بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی

عنوان

مقایسه پرایمرهای مختلف برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری

استادان راهنما

دکتر طاهره فلسفی

دکتر عزت عسگرانی

دانشجو

فرشته شهیدی

شهریور ماه سال ۱۳۹۱

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به دانشگاه الزهرا است

چکیده

هلیکوباکتر پیلوری عامل اولیه ی گاستریت، زخم معده، زخم دئودنوم و سرطان معده می باشد. روش های مختلفی برای تشخیص عفونت *Helicobacter pylori* وجود دارد که به دو دسته مهاجم و غیر مهاجم تقسیم می شوند. روش های غیر مهاجم شامل جستجوی آنتی بادی های سرمی، آنتی ژن مدفوعی، PCR مدفوعی و تست تنفسی اوره آز می باشند. هر یک از این تست ها دارای مزایا و معایبی هستند؛ اما روش هایی که دارای اختصاصیت بالا هستند به ویژه حائز اهمیت می باشند. در این پژوهش با هدف مقایسه نتایج PCR با چند جفت پرایمر، ژن های 16sRNA، vacA و ureC یا Phosphoglucosamine mutase (glmM) انتخاب شدند. پرایمر های مختلف از این ژن های اختصاصی تهیه شده و در شرایط بهینه بررسی شدند. در مورد glmM سعی شد تا حساس ترین پرایمر انتخاب شود. لذا برای تکثیر این ژن چند جفت پرایمر طراحی و استفاده شد و بهترین آن ها به ویژه از نظر حساسیت انتخاب شد. دو روش PCR نیز شامل روش معمول و روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ureC PCR با نتایج PCR ژن های vacA(m)، vacA(s) و 16s rRNA مقایسه شدند. نتایج نشان دادند که دو جفت از پرایمر های ureC طراحی شده در این پژوهش نسبت به سایرین حساسیت بالاتری داشتند. واکنش Multiplex PCR برای این دو جفت پرایمر نتایج مطلوبی را حاصل نمود. بنابراین روش و دستور کار مربوط به واکنش Multiplex طراحی شده در این پژوهش می تواند برای تشخیص *H. pylori* در نمونه های مختلف استفاده شود.

لغات کلیدی: *Helicobacter pylori*، PCR، GlmM، Multiplex PCR، vacA(m)، vacA(s)، 16s rRNA

فهرست مطالب..... صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات.....۱

۱-۱- مقدمه.....۲

۱- کلیات.....۳

۱-۱- تاریخچه.....۳

۱-۲- اپیدمیولوژی.....۴

۱-۳- ویژگی های عمومی میکروبیولوژیکی.....۵

۱-۴- سیستماتیک.....۶

۱-۵- بیماری زایی.....۷

۱-۶- فاکتورهای بیماری زایی اصلی.....۹

۱-۶-۱- CagA.....۹

۱-۶-۲- VacA.....۱۱

۱-۶-۳- اوره آز.....۱۲

۱-۶-۴- ادزین ها.....۱۳

۱-۷- ژنوم.....۱۴

۱-۸- ژن های اختصاصی جنس و گونه.....۱۶

۱-۹- تنوع ژنتیکی..... ۱۷

۱-۱۰- نقش هلیکوباکتر پیلوری در سرطان زایی..... ۱۹

۱-۱۱- تشخیص عفونت..... ۲۱

۱-۱۱-۱- روش های مستقیم یا تهاجمی..... ۲۱

الف- بافت شناسی..... ۲۱

ب- تست سریع اوره آز..... ۲۲

ج- کشت..... ۲۲

د- تست های مولکولی..... ۲۳

- تست واکنش زنجیره ای پلی مراز..... ۲۳

- تست دورگه سازی در محل..... ۲۴

۱-۱۱-۲- روشهای غیر مستقیم یا غیر تهاجمی..... ۲۴

الف- آزمایشات سرولوژی..... ۲۴

ب- تست تنفس..... ۲۶

ج- تست های مدفوعی..... ۲۶

اهداف پژوهش..... ۲۸

پیشینه پژوهش..... ۲۹

فصل دوم: مواد و روشها..... ۳۱

۲-۱- فهرست مواد و دستگاه های اصلی استفاده شده..... ۳۲

۲-۲- تهیه ی نمونه و کشت..... ۳۴

۲-۲-۱- طرز تهیه ی محیط کشت Brucella blood agar..... ۳۴

۲-۲-۲- طرز تهیه ی محیط Skim milk..... ۳۵

۲-۳- رنگ آمیزی گرم..... ۳۵

۲-۴- تست های بیوشیمیایی..... ۳۵

۲-۴-۱- تست اکسیداز..... ۳۶

۲-۴-۲- تست اوره آز..... ۳۶

۲-۵- طرز تهیه ی محیط کشت اوره..... ۳۶

۲-۶- استخراج DNA و PCR..... ۳۷

۲-۶-۱- استخراج DNA با روش جوشاندن (Boiling)..... ۳۷

۲-۶-۲- استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم..... ۳۸

- طرز تهیه ی بافر STE..... ۳۹

- طرز تهیه ی بافر لیز..... ۳۹

- طرز تهیه ی بافر TE..... ۴۰

۲-۷- واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)..... ۴۰

۲-۸- پرایمرها..... ۴۰

۲-۹- طراحی پرایمر..... ۴۲

۲-۱۰- تهیه ی مخلوط واکنش برای PCR..... ۴۴

۲-۱۱- برنامه ی PCR..... ۴۵

۲-۱۱-۱- برنامه برای پرایمرهای VacA و 16s rRNA..... ۴۶

۲-۱۱-۲- برنامه برای پرایمرهای ureC..... ۴۶

۲-۱۲- گرادیان غلظت DNA..... ۴۷

۲-۱۳- Multiplex PCR..... ۴۷

۲-۱۴- الکتروفورز..... ۴۸

فصل سوم: نتایج..... ۵۰

۳-۱- روشهای روتین میکروبیولوژیکی..... ۵۱

۳-۱-۱- کشت و رنگ آمیزی گرم..... ۵۱

۳-۱-۲- تست های بیوشیمیایی..... ۵۱

۳-۲- بررسی های مقدماتی برای شناسایی بروش PCR..... ۵۲

۳-۲-۱- بررسی پرایمرها..... ۵۲

۳-۲-۲- بررسی نمونه های استخراج شده ی DNA..... ۵۲

۳-۳- نتایج PCR با پرایمرهای گوناگون..... ۵۳

۳-۳-۱- VacA (m)، VacA (s) و 16srRNA..... ۵۳

۳-۳-۲- نتایج PCR با پرایمرهای ureC..... ۵۳

۳-۴- نتایج گرادیان غلظت DNA..... ۵۴

۳-۵- Multiplex PCR با دو جفت پرایمر..... ۵۵

۳-۶- اشکال نتایج الکتروفورز..... ۵۶

فصل چهارم: بحث..... ۶۶

پیشنهادات..... ۷۱

فهرست منابع به ترتیب حروف الفبا..... ۷۲

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

بیش از ۵۰٪ جمعیت جهان حامل هلیکوباکتر پیلوری در دستگاه گوارشی فوقانی خود هستند. عفونت در کشورهای درحال توسعه شایع تر است، ولی شیوع آن در کشورهای غربی در حال کاهش می باشد. این عفونت با گاستریت مزمن، زخم معده، زخمهای دئودنوم و سرطان معده در ارتباط است. البته بیش از ۸۰٪ افراد آلوده شده با *Helicobacter pylori* بدون علامت (asymptomatic) هستند که نشان دهنده دخالت فاکتورهایی ضمیمه ای چون ژنتیک سویه ها، ژنتیک میزبان و فاکتورهایی دیگری چون تغذیه می باشد. البته برخی از محققین بر این اعتقادند که این باکتری می تواند نقش مهمی در اکولوژی طبیعی معده ایفا کند؛ مثلا Blaser در سال ۱۹۹۶ فرضیه ای را مطرح کرد که *H. pylori* با تنظیم اسیدیته ی محتوای معده اثر مفیدی دارد و معتقد است که *H. pylori* بخشی از فلور طبیعی معده می باشد که البته مورد پذیرش همگانی قرار نگرفته است.

این باکتری ده ها سال در معده ی اغلب افراد آلوده باقی می ماند. اغلب افراد آلوده با *H. pylori* هیچگاه علایم کلینیکی بجز گاستریت مزمن را تجربه نمی کنند. حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد افراد آلوده سرانجام دچار زخم های معده یا اثنی عشر (duodenal) می شوند. عفونت *H. pylori* همچنین با یک تا دو درصد احتمال سرطان معده و کمتر از ۱٪ احتمال لنفومای MALT معده همراه است (Kusters *et al*. 2006).

بطور گسترده اعتقاد بر این است که عفونت *H. pyloi* در غیاب درمان برای تمام عمر باقی می ماند. البته احتمالا در کهنسالی عفونت با افزایش آتروفیک شدن مخاط معده و نامناسب شدن آن برای کولونیزاسیون ناپدید شود.

۱- کلیات

۱-۱- تاریخچه

هلیکوباکتر پیلوری اولین بار در معده ی بیماران دارای زخمهای معده و گاستریت در سال ۱۹۸۲ توسط دکتر Barry Marshall و دکتر Robin Warren در Perth (غرب استرالیا) کشف شد. در آن زمان تصور بر این بود که هیچ نوع باکتری نمی تواند در معده ی انسان زنده بماند، زیرا معده مقادیر عظیمی اسید با قدرتی مشابه اسید موجود در باتری اتومبیل تولید می کند. آنها پس از چندین تلاش ناموفق برای کشت باکتری ها از معده سرانجام در سال ۱۹۸۲ موفق به مشاهده ی کولونی هایی شدند و برای این کشف در سال ۲۰۰۵ جایزه ی نوبل را در فیزیولوژی یا پزشکی دریافت کردند.

دانشمندان آلمانی باکتری های مارپیچی را در معده ی انسان در سال ۱۸۷۵ پیدا کردند، ولی نتوانستند آنها را کشت دهند (Blaser. 2005). محقق ایتالیایی Giulio Bizzozero در سال ۱۸۹۳ باکتری هایی زنده با شکلی مشابه در محیط اسیدی معده سگ ها پیدا کرد. پروفسور Walery Jaworski از دانشگاه Jagiellonian در شهر Krakow رسوبات شستشوی معده ای بدست آمده از انسان را در سال ۱۸۹۹ بررسی کرد. او در میان برخی باکتری های میله ای، باکتری هایی با شکل مارپیچی مشخص یافت که آنها را *Vibrio rugula* نامید. او اولین کسی بود که نقشی احتمالی برای این ارگانیسم در بیماری زایی بیماری های معده ای پیشنهاد کرد .Konturek). 2003)

چند مطالعه در اوایل قرن بیستم نیز حضور میله های خمیده را در معده بسیاری از بیماران دارای زخم های معده و سرطان معده نشان دادند .(Egan *et al* 2007)

این باکتری ابتدا *Campylobacter pyloridis* نامیده شد؛ ولی هنگامی که تعیین توالی ژن 16s rRNA و سایر تحقیقات در سال ۱۹۸۹ نشان داد که این باکتری به جنس Campylobacter تعلق ندارد در جنس Helicobacter قرار داده شد.

۱-۲- اپیدمیولوژی

کشورهای درحال توسعه دارای آمار عفونت بسیار بالاتر از غرب یعنی اروپای غربی، آمریکای شمالی و استرالیا (جایی که آمار درحدود ۲۵٪ برآورد می شود) می باشند. عفونتها در همه ی کشورها معمولا در اوایل دوران کودکی کسب می شوند؛ ولی میزان عفونت کودکان در کشورهای درحال توسعه بالاتر از کشورهای صنعتی است (احتمالا بدلیل اوضاع بهداشتی ضعیف). یافتن کودکان آلوده در کشورهای توسعه یافته غیر معمول است؛ ولی درصد افراد آلوده با افزایش سن درحدود ۵۰ درصد برای افراد بالاتر از ۶۰ سال در مقایسه با حدود ۱۰ درصد در افراد بین ۱۸ و ۳۰ سال افزایش می یابد. شیوع بالاتر بین افراد میانسال میزان بالاتر عفونت را در زمان کودکی نشان می دهد؛ نه عفونت در سنین بالاتر.

به نظر می رسد که شیوع در افراد آفریقایی-آمریکایی احتمالا بدلیل فاکتورهای اجتماعی اقتصادی بیشتر باشد. میزان پایینتر عفونت در غرب بمیزان زیادی به استانداردهای بهداشتی بالاتر و استفاده ی گسترده از آنتی بیوتیکها مربوط است. برخلاف میزان بالای عفونت در مناطق خاص جهان، فراوانی کلی *H. pylori* در حال کاهش است؛ ولی مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری در حال ظهور است. تعداد زیادی از سویه های مقاوم به مترونیدازول و کلاریترومایسین در اغلب بخشهای جهان بوجود آمده اند.

مسیر دقیق انتقال *H. pylori* شناخته شده نیست. انتقال فرد به فرد و دهانی-دهانی یا دهانی-مدفوعی محتمل تر است. این باکتری از مدفوع، بزاق و پلاک دندانی برخی افراد آلوده جدا شده است. انتقال در کشورهای توسعه یافته اغلب در داخل خانواده رخ می دهد و در کشورهای درحال توسعه می تواند از جامعه نیز کسب شود (Delport *et al*. 2007).

۱-۳- ویژگی های عمومی میکروبیولوژیکی

Helicobacter pylori یک باکتری گرم منفی مارپیچی میکروآئروفیل با حدود ۳ میکرومتر طول و تقریبا ۰.۵ میکرومتر عرض می باشد. تصور بر این است که شکل مارپیچی هلیکوباکتر برای نفوذ به لایه ی موکوئیدی معده تکامل یافته باشد (Brown, M.L. 2000).

این باکتری هیدروژنازی تولید می کند که می تواند برای کسب انرژی از طریق اکسیداسیون هیدروژن مولکولی تولید شده توسط باکتری های روده ای استفاده شود (Olson *et al*. 2002). آنزیم های اکسیداز، کاتالاز و اوره آز نیز تولید می شوند.

این باکتری قادر به تشکیل بیوفیلم است (Stark *et al*.1999) و می تواند از شکل مارپیچی به شکل کوکوئیدی زنده ولی غیر قابل کشت تبدیل شود. *H. pylori* دارای پنج خانواده ی پروتئین اصلی غشای خارجی (OMP) می باشد. بزرگترین خانواده شامل adhesin های شناخته شده می باشد. چهار خانواده ی دیگر شامل پورین ها، انتقال دهنده های آهن، پروتئین های وابسته به تاژک (Flagellum) و پروتئین های دارای عملکرد ناشناخته می باشند. آنتی ژن O لیپوپلی ساکارید (LPS) می تواند Fucosylated شده و آنتی ژن های گروه خونی موجود در اپی تلیوم معده را تقلید کند. غشای خارجی

همچنین شامل گلوکوزیدهای کلسترول می باشد که در باکتریهای معدودی وجود دارد (Kusters *et al*. 2006).

H. pylori چهار یا شش تاژه ی Lophotrichous دارد و به همین دلیل تمام گونه های هلیکوباکتر گاستریک (gastric) و انتروهپاتیک (enterohepatic) به شدت متحرک هستند (Josenhans *et al*. 2000). رشته های فلاژلی غلافدار شاخص هلیکوباکتر متشکل از دو نوع فلاژلین FlaA و FlaB می باشند.

۱-۴- سیستماتیک

H. pylori متعلق به قلمرو Bacteria، شاخه ی Proteobacteria، رده ی Epsilonproteobacteria، راسته ی *Campylobacterales*، خانواده ی Helicobacteraceae، جنس Helicobacter و گونه ی *H. pylori* می باشد.

۱-۵- بیماری زایی

زیستگاه (Niche) اکولوژیکی طبیعی هلیکوباکتر پیلوری معده ی انسان می باشد. این ارگانیسم به عنوان عامل اصلی گاستریت مزمن (Chronic gastritis)، زخم معده (Peptic ulcer) و سرطان معده (Gastric cancer) در سراسر جهان می باشد.

برای کولونیزه کردن معده، *H. pylori* باید در pH اسیدی لومن زنده بماند و با استفاده از تاژک های خود به داخل مخاط نفوذ می کند تا به زیستگاه خود یعنی نزدیک به لایه ی سلولی اپی تلیالی معده برسد (Amieva *et al*. 2008). *H. pylori* شیب pH در لایه ی مخاط را با شیمیوتاکسی احساس می کند و از محتوای اسیدی لومن به سمت محیط دارای pH خنثی تر سطح سلول های اپی تلیال حرکت می کند (Schreiber *et al*. 2004). این باکتری همچنین روی سطح داخلی سلول های اپی تلیال معده و گاهی داخل سلول های اپی تلیال یافت می شود (Petersen *et al*. 2003).

این باکتری چسبنده (adhesin) هایی تولید می کند که به واسطه آنها به لیپیدهای وابسته به غشا و کربوهیدراتها متصل شده و به این ترتیب اتصال به سلول های اپی تلیالی تسهیل می شود؛ مثلا ادزین BabA به آنتی ژن b لوئیس موجود در سطح سلول های اپی تلیالی معده متصل می شود (Ilver *et al*. 1998).

بقای *H. pylori* در معده ی اسیدی به اوره آز وابسته است. آمونیوم تولید شده از هیدرولیز اوره برای سلولهای اپی تلیال سمی بوده و بهمراه سایر محصولات *H. pylori* شامل پروتئازها، Vacuolating cytotoxin A (VacA) و فسولیپازهای خاص به این سلول ها صدمه می زند.

فرآیندهای التهاب ناشی از عفونتهای *H. pylori* به واسطه پروتئین های غنی از پل های دی سولفیدی انجام می شوند. پروتئین های غنی از سیستئین *H. pylori* (Hcp) به ویژه HcpA (hp0211) پاسخ ایمنی را القا می کنند که در آن تمایز مونوسیت های Th1 میلوئید انسانی به ماکروفاژ صورت می پذیرد. آنها بر خلاف سایتوکاین های یوکاریوتی با عملکرد سلول میزبان تداخل می کنند و مرفولوژی مونوسیت ها را تغییر می دهند که سبب القای بیان پروتئین مارکر سطحی CD11b، فعالیت فاگوسیتیک و اتصال سلولی می شود که همگی نشانگر تمایز مونوسیت به ماکروفاژ می باشند (Dumrese *et al*. 2009)

کولونیزاسیون معده توسط *H. pylori* منجر به گاستریت مزمن می شود. زخمهای معده و دئودنوم وقتی ایجاد می شوند که اثرات التهاب به اسید و پپسین موجود در لومن معده اجازه می دهد که بر مکانیسم های محافظت کننده ی مخاط معده و دئودنوم از این مواد مخرب غلبه کنند. نوع زخم ایجاد شونده به ناحیه ی گاستریت مزمن که در محل کولونیزاسیون *H. pylori* رخ می دهد بستگی دارد (Dixon. 2000). اسیدیته ی داخل لومن معده الگوی کولونیزاسیون *H. pylori* را تحت تاثیر قرار می دهد و بنابراین در نهایت تعیین می کند که آیا یک زخم گاستریک یا دئودنال تشکیل می شود یا خیر.

در افراد تولید کننده ی مقادیر زیاد اسید، *H. pylori* بخش آنتروم (antrum) معده را کولونیزه می کند تا از سلول های پاریتال (parietal) ترشح کننده ی اسید واقع شده در بخش کورپوس (corpus) یا بدنه ی اصلی معده اجتناب کند (Kusters *et al*. 2006).

پاسخ التهابی به باکتریها سلولهای G در آنتروم را برای ترشح هورمون گاسترین القا می کند که از طریق جریان خون به کورپوس می رسد. گاسترین سلولهای پاریتال در

کورپوس را برای ترشح اسید بیشتر بداخل لومن معده تحریک می کند. سطوح بطور مزمن افزایش یافته ی گاسترین سرانجام سبب افزایش تعداد سلولهای پاریتال نیز می شود و میزان اسید ترشح شونده بیشتر بالا می رود. حجم اسید افزایش یافته به دئودنوم صدمه می زند و ممکن است در نهایت زخم بوجود آید. برعکس زخمهای گاستریک اغلب با تولید اسید معده ی نرمال یا کاهش یافته همراه هستند که پیشنهاد می کند مکانیسمهایی که از مخاط معده حفاظت می کنند، آسیب دیده هستند (Schubert *et al*. 2008).

۱-۶- فاکتورهای بیماری زایی اصلی (Virulence factors)

CagA -۱-۶-۱

CagA بیش از هر فاکتور بیماریزای دیگر در این باکتری مطالعه شده و یک پروتئین ایمونوژن قوی را کد می کند. ژن cagA در انتهای cag pathogenicity island (cag-PAI) واقع شده است. این ناحیه حدود ۴۰ کیلو باز می باشد و به نظر می رسد که با انتقال افقی ژنتیکی از یک منبع ناشناخته به ژنوم این باکتری وارد شده است (Suzuki *et al*. 2012).

cagA یک پروتئین ۱۲۸ کیلو دالتونی می باشد که توسط Cytotoxin-associated gene A کد می شود که بخشی از cag-PAI می باشد. cagA توسط سوش های ویرولانت *H. pylori* تولید می شود و حضور آن با افزایش ریسک بیماری زخم معده و نیز سرطان معده همراه است.

دو نوع ایزوله ی کلینیکی *H. pylori* وجود دارد: سوش های مولد cagA (cagA- producing) یا cagA-positive و سوش های غیر مولد cagA (cagA-non-producing) یا cagA-negative. در کشورهای غربی گزارش شده

که افراد آلوده شده با *H. pylori* cagA-positive دارای ریسک بالاتری برای زخم معده یا سرطان معده در مقایسه با افراد آلوده شده با سویه های cagA-negative هستند.

cagA به وسیله ی یک سیستم ترشحی Type IV که توسط چندین ژن cag-PAI کد می شود به داخل سلول های اپی تلیالی معده تزریق می شود. پس از انتقال، cagA در سطح داخلی غشای پلاسمایی مستقر شده و به وسیله ی چندین عضو خانواده ی Src kinase فسفریله می شود. cagA فسفریله به همراه SHP-2 phosphatase یک کمپلکس فیزیکی را تشکیل می دهد که سبب تولید سیگنال های سلولی غیر طبیعی می شود. این سیگنال های غیرطبیعی منجر به برهم خوردن تنظیم رشد سلول، ارتباط سلولی و مهاجرت سلولی شده و طویل شدن سلول های اپی تلیال و افزایش over turn سلولی را باعث می شود که در نهایت با افزایش ریسک آسیب های سلولی، تغییرات ژنتیکی پیش سرطانی را القا می کند. فسفریلاسیون cagA در موتیف های Tyrosine phosphorylation در انتهای کربوکسیل ناحیه ی متغیر پروتئین رخ می دهد. این موتیف ها EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) نامیده می شوند.

EPIYA دارای چهار نوع A، B، C و D بسته به توالی های آمینواسیدی متفاوت می باشد. پروتئین cagA تقریبا همیشه دارای قطعات EPIYA A و EPIYA B می باشد که به دنبال آن یک تا سه قطعه ی C در سویه های موجود در کشورهای غربی و یک قطعه D در سویه های کشورهای آسیای شرقی قرار می گیرند. EPIYA C و EPIYA D مکان های اصلی برای فسفریلاسیون روی محل ورود cagA در سلول معده می باشند و برای برهم کنش بین پروتئین cagA و SHP-2 phosphatase سلول میزبان ضروری هستند. اعتقاد بر این است که داشتن نوع D یا تکرارهای بیشتر C با افزایش فعالیت SHP-2 phosphatase القا شده با cagA همراه است که درجات