

بررسی وجود ژن *cagA* در سویه 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 میکروبیشناسی، 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 میکروبیشناسی، 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 بر روی محیط اختصاصی تحت شرایط میکروآئروفلیک 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 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 ($P = ۰/۰۸$).

نتیجه گیری نهایی: با توجه به نتایج این مطالعه می توان استنباط نمود که وجود ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتر پیلوری 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 میکروبیشناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری این توانایی را دارد که در موکوس معده کلونیزه شود و انواع مختلفی از بیماریهای دستگاه فوقانی گوارش را ایجاد کند. مطالعات اپیدمیولوژیکی ارتباط این باکتری با گاستریت مزمن، زخمهای پپتیک و سرطان معده را اثبات نموده است (۲۰۱).

همچنین مطالعات کلینیکی نشان داده است که ریشه کنی هلیکوباکتر پیلوری منجر به کاهش خطر بازگشت سرطان معده و بهبود لنفومای MALT^۱ می گردد (۴۳).

بر اساس نتایج مطالعات مختلف می توان گفت که فاکتورهای محیطی، خصوصیات ژنتیکی میزبان و فاکتورهای بیماریزایی باکتری در نتیجه نهایی بیماری ممکن است سهمیم باشند (۲، ۵ و ۶). از جمله عواملی که بیشتر مورد توجه محققین قرار گرفته است فاکتورهای بیماریزایی باکتری می باشند. اگرچه فاکتورهای متعدد هلیکوباکتر پیلوری شامل اوره از فلاژل، آدهسین ها، سیتوتوکسین واکوئل زا و جزیره پاتوژنیسیته *cag* ممکن است در بیماریزایی درگیر باشند ولی بنظر می رسد اصلی ترین فاکتور درگیر در بیماریزایی، ژنهای متعلق به جزیره پاتوژنیسیته *cag* باشند (۵ و ۶). در مطالعاتی که بر اساس عفونت تجربی حیوانات آزمایشگاهی (Mongolian gerbil) با سویه های مختلف هلیکوباکتر پیلوری انجام گرفته است، مشخص گردید که سویه های تایپ I، که در ژنوم آنها جزیره پاتوژنیسیته *cag* وجود دارد، بیشتر منجر به زخمهای پپتیک و سرطان می گردند (۷، ۸، ۹ و ۱۰). یکی از عملکردهای مهم عناصر کد شونده توسط جزیره پاتوژنیسیته *cag*، فعال کردن و تحریک واکنشهای ایمنی می باشد که از آن جمله می توان به فعال شدن فاکتورهای رونویسی از قبیل NF- κ B^۲ و AP-1^۳ اشاره نمود. فعال شدن این فاکتورهای رونویسی باعث بیان ژنهای متعددی شامل ژنهای سرطانزا، ژنهای کدکننده کموکاین ها و نیز ژنهای فعال کننده چرخه های آنتی آپوپتوزیس می گردند (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴). علاوه بر فعالیت های فوق، اخیراً ثابت شده است که برخی از ژنهای جزیره پاتوژنیسیته *cag* پروتئین های مربوط به سیستم های ترشحی را کد می کنند (۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). یکی از ژنهای مربوط به جزیره پاتوژنیسیته *cag* ژن *cagA*^۴ می باشد. این ژن در همه سویه های هلیکوباکتر پیلوری دیده نمی شود و بنابراین

بعنوان مارکری برای حضور جزیره پاتوژنیسیته *cag* استفاده می گردد (۱۹). Brandt و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که پروتئین CagA قادر به تحریک ترشح IL-8^۵ می باشد (۲۰). همچنین Masanori در سال ۲۰۰۵ نشان داد که هلیکوباکتر پیلوری قادر است پروتئین CagA را با استفاده از سیستم ترشحی نوع IV بداخل سلول میزبان وارد کند. CagA بعد از وارد شدن به سلول میزبان قادر است به دو روش وابسته به فسفوریلاسیون و مستقل از فسفوریلاسیون اثرات مختلفی بر روی سلول میزبان بگذارد که در نهایت سلول آلوده شده به سمت بدخیم شدن پیش خواهد رفت (۲۱). در کشورهای غربی آلودگی با سویه های *cagA* مثبت، بعنوان مارکری در همراهی با زخم های معده، اثنی عشر و سرطان معده دیده شده است اما در کشورهای آسیایی چون اکثر افراد آلوده شده با هلیکوباکتر پیلوری سویه های *cagA* مثبت هستند، همراهی و ارتباط میان سویه های *cagA* مثبت و نتایج بیماری مشخص نمی باشد (۲۲). در این مطالعه وجود ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتریلوری مرتبط با بیماریهای NUD، زخم های پپتیک و سرطان معده مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت: در این مطالعه ۱۵۰ نمونه بیوپسی از بیماران با مشکلات فوقانی دستگاه گوارش توسط پزشک متخصص از بخش های آندوسکوپی بیمارستان شریعتی و مطب پزشک تهیه گردید. نمونه های بیوپسی جهت کشت با استفاده از سرم نرمال به آزمایشگاه میکروشناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل می شدند. نمونه های بیوپسی پس از هموژن شدن سریعاً بر روی محیط های بروسلا آگار و کمپیلوباکتر آگار حاوی ۱۰ درصد خون گوسفند و آنتی

1. Mucosal Associated Lymphoid Tissue

۲. NF- κ B : فاکتور نسخه برداری است که در پاسخ به سیگنال های TCR فعال می شود و برای سنتز سایتوکاین ها ضروری است.

۳. AP-1: یک فاکتور نسخه برداری است که در بسیاری از انواع سلول ها یافت می شود، ولی در لنفوسیت های T، به طور اختصاصی به وسیله سیگنالهای ارسالی از طریق TCR فعال می گردد.

4. Cytotoxin associated gene A

۵. در ارتشاح نوتروفیل ها و لنفوسیت ها به نواحی التهابی نظیر التهاب حاصل از بیماریهای تنفسی، آرتریت روماتوئید و ... نقش کلیدی ایفا می کند.

پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام 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 پتاسیم ۵۰ 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 حمل کننده ژن *cagA* مدنظر قرار گرفتند (شکل ۱).

در کل در میان ۹۲ 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.

بیوتیکهای وانکومایسین، تریمتوپریم و آمفوتریپسین B، تلقیح گردیدند و پلیتهای تلقیح شده در شرایط میکروآتروفیل 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 20°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 20°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 شده اند که قادرند قطعه ای به طول ۵۰۶ جفت باز را تکثیر نمایند.

پرایمر پیشرو:

5' -GATCTCGGTGGGTCTTTCC-3'

پرایمر معکوس:

3' -TCTTTTACGGCATTGTTCA-5'

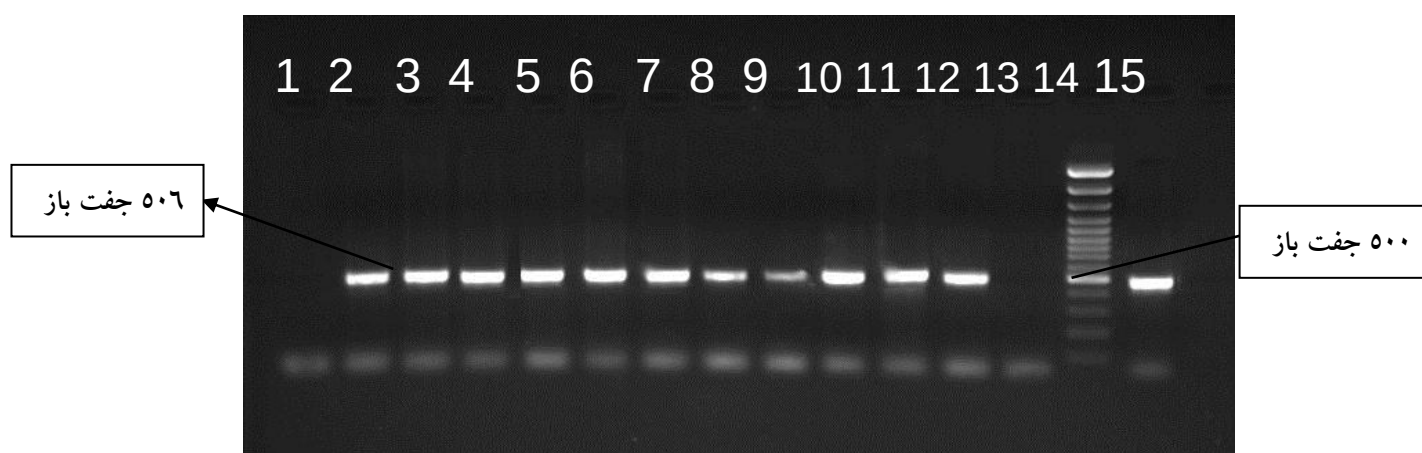
از سوش هلیکوباکتر پیلوری ATCC43504 نیز بعنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

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 مرز همراه ۵۰

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



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مربوط به قطعه ۵۰۶ جفت بازی ژن *cagA*. از چپ به راست: ردیف های ۱ و ۱۳ مربوط به کنترل منفی، ردیف های ۱۲-۲ نمونه های *cagA* مثبت، ردیف ۱۴ مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و ردیف ۱۵ نمونه کنترل مثبت مربوط به سویه ATCC43504

بحث و نتیجه گیری

همانطور که در نتایج اشاره شد از ۹۲ نمونه کشت مثبت ۷۸ مورد (۸۵ درصد) آنها حاوی ژن *cagA* بودند اما این میزان با فراوانی این ژن در سویه های هلیکوباکتریلوری جدا شده از کشورهای مختلف متفاوت می باشد. Raymond و همکاران در آمریکا گزارش کرده اند که فقط ۶۶ درصد از سویه های هلیکوباکتریلوری حامل ژن *cagA* می باشند (۲۴). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۵

در کشور برزیل توسط Luciano و همکاران صورت گرفته است میزان فراوانی ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتریلوری جدا شده از بیماران برزیلی ۴۸ درصد گزارش شده است (۲۵). همچنین Janchang و همکاران نشان داده اند که فراوانی ژن *cagA* در سویه های هلیکوباکتریلوری در کشور چین ۹۳/۹ درصد می باشد (۲۶). آنها همچنین نشان داده اند که شیوع *cagA* در سویه های مرتبط با بیماران مبتلا به زخم های پپتیک و سرطان معده ۱۰۰ درصد و در افراد مبتلا به

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 و ۸۸ 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 در نظر گرفته شود، اما نباید نقش فاکتورهای دیگر شناخته شده مانند فاکتورهای محیطی در بیماریزایی این باکتری را نادیده گرفت.

NUD، ۹۴ درصد می باشد (۲۶). همچنین Chen و همکاران نشان داده اند که ۹۴ درصد سویه های جدا شده از بیماران مبتلا به زخم های پپتیک و سرطان معده دارای ژن *cagA* هستند (۲۷). در مطالعه ما نیز فراوانی ژن *cagA* در سویه های جدا شده 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 زخم های 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 ($P < 0.05$)، اما این تفاوت در مورد سویه های جدا شده از بیماران NUD معنی دار نبود ($P = 0.08$). در

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, et al. *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, et al. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated 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, et al. 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, et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. Science 1999;284: 1328– 1333.
6. Peek Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer 2002, 2: 28– 37.
7. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H. et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res 1995, 55: 2111 – 2115.
8. Censini S, Lange C, Xiang Z, et al. 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.

10. Israel DA, Salama N, Arnold CN, et al. *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, et al. 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, et al. *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, et al. *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, et al. *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, et al. 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, et al. 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, et al. 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, et al. *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 et al. 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, et al. *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, et al. 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, et al. 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.

25. Luciano LG, Ellen Kris FS, Ka'tia R L, etal. cagA vacA alleles 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.