بررسی وجود ژن *cagA* درسویه های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به NUD، زخم های پپتیک و سرطان با روش PCR

دکتر محمد حسن شیرازی*[۱]، امیر قاسمی [۱]، دکتر محمدرضا خرمی زاده[۲]، دکتر ناصر ابراهیمی دریانی[۳]، دکتر مصطفی حسینی[۴]، دکتر نورخدا صادقی فرد[۵].

۱) بخش میکروبشناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) بخش بیوتکنولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳) گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴) گروه آمار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵) گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۵/۹/۲۷

چکیده

مقدمه: هلیکوباکتر پیلوری در موکوس معده کلونیزه می شود و انواعی از تظاهرات بالینی در دستگاه فوقانی گوارش ایجاد می کند. نتایج بالینی عفونت هلیکوباکتر پیلوری ممکن است در ارتباط با وجود یا عدم وجود ژن *cagA* باشد.

مواد و روش ها: به منظور بررسی وجود ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتر پیلوری مرتبط با Non Ulcer Dyspepsia، زخم های پپتیک و سرطان معده ۱۵۰ نمونه بیوپسی از بیماران آلوده به هلیکوباکتر پیلوری تهیه گردید. نمونه های بیوپسی برروی محیط اختصاصی تحت شرایط میکروآئروفیلیک کشت داده شد. پس از پایان مهلت انکوباسیون، کلنی های مشکوک به هلیکوباکتر پیلوری با روشهای بیوشیمیایی تعیین هویت گردید. در مرحله بعد، کلنی های باکتری جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از پرایمر اختصاصی حضور یا عدم حضور ژن *cagA* *با روش* PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: از میان نمونه های مورد بررسی در ۹۲ مورد باکتری با روش کشت، ایزوله گردید. پس از انجام PCR فراوانی ژن *cagA* در سویه های مرتبط با بیماران مبتلا به NUD، زخم اثنی عشر، زخم معده و سرطان معده به ترتیب برابر بود با ۶۴/۷٪ (۲۲ مورد از ۳۴ نمونه مورد مطالعه)، ۱۰۰ ٪ (۲۸ مورد از ۲۸ نمونه مورد مطالعه)، ۹۰٪ (۱۸ مورد از ۲۰ نمونه مورد مطالعه) و ۱۰۰٪ (۱۰ مورد از ۱۰ نمونه مورد مطالعه). تفاوت معنی داری در همراهی این ژن با سویه های جدا شده از بیماران مبتلاء به زخم های پپتیک و سرطان معده وجود داشت ($P<0/05$)، اما این تفاوت در مورد سویه های جدا شده از بیماران NUD معنی دار نبود ($P=0/08$).

نتیجه گیری نهایی: با توجه به نتایج این مطالعه می توان استنباط نمود که وجود ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکترپیلوری می تواند منجر به نوع شدید بیماری از جمله زخم های پپتیک و سرطان گردد.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، *cagA*، زخم های پپتیک، سرطان معده

* **نویسنده مسئول**: بخش میکروبشناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

E-mail: Shirazi_h2002@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری این توانایی را دارد که در موکـوس معـده کلونیزه شـود و انـواع مختلفـی از بیماریهـای دسـتگاه فوقـانی گوارش را ایجاد کند. مطالعات اپیدمیولوژیکی ارتباط این باکتری با گاستریت مزمن، زخمهـای پپتیـک و سـرطان معـده را اثبـات نموده است (۱و۲) .

همچنین مطالعات کلینیکی نشان داده است که ریشه کنـی هلیکوباکتر پیلوری منجر به کاهش خطر بازگشت سرطان معـده و بهبود لنفومـای MALT[1] می‌گردد (۳و۴).

بـر اسـاس نتـایج مطالعـات مختلـف مـی تـوان گفـت کـه فاکتورهای محیطی، خصوصیات ژنتیکـی میزبـان و فاکتورهـای بیماریزایی باکتری در نتیجه نهایی بیماری ممکـن اسـت سـهیم باشند (۲، ۵ و۶). از جمله عواملی که بیشتر مورد توجه محققـین قرار گرفته است فاکتورهای بیماریزایی باکتری می باشند. اگرچه فاکتورهای متعـدد هلیکوبـاکتر پیلـوری شـامل اوره از فـلاژل، آدهیســین هــا، سیتوتوکســین واکوئــل زا و جزیــره پاتوژنیسیتــه cag ممکن است در بیماریزایی درگیر باشند ولـی بنظر می رسد اصلی ترین فاکتور درگیـر در بیمـاریزایی، ژنهـای متعلـق بـه جزیــره پاتوژنیســیته cag باشنــد (۵ و۶). در مطالعــاتی کــه بـر اســاس عفــونت تجــربی حیــوانــات آزمـایشگـاهــی (Mongolian gerbil) بـا سویه هـای مختلـف هلیکوبـاکتر پیلـوری انجـام گرفتـه اسـت، مشخص گردید که سویه های تایپ I ، که در ژنوم آنهـا جزیـره پاتوژنیسیته cag وجود دارد، بیشتر منجر به زخم‌های پپتیـک و سرطان می گردنـد (۷، ۸، ۹ و۱۰). یکـی از عملکردهـای مهـم عناصر کد شونده توسط جزیره پاتوژنیسیته cag، فعال کـردن و تحریک واکنشهای ایمنی می باشد که از آن جمله می تـوان بـه فعال شدن فاکتورهای رونویسی از قبیل NF κ B[2] و AP-1[3] اشاره نمود. فعال شدن ایـن فاکتورهـای رونویسـی باعـث بیـان ژنهـای متعـددی شــامل ژنهـای سـرطانزا، ژنهـای کدکننـده کموکاین ها و نیز ژنهای فعال کننده چرخه‌های آنتی آپوپتوزیس می گــردند (۱۱، ۱۲،۱۳ و ۱۴). علاوه بـر فعالیـت هـای فـوق، اخیراً ثابت شده است کـه برخـی از ژنهـای جزیـره پاتوژنیسـیته cag پروتئین‌هـای مربـوط بـه سیسـتم هـای ترشـحی را کـد مـی‌کننـد (۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). یکـی از ژنهــای مــربوط بـه جــزیره پاتوژنیسیتــه cag ژن *cagA*[4] می‌باشـد. ایـن ژن در همه سویه های هلیکوباکتر پیلوری دیده نمی‌شود و بنـابراین بعنــوان مارکری برای حضور جزیره پاتوژنیسـیته cag اسـتفاده می گردد (۱۹). Brandt و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که پروتئین CagA قادر به تحریک ترشـح IL-8[5] مـی باشـد (۲۰). همچنـین Masanori در سـال ۲۰۰۵ نشـان داد کـه هلیکوباکتر پیلوری قادر است پروتئین CagA را بـا اسـتفاده از سیسـتم ترشـحی نـوع IV بـداخل سـلول میزبـان وارد کنـد. CagA بعد از وارد شدن به سلول میزبان قادر است به دو روش وابسته به فسفوریلاسـیون و مسـتقل از فسفوریلاسـیون اثـرات مختلفی بر روی سلول میزبان بگذارد که در نهایت سلول آلـوده شده به سمت بدخیم شدن پیش خواهد رفت (۲۱). در کشورهای غربی آلودگی با سویه های *cagA* مثبـت، بعنـوان مـارکری در همراهی با زخم های معده، اثنی‌عشر و سرطان معده دیده شـده است اما در کشورهای آسیایی چون اکثـر افـراد آلـوده شـده بـا هلیکوباکتر پیلوری سویه های *cagA* مثبت هستند، همراهـی و ارتباط میــان سویه هــای *cagA* مثبـت و نتـایج بیمــاری مشخص نمی باشد (۲۲). در ایـن مطالعـه وجـود ژن *cagA* در سویه های هلیکــوباکترپیلــوری مــرتبــط با بیمــاریهــای NUD، زخم های پپتیک و سرطان معده مـورد مطالعـه قـرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت: در این مطالعه ۱۵۰ نمونه بیوپسـی از بیماران با مشـکلات فوقـانی دسـتگاه گـوارش توسـط پزشـک متخصص از بخش های آندوسکوپی بیمارستان شریعتی و مطب پزشک تهیه گردید. نمونه‌های بیوپسی جهت کشت با استفاده از سرم نرمـال بـه آزمایشـگاه میکروبشناسـی دانشـکده بهداشـت دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل می شدند. نمونه‌های بیوپسی پس از هموژن شدن سریعاً بر روی محیط های بروسـلا آگـار و کمپیلوبـاکتر آگـار حـاوی ۱۰ درصـد خـون گوسـفند و آنتـی

1. Mucosal Associated Lymphoid Tissue

۲. NF κ B: فـاکتـور نسخـه بـرداری است که در پاسخ به سیگنال‌هـای TCR فعال می شود و برای سنتز سایتوکاین ها ضروری است.

۳. AP-1: یک فاکتور نسخه برداری است که در بسیاری از انواع سـلول هـا یافـت می شود، ولی در لنفوسیت های T ، به طـور اختصـاصی بـه وسـیله سیگنالهـای ارسـالی از طـریق TCR فعال می‌گردد.

4. Cytotoxin associated gene A

۵. در ارتشاح نوتروفیل ها و لنفوسیت ها به نواحی التهابی نظیـر التهـاب حاصـل از بیماریهای تنفسی، آرتریت روماتوئید و ... نقش کلیدی ایفا می کند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

بیوتیکهای وانکومایسین، تریمتوپریم و آمفوتریپسین B، تلقیح گردیدند و پلیت‌های تلقیح شده در شرایط میکروآئروفیل به مدت ۵-۷ روز انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون کلنی‌های بدست آمده که حاوی باسیل های خمیده گرم منفی، کاتالاز، اوره آز و اکسیداز مثبت بودند، بعنوان کلنی‌های هلیکوباکتر پیلوری تشخیص داده شدند. سپس کلنی‌های مورد نظر در آب مقطر استریل جمع آوری گردید و در دمای ۲۰°c- جهت استخراج DNA و انجام کارهای مولکولی نگهداری شدند.

استخراج DNA:

جهت استخراج DNA از کیت Diatom استفاده شد که بر مبنای استفاده از GuSCN-Silica Gel طراحی شده بود.

PCR:

پس از استخراج DNA هر نمونه تا انجام PCR در دمای ۲۰ °c- نگهداری گردید. سکانس پرایمرها جهت تکثیر بخشی از قطعه ژن cagA که در مطالعات قبلی طراحی گردیده است در ذیل آمده است (۲۳). این پرایمرها طوری طراحی شده‌اند که قادرند قطعه‌ای به طول ۵۰۶ جفت باز را
تکثیر نمایند.

پرایمر پیشرو:

F 5' –GATCTCGGTGGGTCTTTCC-3'

پرایمر معکوس:

R 5'- TCTTTTACGGCATTGTTCA-3'

از سوش هلیکوباکتر پیلوری ATCC43504 نیز بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش PCR برای ژن *cagA*:

جهت تکثیر قطعه مورد نظر از ژن cagA در یک حجم ۵۰ میکرولیتری ۲/۵ واحد از آنزیم Taq پلی مراز همراه ۵۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار از هرکدام از دزوکسی نوکلئوتیدهای چهارگانه، ۵ میکرولیتر از DNA الگو ، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، Tris-HCl (pH 8.3) ۱۰ میلی مولار و کلرید پتاسیم۵۰ میلی مولار استفاده گردید. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر با دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۸ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد یک دقیقه و در آخر جهت تکثیر قطعات ناتمام ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گردید. محصول بدست آمده از PCR در ژل ۲ درصد آگاروز رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و سپس باندها با استفاده از UV ترانس لومیناتور مشاهده گردیدند.

یافته های پژوهش

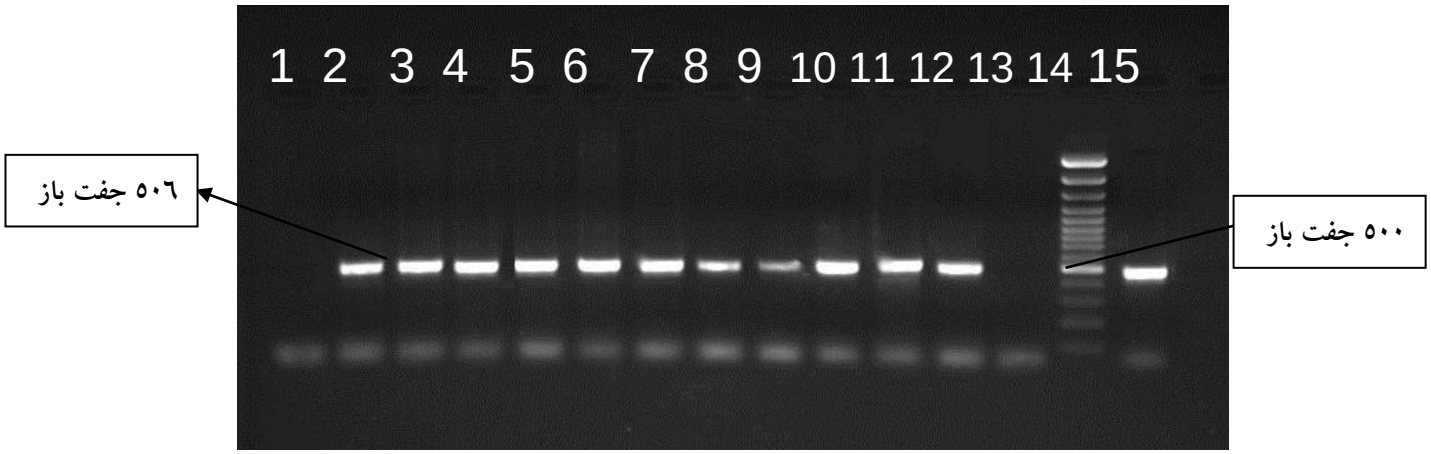
از ۱۵۰ نمونه بیوپسی متعلق به ۷۸ مرد و ۷۲ زن، ۹۲ مورد کشت مثبت بدست آمد که ۳۴ نمونه مربوط به افراد مبتلا به NUD، ۲۸ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم اثنی عشر، ۲۰ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم معده و ۱۰ نمونه مربوط به افراد مبتلا به سرطان معده بود. بعد از PCR، باندهای بدست آمده با وزن ۵۰۶ جفت باز بعنوان قطعه مورد نظر از ژن *cagA* در نظر گرفته شدند و بعنوان سویه های حمل‌کننده ژن cagA مدنظر قرار گرفتند (شکل ۱).

در کل در میان۹۲ مورد کشت مثبت که PCR شدند در ۷۸ نمونه (۸۵ درصد) ژن *cagA* مشخص گردید. فراوانی ژن *cagA* در سویه های مرتبط با هر گروه در جدول شماره یک نشان داده شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

جدول شماره ۱ : میزان فراوانی ژن cagA در سویه های جدا شده از چهار گروه مختلف از بیماران مورد مطالعه

نتایج / نوع بیماری	موارد cagA مثبت		موارد cagA منفی		جمع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
سرطان معده	۱۰	۱۰۰	۰	۰	۱۰	۱۰/۹
زخم دوازدهه	۲۸	۱۰۰	۰	۰	۲۸	۳۰/۴
زخم معده	۱۸	۹۰	۲	۱۰	۲۰	۲۱/۷
NUD	۲۲	۶۴/۷	۱۲	۳۵/۳	۳۴	۳۷
جمع	۷۸	۸۴/۸	۱۴	۱۵/۲	۹۲	۱۰۰



شکـل ۱: تصـویر ژل الکتروفورز محصول PCR مـربوط به قطعـه ۵۰۶ جفت بـازی ژن *cagA* . از چـپ بـه راسـت: ردیف های ۱ و ۱۳ مربوط به کنترل منفی، ردیف های ۱۲-۲ نمونهای cagA مثبت، ردیف ۱۴ مـارکر مولکـولی ۱۰۰ جفـت بازی و ردیف ۱۵ نمونه کنترل مثبت مربوط به سویه ATCC43504

بحث و نتیجه گیری

همانطور که در نتـایج اشاره شد از ۹۲ نمـونه کشـت مثبـت ۷۸ مـــورد (۸۵ درصد) آنها حاوی ژن *cagA* بودند امـا ایـن میـزان با فراوانی این ژن در سویه‌هـای هلیکـــوباکتر پیلـوری جدا شـده از کشورهـــای مختلف متفـاوت می باشـد.

Raymond و همکاران در آمـریکا گزارش کـرده انـد کـه فقط ۶۶ درصـد از سویه های هلیکوباکتـــر پیلـوری حامـل ژن *cagA* می باشند (۲۴). در مطالعه دیگری کـه در سـال ۲۰۰۵ در کشـور برزیـل توســـط Luciano و همکـاران صـورت گرفته است میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه‌های هلیکوباکتـر پیلوری جدا شده از بیماران برزیلی ۴۸ درصد گزارش شده اسـت (۲۵). همچنـین Janchang و همکـاران نشـان داده انـد کـه فراوانی ژن *cagA* در سویه های هلیکوبـاکترپیلوری در کشـور چین ۹۳/۹ درصد می باشد (۲۶). آنها همچنین نشـــان داده اند که شیـــوع *cagA* در سویه های مرتبط بـا بیمـاران مبـتلا بـه زخم های پپتیک و سرطان معده ۱۰۰ درصد و در افراد مبتلا بـه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

NUD ، ۹۴ درصد می باشد (۲۶). همچنین Chen و همکاران نشان داده اند که ۹۴ درصد سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم‌های پپتیک و سرطان معده دارای ژن *cagA* هستند (۲۷). در مطالعه ما نیز فراوانی ژن *cagA* در سویه های جداشده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک و سرطان معده ۹۶ درصد بود که بسیار مشابه با نتایج مطالعه Chen و همکاران می باشد. در مطالعه دیگری که توسط Aydin و همکاران در ترکیه انجام گرفته است، میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم‌های پپتیک را ۷۲/۳ درصد و در بیماران مبتلا به NUD را ۴۷ درصد گزارش کرده اند (۲۸). در مطالعه ما ۶۴/۷ سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به NUD حاوی ژن *cagA* بودند. در این مطالعه تفاوت معنی داری در همراهی این ژن با سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک و سرطان معده وجود داشت ($P<۰/۰۵$)، اما این تفاوت در مورد سویه های جدا شده از بیماران NUD معنی دار نبود ($P=۰/۰۸$). در مطالعه دیگری که توسط Carloss و همکاران در برزیل صورت گرفته، گزارش شده است که میزان شیوع *cagA* در سویه های مرتبط با بیماران مبتلا به زخم اثنی عشر ۹۰/۵ درصد و در بیماران مبتلا به NUD برابر با ۷۰/۵ درصد می باشد (۲۹). همچنین Figueiredo و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که فراوانی سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به گاستریت، زخم اثنی عشر، زخم معده و سرطان معده به ترتیب برابر است با ۵۶، ۹۰، ۸۸ و۸۸ درصد.

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 می توان استنباط نمود که وجود و یا عدم وجود ژن *cagA* می تواند بعنوان مارکری در جهت آنالیز شدت بیماری درنظر گرفته شود، اما نباید نقش فاکتورهای دیگر شناخته شده مانند فاکتورهای محیطی در بیماریزایی این باکتری را نادیده گرفت.

Reference:

1. Marshall BJ Warren JR, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984.1, 1311 – 1315.

2. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, etal. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N Engl J Med 1991, 325: 1132–1136.

3. Bayerdorffer E, Neubauer A, Rudolph B, etal. Regression of primary gastric lymphoma of mucosaassociated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. MALT Lymphoma Study Group. Lancet 1995,345:1591–1594.

4. Uemura N, Mukai T, Okamoto S, etal. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev 1997,6: 639– 642.

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

6. Peek Jr, Blaser M,J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer 2002, 2: 28– 37.

7. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H. etal. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res1995, 55: 2111 – 2115.

8. Censini S, Lange C, Xiang Z, etal. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors Proc Natl Acad Sci U S A 1996, 93: 14648– 14653.

9. Ogura K, Maeda S, Nakao MW. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. J Exp Med 2000, 192: 1601– 1610.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

10. Israel DA, Salama N, Arnold CN, etal. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses J Clin Invest 2001, 107: 611 –620.

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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 A 2000, 97: 1263– 1268.

18. Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AST, etal. Factors associated with *Helicobacter pylori* infection by a cagA-positive strain in children. J Infect Dis 2000, 181: 626–630.

19. Oleastro M, Gerhard M, Lopes AI, etal. *Helicobacter pylori* virulence genotypes in Portuguese children and adults with gastroduodenal pathology. Eur J Clin Microbiol Infec Dis 2003, 22: 85–91.

20. Brandt S, Kwok T, Hartig R etal. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. Proc Natl Acad Sci USA. 2005,102: 9300-5.

21. Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA -, a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. Int J Cancer. 2006,119: 1217-23.

22. Mohamed R, Ahmad A, Hana.ah A, etal. cagA gene variants in Malaysian *Helicobacter pylori* strains isolated from patients of deferent ethnic groups. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2005, 44: 239–242.

23. Gregory GS, Dee S, Robert K, etal. PCR-RFLP typing of ureC from *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsies during a European multi-country clinical trial. J Antimicrob chem 1997, 40: 251–256.

24. 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, 2003, 46: 83–88.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]

25. 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 Dis 2005, 51: 231–235.

26. Jianchang Z, Jianzhong Z, Capiu X,etal. cagAgenotype and variants in Chinese *Helicobacter pylori* strains and relationship to gastroduodenal diseases. J Med Microbidl 2004, 53: 231–235.

27. Chen X Y, Yan J, Shen YF. Dominant cagA/vacA 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 2005, 118: 466-467.

28. 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 Microbid Inf 2004, 10: 12-18.

29. 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.

30. Figueiredo C, Van Doorn L.-J, Nogueira C, etal. *Helicobacter pylori* Genotypes Are Associated with Clinical Outcome in Portuguese Patients and Show a High Prevalence of Infections with Multiple Strains. Scand J Gastroentero 2001, 36:128 –135.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-20]