۵ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام همزمان PCR از آلل های M_1/M_2 و S_1/S_2 مربوط به ژن VacA و ژن CagA. وضعیت مولتی پلکس سه تایی ۴۹
۲-۱-۸ الکتروفورز روی ژل ۱/۵ در صد ۴۹
۲-۱-۸-۱ مواد و وسایل مورد نیاز ۴۹
۲-۱-۸-۲ روش ساخت ژل آگارز ۵۰
۲-۱-۸-۳ روش تهیه دی آمینو تترا استیک اسید ۵۰
۲-۱-۸-۴ روش تهیه محلول TBE ۵۰
۲-۱-۸-۵ مارکرهای DNA ۵۱
۲-۱-۸-۶ روش تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۵۱
۲-۱-۸-۷ انتقال محصول PCR به درون چاهک ها ۵۱
۲-۱-۹ انجام PCR به روش Multiplex ۵۲

فصل سوم نتایج

۳-۱ اختلالات گوارشی مشخص شده در نمای آندوسکوپی ۵۵
۳-۱-۱ نمای آندوسکوپی التهاب فرسایشی معده (Erosive gastritis) ۵۵
۳-۱-۲ نمای آندوسکوپی التهاب معده (gastritis) ۵۶
۳-۲ جداسازی و کشت باکتری ۵۶
۳-۲-۱ رنگ آمیزی گرم ۵۸
۳-۲-۲ تست کاتالاز ۵۹
۳-۲-۳ تست اکسیداز ۶۰
۳-۳ نتایج PCR ۶۰
۳-۳-۱ نتایج PCR ژن *CagA* در تعدادی از نمونه ها ۶۰

عنوان صفحه

۳-۳-۲ نتایج PCR آللهای M_1/M_2 و S_1/S_2 ژن *VacA* به طور جداگانه در تعدادی از نمونه ها در شکل ۳-۱۰ نشان داده شده است..... ۶۲

۳-۳-۳ نتایج PCR آللهای M_1/M_2 و S_1/S_2 ژن *VacA* به طور همزمان جهت بررسی پلی مورفیسم این ژن در تعدادی از نمونه ها..... ۶۳

۳-۳-۴ نتایج PCR آللهای M_1/M_2 و S_1/S_2 ژن *VacA* و ژن *CagA* به طور همزمان در تعدادی از نمونه‌ها (مولتی پلکس سه گانه)..... ۶۴

فصل چهارم بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ مقدمه..... ۶۵

۴-۲ نتایج PCR ژن *CagA*:..... ۶۷

۴-۳ نتایج PCR اشکال آللی ژن *VacA* به منظور بررسی پلی مورفیسم این ژن در نمونه مورد بررسی..... ۶۷

۴-۴ مقایسه نتایج به صورت همزمان..... ۶۸

۴-۵ پیشنهادات..... ۷۰

پیوست ۱ نتایج بلاست پرایمر ها..... ۷۱

منابع و ماخذ..... ۷۵

فهرست شکل ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱: ساختار Cag-PaI ۶

شکل ۱-۲ نحوه عملکرد VacA درون سلول میزبان..... ۸

شکل ۱-۳ نواحی S و M ژن VacA..... ۹

شکل ۱-۴ پاسخ ایمنی میزبان به باکتری..... ۱۷

شکل ۱-۵ هلیکوباکتر پیلوری و لنفومای معده..... ۲۸

شکل ۳-۱ تست اوره آز مثبت سمت راست، اوره آز منفی سمت چپ..... ۵۴

شکل ۳-۱-۱ نمای آندوسکوپی التهاب معده فرسایشی (erosive gastritis)..... ۵۵

شکل ۳-۱-۲ نمای آندوسکوپی التهاب معده (gastritis)..... ۵۶

شکل۳-۴ کلنی های ریز شفاف، محدب و خاکستری هلیکوباکتر پیلوری بر روی محیط کلمبیا بیس آگار کشت داده شده در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان..... ۵۷

شکل ۳-۵ باسیل های گرم منفی با درشتنمایی X ۱۰۰ ..... ۵۸

شکل ۳-۶ نمای میکروسکوپی باکتری با غالبیت اشکال کوکوییدی 100X..... ۵۹

شکل ۳-۷ واکنش کاتالاز: سمت چپ کاتالاز مثبت ، سمت راست کاتالاز منفی..... ۵۹

شکل ۳-۸ تست اکسیداز: سمت راست اکسیداز مثبت، سمت چپ اکسیداز منفی..... ۶۰

شکل ۳-۹ تصویر ژل مربوط به PCR ژن *CagA* در تعدادی از نمونه ها..... ۶۰

شکل۳-۱۰ تصویر ژل مربوط به PCR ژن *VacA*..... ۶۲

شکل ۳-۱۱ تصویر ژل مربوط به PCR همزمان آللهای ژن *VacA* در یک مخلوط ۲۵ میکرولیتری..... ۶۳

شکل ۳-۱۲ تصویر ژل مربوط به مولتی پلکس سه گانه از ژن های *CagA* و آللهای ژن *VacA* در یک مخلوط ۲۵ میکرولیتری واکنش..... ۶۴

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول ۲-۱ فرم مشخصات بیماران ۳۶

جدول ۲-۲ مشخصات پرایمر ژن Forward CagA ۴۵

جدول ۲-۳ مشخصات پرایمر Reverse CagA ۴۵

جدول ۲-۴ مشخصات $VacAS_1/VacAS_2$ Forward ۴۵

جدول ۲-۵ مشخصات $VacAS_1/VacAS_2$ Reverse ۴۵

جدول ۲-۶ مشخصات VacA M1/M2 Forward ۴۶

جدول ۲-۷ *VacA* M1/M2 Reverse ۴۶

جدول ۲-۸ برنامه PCR ۴۶

جدول ۲-۹ حجم مواد مورد نیاز جهت تکثیر آللهای S_1/S_2 مربوط به ژن *VacA* ۴۷

جدول ۲-۱۰ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام PCR از آللهای M_1/M_2 مربوط به ژن *VacA* ۴۷

جدول ۲-۱۱ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام PCR از ژن *CagA* ۴۸

جدول ۲-۱۲ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام همزمانPCR از آللهای M1/M2 و S1/S2 ۴۸

جدول ۲-۱۳ حجم مواد مورد نیاز جهت انجام همزمانPCR از آللهای M_1/M_2 وS_1/S_2 و ژن *CagA* ۴۹

جدول ۳-۱ انواع اختلالات گوارشی در بیماران مورد مطالعه بر اساس یافته های آندوسکوپی ۵۵

جدول ۳-۲ فراوانی ژن *CagA* در انواع التهابات بخش فوقانی دستگاه گوارش ۶۱

جدول ۳-۳ فراوانی آللی هر کدام از نواحی S و M ژن VacA ۶۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱ هلیکوباکتر پیلوری

۱-۱-۱ تاریخچه و معرفی جنس هلیکوباکتر:

این باکتری خمیده نخستین بار بیش از ۱۰۰ سال قبل در معده انسان و دیگر حیوانات مشاهده گردید اما در سال۱۹۸۲ بود که این ارگانیسم به طور موفقیت آمیزی از نمونه های بیوپسی معده در بیمارستان Royal Perth Hospital در غرب استرالیا کشت داده شد(۱). از آنجایی که این باکتری میکروآئروفیلیک در نمای میکروسکوپ نوری و محتوی G+C مشابه کمپیلوباکترها بودند به کمپیلوباکتر پیلوریدیس[1] نامگذاری شد(۲) چون این اصطلاح ویژه از نظر گرامری نادرست بود به *Campylobacter pylori* تغییر نام یافت. تغییرات بعدی به نام *Helicobacter pylori* در سال ۱۹۸۹ در نتیجه تجزیه و تحلیل جزئیات و خصوصیات ماکرومولکولها از قبیل توالی rRNA و کینونهای تنفسی به وضوح نشان داد که این ارگانیسم به کمپیلوباکتر تعلق ندارد(۳). درنخستین موارد کشت باکتری به تصور اینکه کمپیلوباکترها تحت شرایط میکروآئروفیلیک و روی محیط کشت انتخابی طی ۴۸ ساعت رشد می کردند پلیتهای بدون رشد قابل رویت را طی ۳ روز کنار گذاشته می شدند و کشت اولیه منفی گزارش می گردید، اما برحسب اتفاق یک محیط کشت که به مدت ۵ روز انکوبه گردیده بود کلنی ها مشاهده گردیدند.

---

1 Campylobacter pyloridis

هلیکوباکتر و *wolinella* خانواده هلیکوباکتریاسه را تشکیل می دهند که به نوبه خود همراه کمپیلوباکتریاسه متعلق به گروه اپسیلون پروتئوباکتر Epsilon proteobacteria class nov می باشند. ۳۰ گونه مختلف از این جنس نام گذاری شده اند(۴). تاکنون توالی کامل ژنوم ۲-۳ سویه گزارش شده است.

تخمین زده می شود این باکتری انسان را قبل از مهاجرت های عمده به خارج از آفریقا یعنی ۵۰/۰۰۰ تا ۱۰۰/۰۰۰سال پیش آلوده کرده باشد(۵). اعضای جنس هلیکوباکتر، شامل باکتری هایی گرم منفی خمیده، مارپیچی بدون اسپور و متحرک با یک تاژک قطبی بدون غشا در *H. pullorum* تا ۲ تاژک قطبی و یا ۲ تا چند تاژک غشا دار که در بسیاری از گونه ها مشاهده شده اند می باشند(۶). به طور کلی باکتری های متعلق به جنس هلیکوباکتر براساس محل استقرار در دستگاه گوارش را می توان در ۲ گروه کلی قرار داد.

الف) معده ای: استقرار درون معده

ب)روده ای: استقرار درون روده ، کبد و مجاری صفراوی.

تمام گونه های معدی هلیکوباکتر مولد اوره‌آز بوده در حالیکه تولید اوره‌آز در سویه های روده‌ای متغیر می‌باشد. فعالیت اکسیدازی در تمام این‌دو گروه وجود دارد و فعالیت کاتالازی در اکثر گونه ها دیده می شود. این باکتری تحت شرایط استرس احتمالاً به فرم کوکوئید تغییر شکل می دهد(۷). برخی اعتقاد دارند که فرم مذکور بیانگر حالت مرگ یا دژنراتیو باکتری است(۸) در حالیکه عده ای دیگر بر این باورند که یک فرم فعال از نظر متابولیکی یا همان فرم VBNC [1] است که یک حالت سازگاری موقت باکتری با محیط نامساعد می‌باشد(۹). البته به ندرت انسان علاوه بر هلیکوباکتر پیلوری توسط یک گروه از باکتری های خمیده غیر قابل کشت که شامل *H. felis* ،*H. suis* ،*H. candidatuo* و *H. bizzozeronii* که قبلاً *H. heilmannii* نامیده می‌شد، آلوده می شود هلیکوباکتر هایی که در سگها، گربه ها، خوکها و دیگر پریماتهای غیرانسانی باعث آلودگی می شوند(۱۰). به عنوان مثال آلودگی با *H. heilmannii* در انسان که ناشی از تماس با منابع حیوانی [2] است(۱۱)، در اکثر موارد با التهابات خفیف معده و همچنین در ارتباط با لنفومای مالت می باشد(۱۹). علاوه بر این‌ها آلودگی با باکتری فوق در تشخیص آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری تداخل ایجاد می نمایند، چرا که این احتمال وجود دارد درصدی از موارد مثبت تست UBT [3] بیانگر آلودگی با *H. heilmannii* باشد. هلیکوباکتر پیلوری به عنوان باکتری خارج سلولی در نظر گرفته می شود، گرچه اطلاعات زیادی وجود دارد که جایگاه

---

1 Viable But None Cultureable (VBNC)
2 Zoonosis
3 Urease Breath Test

درون سلولی باکتری را نشان می دهد(۱۲). یکی از خصوصیات مهم باکتری تنوع ژنتیکی آن است که تاکنون در این سطح در دیگر باکتری‌های پاتوژن مشاهده نشده است.

هلیکوباکترپیلوری به برخی از عوامل ضد میکروبی مانند پلی میکسین B و تری متوپریم مقاوم است. این عوامل بسیاری از باکتری های گرم منفی را می کشند. هنگامی که این آنتی بیوتیکها با عوامل ضد قارچی و ترکیبات ضد میکروبی خاص گرم مثبت ها ترکیب شوند این امکان را فراهم می سازند که رشد اکثریت فلورمیکروبی معده و مدفوع حیوانی مهار گشته و این مهارگری دارای ارزش زیادی است(۱۳). استفاده از همین ویژگی جهت جداسازی هلیکوباکترپیلوری از منابعی که احتمالاً باکتری به تعداد کم وجود دارد سودمند خواهد بود(۱۴).

۱-۱-۲ همه گیری[1] و انتقال

مکانیسم های دقیق آلوده شدن به باکتری هنوز به طور زیادی مشخص نشده است. این باکتری در شیره معده ، استفراغ، بزاق و مدفوع وجود دارد. اما شواهد ویژه ای دال بر اینکه راه انتقال غالب کدام است در دست نمی‌باشد(۱۵).

تخمین زده می شود تقریباً ۵۰٪ جمعیت آدمی در سراسر جهان به این باکتری آلوده باشند که البته شیوع آن در کشورهای در حال توسعه ٪۹۰-۸۰ و در کشورهای توسعه یافته ٪۵۰-۳۵ می باشد. انتقال مستقیم از فرد به فرد از طریق معدی ـ دهانی، دهانی ـ دهانی و مدفوعی ـ دهانی رخ می دهد(۱۶). در زنان آفریقایی که غذاهای جویده شده خود را به نوزادانشان می دهند شیوع بالایی مشاهده می شود.

به طور کلی آلودگی طی دوران بچگی رخ می دهد. تقریباً تمام این ابتلاها قبل از ۱۰ سالگی می باشد و منبع و منشا آلودگی اعضای خانواده می باشند. اکثر مطالعات نشان می دهد که زنان و مردان تقریباً به میزان یکسانی در خطر ابتلا قرار دارند. شیوع ابتلا به عفونت همراه با وضعیت اجتماعی اقتصادی پائین در طی دوران بچگی و تراکم بالای زندگی و درآمد کم خانواده می باشد. آلودگی در کشورهای توسعه یافته به تدریج در حال کاهش یافتن می باشد(۱۷).

انتقال از طریق جنسی مشخص نشده است. انتقال از طریق اسپیراسیون باکتری از استفراغ مسیر احتمالی دیگر می‌باشد.

---

1 Epidemiology

۱-۱-۳ مورفولوژی باکتری

در نمونه های بیوپسی باکتری مارپیچی ، میکروآئروفیلیک ، گرم منفی با انتهای مدور صاف است. هر گاه بر روی محیط کشت جامد قرار گیرند به صورت میله ای شکل مشخص می گردند و اشکال مارپیچی کم یا اصلاً دیده نمی شوند. . اندازه ژنوم ۱/۷ میلیون جفت باز می باشد ویکی از خصوصیات جالب آن حالت هایی از تقلید مولکولی است که با میزبان انسانی خود دارد(۱۸).

بعد از کشت طولانی مدت بر روی محیط جامد یا مایع اشکال کوکوئید غالب می گردند. این اشکال توسط میکروسکوپ الکترونی به صورت باسیلهای U شکل دیده می شوند که انتهای دو بازو بوسیله ساختار غشایی به همدیگر متصل می گردند(۱۹). این اشکال از نظر متابولیکی فعال بوده اما در شرایط آزمایشگاهی قابل کشت نمی‌باشند. در نمونه های بیوپسی هلیکوباکترپیلوری ۲/۵ـ۵ میکرومتر طول و ۰/۵ـ۱ میکرومتر قطر دارند. دارای ۶-۴ تاژک غلاف دار تک قطبی هستند که برای تحرک باکتری ضروری اند(۲۰). هر فلاژل تقریباً ۳۰ میکرون طول طول و ۲/۵ـ۵ نانومتر قطر دارد. غشاء فلاژل ساختاری مشابه غشای باکتریایی را نشان می دهد. فیلامان‌های فلاژلی از دو زیر واحد پروتئینی به نام های FlaA و FlaB ساخته شده اند. بیش از ۶۰ ژن در بیوسنتز و عملکرد فلاژل ها تاثیر دارند(۲۲).

از نظر ساختاری هنگامی که از اسید تانیک به منظور رنگ آمیزی استفاده شود معلوم می شود که غشا خارجی باکتری با یک ساختار شبیه گلیکوکالیکس پوشیده شده است(۲۱). هلیکوباکتر پیلوری رشد کرده بر روی پلیتهای آگار، با ساختارهای حلقه ای شکل ۱۲ـ۱۵ نانومتر از اوره آز و HSPB [1] پوشیده شده اند که همولوگی از پروتئین شوک حرارتی GroEL می باشد(۱۷۲).

۱-۱-۴ جنبه های بیوشیمیایی

۱-۱-۴-۱ اوره‌آز

تمام سویه های هلیکوباکتر پیلوری و همچنین گونه های دیگر هلیکوباکتر که درمعده استقرار می یابند و تا بحال شناسائی شده‌اند مقادیر زیادی آنزیم اوره‌آز تولید می کنند. اوره‌آز طبیعی دارای وزن مولکولی ۵۴۰ کیلو دالتون بوده، مولکولی هگزامریک و حاوی نیکل می باشد که شامل ۲ زیر واحد ureA(30kda) ureB(62kda) به نسبت برابر می باشد. این آنزیم ۱۰٪ کل پروتئین های باکتری را تشکیل می دهد. کلاستر ژنی آنزیم اوره‌آز هلیکوباکتر پیلوری دارای ۹ ژن که شامل ژن های ساختاری ureA و ureB و همچنین ژن های تنظیم کننده ای

---

1 Heat Shock Protein