بررسی وجود ژن *cagA* در سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیمـاران دچار مشکلات گوارشی فوقانی با روش PCR

زینب پورقاسم(MSc)[1]- *دکتر فریبرز منصور قناعی(MD)[2]- دکتر محمد فائزی(PhD)[1]- دکتر خسرو عیسی‌زاده(PhD)[1]

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: ghanaei@gums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله:۹۳/۰۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۹/۰۱

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری عامل اصلی بیماری‌های گوناگون گوارشی است. برپایه دلایل تنوع پیامد عفونت هلیکوباکتر پیلوری ممکن است با اختلاف در ژنوتیپ یا بیان عوامل بیماری‌زایی وابسته به باکتری و همچنین عوامل محیطی و میزبان در سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران vacA و cagA مرتبط باشند.

هدف: بررسی فراوانی ژن cagA درسویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیمـاران دچار مشکلات گوارشی فوقانی بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مقطعی- توصیفی بر ۱۲۷ بیمار مراجعه‌کننده به درمانگاه گوارش مرکزتحقیقات گوارش وکبد استان گیلان انجام شد که فراوانی ژن cagA در ۵۰ مورد هلیکوباکترپیلوری جداشده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمر از(PCR) بررسی شد. آزمون آماری مورد استفاده مجذور کای بود.

نتایج: از نمونه‌های بررسی شده در ۵۰ مورد باکتری به روش کشت جداشد. پس از PCR فراوانی ژن cagA در سویه‌های مرتبط با بیماران گاستریت آنترال خفیف، گاستریت اروزیو، زخم دئودنوم و زخم معده به ترتیب ۸۵/۷٪، ۶۴/۳٪ ، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ بود و تفاوت معنی‌داری در همـراهی این ژن با سویه‌های جدا شده از بیماران گاستریت اروزیو وجود داشت (P<۰/۰۵) اما این تفاوت در مورد سویه‌های جدا شده از بیماران گاستریت آنترال خفیف، زخم دئودنوم و زخم معده معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: هلیکوباکتر پیلوری با ژنcagA در بیماران دچار زخم معده و زخم دئودنوم بیشتر است.

کلید واژه‌ها: آنتی بادی‌ها/ زخم پپتیک/ هلیکوباکترپیلوری

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و چهارم شماره ۹۳، صفحات: ۳۰-۲۴

مقدمه

هلیکوباکتر پیلـوری عامـل اصـلی گاسـتریت، زخـم معـده و دوازدهه، سرطان معده و لنفـوم بافـت لنفوییـدی اسـت(۱و۲). گاستریت بافتی بـین تمـام افـراد آلـوده شـده بـا ایـن بـاکتری همگانی است اما تنها در عـده کمـی از بیمـاران پیامـد بـالینی بارزی مانند زخم یا سرطان معـده ایجـاد مـی‌شـود. مکانیسـم حالت‌های متفاوت بیماری به‌طور کامـل تشـخیص داده نشـده (۵-۳) و از عواملی که بیشتر مورد توجه محققان قرار گرفتـه، عوامل بیماریزایی باکتری بوده‌است. گرچه ممکن است عوامل انبوه *هلیکوباکتر پیلـوری* شـامل اوره‌از، فـلاژل، آدهیسـین‌هـا، سیتوتوکسـین واکوئـل‌زا و جزیـره پاتوژنیسیتـه cag در بیماریزایی دخالت داشته باشند ولی به نظر می‌رسد اصلی‌ترین عامل بیماریزایی، ژن‌های متعلـق بـه جزیـره پاتوژنیسـیته cag باشنـد (۸-۶). یکی از عملکردهای مهم عناصـر کـد شـونده توسط جزیـره پاتوژنیسـیته cag، فعـال کـردن و برانگیختگـی واکنش‌های ایمنی است که از آن جمله می‌توان به فعال شـدن عوامـل رونویسـی ماننـد NF κ B (NF: κ B) فـاکتـور نسخـه‌بـرداری است که در پاسخ به سیگنال‌های TCR فعـال می‌شود و برای سنتز سایتوکاین‌ها ضروری است.)

و AP-1(AP-1: یـک فـاکتور نسـخه‌بـرداری اسـت کـه در بسیاری از انواع سلول‌ها یافت می‌شود، ولی در لنفوسیت‌هـای T، به‌طور اختصـاصی بـه وسـیله سـیگنال‌هـای ارسـالی از طـریق TCR فعال می‌گـردد.) اشـاره کـرد. فعـال شـدن ایـن عوامل رونویسی باعث بیان ژن‌های متعـددی شـامل ژن‌هـای سرطان‌زا، ژن‌های کدکننده کموکاین‌ها و نیز ژن‌های فعال‌کننده چرخـه‌هـای آنتـی‌آپوپتـوزیس مـی‌شـود (۱۳-۹). عـلاوه بـر فعالیت‌های نامبرده، به‌تازگی ثابـت شـده کـه برخـی ژن‌هـای

۱. دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

جزیره پاتوژنیسیته cag پروتئین‌های مربوط به سیستم‌های ترشحی را کد می‌کنند (۱۸-۱٤). یکی از ژن‌های مربوط به جزیره پاتوژنیسیته cag ژن cagA (Cytotoxin associated gene A) است که در انتهای جزایر پاتوژنیسیتی (Pathogenisity Island) در ناحیه I قطعه 40bp وجود دارد که محل قرارگیری ژن*cagA* بوده و درصد میزان سیتوزین-گوانوزین آن ۳۵ درصد است که تفاوتی با نواحی دیگر ژنوم (۳۹درصد) دارد. *cagA* طی انتقال افقی به برخی سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* منتقل شده‌است(۱۹و۲۰). *cagA* نام ژنی است که پروتئین ۱۲۸-۱٤٥کیلودالتونی به همین نام را رمزدهی می‌کند. این ژن در۵۰-۷۰ درصد سویه‌های باکتری وجود دارد. پروتئینCag پس از ورود به سیتوزول سلول میزبان و فسفریله شدن، فعال گشته و تغییر عملکرد و مورفولوژی زیادی را درون سلول میزبان باعث می‌شود(۱۷و۲۱). ژن*cagA* *هلیکوباکترپیلوری* به عنوان مارکر خطر بروز زخم معده و سرطان معده است. تحقیق اولیه در مورد تنوع گونه‌های *H.pylori* و ایزوله‌ها، ارتباط وجود *cagA*با افزایش بیماریزایی وتوان ایجاد تغییر متعدد مورفولوژی و بیوشیمی در سلول‌های معدی انسان را ثابت می‌کند(۲۲). هدف این مطالعه بررسی ژن cagA در سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* در بیماران دچار ناراحتی‌های گوارشی مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات گوارش وکبد گیلان، بیمارستان رازی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: این مطالعه به صورت مقطعی- توصیفی بر ۱۲۷ بیمار مراجعه‌کننده به درمانگاه گوارش مرکز تحقیقات گوارش وکبد استان گیلان انجام شد. پس از تکمیل پرسشنامه، نوع بیماری توسط متخصص گوارش تشخیص داده شد. همه بیماران رضایت‌نامه‌ای مبنی بر استفاده از نمونه‌ی بیوپسی معده‌ی خود را امضا کردند. در این مطالعه بیماران دست‌کم به مدت ۲ هفته پیش از شروع بررسی هیچ‌گونه درمان آنتی‌بیوتیکی علیه *هلیکوباکتر پیلوری* یا داروی مهارکننده پمپ پروتونی مصرف نکرده بودند. یافته‌های آندوسکوپی در مورد هر بیمار ثبت شده و سپس بیماران به چهارگروه شامل گاستریت آنترال خفیف، گاستریت اروزیو، زخم معده و زخم دوازدهه تقسیم شدند.

جداسازی باکتری و شناسایی آن: از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم توسط آندوسکوپی گرفته و برای یکی از نمونه‌ها تست اوره‌آز سریع (کیت تست اوره‌آز محصول شرکت بهارافشان) در محل انجام شد. نمونه دوم از افرادی که تست اوره آز سریع آنها مثبت بود در داخل محیط ترانسپورت به آزمایشگاه منتقل و بر محیط کشت بروسلا آگار انتخابی که با ۷- ۵ درصد خون گوسفند دفیبرینه غنی شده بود، کشت داده شد. بشقاب‌ها در شرایط کم هوازی حاوی Co_2 ۵ درصد و رطوبت بالای ۹۸ درصد به مدت ٤ تا۱۰روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه نگهداری شدند. تعیین هویت کلنی‌های باکتریایی برپایه رنگ‌آمیزی گرم، شکل مارپیچی در زیر میکروسکوپ، مثبت شدن تست‌های اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز انجام شد. کشت خالص باکتری‌ها به محلول بافر فسفات نمکی منتقل و تا هنگام استخراج DNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج و جداسازیDNA: استخراج DNA روش استاندارد فنل و کلروفرم انجام شد(۳). ابتدا نمونه‌ها سانتریفوژ شدند و سپس مایع رویی خارج و ۵۰ میکرولیتر بافر STES (SDS-Tris-EDTA-NaCl) و۲۰ میکرولیتر بافر(-Tris) TE EDTA با PH=۷/٦ اضافه شد. سپس حجم‌های مساوی از فنل و کلروفرم به نسبت ۱ به ۱ به میزان ٦۰ میکرولیتر اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس و ۵ دقیقه سانتریفوژ(13000RPM) شد. پس از سانتریفوژ و تشکیل ۳ فاز، به مایع رویی ۱/۱۰ حجم نمونه استات سدیم ۳ مولار با PH=۵/۲ و ۲/۵ برابرحجم نمونه اتانول مطلق اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه و ۱۰ دقیقه سانتریفوژ(13000RPM) سرانجام رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ (13000RPM)، DNAهای استخراج شده در ۵۰ میکرولیتر بافرTE (PH=۸/۳) در یخچال نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNAها به‌ترتیب با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز تایید شد.

انجام PCR: واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با مقادیر

۲/۵ میکرولیتر از بافرPCR 1X، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (شرکت سیناژن)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر(جدول۱)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymeras (شرکت سیناژن) و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده از سویه‌های *هلیکوباکتر پیلوری* انجام شد. DNA در دستگاه ترموسیکلر(Bio-RAD) تکثیر شد. تکثیر به صورت زیر انجام شد: ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد،۳۳ سیکل هرکدام شامل ۱دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۱دقیقه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۱دقیقه در ۷۲درجه سانتی‌گراد و بسط و گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲درجه انجام شد. از سویه *هلیکوباکترپیلوری* ATCC43504 نیز به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. فرآورده‌های PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شدند. مدت الکتروفورز یک ساعت و ولتاژ مورد استفاده ۱۳۵ ولت بود. همچنین، size marker ۱۰۰جفت بازی (100bp) بود. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید از باندهای تشکیل شده، عکسبرداری و اندازه باندها با شاخص وزن مولکولی تعیین شد.

جدول۱. پرایمر مورد استفاده برای آنالیز ژن *cagA*

Gens	Primer Name	Primer Sequence	Amplicon Size(bp)
CagA	D008 R008	ATAATGCTAAATTAGACAACTTGAGCGA TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT	298bp

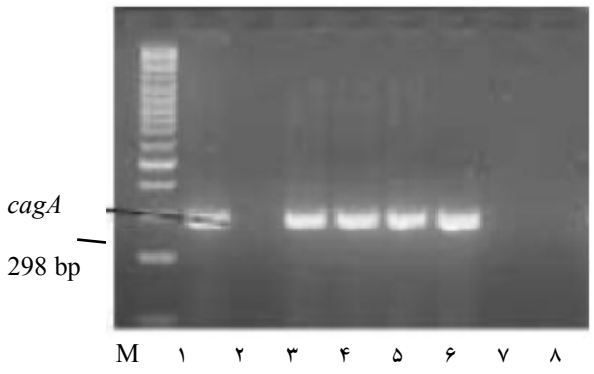
برای تجزیه وتحلیل اطلاعات از نرم‌افزارSPSS 16 وآزمون آماری مجذورکای استفاده شد.

نتایج

از ۱۲۷نمونه بیمار با تست سریع اوره آز مثبت، ۵۰ مورد *هلیکوباکتر پیلوری* بر محیط کشت اختصاصی رشد مشاهده گردید که این تعداد(۲٦ مرد و۲٤ زن) میانگین سنی ٤۸ ساله (۸۱– ۲۰ساله) داشتند. به علاوه در ارتباط با نوع بیماری و ارتباط آن با ژن‌های بررسی شده نتایج نشان داد که در جمعیت مورد مطالعه، ۲۱ بیمار(٤۲درصد) دچار گاستریت آنترال خفیف، ۱٤بیمار(۲۸درصد) گاستریت اروزیو، ۸ بیمار(۱٦درصد) زخم دوازده و ۷ بیمار(۱٤درصد) زخم معده بودند.

جدول۲. فراوانی ژن *cagA* در *H. pylori* جدا شده از بیماران دچار مشکلات گوارشی، برحسب گروه‌های بیمار

گروه‌های بیمار ژن(تعداد)	زخم دئودنوم n(%)	زخم معده n(%)	گاستریت اروزیو n(%)	گاستریت آنترال خفیف n(%)	جمع
cagA+	۸ (۱۰۰)	۷ (۱۰۰)	۹ (۶۴/۳)	۱۸ (۸۵/۷)	۴۲(۸۴)
cagA-	۰ (۰)	۰ (۰)	۵ (۳۵/۷)	۳(۱۴/۳)	۸(۱۶)



شکل۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ۲۹۸ جفت بازی ژن *cagA*

از چپ به راست: ردیف‌های ۸ مربوط به کنترل منفی، ردیف‌های ۷-۲ نمونه‌های بیماران، ردیف M مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و ردیف ۱ نمونه کنترل مثبت مربوط به سویه ATCC43504

از مجموع سویه‌های شناسایی شده‌ی *هلیکوباکترپیلوری* در ٤٢ نمونه(٨٤ درصد) ژن *cagA* وجود داشت. بیشترین فراوانی ژن *cagA* در گروه زخم معده و زخم دئودنوم(١٠٠ درصد) *بود* (جدول٢)

بحث و نتیجه‌گیری

١. امروزه نقش انکارنشدنی *هلیکوباکترپیلوری*(*H.pylori*) در ایجاد و عود بیماری‌های معده، بویژه گاستریت، زخم معده و زخم دئودنوم و سرطان معده به اثبات رسیده است و این باکتری از سوی سازمان بهداشت جهانی عنوان کارسینوژن حقیقی (تیپ ١) را به خود اختصاص داده است، زیرا مشخص شد که *H.pylori* با ایجاد آدنوکارسینومای معده، دومین سرطان کشنده شایع در سراسر جهان، و سندرم MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) مرتبط است(٢٣).

این مطالعه به بررسی ژن شاخص بیماریزایی *cagA* *پرداخته* و ارزش ردیابی این ژن را برای غربالگری بیماران در معرض خطر بالا تعیین کرده است. در صورت حضور ژن *cagA* در محصول PCR حاصل قطعه ژنی به طول ٢٩٨ جفت باز تکثیر می‌شود. بررسی حضور ژن مذکور نشان داد که ٨٤ درصد افراد دچار بیماری‌های گوارشی، سویه حاوی ژن *cagA* مثبت را دارند که این میـــزان با فراوانی این ژن در سویه‌هـای *هلیکـــوباکتر پیلوری* جدا شـده از کشورهـــای مختلف متفـاوت است(٢٤). سنجش فراوانی ژن *cagA* در سویه‌های *هلیکوباکترپیلوری* ایرانی و کشورهای غربی نشان می‌دهد که فراوانی این ژن از کشورهای غربی بیشتر و مشابه کشورهای آسیای جنوب شرقی مانند کره(٩٧درصد) و ژاپن(٩٥درصد) است(٢٥و٢٦). فراوانی ژن *cagA* در برزیل نیز بالا(٩٤درصد) گزارش شده‌است(٢٧). تنوع فراوانی ژن *cagA* در کشورهای مختلف، ممکن است به دلیل تفاوت در جمعیت بیماران مورد مطالعه و تنوع ژنتیکی سویه‌های مورد بررسی بوده باشد.

Raymond و همکاران از آمـریکا گزارش کـرده‌اند که تنها ٦٦ درصـد سویه‌های *هلیکوباکتـــرپیلوری* حامل ژن *cagA* هستند(١٦). در مطالعه دیگری در سال ٢٠٠٥ در برزیل توســـط Luciano و همکاران، میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه‌های *هلیکوباکتـرپیلوری* جدا شده از بیماران برزیلی ٤٨ درصد گزارش شده‌است(٢٢). همچنین، Janchang و همکاران نشان داده‌اند که فراوانی ژن *cagA* در سویه های *هلیکوباکترپیلوری* در چین ٩٣/٩ درصد است (١٢). آنها همچنین نشـــان داده اند که شیـــوع *cagA* در سویه‌های مرتبط با بیماران دچار زخم‌های پپتیک و سرطان معده ١٠٠ درصد و در افراد دچار NUD (Non Ulcer Dispepsia) ، ٩٤ درصد است(٢٨). در مطالعه مولایی وهمکاران میزان فراوانی ژن *cagA* 79/6، درصد گزارش شد(٢٩). مطالعه دوستی و همکاران در شهرکرد و دورقی و همکاران در تهران میزان فراوانی ژن*cagA* را به‌ترتیب ٨٣/٥ و٨٤/٢ درصد گزارش کرده است(٣٠و٣١). درمطالعه دیگری توسط Aydin و همکاران در ترکیه، میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم‌های پپتیک ٧٢/٣ درصد و در بیماران مبتلا به NUD ٤٧ درصد گزارش شده‌است(٦). در مطالعه ما ٨٥/٧ درصد سویه‌های جدا شده از بیماران دچار NUD، ١٠٠درصد سویه‌های جدا شده از بیماران دچار زخم معده، ١٠٠ درصد سویه‌های جداشده از بیماران دچار زخم اثنی عشر و ٦٤/٣ درصد سویه‌های جدا شده از بیماران دچار گاستریت اروزیو حاوی ژن *cagA* بودند.. در مطالعه دیگری توسط Carloss و همکاران در برزیل، میزان شیوع *cagA* گزارش شده در سویه‌های مرتبط با بیماران مبتلا به زخم اثنی‌عشر ٩٠/٥ درصد و در بیماران دچار NUD ٧٠/٥ درصد بود (٣٢).

علیرغم شباهت‌های فراوانی ژن *cagA* بدست آمده در این مطالعه با مطالعات گزارش شده از بعضی از کشورهای غربی و در بعضی موارد کشورهای شرقی از جمله مطالعه Chen می‌توان استنباط نمود که وجود و یا عدم وجود ژن *cagA* می‌تواند به‌عنوان مارکری در جهت آنالیز شدت بیماری در نظر گرفته شود اما نباید نقش عوامل دیگر شناخته شده مانند عوامل محیطی در بیماریزایی این باکتری را نادیده گرفت.

در مطالعه حاضر نشان داده شده‌است که *هلیکوباکترپیلوری* با ژن*cagA* در بین بیماران دچار زخم معده و زخم دئودنوم بیشتر بود. و در نهایت به نظر می‌رسد تحقیقات بیشتر در مورد بررسی فراوانی این زنوتیپ در چند منطقه جغرافیایی و قومیت‌های مختلف داخل کشور با تعداد نمونه‌های بیشتر قابل

تامل و تحقیق باشد.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. 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.

2.Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A, Souod N. Real-time PCR assay using allele-specific TaqMan probe for detection of clarithromycin resistance and its point mutations in *Helicobacter pylori*. Journal of Isfahan Medical School 2011;29(126): 65-73.

3.Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. C*ag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl AcadSci USA* 1996;93:648–653.

4.Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Res 1992; 20: 5137-42.

5.Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *InfectImmun* 1995;63:94–98.

6.Aydin F, Kaklikkaya1 N, Ozgur O. etal. Distribution of vacA alleles and cagA status of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. Clin Microbil Inf 2004; 10: 12-18.

7.Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, etal. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science1999;284: 1328– 1333

8. Peek Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas.Nat Rev Cancer 2002; 2: 28- 37

9.Keates S, Keates AC, Warny M, etal. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by cag+ and cag- *Helicobacter pylori*.J Immunol 1999; 163: 5552– 5559.

10.Luciano LG, Ellen Kris FS, Ka´tia R L, etal. cagA, vacA alelles and babA2 genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. Diag Microbiol Inf Dis2005; 51: 231–235.

11.Maeda S, Yoshida H, Ogura K, etal. *H. pylori* activates NFkappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinases, NFkappaB- inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. Gastroenterology 2000;119: 97- 108.

12. Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, etal. *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. J Biol Chem 2000; 275: 16064– 16072.

13. Mitsuno Y, Yoshida H, Maeda S, etal. *Helicobacter pylori* induced transactivation of SRE and AP-1 through the ERK signaling pathway in gastric cancer cells.Gut 2001; 49 18- 22.

14. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, etal.Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science 2000; 287:1497-500.

15. Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AST, etal.Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a cagA-positive strain in children. J Infect Dis2000; 181: 626–630.

16. Raymond PP, Diane S, Wuerth A, etal. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. Diagnostic microbiology and infectious disease 2003; 46: 83–88

17. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. Embo J 2003; 22: 515–28.

18. Stein M, Rappuoli R, Covacci A, Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl Acad Sci U S A2000; 97: 1263– 1268.

19. Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L,Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, et al. PCRbased subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences 1998; 95 22- 13108.

20.Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*,encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences 1996; 93 25- 14648.

21.Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, RappuoliR, Fantl W.J and Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular Microbiology*2002 ;43: 971–80

22. Leunk R, Johnson P, David B, Kraft W,Morgan D. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. Journal of medical microbiology 1988; 26(2): 93-9.

23. Kusters JG,Vliet M.Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clinical Microbiology Review 2006;3:449-490.

24. Segal ED, Cha J, Lo J, etal. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 14559– 14564.

25. Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB, et al. Genotyping CagA, VacA subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. Journal of Korean medical science 2001; 16(5):579-84.

26. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K,Kanai F, Kato N, et al. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori*isolates Gut 1999; 44(3):336-41.
27. Ashour AAR, Magalhães PP, Mendes EN,Collares GB, Gusmão VR, Queiroz DMM, et al.Distribution of vacA genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. FEMS Immunology & Medical Microbiology 2002; 33(3): 173-8.
28. Jianchang Z,Jianzhong Z, Capiu X, etal. cagAgenotype and variants in Chinese *Helicobacter pylori* strains and relationship to gastroduodenal diseases J Med Microbidl2004 53: 231–235.
29.Molaei M, Foroughi F, Mashayekhi R,Mehrdad H, Zojaji H, Jafari H, et al. CagA status and VacA subtypes of *Helicobacter pylori* in relation to histopathologic findings in Iranian population. Indian Journal of Pathology and Microbiology 2010; 53(1):24.
30.Douraghi M, Mohamadi M, Shirazi M.H,Esmaili M, et al. Evaluation of cytotoxin associated gene with gastric disorders in *H.pylori* infected patients. Journal of Iran Medical Microbiology2008; 2(1): 31-6.[Text in persian]
31. Dousti A, Rahimian Gh, Nasiri J, Yavari foroshani P. Identification the frequency of cytotoxin associated gene in *H.pylori* strain isolated form biopsy samples in Shahrekord.Journal of Armaghan Danesh2007;29(1): 12-38.[Text in persian]
32. Carlos AAB, Lenora MBS, Norma J, etal. Prevalence of cagA and vacA Genes in Isolates from Patients with *Helicobacter pylori*-associated Gastroduodenal Diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 2003; 98: 817-821.

Survey the Existence of CagA in Helicobacter Pylori Levels Separated from Patients Suffering from the Lower Gastrointestinal Disorders by PCR Method.

Pourghasem Z (MSc)[1]-[*]Mansour- Ghanaei F (MD)[2]- Faezi M (PhD)[1] -Isazadeh KH (PhD)[1]

[*]**Corresponding Address:**Gastrointestinal and Liver Disease Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Email: ghanaei@gums.ac.ir

Received: 18 May/2014 Accepted : 27 jul/2014

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* is the main reason of different gastrointestinal diseases. Studies have shown that the diversity of infection outcomes resulted from *H. pylori* may be associated with differences in genotypes or bacterial pathogenesis factors expression and also environmental and host factors in isolated *H. pylori* strains in patients with *CagA* and *VacA*.

Objective: The purpose of this study is to determine the frequency of cagA gene in helicobacter pylori levels separated from patients suffering from lower gastrointestinal disorders.

Materials and Methods: This study is a cross- sectional descriptive one, carried out on 127 patients referred to gasterointestinal clinic of Guilan Province, Gastrointestinal and Liver Research Center, in which the frequency of cagA gene in 50 separated helicobacter pylori cases was investigated using polymeras chain reaction (PCR). The used statistical test was Chai Square.

Results: Among the studied samples, in 50 cases bacteria were isolated by culture method. After performing PCR, the frequencies of *cagA* gene in strains from patients with mild antral gastritis, erosive gastritis, duodenal ulcer, gastric ulcer were equivalent to 85.7% 64.3%, 100% and 100%, respectively. There were significant differences in the association of this gene with isolated strains from patients with erosive gastritis ($p<0.05$), but the difference was not significant for the isolated strains from patients with mild antral gastritis, duodenal ulcer, and gastric ulcer.

Conclusions: This study has shown that *H. pylori cagA* gene level was higher among patients with gastric ulcer and duodenal ulcers.

Conflict of interest: non declared

Keywords: Antibodies/ *Helicobacter pylori*/ Peptic ulcers

_____Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 93, Pages: 24-30

Please cite this article as: Pourghasem Z, Faezi M, Mansour Ghanaei F, Isazadeh KH. Survey the Existence of CagA in Helicobacter Pylori Levels Separated from Patients Suffering from the Lower Gastrointestinal Disorders by PCR Method. J of Guilan University of Med Sci 2015; 24(93):24-30. [Text in Persian]

1. Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University Lahijan Branch, Lahijan, Iran
2. Gastrointestinal and Liver Disease Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran