دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت مدرک کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

شناسایی مولکولی و تشخیص فاکتورهای ویرولانس گونه *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از نمونه های بیوپسی معده

نگارش:

پریسا جوانبخت

اساتید راهنما:

دکترهادی پیری

دکتررقیه تیمورپور

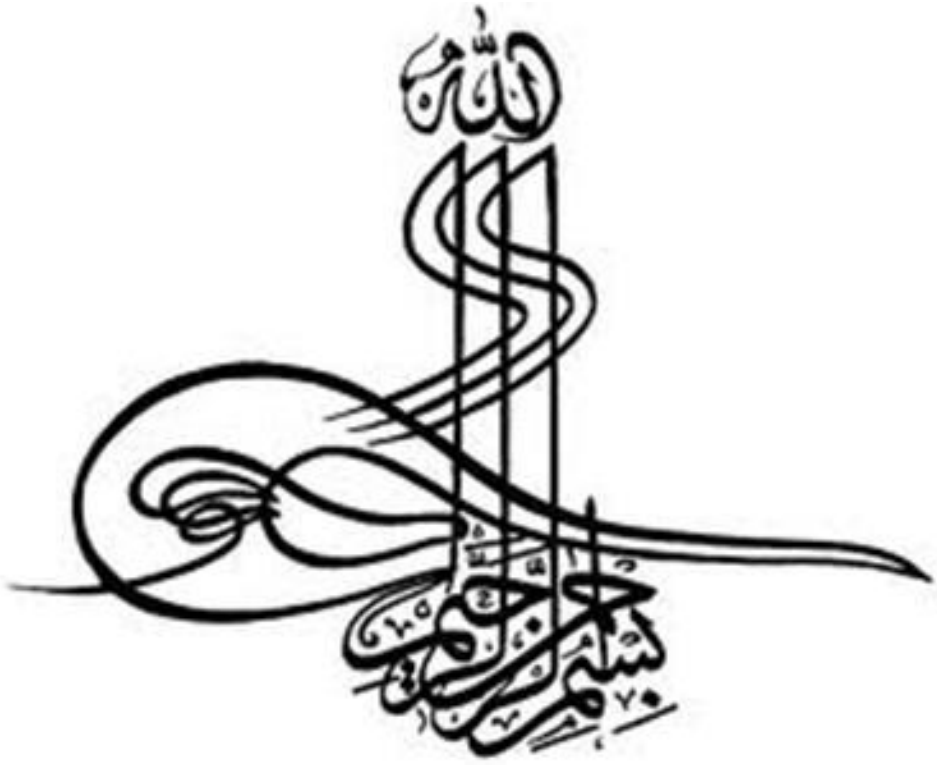
اساتید مشاور:

دکتر عباس یزدانبد

دکتررسول نعمتی

دی ماه ۱۴۰۰

شماره پایان نامه: ۰۷۲


الله
بسم الله الرحمن الرحيم

تقدیم به

مادر عزیز و مهربانم

که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یاوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

و به خواهران عزیزم

تقدیر و تشکر:

از استادان گرامیم جناب اقای دکتر هادی پیری و سرکار خانم دکتر تیمورپور بسیار سپاسگزارم چرا که بدون راهنمایی های ایشان تامین این پایان نامه ممکن نبود.

از جناب آقای دکتر ارزنلو و جناب آقای دکتر محمدی و جناب اقای دکتر عباس یزدانبد و اقای دکتررسول نعمتی به دلیل یاری ها و راهنمایی های بی چشم داشت ایشان که بسیاری از سختی ها را برایم آسان تر نمودند.

از مسئولان آزمایشگاه جناب آقای خانزاده، خانم خاوندی وخانم حسین زاده و جناب آقای آزغانی صمیمانه تشکر می نمایم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده:.....۱

فصل اول: مقدمه

(۱-۱) اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق ۳

(۱-۲)اهداف و فرضیات طرح.....۶

(۱-۲-۱)هدف کلنی طرح.....۶

(۱-۲-۱) اهداف اختصاصی.....۶

(۱-۲- ۶)سوالات تحقیق.....۷

(۱-۳)تعریف واژه های اختصاصی.....۷

فصل دوم: بررسی متون

(۲-۱)هلیکوباکتر.....۱۱

(۲-۲) هلیکوباکترپیلوری.....۱۲

(۲-۲-۱) تاریخچه ۱۲

(۲-۲-۲)خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژی.....۱۴

(۲-۳) سیستم ترشحی نوعIV.....۱۵

(۲-۳-۱) سیستم comb.....۱۶

(۲-۳-۲) سیستم cag ۱۶

(۲-۳-۳)سیستم TFs3.....۱۶

(۲-۴) کلونیزاسیون در محیط اسیدی معده.....۱۶

(۲-۵) عوامل مرتبط باشیوع عفونت هلیکوباکترپیلوری.....۱۷

(۲-۶)وضعیت هلیکوباکتر پیلوری در ایران.....۱۸.

(۲-۷) روش های انتقال عفونت هلیکوباکترپیلوری.....۱۸

(۲-۸) بیماری های مرتبط با هلیکوباکترپیلوری.....۱۹

(۲-۹)سر طان معده.....۱۹

(۲-۱۰)اتصال هلیکوباکترپیلوری به سطح بافت اپیتلیال معده..... ۲۰
(۲-۱۰-۱) گروهHop ،پروتئین های غشای خارجی..... ۲۱
(۲-۱۰-۲)ساختار پروتئین های Hop..... ۲۱
(۲-۱۱)ژن iceA..... ۲۱
(۲-۱۱-۱) آلل iceA1..... ۲۱
(۲-۱۱-۲) الل iceA2 ..... ۲۲
(۲-۱۲)اهمیت مطالعه ی ژن iceA..... ۲۳
(۲-۱۳) پی امد های بالینی ژن iceA..... ۲۳
(۲-۱۴)ژن cagA..... ۲۴
(۲-۱۴-۱)cagA و ترشح اینترلوکین۱۹..... ۲۴
(۲-۱۵)ژن sabA..... ۲۴
(۲-۱۶)ژن vacA..... ۲۵
(۲-۱۶-۱)پلی مورفیسم vacA..... ۲۷
(۲-۱۷)ژن oipA..... ۲۷
(۲-۱۸)ژن dupA..... ۲۸
(۲-۱۸-۱)پی امد بالینی ژن dupA..... ۲۹
(۲-۱۹)ژن hom..... ۲۹
(۲-۲۰)ژنhopQ..... ۳۰
(۲-۲۱) ژن tnp..... ۳۰
(۲-۲۲)بررسی متون..... ۳۱
(۲-۲۲-۱)مطالعات در جهان..... ۳۱
(۲-۲۲-۲)مطالعات در ایران..... ۳۳

فصل سوم: مواد و روش کار

(۳-۱) نوع مطالعه..... ۳۹

(۳-۲)مواد، وسایل و دستگاه های مورد استفاده..... ۳۹

(۳-۲-۱)محیط های کشت مورد استفاده..... ۳۹

(۳-۲-۲)مواد مورد استفاده..... ۴۰

(۳-۲-۳)وسایل مورد استفاده..... ۴۱

(۳-۲-۴)لیست دستگاه های مورد استفاده..... ۴۲

(۳-۲-۵)لیست محلول های مورد استفاده..... ۴۲

(۳-۳) تهیه و جمع آوری نمونه..... ۴۳

(۳-۴) محیط های کشت و انتقال باکتری..... ۴۳

(۳-۴-۱)محیط کشت هلیکوباکتر پیلوری..... ۴۳

(۳-۴-۲)محیط انتقال(ترانسپورت)..... ۴۳

(۳-۴-۳)محیط پرتقالی (حاوی اوره)..... ۴۳

(۳-۴-۴)محیط حاوی گلایسین..... ۴۴

(۳-۴-۵)محیط ذخیره باکتری..... ۴۴

(۳-۵) شناسایی بیوشیمیایی سویه ها..... ۴۴

(۳-۵-۱)رنگ امیزی گرم..... ۴۴

(۳-۵-۲)ازمون کاتالاز..... ۴۵

(۳-۵-۳)ازمون اکسیداز..... ۴۵

(۳-۵-۴)ازمون اوره از..... ۴۶

(۳-۵-۵)محیط پرتقالی..... ۴۷

(۳-۶) MICنسبت به گلایسین..... ۴۷

(۳-۷) روش تهیه محلول استاندارد نیم مک فارلند..... ۴۸

(۳-۸) روش PCRبرای شناسایی ژن های مورد بررسی..... ۴۹

(۳-۸-۱)استخراج DNAکروموزومی..... ۴۹

(۳-۸-۱-۱)تهیهTris Hcl 100 mM..... ۴۹

(۳-۸-۲)آماده سازی پرایمر..... ۵۰

(۳-۹)شناسایی ژن 16SrRNA برای تایید سویه ها به عنوان *هلیکوباکترپیلوری*..... ۵۰

(۳-۱۰)محاسبه دمای اتصال (Anneling)..... ۵۱

(۳-۱۱) الکتروفورز محصولاتPCR..... ۵۳

(۳-۱۱-۱) تهیه بافر TBE 10x ۵۳

(۳-۱۲) شناسایی ژنهای هلیکوباکترپیلوری با استفاده ازPCR ۵۴

(۳-۱۳) بررسی حضور ژن ureCدر نمونه های الوده به هلیکوباکترپیلوری..... ۵۷

(۳-۱۴)انالیز اماری..... ۵۸

فصل چهارم: نتایج

(۴-۱)نتایج اطلاعات دموگرافیک..... ۶۱

(۴-۲)تایید نهایی سویه های هلیکوباکترپیلوری ۶۱

(۴-۲-۱)نتایج توالی یابی ژن ۱۶SrRNA..... ۶۲

(۴-۳)تصاویر ژن های مورد بررسی..... ۶۴

(۴-۴)نتایج توالی یابی ژن ureCبه همراه تصویر..... ۶۷

(۴-۵) نتایج توالی یابی ژن های مورد بررسی..... ۶۸

(۴-۶)رابطه کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری با متغییرها..... ۷۱

(۴-۷) بررسی رابطه بین فاکتورهای ویرولانس *هلیکوباکترپیلوری* با زخم معده..... ۷۲

(۴-۸)نتایج MICگلایسین..... ۷۳

(۴-۹)نتایج فراوانی ژن های مورد بررسی..... ۷۴

(۴-۱۰)تعیین الگوی تایید شده بین ژن های هلیکوباکترپیلوری..... ۷۵

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

(۵-۱)بحث ۱۲۹

(۵-۲)محدودیت های مطالعه..... ۱۴۱.

(۵-۳)نتیجه گیری..... ۱۴۲

(۴-۵)پیشنهادات.....۱۴۳

منابع.....۱۴۵

ضمایم

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

جدول ۱-۳پرایمر مورد استفاده برای ژن SrRNA ۱۶.....۵۱

جدول۲-۳ مواد لازم برای واکنشPCR ۵۲

جدول۳-۳ پرایمر های مورد استفاده برای شناسایی ژن های هلیکوباکترپیلوری.....۵۴

جدول۴-۳ پرایمر ژن ureC.....۵۷

جدول۱-۴نتایج توالی یابی ژن های مورد بررسی.....۷۰

جدول۲-۴نتایج توالی یابی ژن های مورد بررسی.....۷۰

جدول۳-۴ جدول رابطه کلونیزاسیون *هلیکوباکترپیلوری* با متغییر ها.....۷۱

جدول ۴-۴ بررسی رابطه بین ژن های *هلیکوباکترپیلوری* با زخم معده.....۷۲

جدول۵-۴ اثر گلیسین بر روی ۷۰ سویه باکتریایی.....۷۴

جدول۶-۴ شیوع ژن های فاکتورهای ویرولانس در هلیکوباکتر پیلوری های جدا شده ۷۵

جداول ۷-۴جداول مربوط به الگوی فاکتورهای ویرولانس هلیکوباکترپیلوری.....۷۶

نمودار ۱-۴نمودار الگوی فاکتورهای ویرولانس *هلیکوباکترپیلوری*.....۷۶

فهرست اشکال:

تصویر۱-۲ نقش VacAدر ایجاد اپوپتوز.....۲۷

تصویر۲-۲ پلی مورفیسم vacA.....۲۷

تصویر ۳-۲ نقشOipA در ایجاداپوپتوز.....۲۸

تصویر ۱-۳کلنی های هلیکوباکترپیلوری زیر میکروسکوپ.....۴۵

تصویر ۲-۳ازمون کاتالاز هلیکوباکترپیلوری.....۴۵

تصویر ۳-۳ازمون اکسیداز مثبت هلیکوباکتر پیلوری.....۴۶

تصویر ۴-۳ازمون اوره از.....۴۷

تصویر۵-۳ازمون اوره از.....۴۷

تصویر۱-۴: نمونه تصویری از ژن 16SrRNA محصول PCR بر روی ژل آگارز۱٪؛ ستون۱:سایز مارکر (Ladder100bp:CinnaClon,Iran)؛ ستون ۲: نمونه دارای ژن 16srRNA.....۶۱

در تصویر زیر محل اتصال پرایمرهای به ژن 16srRNA نشان داده شده است . این ژن از Genbank گرفته شده و طبق توضیحات ارائه شده نمونه یک سویهATCCگرفته شده ازبیوپسی بیماران الوده به هلیکوباکترپیلوری می باشد.....۶۱

تصویر۲-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن های *vacAs1*و*vacAs2*و*dupA*و*homB*و*tnpB*بر روی ژل آگاروز۱٪؛ ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۳و۲از سمت چپ: کنترل منفی؛ ستون۴تا۶: tnpB (600bp) ؛ ستون۷و۸:کنترل منفی؛ستون ۹و۱۰: vacAs1(250bp) ؛ ستون۱۱: vacAs2(250bp)وستون۱۲:homB(250bp)ازسمت راست ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon)؛ستون۲:کنترل مثبت؛ستون۳: dupA(850bp).....۶۴

تصویر۳-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن های hopQIIوiceA2وvacAm2و tnpAبر روی ژل آگاروز۱٪؛ ازسمت چپ ستون۴:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون ۱از سمت چپ: کنترل منفی؛ ستون۲تا۳:hopQII (170bp) ؛ شکل وسط ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۲: کنترل مثبت؛ستون۳:iceA2 (620bp) از سمت راست ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۲: کنترل منفی؛ستون۳: tnpA(110bp)؛ستون ۴: vacAm2(110bp).....۶۵

تصویر۴-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن های cagAوoipAوvacAm1و hopQIبر روی ژل آگاروز۱٪؛ ازسمت چپ ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون ۲از سمت چپ: کنترل مثبت؛ ستون۳تا۶:vacAm1 (340bp) ؛ شکل وسط ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۲: کنترل مثبت؛ستون۳:oipA (380bp) شکل وسط ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۲: کنترل مثبت؛ستون۳ تا۴۳ hopQI (500bp)از سمت راست ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۲: کنترل منفی؛ستون۳: cagA(400bp).....۶۶

تصویر۵-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن های cagAوsabAوiceA1 روی ژل آگاروز۱٪؛ ازسمت چپ ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon)؛ ستون ۲و۳از سمت چپ: کنترل منفی؛ ستون۴تا۵:iceA1(748bp)؛ از سمت راست ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon) ؛ ستون۲: کنترل منفی؛ستون۳: cagA(400bp)و ستون۴:sabA(700bp).....۶۷

تصویر۶-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن ureCروی ژل آگاروز٪۱؛ ستون۱:سایزمارکر(Ladder100bp:SinnaClon)؛ ستون ۲و۳: کنترل مثبت؛ ستون۴تا۷: ureC (300bp)؛.....۶۸

اختصارات:

PUD	Peptic ulcer disease
MLAT	Mucosa-associated lymphoid tissue

شناسایی مولکولی و تشخیص فاکتورهای ویرولانس گونه *هلیکوباکتر پیلوری* جدا شده از نمونه های بیوپسی معده

چکیده:

زمینه : *هلیکوباکتر پیلوری* مخاط معده انسان را کلونیزه و به عنوان باکتری سرطان زای سطح یک طبقه بندی شده است . مطالعات گذشته نشان داده اشت که برخی از فاکتورهای ویرولانس این باکتری ارتباط مستقیمی با ایجاد بیماری دارد.

هدف : این مطالعه با هدف جداسازی *هلیکوباکتر پیلوری* از نمونه های بیوپسی معده بیماران دارای علائم بالینی مراجعه کننده به کلینیک ارس اردبیل و شناسایی فاکتورهای بیماری زای اصلی آن انجام شد.

مواد و روش‌ها : در مطالعه حاضر ۲۸۷ بیمار با علائم گوارشی وارد مطالعه شدند. پس از اخذ رضایت کتبی، هر بیمار تحت آندوسکوپی قرار گرفت و دو نمونه بیوپسی آنترال گرفته شد. آزمایش اوره آز، کاتالاز و اکسیداز و تکثیر ۱۶srRNA(با تعیین توالی # Submission 2419628 16S ribosomal RNA) اساساً برای تشخیص سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری مورد استفاده قرار گرفت. از تکنیک uniplex PCR جهت شناسایی فاکتورهای ویرولانس استفاده گردید.

یافته‌ها : ۷۰ نفر (۲۴/۳۹٪) مبتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* بودند. پس از آندوسکوپی از این تعداد ۹ نفر (۱۲.۸۵۷٪) و ۲ بیمار (۲.۸۷۵٪) به ترتیب دارای زخم معده و سرطان معده بودند.

درسویه ها فراوانی ژن های *oipA*، *dupA*، *iceA1*، *iceA2*، *sabA*، *ureC*، *vacAs1*، *vacAs2*، *hopQ1*، *cagA*، *vacAm1*، *vacAm2*، *tnpA*، *hom*، *hopQ2*، *tnpB* به ترتیب۶۷/۱۴٪، ۱۵/۷۱٪، ۲۲/۸۵٪، ۱۴/۲۸٪، ۱۴/۲۸٪، ۶۴/۲۸٪، ۵۲/۸۵٪، ۷۵/۷۱٪، ۱۴/۲۸٪، ۲۴/۲۸٪، ۳۰٪، ۷۲/۸۵٪، ۱۰٪، ۱۰٪، ۱۴/۲۸٪ و ۲۷/۱۴٪بود. در این مطالعه ۵۷ الگوی مختلف مربوط به فاکتورهای ویرولانس شناسایی گردید که شایعترین‌ژنوتیپ (3. 4, n= 28%) *oipA-vacAs1-vacAm2* و (3. 4, n= 28%) *oipA-vacAs1-vacAs2-vacAm2* بود. در هر دو بیماری که سرطان معده داشتند حظور همزمان ژنهای vacAS2, vacAm2 ,hopQ2مشاهده گردید. در افراد مبتلا به زخم معده فراوانی فاکتورهای ویرولانس
oipA (n=5,62.5%),*vacAs1*(n=6,75%), *vacAs2*(n=6,75%), *vacAm1*(n=3,37.5%), *vacAm2*(n=7,87.5%), *cagA*(n=4,50%), *hopQ2*(n=4,50%), *hopQ1*(n=2,25%), *iceA1*(n=3,37.5%), *iceA2*(n=2,25%), *tnpB*(n=5,62.5%), *hom*(n=2,25%), *dupA*(n=1 ,12.5%) بود.

نتیجه گیری : این تحقیق به بررسی شیوع فاکتورهای مختلف ابتلا به *هلیکوباکتر پیلوری* در افراد *هلیکوباکتر پیلوری* مثبت پرداخته است. نتایج این مطالعه نشان داد که ژنهای *vacAs1, vacAs2,vacAm2,oipA*فراوانی بسیار بالایی در ایزوله های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم معده دارد.

کلمات کلیدی: *هلیکوباکتر پیلوری*، بیوپسی معده، اوره آز، زخم معده، سرطان معده