

فراوانی ژن *cagA* و *iceA* در سویه های هلیکوباکتریلوری جدا شده از افراد مبتلا به

بیماری های گاستروئودنال در شهرستان بابل

جواد شکری شیروانی^{۱*}، رمضان رجب نیا^۲، فاطمه توحیدی^۳، مهدی آسمار^۴، حسن طاهری^۱

۱- استادیار گروه داخلی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۳- کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه آزاد واحد لاهیجان ۴- استاد گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران

سابقه و هدف: هلیکوباکتریلوری شایع ترین باکتری است که جوامع انسانی را در بعد جهانی مبتلا ساخته و عمدتاً با عوارض گوارشی به صورت گاستریت، زخم و گاهی سرطان معده همراه است. هدف از این مطالعه بررسی انواع ژنوتیپ هلیکوباکتری پیلوری در بیماریهای گاسترو دئودنال در شهرستان بابل می باشد.

مواد و روشها: برای بررسی ژن *cagA* و *iceA* و آللهای *iceA1* و *iceA2* از ۵۰ بیمار با بیماریهای گاسترو دئو دنال بیوپسی معده بعمل آمد. بعد از کشت و استخراج DNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن های *iceA*, *cagA*, *iceA1* و *iceA2* با روش PCR بررسی شد.

یافته ها: از ۳۰ نمونه هلیکو باکتر مثبت، فراوانی ژن *cagA* ۸۰٪ بدست آمد. همچنین فراوانی ژن *cagA* در بیماران مبتلا به گاستریت، زخم دوازدهه و زخم معده به ترتیب برابر با ۹۱/۷٪ (۱۱ نفر از ۱۲ نفر) و ۷۳/۳٪ (۱۱ نفر از ۱۵ نفر) و ۶۶/۷٪ (۲ نفر از ۳ نفر) بود. فراوانی ژن *iceA* در کل جمعیت ۷۰٪ بدست آمد که از این تعداد ۱۴ مورد *iceA1* مثبت (۶۶/۷٪) و ۵ مورد *iceA2* مثبت (۲۳/۸٪) بودند. ۲ مورد هیچ کدام از آلل های *iceA1* و *iceA2* نبودند (۹/۵٪). فراوانی ژن *iceA1* در بیماران مبتلا به زخم دوازدهه، زخم معده و گاستریت به ترتیب برابر با ۴۵/۵ و ۵۰ و ۸۸/۹ درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: در این مطالعه فراوانی سویه های *cagA* مثبت هلیکوباکتریلوری بیشتر است و آلل *iceA1* نیز در این منطقه آلل غالب شناخته گردید. دو نمونه *iceA* مثبت جزو هیچ کدام از آلل های *iceA1* و *iceA2* نبودند که به نظر می رسد آلل های جدیدی از این ژن باشند.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتریلوری، ژن *cagA*، ژن *iceA* گاستروئودنال.

دریافت: ۸۶/۶/۲۸، ارسال جهت اصلاح: ۸۶/۱۱/۳، پذیرش: ۸۷/۲/۱۸

مقدمه

هلیکوباکتریلوری شایع ترین باکتری است که جوامع انسانی را در بعد جهانی مبتلا به عفونت ساخته است (۱). معده انسان تنها محل مناسب برای این میکروب است و انسان از دوران پس از شیرخوارگی تا سنین کهولت می تواند ناقل این باکتری باشد. این میکروب به علت اقامت طولانی در معده، می تواند باعث التهاب حاد و مزمن معده، زخم معده، زخم دوازدهه و بدخیمی های معده مثل MALToma گردد (۱). براساس نتایج مطالعات مختلف، فاکتورهای محیطی، خصوصیات ژنتیکی میزبان و فاکتورهای بیماریزایی باکتری

در نتیجه نهایی بیماری سهیم می باشند (۴-۲). از جمله عواملی که بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است فاکتورهای بیماریزایی باکتری باشد. اگرچه فاکتورهای متعدد هلیکوباکتریلوری شامل اوره ازا، فلاژل، فاکتورهای چسبندگی، سیتوتوکسین واکوئل زا و جزیره پاتوژنیسیته *cag* ممکن است در بیماریزایی دخیل باشند ولی به نظر می رسد اصلی ترین فاکتور در بیماریزایی، ژن های متعلق به جزیره

□ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۲۰۳۷۱۱۴۵

از اعتبارات دانشگاه علوم پزشکی بابل تامین شده است.

مواد و روشها

این مطالعه مقطعی بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به گاستریت، زخم دوازدهه، زخم معده مراجعه کننده به بیمارستان شهید بهشتی بابل به روش نمونه گیری آسان انجام شد. حداقل سه نمونه بیوپسی از آنتر و تنه معده این افراد با آندوسکوپ توسط پزشک متخصص گوارش گرفته شد و پس از قرار گیری در محیط ترانسپورت به آزمایشگاه میکروشناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل فرستاده شد.

جداسازی و کشت: نمونه ها سریعاً بر روی محیط بروسلاآگار حاوی ۱۰٪ خون گوسفند و آنتی بیوتیکهای وانکومایسین، تری متوپریم و پلی میکسین B تلقیح گردیدند و پلیت تلقیح شده در شرایط میکروآتروفیل به مدت ۷-۵ روز انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون کلنی های بدست آمده که حاوی باسیل های خمیده گرم منفی کاتالاز، اوره آز و اکسیداز مثبت بودند، به عنوان کلنی های هلیکوباکتریلوری تشخیص داده شدند. سپس از کلنی های مربوطه جهت استخراج DNA استفاده شد.

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از High pure PCR template preparation kit شرکت رژ آلمان استفاده شد.

PCR: پس از استخراج DNA هر نمونه تا انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سکانس پرایمرها جهت تکثیر بخشی از این پرایمرها طوری طراحی شده اند که قادرند در *cagA* قطعه به طول ۵۰۶ جفت باز و در *iceA* قطعه به طول ۹۷۴ جفت باز و در *iceA1* قطعه به طول ۲۴۶ bp و در *iceA2* قطعه به طول ۳۳۴/۲۲۹ bp را تکثیر نمایند.

cagA 5'-GATCTCGGTGGGTCTTTC-3'
3'-TCTTTTACGGCATTGTTCA-5'

iceA 5'-GGGTGCGATTGCGTGGGCGATG-3'
3'-GATCATGGCCTACAACCGCATGGA-5'

iceA1 5'-GTGTTTTTAACCAAAGTATC-3'
3'-CTATAGCCACTCTCTTTGCA-5'

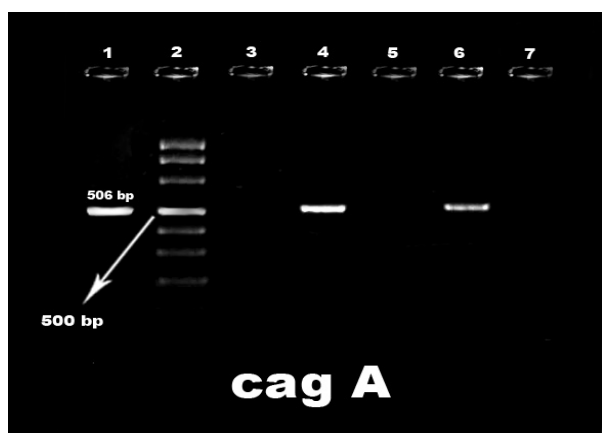
iceA2 5'-GTTGGGTATATCACAATTTAT-3'
3'-TTGCCCTATTTTCTAGTAGGT-5'

پاتوژنیسیته *cag* باشند (۲۳). *CagA* یک پروتئین ۱۲۰ تا ۱۴۰ کیلو دالتونی است و ژن آن فقط در سویه هایی است که بیان می شوند. این ژن در یک قطعه ۴۰ کیلو بازی به نام منطقه بیماریزایی قرار دارد (۵). در مطالعاتی که بر اساس عفونت تجربی حیوانات آزمایشگاهی با سویه های مختلف هلیکوباکتریلوری انجام گرفته است، مشخص گردید که سویه های تیپ I، که در ژنوم آن ها منطقه بیماریزایی *cag* وجود دارد، بیشتر منجر به زخم های پتیک و سرطان میگردند (۸-۶). *cagA* در همه سویه های هلیکوباکتریلوری دیده نمی شود و بنابراین به عنوان مارکری برای حضور جزیره پاتوژنیسیته *cag* استفاده می گردد (۹). فراوانی سویه های *cagA* مثبت در کشورهای پیشرفته ۷۰-۸۰ درصد و در ژاپن و کره ۱۰۰٪ گزارش شده است (۱۲-۱۰).

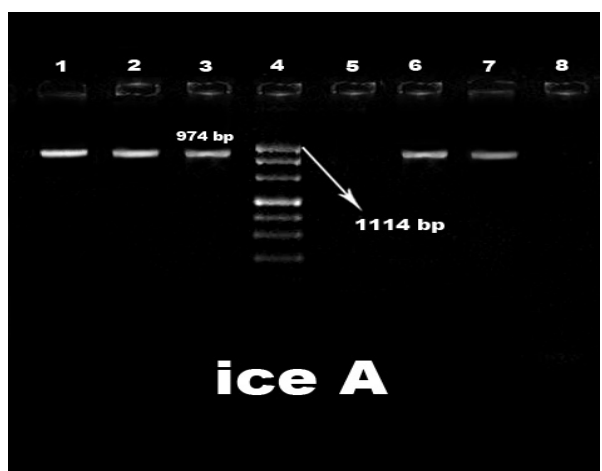
در کشورهای غربی آلودگی با سویه های *cagA* مثبت، به عنوان مارکری در همراهی با زخم های معده، دوازدهه و سرطان معده دیده شده است اما در کشورهای آسیایی چون اکثر افراد آلوده شده با هلیکوباکتریلوری سویه های *cagA* مثبت هستند، همراهی و ارتباط میان سویه های *cagA* مثبت و نتایج بیماری مشخص نمی باشد (۱۳). در مطالعه طالب خان و محمدی در ایران ۹۰٪ از بیماران با سوءهاضمه، ۵۷٪ با زخم پتیک و ۸۹٪ با سرطان معده از نظر *cagA* مثبت بودند (۱۴). همچنین ژن *iceA* هلیکوباکتریلوری، اخیراً به عنوان یک شاخص ژنتیکی برای پیشرفت و تکامل بیماری زخم دوازدهه در شرق شناخته شده است (۱۵). این ژن توسط Peek و همکارانش معرفی شد. *iceA* دارای دو آلل *iceA1*، *iceA2* می باشد. آلل *iceA1* پروتئین مشابه (homologue) آنزیم اندو نوکلئاز *nlaHIIIR* در نایسریا لاکتامیکا (*N. Lactamica*) را کد می کند و *iceA2* پروتئین با ۵۹ اسید آمینه را کد می کند و به *iceA1* وابسته نیست (۱۵). نقش ژن *iceA* در عفونت انسانی هنوز مشخص نشده است (۱۸-۱۶). بیان یکی از این دو، به شیوع جغرافیایی و به نوع بیماری بستگی دارد. تحقیقات و مطالعات نشان داده است که آلل *iceA1* در هلند و آمریکا با زخم پتیک مرتبط بوده ولی در کشورهایی مانند ژاپن، کره و کلمبیا این ارتباط وجود ندارد (۱۸ و ۱۵).

هدف ما در این مطالعه بررسی وجود ژن *cagA*، *iceA* و آللهای آن *iceA1*، *iceA2* در سویه های هلیکوباکتریلوری مرتبط با بیماریهای گاستروئودنال بوده است.

برای تعیین آلل های این ژن (iceA1 , iceA2) PCR اختصاصی آلل انجام شد که ۱۴ مورد (۶۶/۷٪) iceA1 و ۵ نمونه (۲۳/۸٪) iceA2 را داشتند و دو مورد هیچ آللی یافت نشد. نتایج حاصله از الکتروفورز در تصاویر ۱ و ۲ نشان داده شده است. فراوانی ژن iceA در گاستریت، زخم دوازدهه و زخم معده به ترتیب ۷۵، ۳۳/۷ و ۳۳/۷ درصد بدست آمد.



تصویر ۱. ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ۵۰۶ جفت بازی ژن cagA. از چپ به راست: ردیف ۱ و ۶ مربوط نمونه های cagA مثبت، ردیف ۲ مارکر مولکولی و ردیف ۴ نمونه کنترل مثبت، ردیف ۵ نمونه cagA منفی مارکر مولکولی از بالا به پائین، ۱۱۱۴-۹۰۰-۶۹۲-۴۸۹ تا ۵۰۱-۴۰۴-۳۲۰-۲۴۲



تصویر ۲. ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ۹۷۴ جفت بازی ژن iceA. از چپ به راست: ردیف ۱ و ۳ و ۷ مربوط نمونه های iceA مثبت، ردیف ۴ مارکر مولکولی، ردیف ۵ مربوط به کنترل منفی و ردیف ۶ نمونه کنترل مثبت مارکر مولکولی از بالا به پائین، ۱۱۱۴-۹۰۰-۶۹۲-۴۸۹

واکنش PCR برای ژن های cagA , iceA (A1/A2): جهت

تکثیر قطعه مورد نظر از ژن های cagA و iceA در یک حجم ۵۰ میکرولیتری ۱/۵ واحد از آنزیم Taq پلی مرز همراه ۵۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از دزوکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه، ۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم (pH=۸/۳)، Tris - HCL ۱۰ میلی مولار استفاده گردید. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر برای ژن cagA با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه. در پایان جهت تکثیر قطعات ناتمام، ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گردید و برای ژن iceA1 و iceA2 نیز ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ سیکل با دمای ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۷ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه یک دقیقه و آخرین مرحله آن نیز همانند ژن cagA انجام شد. برای ژن iceA نیز از همان برنامه با زمان Extension ۹۰ دقیقه استفاده شد. پس از قرار دادن نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر محصولات PCR به تفکیک هر پرایمر در ژل آگارز ۱/۵٪ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز گردید و از ژل تحت نور UV، عکس گرفته شد و این تصاویر (باندها) مورد بررسی قرار گرفت. بعد از PCR، باندهای بدست آمده با وزن مربوطه به عنوان قطعه مورد نظر از ژن های iceA و cagA در نظر گرفته شد.

در نهایت داده ها با استفاده از آزمون های آماری Chi-square و Fisher exact مورد بررسی قرار گرفت و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

از ۵۰ نمونه تحت بررسی ۳۰ مورد (۶۰٪) کشت مثبت هلیکوباکتریلوری بدست آمد. از این میان، ۱۲ نمونه مربوط به افراد مبتلا به گاستریت (۴۰٪)، ۱۵ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم دوازدهه (۵۰٪) و ۳ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم معده بود (۱۰٪). از ۳۰ مورد کشت هلیکوباکتریلوری مثبت در ۲۴ نمونه (۸۰٪) ژن cagA شناسائی گردید. فراوانی ژن cagA در سویه های مرتبط در زخم دوازدهه، معده و گاستریت به ترتیب ۷۳/۳٪، ۶۶/۷٪ و ۹۱/۷٪ بود. همچنین در میان ۳۰ مورد کشت مثبت، ۲۱ نمونه (۷۰٪) دارای ژن iceA بودند. سپس بر روی این نمونه های مثبت،

گردید (۲۵). تشابهات و اختلاف فراوانی بروز این ژنها در این مطالعه و در کشورهای دیگر را می توان به انتشار جغرافیایی مرتبط دانست. همچنین Figueredo و همکاران نشان دادند که فراوانی سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم دوازدهه، زخم معده و سرطان معده به ترتیب برابر با ۵۶، ۹۰، ۸۸ و ۸۸ درصد است (۲۶). در مطالعه Arents و همکاران در کشور هلند فراوانی *cagA* در بیماری زخم معده نسبت به سایر بیماری ها مورد مطالعه غالب بود (۲۷). در بررسی انجام شده در بابل فراوانی ژن *cagA* در گاستریت بالاتر بوده است ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری در همراهی این ژن با فرم بالینی بیماری یافت نشد که احتمال می رود به علت حجم کم نمونه باشد. علی رغم تفاوتی که در فراوانی این ژن ها در نوع بیماری ها بدست آمد اما از آن جاییکه ژن *cagA* در هر ۳ فرم بالینی دیده شده است می توان استنباط نمود که وجود یا عدم وجود ژن *cagA* می تواند به عنوان مارکری در جهت آنالیز شدت بیماری در نظر گرفته شود اما نباید نقش فاکتورهای دیگر شناخته شده مانند فاکتورهای محیطی را در بیماریزایی این باکتری، نادیده گرفت.

در ارتباط با ژن *iceA* که دارای ۲ آلل *iceA1* و *iceA2* می باشد هنوز ارتباط آن با بیماری زخم معده به طور دقیق مشخص نشده است (۲۸). همانطور که در نتایج اشاره شد از ۳۰ نمونه که از نظر *H. Pylori* مثبت بودند، ۲۱ مورد ژن *iceA* را داشتند که از این ۲۱ نمونه مثبت، ۱۴ مورد آلل *iceA1* را داشتند که این آلل در کل جمعیت غالب بود (۶۶/۷٪) همچنین در مطالعه ای که در چهار کشور آمریکا، کلمبیا، ژاپن و کره صورت گرفت، شیوع ژن *iceA1* در دو کشور کره و ژاپن بیشتر بود، درحالیکه در کشور آمریکا آلل *iceA2* غالب بود (۲۸). در آلمان شیوع آلل *iceA1* در مقایسه با *iceA2* در میان تمام بیماری های مورد بررسی بیشتر بود (۲۳). ژن *iceA* توسط Van Doorn و همکاران وی در هلند مورد مطالعه قرار گرفت و پس از آزمایش بر روی ۹۴ نمونه بیوپسی گرفته شده از بیماران، رابطه بین آلل *iceA1* و زخم معده را گزارش کردند (۲۹) ولی تحقیقات در دیگر کشورها این مطلب را تأیید نکرد (۲۸). در این مطالعه تنوع آلی *H. Pylori* در حالت ترکیبی از *cagA* و *iceA* در هر ۳ فرم بیماری مورد بررسی قرار گرفت که به طور کلی ۸۰٪ از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم دوازدهه و زخم معده هر دو ژن *cagA* و *iceA* را داشتند ($p=0/049$). می توان گفت احتمالاً *cagA* و *iceA* در کنار هم باعث بیماریزایی و یا تشدید آن می شوند. در

فراوانی آلل *iceA1* در بیماری های گاستریت، زخم دوازدهه و زخم معده به ترتیب ۸۸/۸، ۴۵/۵ و ۵۰٪ بدست آمد. در حالیکه میزان آلل *iceA2* در بیماری های گاستریت، زخم دوازدهه و زخم معده به ترتیب ۱۱/۱، ۳۶/۴ و صفر درصد بدست آمد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که ۶۰٪ بیماران با بیماریهای گاسترو دودنال، هلیکوباکتریلوری مثبت بودند که از این میان ۲۴ مورد (۸۰٪) حاوی ژن *cagA* و ۲۱ مورد (۷۰٪) حاوی ژن *iceA* بودند. فراوانی *cagA* در بیماران مبتلا به گاستریت، زخم دوازدهه و زخم معده به ترتیب ۹۱/۷، ۷۳/۳، ۶۶/۷ درصد بوده است که با مقادیر فراوانی این ژن در سویه های هلیکوباکتریلوری جدا شده از کشورهای مختلف متفاوت می باشد.

Podzorski و همکاران در آمریکا گزارش کرده اند که ۶۶ درصد از سویه های هلیکوباکتریلوری حامل ژن *cagA* می باشند (۱۹). در مطالعه دیگری که در کشور برزیل توسط Gatti و همکاران صورت گرفته است، میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتریلوری جدا شده از بیماران برزیلی ۴۸٪ گزارش شده است (۲۰). همچنین Zhovi و همکاران نشان داده اند که فراوانی ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتریلوری در کشور چین ۹۳/۹٪ می باشد (۲۱). همچنین Chen و همکاران نشان داده اند که ۹۴٪ از سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک و سرطان معده دارای ژن *cagA* هستند (۲۲). فراوانی ژن *cagA* در کشورهای هلند - آلمان و استونی و سریلانکا نیز به ترتیب ۸۷/۲٪، ۸۷٪ و ۴۵٪ گزارش شد (۲۳). فراوانی این ژن در شهرستان بابل ۸۰٪ بدست آمد که مشابه با نتایج مطالعات در کشورهای آلمان و استونی می باشد. در بررسی دیگری که توسط شیرازی و همکاران در تهران انجام گردید فراوانی ژن *cagA* در سویه های جدا شده از بیماران ۸۵٪ بدست آمد (۲۴).

مطالعات متعددی نیز بر روی ارتباط این ژن با نوع بالینی بیماری انجام شده است. در مطالعات صورت گرفته توسط Zhou و همکاران، شیوع ژن *cagA* در سویه های مرتبط با بیماران مبتلا به زخم های پپتیک و سرطان معده ۱۰۰٪ بوده است (۲۱). در مطالعه Aydin و همکاران در ترکیه، میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک ۷۲/۳٪ گزارش

مشهور باکتری با سرانجام بالینی بیماری، به نظر می رسد این موضوع، همچنان به عنوان بحثی جدال برانگیز در مباحثات و مناظرات علمی مطرح بماند. در هر حال در همه عفونتهایی که *H. Pylori* باعث بیماری آن ها می شود فاکتورهای بیماریزایی از قبیل فاکتورهای محیطی، فاکتورهای ژنتیکی میزبان و توانایی بیماریزایی باکتری نقش دارند و پیشنهاد می شود برای روشن شدن هر چه بیشتر پاتوژن های دخیل در بیماریهای گاستروئودنال مثل هلیکوباکتر مطالعات با حجم وسیع تر و در مناطق متفاوت جغرافیایی ایران انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل، بخش میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه، آقای دکتر علی بیژنی و خانم مریم محمدی و همچنین از پرسنل محترم بخش آندوسکوپی بیمارستان شهید بهشتی خانم ها سیده مرضیه موسوی، فاطمه اره کشان، آمنه قربانی و مریم اصغرینیا و نیز خانم محدثه میرزاپور بعلت فعالیت در شروع مطالعه تشکر می شود.

این مطالعه فراوانی ژن های *cagA* و *iceA1* در کنار هم، در هر سه فرم متفاوت بیماری بررسی شد که ملاحظه گردید بیشتر افراد دارای *cagA* مثبت، از نظر *iceA* نیز مثبت بودند و همه افراد *cagA* منفی، *iceA* منفی نیز بودند. Vandoorn نیز حضور ژن *cagA* را به همراه *iceA1* به عنوان شاخصی برای بیماریهایی همراه با زخم مطرح کرد (۲۹). در این تحقیق نیز ۶۶/۷٪ سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت حاوی ژن *cagA* و *iceA1* بوده اند که تفاوت معنی داری در همراهی این ژن با سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت وجود داشت ($p=0/038$). اگر چه مطالعات انجام شده توسط Peek و همکاران و نیز Vandoorn و همکاران ارتباط بین *iceA1* و بیماری های زخم پپتیک را گزارش کردند (۲۹و۳۰)، اما در مطالعات انجام شده در آمریکا، ژاپن، کره، کلمبیا و آلمان، ارتباطی بین ژنوتیپ *iceA1* و نتایج بالینی بیماری پیدا نشد (۲۸و۳۱) چنانچه در این مطالعه نیز نتایج متفاوتی از نظر فرم بالینی بیماری ارائه گردید. اختلاف درصد بروز این ژن در این مطالعه و نیز اختلاف در کشورهای دیگر را می توان به انتشار جغرافیایی مرتبط دانست. در خاتمه، با وجود ارتباط این ژن های

References

1. Czinn SJ, Nedrud JG. Oral immunization against helicobacter pylori. Infect Immun 1991; 59(7): 2359-63.
2. Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science 1999; 284(5418): 1328-33.
3. Peek JR, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer 2002; 2(3): 28-37.
4. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 1991; 325(16): 1132-6.
5. Kikuchi S, Crabtree JE, Forman D, Kurosawa M. Association between infections with *cagA* positive for negative strains of Helicobacter pylori and risk for gastric cancer in young adults. Research group on prevention of gastric carcinoma among young adults. Am J Gastroenterol 1999; 94(12): 3455-9.
6. Blaser MJ, Perez Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with Helicobacter pylori strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res 1995; 55(10): 2111-5.
7. Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. CagA pathogenicity island of Helicobacter pylori encodes type I- specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(25): 14648-53.

8. Ogura K, Maeda S, Nakao M, et al. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp Med* 2000; 192(11): 1601-10.
9. Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, et al. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(2): 85-91.
10. Peek RM, Van Doorn LJ, Donahue JP, et al. A quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression in vivo and relationship to gastric pathology. *Infect Immune* 2000; 68(10): 5488-95.
11. Yamoka Y, Kodama T, Kita M, Imanish J, Kashima K, Graham DY. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* to *cagA* status, cytotoxin production and clinical outcome. *Helicobacter* 1998; 3(4): 241-53.
12. Yamaoka Y, Kodama T, Imanishi J, Kashima K. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998; 42(5): 609-17.
13. Ramelah M, Aminuddin A, Alfizah H, et al. *CagA* gene variants in Malaysian *Helicobacter pylori* strains isolated from patients of different ethnic groups. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44(2): 239-42.
14. Talebkhan Y, Mohammadi M, Mohagheghi MA, et al. *CagA* gene and protein status among Iranian *helicobacter pylori* strains. *Dig Dis Sci* 2008; 53(4): 925-32.
15. Figueiredo C, Quint WG, Sanna R, et al. Genetic organization and heterogeneity of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*. *Gene* 2000; 246(1-2): 59-68.
16. Jiang X, Doyle MP. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5): 1984-87.
17. Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Sequence analysis and clinical significance of the *iceA* gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 483-8.
18. Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, et al. *IceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001; 39(5): 1746-50.
19. Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A, Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* gene in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Mid Western United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46(2): 83-8.
20. Gatti LL, Fagundes E, Souza EK, et al. *CagA vacA* alleles and *baba2* genotypes of *helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51(4): 231-5.
21. Zhou J, Zhang J, Xu C, He L. *CagA* genotype and variants in chine *Helicobacter pylori* strains and relationship to gastroduodenal diseases. *J Med Microbiol* 2004; 53(3): 231-5.
22. Chen XJ, Yan J, Shen YF. Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H. pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang province and correlation among different genotype coinfection and severity of the disease. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118(6): 460-7.
23. Miehlke S, Schuppler M, Frings C, et al. *Helicobacter pylori vacA*, *iceA* and *cagA* status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *Am J Gastroentrol* 2001; 96(4): 1008-130.

۲۴. شیرازی م، قاسمی ا، خرمی زاده م. بررسی وجود ژن *cagA* در بیماران با دیس پپسی، زخم پپتیک و سرطان معده با روش PCR. مجله

علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام ۱۳۸۵؛ ۱۴(۳): ۲۲-۸.

25. Aydin F, Kaklikkaya N, Ozgur O, et al. Distribution of vacA alleles and cagA status of Helicobacter pylori in peptic ulcer disease and non- ulcer dyspepsia. Clin Microbiol Infect 2004;10(12): 1102-4.
26. Figueiredo C, Van Doorn LJ, Nogueira C, et al. Helicobacter pylori genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. Scand J Gastroenterol 2001; 36(2): 128-35.
27. Arents NL, Van Zwet AA, Thijs JC, et al. The importance of vacA, cagA and iceA genotypes of H. pylori infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. Am J Gastroenterol 2001; 96(9): 2603-8.
28. Yamaoka Y, Kocama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashama K, Graham DY. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome. J Clin Microbiol 1999; 37(7): 2274-9.
29. Vandoorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the cagA , vacA and iceA status of H. pylori. Gastroenterology 1998; 115(1): 58-66.
30. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahve JP, et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a H. pylori gene iceA, that is associated with clinical outcome. Proc Assoc Am Physicians 1998; 110(6): 531-44.
31. Nishiya D, Shimoyama T, Fukuda S, et al. Evaluation of the clinical relevance of the iceA1 gene in patients with H. pylori infection in Japan. Scand J Gastroenterol 2000; 35(1): 36-9.

OUTBREAK OF *cagA* AND *iceA* IN *H. PYLORI* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH GASTRO DUODENAL DISEASES IN BABOL CITY

J. Shokri Shirvani (MD)^{1*}, R. Rajabnia (PhD)², F. Tohidi (MSc)³, M. Asmar (PhD)⁴, H. Taheri (MD)⁵

1. *Assistant Professor of Internal Medicine, Babol Univ Medical Sciences, Babol, Iran, javadshokry@gmail.com.

2. Assistant Professor of Microbiology, Babol Univ Medical Sciences, Babol, Iran, 3. MSc in Microbiology, Islamic Azad Univ of Lahijan, Lahijan, Iran, 4. Professor of Parasitology Tehran Univ Medical Sciences, Tehran, Iran,

5. Assistant Professor of Internal Medicine, Babol Univ Medical Sciences, Babol, Iran

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Helicobacter pylori* is one of the most common bacteria that afflicts world' human population. Virulence factor of *Helicobacter pylori* have been associated with clinical outcome of the infection including gastritis, gastric ulcer (GU), duodenal ulcer (DU) and gastric cancer. The aim of the present study was to determine the outbreak of *cagA* and *iceA* genotypes of *H. pylori* in patients with gastroduodenal diseases in Babol, North of Iran.

METHODS: Fifty patients with dyspepsia underwent gastroscopy and antral biopsy for histologic study. *CagA*, *iceA*, *iceA1* and *iceA2* genotypes were determined by PCR.

FINDINGS: Of 30(60%) HP positive strains, 80% were positive for *cagA* gene. *CagA* genotype was positive in 91.7% (11 of 12), 73.3% (11 of 15) and 66.7% (2 of 3) of patients with gastritis, DU and GU, respectively. *IceA* was positive in 21(70%) of all patients and *iceA1* was found in 14(66.7%) isolates and *iceA2* was found in 23.8% isolates. *IceA1* and *IceA2* were not found in 2(9.5%). *IceA1* outbreak in patients with gastritis, DU and GU was 88.9%, 45.5% and 50%, respectively.

CONCLUSION: Positive *cagA* strain was more than negative *cagA* and, *iceA1* was predominant strains in our patients with HP infection. We found that two genes other than *iceA1* and *iceA2* in this study. It seems that new allele other than *iceA1* and *iceA2* genes are present in *H. pylori*.

KEYWORDS: *Helicobacter pylori*, *CagA*, *IceA*, *Gasteroduodenal*.

Journal of Babol University of Medical Sciences 2008; 10(1): 46-53

Received: September 18th 2007, Revised: January 22nd 2008, Accepted: May 7th 2008