

## Relationship between New Allelic Types of *Helicobacter pylori* *vacA* Gene and *cagA* Status and Risk of GU or DU in Iran

Bakhti SZ<sup>1</sup>, Latifi-Navid S\*<sup>1</sup>, Zahri S<sup>1</sup>, Yazdanbod A<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Gastrointestinal Cancer Research Center, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

\* **Corresponding author.** Tel: + 989173510888 Fax: +9845335514701 E-mail: slatifin@yahoo.com

Received: Jun 17, 2015 Accepted: Aug 9, 2015

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Several studies have described VacA and CagA as the two important virulence determinants of *Helicobacter pylori*, which are associated with gastric ulcer (GU) and duodenal ulcer (DU). The aim of present study was to determine the associations of the i and d regions genotypes of *H. pylori vacA* gene; and *cagA* status with GU and DU risk.

**Methods:** A total of 177 isolates were cultured from the biopsies of Iranian patients with different geographic origins and genotyped. Data were collected and analyzed.

**Results:** Frequency of the *vacA* i1, i2, ii2, d1, and d2 alleles and *cagA* in all patients was 42.9%, 55.4%, 1.7%, 41.8%, 58.2% and 68.4%, respectively. There was a significant difference between the frequencies of *vacA* i1 in isolates from GU than those from non-atrophic gastritis ( $p < 0.05$ ). When the GU was considered as a dependant factor by the multiple logistic regression analysis, the *vacA* i1 genotype was significantly associated with the age- and sex-adjusted risk for GU ( $p = 0.006$ , odds ratio [OR]=3.56; 95% confidence interval [CI]=1.45–8.75). Statistical analysis showed no significant association between *vacA* d genotype and digestive diseases. After controlling for age and sex variables, the *cagA* genotype remained in the final model when the DU was considered as a dependant factor by the multiple logistic regression analysis ( $p = 0.021$ , OR=3.77; 95% CI=1.22-11.60).

**Conclusion:** We have proposed that the *H. pylori vacA* i1 and *cagA* genotypes could be considered as benefit biomarkers for prediction of risk of GU and DU in Iran, respectively.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*; *vacA*; *cagA*; Gastric Ulcer; Duodenal Ulcer; Iran.

## ارتباط بین تیپ‌های آللی جدید ژن *vaca* هلیکوباکتریپیلوری و وضعیت *caga* با خطر زخم معده یا دوازدهه در ایران

سیده زهرا بختی<sup>۱</sup>، سعید لطیفی نوید<sup>۱\*</sup>، صابر زهری<sup>۱</sup>، عباس یزدان بد<sup>۲</sup>

۱. گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. مرکز تحقیقات سرطان معده، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۳۵۱۰۸۸۸ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۱۴۷۰۱ پست الکترونیک: slatifin@yahoo.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** هلیکوباکتریپیلوری به عنوان عامل اصلی بیماری‌های گوارشی مثل التهاب غیر آتروفی (NAG)، زخم معده (GU) و زخم دوازدهه (DU) می‌باشد. ارتباط نزدیکی بین فاکتورهای اختصاصی این باکتری نظیر *VacA* و *CagA* با GU و DU وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط تیپ‌های اللی نواحی *i* و *d* ژن *vaca* و وضعیت *caga* با خطر GU می‌باشد.

**روش کار:** ۱۷۷ سویه از کشت بیوپسی معده بیماران ایرانی از استان‌های مختلف به دست آمد و با استفاده از PCR تعیین ژنوتیپ شد. داده‌ها جمع‌آوری شده و تحلیل گردید.

**یافته‌ها:** فراوانی آلل‌های *vaca*; *i1*, *i2*, *i1*, *i2*, *d1* و *d2* و ژن *caga* به ترتیب برابر با ۴۲/۹، ۵۵/۴، ۱/۷، ۴۱/۸، ۵۸/۲ و ۶۸/۴ درصد بود. تفاوت معنی‌داری بین فراوانی *vaca i1* در سویه‌های به دست آمده از بیماران GU نسبت به بیماران NAG وجود داشت ( $p < 0.05$ ). در آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک زمانی که GU بعنوان متغیر وابسته لحاظ شد، ژنوتیپ *vaca i1* پس از کنترل متغیرهای سن و جنس ارتباط معنی‌داری با خطر بروز بیماری GU داشت ( $OR = 3.56$ ;  $CI = 1.95-7.5$ ). در آنالیزهای آماری هیچ ارتباط معنی‌داری بین فراوانی ژنوتیپ *vaca d* و بیماری‌های گوارشی نشان نداد. زمانی که DU در آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک بعنوان متغیر وابسته مطرح شد، ژنوتیپ *caga* در حضور متغیر سن و جنس در مدل نهایی باقی ماند ( $OR = 3.77$ ;  $CI = 1.22-11.6$ ;  $p = 0.021$ ).

**نتیجه‌گیری:** ژنوتیپ‌های *vaca i1* و *caga* هلیکوباکتریپیلوری به ترتیب می‌توانند بعنوان نشانگرهای زیستی مفید برای پیشگویی خطر زخم معده و زخم دوازدهه در ایران مطرح باشند.

**واژه‌های کلیدی:** هلیکوباکتریپیلوری، *vaca*، *caga*، زخم معده، زخم دوازدهه، ایران

پذیرش: ۹۴/۵/۱۸

دریافت: ۹۴/۳/۲۷

### مقدمه

هلیکوباکتریپیلوری عامل اصلی بیماری‌های عفونی مزمن قابل انتقال است که در سال ۱۹۷۹ توسط دو محقق استرالیایی به نام‌های وارن روبین و باری مارشال<sup>۲</sup> کشف شد [۱]. آن‌ها گزارش کردند که علت ایجاد زخم‌ها و التهاب‌های معده‌ای، استرس یا غذاهای ادویه‌دار نبوده بلکه بیشتر به دلیل آلودگی با

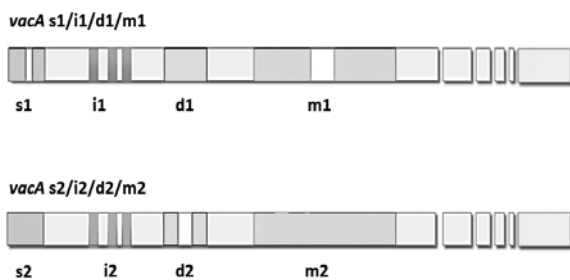
این باکتری است [۲]. عوامل بیماری‌زای مختلفی در هلیکوباکتریپیلوری شناسایی شده است که نقش مهمی در کلونیزاسیون، استقرار پایدار و طولانی مدت در موکوس معده و همچنین در بروز بیماری‌های مرتبط با عفونت هلیکوباکتریپیلوری ایفا می‌کنند که از آن جمله می‌توان  $VacA^3$  [۳] و  $CagA^4$  [۴] اشاره کرد. این دو پروتئین به عنوان شناخته شده‌ترین

<sup>3</sup> Vacuolating cytotoxin A

<sup>4</sup> Cytotoxin associated gene A

<sup>1</sup> Confidence Interval

<sup>2</sup> Warren Robbin & Barry J. Marshall



شکل ۱. شکل شماتیک از محل قرارگیری آلل‌های مختلف *vacA*

مطالعات متعددی از سراسر جهان، ارتباط بین ژنوتیپ‌های مشخص از *vacA* و خطر بالای زخم معده [۱۰، ۱۴، ۱۵، ۱۶] و زخم دوازدهه را نشان داده است [۱۰، ۱۴، ۱۷، ۱۸].

یکی دیگر از ژن‌های هلیکوباکتریپیلوری، ژن *cagA* می‌باشد که منجر به بیماری‌زایی می‌شود [۱۹]، به گونه‌ای که سوبه‌های حامل ژن *cagA* توانایی بالایی در بروز بیماری دارند [۲۰]. حضور *cagA* با گسترش زخم‌های دوازدهه [۲۱-۲۳] و معده [۱۴، ۲۱] مرتبط می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر توصیف نقش تیپ‌های الی نواحی *vacA* d و *vacA* i و همچنین آنالیز ارتباط بین وضعیت *cagA* هلیکوباکتریپیلوری در ارتباط با خطر بیماری‌های زخم معده و زخم دوازدهه می‌باشد.

## روش کار

### سوبه‌های باکتریایی

مطالعه حاضر از نوع مقطعی درون گونه‌ای می‌باشد. در این مطالعه، ۱۷۷ سوبه هلیکوباکتریپیلوری از کشت بیوپسی معده بیمارانی که از سال ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۱ به مراکز آندوسکوپی در استان‌های مختلف ایران مراجعه کرده بودند، به دست آمد. نتایج پاتولوژی و آندوسکوپی در مورد هر بیمار ثبت گردید و سپس بیماران در ۳ گروه که شامل ۱۲۰ بیمار التهاب غیرآتروفی<sup>۴</sup> (NAG)، ۲۸ بیمار زخم دوازدهه<sup>۵</sup> (DU) و ۲۹ بیمار زخم معده<sup>۶</sup> (GU) بودند،

عوامل بیماری‌زای این باکتری می‌باشند که در تخریب سلول‌های اپیتلیال معده بصورت مستقیم و یا از طریق فعال‌سازی سیستم ایمنی میزبان نقش اساسی ایفا می‌کنند و به این ترتیب باعث آسیب ساختار و اختلال در عملکرد معده می‌شوند. سایتوتوکسین ایجادکننده واکوئول (*VacA*) یکی از اولین عوامل بیماری‌زای مشهور در این باکتری است [۵]، که با افزایش خطر بیماری در ارتباط بوده و توسط لوکوس مستقل هلیکوباکتریپیلوری که *vacA* نام دارد کد می‌شود [۵-۸]. ژن *vacA* در تمام سوبه‌های هلیکوباکتریپیلوری وجود دارد، با این حال، تفاوت قابل توجهی در فعالیت ایجاد واکوئول بین سوبه‌های هلیکوباکتریپیلوری مشاهده شده است. این تفاوت در فعالیت ایجاد واکوئول به ساختار ژن *vacA* در ناحیه نشانه (s)<sup>۱</sup> (انتهای پروتئین بالغ را کد می‌کند)، ناحیه میانی (m)<sup>۲</sup> (بخشی از زیر واحد ۵۵ کیلو دالتونی انتهایی کربوکسیلی را کد می‌کند) و ناحیه حد واسط (i)<sup>۳</sup> که اخیراً شناسایی شده و بین نواحی s و m واقع شده و نقش عملکردی مهمی را در فعالیت ایجاد واکوئول ایفا می‌کند، نسبت داده شده است [۹]. اخیراً، یک حذف ۸۱bp که بین ناحیه m و i واقع شده است شناسایی و ناحیه d، deletion، نام‌گذاری گردید. ناحیه d از ژن *vacA* در سمت انتهای آمینی دومین P<sup>۵۵</sup> واقع شده و ممکن است در اتصال *VacA* به سلول‌های اپیتلیالی معده میزبان و فعالیت ایجاد واکوئول نقش داشته باشد [۱۰، ۱۱]. این نواحی به زیر مجموعه‌های s1 (s1a، s1b، s1c)، s2، m1 (a/b)، m2، i1، i2، d1 و d2 (دارای ۶۹ تا ۸۱bp ناحیه حذفی) تقسیم می‌شوند [۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳] (شکل ۱).

<sup>4</sup> Non-Atrophic Gastritis

<sup>5</sup> Peptic Ulcer

<sup>6</sup> Gastric Ulcer

<sup>1</sup> Signal, s

<sup>2</sup> Middle, m

<sup>3</sup> Intermediate, i

شده با ۷-۵٪ خون دفیبرینه انسان و در شرایط کم هوازی حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> و رطوبت بالای ۹۸٪ به مدت ۵ الی ۱۰ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. از کشت بیوپسی تک کلون بدست آمد. تعیین هویت کلنی‌های باکتریایی بر اساس مثبت بودن تست‌های اوره‌آز، کاتالاز و اکسیداز، رنگ‌آمیزی گرم، شکل ماریچی در زیر میکروسکوپ و همچنین تکثیر قطعه *16S rDNA* هلیکوباکتریپیلوری با پرایمرهای اختصاصی در جدول ۱ انجام شد.

طبقه‌بندی شدند. همچنین در طبقه‌بندی دیگری این بیماران در ۲ گروه جنسی زنان ۷۷ (۴۳/۵٪) و مردان ۱۰۰ (۵۶/۵٪) و ۲ گروه سنی <۵۵ سال: ۱۲۹ (۷۲/۹٪) و ≥۵۵ سال: ۴۸ (۲۷/۱٪) طبقه‌بندی شدند.

#### جداسازی و شناسایی باکتری

از هر بیمار دو نمونه بیوپسی از ناحیه آنتروم اخذ گردید و برای یکی از نمونه‌ها تست اوره‌آز سریع در محل انجام شد. بیوپسی‌ها روی محیط کشت بروسلا آگار انتخابی (شامل ۱۰ mg/L ونکوماپسین، ۵ mg/L تری متو پریم و ۲/۵ IU/L آمفوتریسین B) غنی

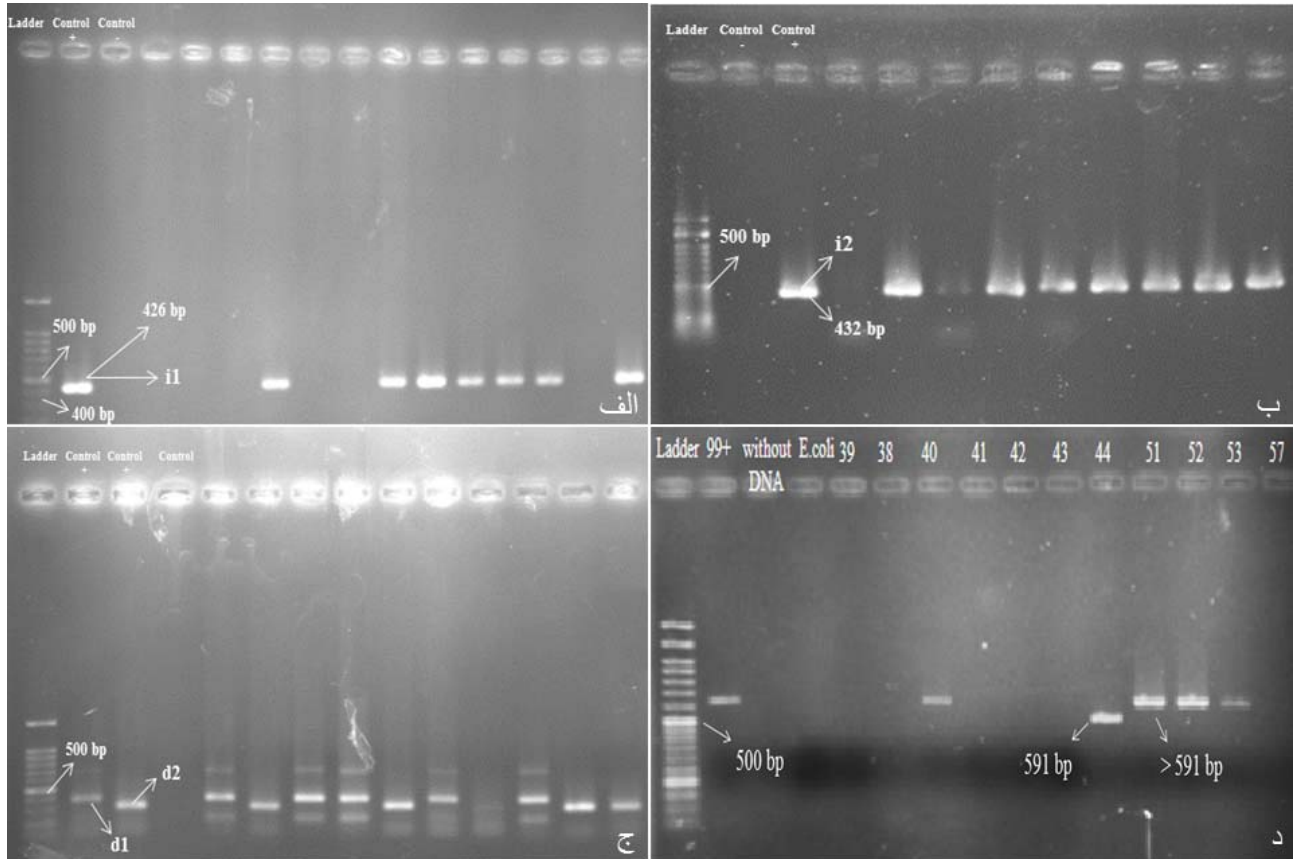
جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده برای تعیین هویت کلنی‌های هلیکوباکتریپیلوری و PCR

Genes	Primers	Sequences (From 5' to 3')	Size of PCR products (bp)	Optimized annealing temperature (°C)	References
<i>16S rDNA vacA</i>	HP1	GCA ATC AGC GTC AGT AAT GTT C	519	56	[32]
	HP2	GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C			
i1/i2	VAC F1 C1R	GTT GGG ATT GGG GGA ATG CCG TTA ATT TAA CGC TGT TTG AAG	i1: 426	53	[9]
	VAC F2 C2R	GTT GGG ATT GGG GGA ATG CCG GAT CAA CGC TCT GAT TTG A	i2: 432	53	
d1/d2	VAS-5 F	ACT AAT ATT GGC ACA CTG GAT TTG	d1: 367-	53	[10]
	VAGF-R	CTC GCT TGA TTG GAC AGA TTG	379		
	mD1-F md1-R	AGG TYA TTA ACC CAC CCA A CTC GCT TGA TTG GAC AGA TTG	d2: 298 d1: 223		
<i>cagA</i>	CAG1 CAG2	ACC CTAGTC GGT AAT GGG TTA GTA ATT GTC TAG TTT CGC	591-856	50	[34]

کدام شامل ۴۰ ثانیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه دمای اتصال پرایمر که برای هر پرایمر اختصاصی بود (جدول ۱)، ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (دمای گسترش) و گرمخانه‌گذاری نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. بعد از تکثیر قطعات مورد نظر، محصولات PCR جهت الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۲٪ بارگذاری شدند. پس از الکتروفورز جهت رنگ‌آمیزی و مشاهده اتیدیوم بروماید و سپس دستگاه ژل داگ انتقال داده شد. در شکل ۲ تصاویر مربوط به الکتروفورز محصولات PCR آمده است.

#### استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج Fermentas, UK و بر اساس دستورالعمل کارخانه تولید کننده انجام شد. از هر نمونه DNA غلظت‌های ۵۰ ng/μl و ۵ ng/μl تهیه گردید و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تعیین ژنوتیپ آلل‌های نواحی i (i1 و i2) و d (d1 و d2) ژن *vacA* و وضعیت ژن *cagA* در حجم ۳۰ μl با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشتی فهرست شده در جدول ۱ با دستگاه PCR انجام شد. شرایط تکثیر توسط PCR به صورت زیر بود: ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه هر



شکل ۲. تصاویر ژل الکتروفورز مربوط به آلل‌های i1 (الف)، i2 (ب)، d1، d2 (ج) و ژن *cagA* (د)

### تحلیل‌های آماری

برای بررسی اینکه آیا فراوانی آللی-ژنی با خطر بروز بیماری‌های زخم معده و زخم دوازدهه در ارتباط می‌باشد و آیا این تفاوت از نظر آماری معنی‌داری است، از آنالیز کای-اسکوئر ( $\chi^2$ ) و آزمون دقیق فیشر در SPSS-19 استفاده شد. به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. آنالیز رگرسیون لجستیک ساده و چندگانه برای بررسی تاثیر هر فاکتور در خطر بروز بیماری‌های زخم معده و زخم دوازدهه به کار برده شد. در این آنالیز از روش *Forward LR* و *Enter* به عنوان

مدل ورود متغیرهای مستقل استفاده شد.  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. بیماران مبتلا به التهاب غیر آتروفی (NAG) در همه تحلیل‌های مقایسه‌ای به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

### یافته‌ها

در این مطالعه فراوانی آلل‌های ژن *vacA* و ژن *cagA* در بیماران مبتلا به زخم معده و زخم دوازدهه نسبت به گروه کنترل (التهاب) مقایسه شد (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی آلل‌های ژن *vacA* و ژن *cagA* در بیماران با اختلالات گوارشی

انواع ژنوتیپ‌های سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری (تعداد (./))							تعداد سویه‌ها	نوع بیماری
<i>cagA</i> <sup>-</sup>	<i>cagA</i> <sup>+</sup>	<i>vacA</i> d2	<i>vacA</i> d1	<i>vacA</i> i1 i2	<i>vacA</i> i2	<i>vacA</i> i1	(%)	
۴۵ (۳۷/۵)	۷۵ (۶۲/۵)	۷۴ (۶۱/۷)	۴۶ (۳۸/۳)	۳ (۲/۵)	۷۵ (۶۲/۵)	۴۲ (۳۵/۰)	۱۲۰ (۶۷/۸)	گاستریت غیر آتروفی (NAG)
۷ (۲۴/۱)	۲۲ (۷۵/۹)	۱۳ (۴۴/۸)	۱۶ (۵۵/۲)	۰ (۰/۰)	۹ (۳۱/۰)	۲۰ (۶۹/۰)	۲۹ (۱۶/۴)	زخم معده (GU)
۴ (۱۴/۳)	۲۴ (۸۵/۷)	۱۶ (۵۷/۱)	۱۲ (۴۲/۹)	۰ (۰/۰)	۱۴ (۵۰/۰)	۱۴ (۵۰/۰)	۲۸ (۱۵/۸)	زخم دوازدهه (DU)
۵۶ (۳۱/۶)	۱۲۱ (۶۳/۴)	۱۰۳ (۵۸/۲)	۷۴ (۴۱/۸)	۳ (۱/۷)	۹۸ (۵۵/۴)	۷۶ (۴۲/۹)	۱۷۷ (۱۰۰/۰)	کل

بود). در آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک زمانی که زخم معده بعنوان متغیر وابسته لحاظ شد، ژنوتیپ ناحیه‌ی *vacA* i1 در حضور متغیر سن و جنس با این بیماری مرتبط شد (OR=۳/۵۶؛  $p=۰/۰۰۶$ ). همچنین زمانی که زخم دوازدهه در آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک بعنوان متغیر وابسته لحاظ شد، *cagA* پس از کنترل متغیرهای سن و جنس با  $p=۰/۰۲۱$  و OR برابر با ۳/۷۷ (OR=۳/۷۷؛ CI=۱/۲۲۶-۱۱/۶۰) در مدل نهایی باقی ماند.

نتایج آنالیز کای-اسکوئر ( $\chi^2$ ) و آزمون دقیق فیشر نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های *vacA* i1 در بیماران زخم معده و *cagA* در بیماران زخم دوازدهه (به ترتیب برابر با ۶۹/۰٪ و ۸۵/۷٪) نسبت به بیماران دارای التهاب (به ترتیب برابر با ۳۵/۰٪ و ۶۲/۵٪) بالاتر بود ( $p<۰/۰۵$ ). نتایج آنالیز رگرسیون لجستیک ساده نشان داد (جدول ۳) ژنوتیپ‌های *vacA* d- هیچ ارتباط مستقلى با خطر زخم معده یا دوازدهه نداشت. اما ژنوتیپ‌های *vacA* i1 و *cagA* ارتباط معنی‌داری به ترتیب با زخم معده و دوازدهه داشتند (OR به ترتیب برابر با ۳/۹۶ و ۳/۶۰ و  $p<۰/۰۵$ )

جدول ۳. نتایج آنالیز رگرسیون لجستیک تک متغیره (ساده)

زخم دوازدهه (تعداد= ۲۸)			زخم معده (تعداد= ۲۹)			فاکتورهای بیماری‌زا
٪۹۵ CI	OR	p value	٪۹۵ CI	OR	p value	
۰/۷۷-۴/۱۰	۱/۷۸	۰/۱۷۲	۱/۹۶-۹/۴۹	۳/۹۶	۰/۰۰۲	<i>vacA</i> i1 در مقابل ناحیه i2
۰/۵۲-۲/۷۷	۱/۲۰	۰/۶۵	۰/۸۷-۴/۴۹	۱/۹۸	۰/۱۰۲	<i>vacA</i> d1 در مقابل ناحیه d2
۱/۱۷-۱۱/۰۴	۳/۶۰	۰/۰۲۵	۰/۷۴-۴/۷۶	۱/۸۸	۰/۱۸۰	<i>cagA</i> <sup>+</sup> در مقابل <i>cagA</i> <sup>-</sup>

فراوانی *vacA* d1 در سویه‌های بدست آمده از بیماران زخم معده و زخم دوازدهه نسبت به بیماران دارای التهاب نشان نداد ( $p>۰/۰۵$ ). در کشورهای آسیای شرقی نیز هیچ ارتباطی بین این ژنوتیپ و زخم معده و زخم دوازدهه وجود نداشت، در حالی که در کشورهای غربی این ژنوتیپ با زخم معده (OR=۹/۹۹؛ CI=۳/۸۸-۲۵/۷۴)؛ و زخم دوازدهه ( $p<۰/۰۱$ ؛ CI=۱/۷۱-۶/۸۹)؛ و زخم معده (OR=۳/۴۳؛  $p<۰/۰۱$ ) مرتبط شد [۱۰]. در این مطالعه نتایج کای-اسکوئر ( $\chi^2$ ) و آزمون دقیق فیشر نشان داد که فراوانی آلل i1 در سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده (۶۹/۰٪) در مقایسه با بیماران مبتلا به گاستریت (۳۵/۰٪) به طور معنی‌داری بالا بود ( $p<۰/۰۵$ ). آنالیز رگرسیون لجستیک ساده نیز بین ژنوتیپ *vacA* i1 ارتباط معنی‌داری با خطر بروز زخم معده نشان داد (OR=۳/۹۶؛ CI=۱/۶۵-۹/۴۹)؛ در حالی که هیچ ارتباطی بین این ژنوتیپ و بیماری زخم دوازدهه یافت نشد.

## بحث

تاکنون گزارش‌های متعددی از سراسر جهان با تفاوت‌های فاحش در شیوع ژن‌ها و آلل‌های مختلف منتشر شده است که نشان‌دهنده ارتباط نزدیک فاکتورهای اختصاصی هلیکوباکتریلوری با بیماری‌های گوارشی است [۲۴-۲۷]. در مطالعه حاضر از یک روش مولکولی برای تعیین ارتباط آلل‌های نواحی i1 و i2) و d1 و d2) ژن *vacA* و وضعیت ژن *cagA* سویه‌های هلیکوباکتریلوری با بیماری زخم معده و زخم دوازدهه استفاده شد. بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن *cagA* (۶۸/۴٪)؛ *vacA* d2 (۵۸/۲٪) و *vacA* i2 (۵۵/۴٪) بود. در این مطالعه فراوانی آلل d1 در گروه‌های مختلف مبتلا به اختلالات گوارشی، فراوانی یکسان و مشابهی را نشان داد. بطوری‌که فراوانی این آلل در سویه‌های جدا شده از بیماران مبتلا به التهاب، زخم معده و زخم دوازدهه به ترتیب برابر ۳۸/۳، ۵۵/۲ و ۴۲/۹ درصد بود. آنالیزهای آماری هیچ تفاوت معنی‌داری بین

شدیدی با زخم دوازدهه (OR=۴/۳۵؛  $p=0/004$ ) و زخم معده (OR=۲۵۹/۶۴؛  $p=0/003$ ) نشان داد. در مطالعه آن‌ها ژنوتیپ *cagA* با زخم معده مرتبط شد ( $p<0/05$ ) ولی هیچ ارتباطی با زخم دوازدهه نشان نداد [۱۴].

در مجموع آنالیز رگرسیون چندگانه لجستیک در حضور متغیرهای سن و جنس نشان داد که ژنوتیپ *vaca il* با زخم معده و ژنوتیپ *cagA* با زخم دوازدهه ارتباط معنی‌داری دارد. البته تعداد نمونه‌های مورد مطالعه برای زخم معده و دوازدهه به نسبت کم بوده و توصیه می‌شود این ارتباط با تعداد نمونه بیشتری بررسی شود تا بهتر بتوان نتیجه‌گیری کرد. آنالیز ترکیبی این ژنوتیپ‌ها و ژنوتیپ ژنتیکی میزبان ممکن است نقش معنی‌داری در بیماری‌زایی هلیکوباکتریلوری داشته باشد. به هر حال نتایج این مطالعه پیشنهاد کرد که ژنوتیپ *vaca il* هلیکوباکتریلوری می‌تواند بعنوان یک نشانگر زیستی مفید برای پیشگویی خطر زخم معده و حضور ژنوتیپ *cagA* در سویه‌های هلیکوباکتریلوری ایرانی در مقایسه با وضعیت ناحیه‌ی *vaca i* و *vaca d* پیش‌گویی کننده بهتری برای بیماری زخم دوازدهه در ایران مطرح باشد.

### تشکر و قدردانی

مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان نامه شماره ۲۰۴ P/T تحت عنوان «جستجوی جایگاه‌های آللی جدید در لوکوس بیماری‌زای *vaca* هلیکوباکتریلوری در ارتباط با بیماری‌های گوارشی» در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۲ می‌باشد که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی اجرا شده است.

مطالعات نشان داده که آلودگی با سویه‌های *vaca il* در بیماران مبتلا به زخم معده در جمعیت‌های عراقی و غربی [۱۰، ۱۸] و بیماران با زخم دوازدهه از جمعیت‌های غربی و ایتالیایی ارتباط دارد [۱۰، ۱۵]. در حالی که مطالعه از کشورهای آسیای شرقی، کره جنوبی و ایران هیچ ارتباطی بین ژنوتیپ *vaca il* و بیماری زخم معده یا زخم دوازدهه نشان نداد [۱۰، ۱۶، ۱۸].

چندین مطالعه از کشورهای پرتغال [۲۱]، انگلستان [۲۲] و ترکیه [۲۳] نشان داده است که سویه‌های حامل ژن *cagA* با خطر زخم معده یا زخم دوازدهه مرتبط هستند، اما مطالعاتی از شرق چین، کره جنوبی (سئول)، ژاپن (کیوتو)، تگزاس (هوستون) و کلمبیا (بوگوتو) بین ژنوتیپ *cagA* و خطر بیماری زخم معده و زخم دوازدهه هیچ ارتباطی نشان نداد [۲۸، ۲۹]. آنالیزهای رگرسیون لجستیک ساده در  $p=0/025$  اما مطالعات داخلی از استان اصفهان [۳۰] و رشت [۳۱] هیچ ارتباطی بین زخم معده و زخم دوازدهه و حضور ژن *cagA* نشان نداد. اگیوارا<sup>۱</sup> و همکاران نیز گزارش کرد در کشورهای آسیای شرقی سویه‌های حامل ژن *cagA* با زخم معده و دوازدهه مرتبط نشد، در حالی که در کشورهای غربی، سویه‌های *cagA* مثبت با زخم معده (OR=۵۵/۳۳؛  $p<0/01$ ) و دوازدهه (OR=۴/۰۲؛  $p<0/01$ ) ارتباط قوی نشان داد [۱۰].

در سال ۲۰۱۴، ممون<sup>۲</sup> و همکاران ۱۲۹ بیمار از بلژیک، کشوری واقع در غرب اروپا را مورد مطالعه قرار داده و وضعیت *vaca*، *cagA* را توسط PCR بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها، ۶۹٪ بیماران دارای ژنوتیپ *vaca il* بودند و این ژنوتیپ ارتباط

<sup>1</sup> Ogiwara

<sup>2</sup> Memon

**References**

- 1- Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*. 1985 Apr 15;142(8):436-9.
- 2- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984 Jun 16;1(8390):1311-5.
- 3- Atherton JC, Cao P, Peek RM, Jr., Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*. 1995 Jul 28;270(30):17771-7.
- 4- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, et al. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*. 1998 Apr;28(1):37-53.
- 5- Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10566-73.
- 6- Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 1992 May 25;267(15):10570-5.
- 7- Phadnis SH, Ilver D, Janzon L, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*. 1994 May;62(5):1557-65.
- 8- Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol Microbiol*. 1994 Apr;12(2):307-19.
- 9- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, et al. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007 Sep;133(3):926-36.
- 10- Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, et al. Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori* vacA gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov;47(11):3493-500.
- 11- Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, et al. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *Embo j*. 2008 Jun 18;27(12):1671-81.
- 12- Sugimoto M, Zali MR, Yamaoka Y. The association of vacA genotypes and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases in the Middle East. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Oct;28(10):1227-36.
- 13- Wroblewski LE, Peek RM, Jr., Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Oct;23(4):713-39.
- 14- Memon AA, Hussein NR, Miendje Deyi VY, Burette A, Atherton JC. Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2984-9.
- 15- Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2008 Jul;135(1):91-9.
- 16- Kim JY, Kim N, Nam RH, Suh JH, Chang H, Lee JW, et al. Association of polymorphisms in virulence factor of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal diseases in South Korea. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 May;29(5):984-91.
- 17- Matsunari O, Shiota S, Suzuki R, Watada M, Kinjo N, Murakami K, et al. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *J Clin Microbiol*. 2012 Mar;50(3):876-83.
- 18- Hussein NR, Mohammadi M, Talebkhan Y, Doraghi M, Letley DP, Muhammad MK, et al. Differences in virulence markers between *Helicobacter pylori* strains from Iraq and those from Iran: potential importance of regional differences in H. pylori-associated disease. *J Clin Microbiol*. 2008 May;46(5):1774-9.
- 19- Atherton JC. CagA: a role at last. *Gut*. 2000 Sep;47(3):330-1.
- 20- Choi KD, Kim N, Lee DH, Kim JM, Kim JS, Jung HC, et al. Analysis of the 3' variable region of the cagA gene of *Helicobacter pylori* isolated in Koreans. *Dig Dis Sci*. 2007 Apr;52(4):960-6.



- 21- Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, Ramalho P, Cabral J, Sousa Guerreiro A, et al. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Feb;22(2):85-91.
- 22- Wotherspoon AC. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *Br Med Bull*. 1998;54(1):79-85.
- 23- Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1648-51.
- 24- Gonzalez-Valencia G, Atherton JC, Munoz O, Dehesa M, la Garza AM, Torres J. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *J Infect Dis*. 2000 Nov;182(5):1450-4.
- 25- Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes: association with gastroduodenal disease in South Africa? *Gut*. 1999 Oct;45(4):499-502.
- 26- Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY, Datta S, Ito Y, Chowdhury A, et al. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *J Bacteriol*. 2000 Jun;182(11):3219-27.
- 27- Pan ZJ, van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dankert J, et al. Equally high prevalences of infection with cagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol*. 1997 Jun;35(6):1344-7.
- 28- Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*. 1999 Jul;37(7):2274-9.
- 29- Chen CY, Wang FY, Wan HJ, Jin XX, Wei J, Wang ZK, et al. Amino acid polymorphisms flanking the EPIYA-A motif of *Helicobacter pylori* CagA C-terminal region is associated with gastric cancer in east China: experience from a single center. *J Dig Dis*. 2013 Jul;14(7):358-65.
- 30- Safaei H, Tavakkoli H, Mojtahedi A, Salehei R, Soleimani B, Pishva E. Correlation of cagA positive *Helicobacter pylori* Infection with clinical outcomes in Alzahra hospital, Isfahan, Iran. *JRMS*. 2008 July & August;13(4):196-201.
- 31- Salehi Z, Jelodar MH, Rassa M, Ahaki M, Mollasalehi H, Mashayekhi F. *Helicobacter pylori* cagA status and peptic ulcer disease in Iran. *Dig Dis Sci*. 2009 Mar;54(3):608-13.
- 32- Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Mar;68(3):1436-9.
- 33- Latifi-Navid S, Mohammadi S, Maleki P, Zahri S, Yazdanbod A, Siavoshi F, et al. *Helicobacter pylori* vacA d1/-i1 genotypes and geographic differentiation between high and low incidence areas of gastric cancer in Iran. *Arch Iran Med*. 2013 Jun;16(6):330-7.
- 34- Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Piazuelo MB, Romero-Gallo J, et al. CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Apr;16(4):369-78.