Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

ارتباط ژنهای CagA، VacA، UreAB باکتری هلیکوباکترپیلوری با بیماریهای زخم‌دار و بدون زخم معده

دکتر شهره فرشاد [۱] دکتر عزیز ژاپونی [۱] مهدی کلانی [۱]

[۱] مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره دوم تابستان ۸۸ صفحات ۸۷-۸۱

چکیده

مقدمه: *علیرغم آلودگی بیش از نیمی از مردم دنیا به هلیکوباکترپیلوری، اما تنها در عده کمی از بیماران، منجر به پیامدهای کلینیکی بارزی مانند گاستریت، زخم یا سرطان معده می‌شود. بنظر می‌رسد که هم عوامل مربوط به ویژگی‌های ویرولانس و هم عوامل میزبانی می‌توانند در ایجاد این پیامدها دخیل باشند.*

روش کار: *در این مطالعه مورد – شاهد، ارتباط ژنهای بیماریزای UreAB، VacA و CagA در هلیکوباکترپیلوری با حالتهای متفاوت اختلالات معده‌ای، واکنش زنجیره‌ای پلیمر بر روی ارگانیسم‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های بیوپسی معده ۳۵ بیمار دارای زخم به عنوان مورد و ۳۵ بیمار به عنوان گروه شاهد مراجعه‌کننده به بخش آندوسکوپی بیمارستان نمازی شیراز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون دقیق فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.*

نتایج: *تفاوت بین دو گروه مورد مطالعه، تنها در مورد ژن VacA از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). با بررسی ژنوم سوشهای جدا شده از بیماران بر اساس سه ژن مورد مطالعه، هشت ژنوتیپ مختلف شناسایی گردید. شیوع ژنوتیپ $CagA^{+}$ $VacA^{+}$ $UreAB^{+}$ در بیماران دارای زخم معده نسبت به بیماران فاقد زخم بصورت معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری: *با توجه به نتایج این مطالعه، تصور می‌شود که در جمعیت مورد بررسی، آلودگی با سوش هلیکوباکترپیلوری دارای ژنوتیپ $CagA^{+}$ $VacA^{+}$ $UreAB^{+}$ ممکن است خطر ایجاد بیماری زخم معده را افزایش دهد.*

کلیدواژه‌ها: *هلیکوباکترپیلوری – ژنها – زخم معده – واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)*

نویسنده مسئول:
دکتر شهره فرشاد
مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی – دانشگاه علوم پزشکی شیراز
شیراز – ایران
تلفن: ۶۴۷۴۳۰۴ ۷۱۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
S_farshad@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۱۴ اصلاح نهایی: ۸۷/۳/۱۶ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۲۲

مقدمه:

ارگانیسم هلیکوباکترپیلوری تقریباً در معده نیمی از جمعیت کل جهان کلونیزه است(۱). این باکتری به عنوان عامل اتیولوژیک التهاب مزمن معده و زخمهای معده و عوارض ناشی از آنها شناخته شده است (۲،۳). گاستریت بافتی اساساً بین تمام افراد آلوده شده با این باکتری همگانی است اما تنها در عده کمی از بیماران پیامدهای کلینیکی بارزی مانند بیماری زخم معده یا سرطان معده ایجاد می‌شود.

مکانیسم‌های ایجادکننده حالتهای متفاوت بیماری بطور کامل مشخص نشده است. با این وجود دو شاخص بیماریزایی در هلیکوباکتر پیلوری شناخته شده که به عنوان مارکرهایی که بیماریزایی سوشهای مختلف این باکتری را تحت تأثیر قرار می‌دهند، معرفی می‌شوند. این شاخص‌ها عبارتند از: سیتوتوکسین مرتبط با ژن A (CagA) و سیتوتوکسین واکوئله‌کننده A (VacA) (۴،۵).

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

ژن CagA یک پروتئین ۱۲۰ کیلو دالتونی با عمکرد نامشخص را در ۷۰-۶۰٪ از سوشهای هلکیوباکترپیلوری کد می‌کند. بطور کلی داده‌ها نشان‌دهنده این مطلب است که عفونت با سوشهای حاوی CagA، خطر علائم کلینیکی خاصی را افزایش می‌دهد اما بروز این علائم کلینیکی قابل پیشگویی نیستند (۶،۷). ژن VacA فاکتور مهم بیماریزای دیگری را کد می‌کند که باعث بوجود آمدن واکوئل بر سطح سلولهای یوکاریوت در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. تفاوتهای آللی در ژن VacA (ترکیب موزائیکی تایپ‌های آللی نواحی سیگنالی و نواحی میانی) شناسایی شده است و کوشش‌هایی برای یافتن ارتباط بین ژنوتیپ‌های خاص VacA و علائم مختلف بیماری انجام شده است (۱۱-۸). بر این اساس هدف از این مطالعه بررسی توزیع ژنهای CagA، VacA در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از دو دسته بیماران ایرانی مبتلا به بیماری زخم‌دار و بدون زخم معده می‌باشد. علاوه بر این موارد، شیوع فاکتور بیماریزای دیگری مانند ژن UreAB نیز مورد مطالعه قرار گرفته زیرا تصور می‌شود فعالیت اوره آزی شدید یک فاکتور کلیدی بیماریزایی باشد (۱۲).

روش کار:

این تحقیق بصورت مقطعی و در مدت ۱۰ ماه از آذرماه ۸۴ تا مهرماه ۸۵ در مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی بالینی استاد البرزی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل ۱۱۶ بیمار (۸۰ مرد و ۵۶ زن با محدوده سنی ۸۰-۱۶ سال و میانگین سنی ۱۴± ۴۱/۳ سال) مراجعه‌کننده به بخش اندوسکوپی بیمارستان نمازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز بودند. نمونه‌های بیوپسی معده برای مطالعات بافت‌شناسی، در پارافین قرار داده شد و پس از رنگ‌آمیزی، برای تشخیص عفونت هلیکوباکترپیلوری و تأیید بیماری معده توسط متخصص آسیب‌شناسی بررسی شدند. قطعه دیگری از بیوپسی آنتروم هر بیمار در لوله‌های حاوی محیط انتقال (Brain Heart Infusion broth غنی شده با ۲۰٪ گلوکز) قرار داده، بلافاصله به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی استاد البرزی منتقل و در مدت کمتر از ۲ ساعت جهت جداسازی هلیکوباکتر کشت داده شدند. بطور خلاصه، نمونه‌های بیوپسی هموژن شده بر روی محیط بروسلاآگار (مرک آلمان) دارای ۱۰٪ خون لیز شده اسب و آنتی بیوتیک‌های مناسب شامل نالیدیکسیک اسید (mg/lit ۱۰)، تری متوپریم (mg/lit ۵) وآمفوتریسن B (mg/lit ۲) (کمپانی سیگما) کشت داده شدند. کشت ها در شرایط اتمسفر میکروائروفیلیک (۷٪ اکسیژن، ۷/۱٪ هیدروژن، ۷۹/۸٪ نیتروژن) (دستگاه ANOXOMAT Mart II, Mart Microbiology BV, Netherlands) در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۰-۷ روز نگهداری شدند و ارگانیسم‌های رشد کرده با بررسی شکل ظاهری کلنی‌ها و رنگ‌آمیزی گرم و با استفاده از واکنش اکسیداز، کاتالاز و اوره آز مثبت به عنوان هلیکوباکتر تلقی شدند (۱۳).

آماده‌سازی DNA ژنومی، سوشهای خالص از سطح پلیت‌ها جمع‌آوری شده و با بافر فسفات سالین استریل در تیوپهای۱/۵ میلی‌لیتری شستشو شدند. جهت لیز باکتریها رسوب حاصل را در ۳۸۳ میکرو لیتر بافر TE Tris- Hcl [10mM (PH=8), 1mM EDTA, 10% SDS] مخلوط کرده و به آن ۲ میکرولیتر محلول پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) اضافه کرده و در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد بمدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس DNA ژنومی به روش فنل کلروفرم استخراج گردید و ۱۰ میکرولیتر از DNA تخلیص شده بعنوان الگو در PCR بکار رفت (۱۴).

تعیین ژنهای UreAB, VacA, CagA به روش واکنش زنجیرهای پلیمراز، توالی پرایمرها در مقالات قبلی گزارش شده بودند و از کمپانی TIB MOLBIOL Syntheselabor Gmb H (برلین آلمان) تهیه گردید (۱۵). توالی پرایمرهای بکار رفته در این تحقیق در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. تکثیر قطعه ژنومی با برنامه‌ای که قبلاً توسط Han et al شرح داده شده در دستگاه ترموسیکلر (gradient thermal cycler, Eppendorf, Germany) انجام شد (۱۶). محصول PCR بدست آمده بر روی ژل آگارز، الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تصویربرداری شد.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده از بیماریها و گروههای مختلف از نرم‌افزار SPSS11.5 و آزمون آماری دقیق فیشراستفاده شد. مقدار ارزش p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار بودن نتایج آماری تلقی گردید.

نتایج:

گروههای بیماران و شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری بر اساس یافته‌های اندوسکوپی و آسیب‌شناسی، بیماران به دو گروه دارای زخم و فاقد زخم معده تقسیم شدند. بطور کلی با روش کشت از گروه بیماران دارای زخم ۳۵ (۴۵/۴۵٪) و از گروه بیماران فاقد زخم ۳۰ (۸۱/۰۸ ٪) سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شد.

شیوع UreAB, VacA, CagA در بیماران با هلیکوباکتر پیلوری مثبت در واکنش زنجیره‌ای پیلمراز از ٦٥ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده ۳۱ (٤٧/٦٩٪) سوش دارای ژن CagA و ۳۷ (٥٦/٩٢٪) سوش دارای ژن VacA و ٤٢ (٦٤/٦١٪) سوش دارای ژن UreAB بودند.

ارتباط بین UreAB, VacA, CagA و بیماریهای دارای زخم و فاقد زخم معده، ۱۳ سوش از ۳۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران فاقد زخم و ٢٤ سوش از ۳۰ سوش جدا شده از بیماران دارای زخم معده از نظر ژن VacA مثبت بودند. فراوانی ژن VacA در گروه بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بصورت معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). ۱۳ سوش از ۳۵ سوش هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران فاقد زخم و ۱۸ سوش از ۳۰ سوش جدا شده از بیماران دارای زخم دارای ژن CagA بودند. اگرچه فراوانی ژن CagA در سوشهای جداشده از بیماران دارای زخم بیشتر از بیماران فاقد زخم بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. ۲۰ سوش از ۳۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران فاقد زخم و ۲۲ سوش از ۳۰ سوش جدا شده از بیماران دارای زخم از نظر ژن UreAB مثبت بودند. بر اساس اطلاعات نشان داده شده در جدول شماره ۲، فراوانی ژنهای UreAB, VacA, CagA در گروه بیماران دارای زخم (به ترتیب ٦٠٪، ٨٠٪ و ٧٣/٣٪) نسبت به بیماران فاقد زخم بیشتر بود (به ترتیب ٣٧/١٤٪، ٣٧/١٤٪ و ٥٧/١٤٪). اما تنها تفاوت معنی‌دار بین گروهها در ژن VacA مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

در این مطالعه ۸ ژنوتیپ با مشخصات $CagA^+$ - $VacA^+$ - $UreAB^+$ (فنوتیپ ۱)، $VacA^-$ – $UreAB^-$ – $CagA^-$ (ژنوتیپ ۲)، $CagA^+$ - $VacA^+$ - $UreAB^-$ (ژنوتیپ ۳)، $CagA^+$ - $VacA^-$ - $UreAB^+$ (ژنوتیپ ٤)، $CagA^-$ - $VacA^+$ - $UreAB^+$ (ژنوتیپ ٥)، $CagA^+$ - $VacA^-$ - $UreAB^-$ (ژنوتیپ ٦)، $CagA^-$ - $VacA^+$ - $UreAB^-$ (ژنوتیپ ۷) و $CagA^-$ - $VacA^-$ - $UreAB^+$ (ژنوتیپ ۸) شناسایی شدند (جدول شماره ۲).

ژنوتیپ یک در ٢٦/١٥ درصد از بیماران (٤٠٪ بیماران دارای زخم و ١٤/٢٨٪ بیماران بدون زخم) مشاهده شد. شیوع این ژنوتیپ در بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بطور معنی‌داری بیشتر بود. ژنوتیپ ۸ نیز تنها در گروه بیماران فاقد زخم دیده شد. هیچ تفاوت معنی‌داری بین دو گروه از نظر ژنوتیپهای دیگر مشاهده نگردید.

جدول شماره ۱- ترادف پرایمرهای مورد استفاده در PCR جهت تکثیر قطعات ژنی VocA، CagA و UreAB در سوش‌های هلیکوباکترپیلوری

VacA	F	GCTTCTCTTACCACCAATGC	۱/۱٦۲
	R	TGTCAGGGTTGTTCACCATG	
CagA	F	AGTAAGGAGAAACAATGA	۱/۳۲۰
	R	AATAAGCCTTAGAGTCTTTTTGGAAATC	
UreAB	F	AGGAGAATGAGATGA	۲/٤۲۰
	R	ACTTTATTGGCTGGT	

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

جدول شماره ۲- فراوانی ژنهای VocA، CagA و UreAB در سوش‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران

CagA	VacA	UreAB	بیماران بدون زخم معده		بیماران با زخم معده		مجموع	
			تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
+	+	+ ژنوتیپ ۱	۵	۱۴/۲۹	۱۲	۴۰	۱۷	۲۶/۱۵
−	−	− ژنوتیپ ۲	۷	۲۰	۲	۶/۶۷	۹	۱۳/۸۵
+	+	− ژنوتیپ ۳	۴	۱۱/۳	۲	۶/۶۷	۶	۹/۲۳
+	−	+ ژنوتیپ ۴	۲	۵/۷۱	۳	۱۰	۵	۷/۶۹
−	+	+ ژنوتیپ ۵	۲	۵/۷۱	۷	۲۳/۳۳	۹	۱۳/۸۵
+	−	− ژنوتیپ ۶	۲	۵/۷۱	۱	۳/۳۳	۳	۴/۶۱
−	+	− ژنوتیپ ۷	۲	۵/۷۱	۳	۱۰	۵	۷/۶۹
+	−	− ژنوتیپ ۸	۱۱	۳۱/۴	۰	۰	۱۱	۱۶/۹۳

بحث و نتیجه‌گیری:

بنظر می‌رسد که سوشهای بیماریزای هلیکوباکتر پیلوری می‌توانند حالتهای مختلفی از بیماریهای گاسترودئودنال را ایجاد نماید. در این مطالعه از روش تعیین ژنوتیپ UreAB, VacA, CagA به منظور شناسایی ۶۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از دو گروه بیماران استفاده شد. حضور VacA در سوشهای جدا شده از بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بصورت معنی‌داری بیشتر بود. اما تفاوت معنی‌داری در فراوانی سوشهای CagA مثبت در بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم مشاهده نشد. در مطالعات انجام شده در مراکز دیگر گزارش شده است که درصد مثبت شدن CagA و VacA به تنهایی و CagA-VacA با یکدیگر به ترتیب در بیماران دارای زخم ۱۰۰-۷۱ و ۹۲-۴۷/۵ و ۷۵-۳۷ درصد می‌باشد (۱۹-۱۷). در تمام مطالعات انجام شده درصد مثبت بودن سوشهای دارای VacA, CagA در بیماران دارای زخم بیشتر بوده که در برخی موارد در مقابسه با گروه فاقد زخم این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار شده است (۲۰،۲۱). اما در برخی دیگر این تفاوت معنی‌دار نبوده است (۲۴-۲۲). در بیماران فاقد زخم درصد مثبت بودن ژنهای VacA و CagA به ترتیب ۸۹/۷- ۳۷٪ (۱۸،۲۰،۲۲) و ۷۳٪ - ۳۳/۳ (۱۸،۲۰،۲۵) گزارش شده است. تقریباً در تمامی مطالعات درصد مثبت بودن VacA, CagAدر بیماران فاقد زخم در مقایسه با بیماران دارای زخم پائین‌تر بوده اگر چه این تفاوت در برخی مطالعات از نظر آماری معنی‌دار بوده (۲۸-۲۶) اما در برخی دیگرهیچ تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشده است (۲۳،۲۹).

در مطالعه ما، درصد مثبت بودن ژن VacA در بیماران فاقد زخم بصورت معنی‌داری از بیماران دارای زخم پائین‌تر بود و یا آنکه درصد مثبت بودن CagA در بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بیشتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. بنابراین به نظر نمی‌رسد که این فاکتور یک عامل خطر برای ایجاد زخم در بیماران مورد مطالعه باشد. معهذا، تعیین ژنوتیپ VacA و حضور ژن CagA با یکدیگر ممکن است در تعیین نتیجه علائم کلینیکی بیمارانی که تحت تأثیر میزان مختلف از عوامل خطرساز باشند، تأثیرگذار باشد. نشان داده شده است که سوشهای تایپ s1/m1 از ژن VacA نسبت به تایپ s1/m2 سایتوتوکسین بیشتری تولید می‌کنند و سوشهای تایپ s2 / m2 هیچگونه سایتوتوکسین فعالی تولید نمی‌کنند (۳۰). تحقیق‌های بسیاری این یافته‌ها را تأیید کرده‌اند (۳۳-۳۱) اما مطالعاتی نیز وجود دارند که در آنها هیچگونه ارتباطی بین حضور CagA با واریته‌های آللی s1 ژن VacA و عوارض کلینیکی عفونتهای هلیکوباکتر پیلوری تأیید نشده است (۳۳). در مقالات مختلف در این مورد که سوشهای دارایCagA VacA می‌توانند سبب زخمهای

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

گاستروودئودنالی شدیدتری شوند اتفاق نظری وجود ندارد (۲۹).

نتایج حاصل از بررسی ژن UreAB نشان داد که این ژن بدون همکاری با ژن VacA هیچ نقشی در پروسه ایجاد زخم ندارد. فراوانی ژن UreAB در بیماران فاقد زخم نسبت به بیماران دارای زخم بیشتر بود. از طرف دیگر در مطالعه حاضر اختلاف معنی‌دار بین پراکندگی ژنوتیپ $CagA^+$ - $VacA^+$ - $UreAB^+$ در بیماران فاقد زخم و دارای زخم (۱۴٪ در برابر ۴۱٪) نشان داد که بیشتر سوشهای هلیکوباکتر پیلوری بیماریزا این سه ژن را بصورت همزمان دارند که نتیجه آن افزایش بروز زخمهای دئودنال در بیماران حامل باکتری حاوی سه ژن UreAB, VacA, CagA می‌باشد.

از نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان اینطور تصور کرد که در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق، آلوده شدن با سوش هلیکوباکترپیلوری با ژنوتیپ $CagA^+$ - $VacA^+$ - $UreAB^+$ ممکن است که با افزایش خطر ایجاد بیماری توأم با زخم همراه باشد. همچنین فاکتورهای مهم دیگری مانند استعداد ژنتیکی جمعیت و فاکتورهای محیطی موضعی ممکن است در ایجاد بیماری دخالت داشته باشند که اختلاف مشاهده شده با بررسی‌های انجام شده در دیگر کشورها را توجیه می‌نماید. در عین حال جهت تعیین نقش دقیق هر کدام از این عوامل نیاز به تحقیقات تکمیلی بیشتری می‌باشد.

سپاسگزاری:

این طرح با حمایت مالی مرکز تحقیقات میکروبشناسی بالینی استاد البرزی، بیمارستان نمازی شیراز انجام گرفته است. همچنین از همکاری صمیمانه اساتید محترم بخش تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شیراز جناب آقایان دکتر کامران باقری لنکرانی، دکتر مهدی صابری فیروز و سیدعلی تقوی قدردانی می‌گردد.

References منابع

1. The ehurogast Study Group. Epidemiology of, and risk factors for, Helicobacter pylori infection among 3,154 asymptomatic subjects in 17 populations. *Gut*. 1993;34:1672–1676.
2. Marshall BJ. Campylobacter pyloridis and gastritis. *J Infect Dis*. 1986;153:650–658.
3. Cover TL, Blaser MJ. Helicobacter pylori: a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease, and gastric cancer. *ASM News*. 1995;61:21–26.
4. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of Helicobacter pylori reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*. 1995;63:94–98.
5. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. C*ag*, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:648–653.
6. Konraethsson A, Andersen LP, Oddsson E, Guethjonsson H, Thornjoethleifsson B. Prevalence of Helicobacter pylori and *Cag-A* strains in patients with duodenal ulcer in Iceland. *Laeknabladid*. 2003;89:595-597.
7. Ali M, Khan AA, Tiwari SK, Ahmed N, Rao LV, Habibullah CM. Association between CagA pathogenicity island in Helicobacter pylori isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. *World J Gastroenterol*. 2005;11:15-22.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018

8. Soltermann A, Koetzer S, Eigenmann F, Komminoth P. Correlation of Helicobacter pylori virulence genotypes vacA and cagA with histological parameters of gastritis and patient's age. *Mod Pathol*. 2007;20(8):878-883.

9. 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;46(5):1774-1779.

10. Ruzsovics A, Molnar B, Unger Z, Tulassay Z, Pronai L. Determination of CagA, VacA genotypes of Helicobacter pylori with real-time PCR-method. *Orv Hetil*. 2001;142:509-514.

11. Correa P. New strategies for the prevention of gastric cancer: Helicobacter pylori and genetic susceptibility. *J Surg Oncol*. 2005;90:134-138.

12. Shen Z, Schauer DB, Mobley HL, Fox JG. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay using the nucleotide sequence of the Helicobacter hepaticus ureas structural genes Urea B. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2447-2453.

13. Farshad SH, Rasouli M, Alborzi A. Simultaneous detection of Helicobacter genus and Helicobacter pylori species using a Multiplex PCR method. *Iranian Biomedical Journal*. 2004;8:205-209.

14. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr Protoc Mol Biol. 2001.

15. Han SR, Schreiber HJ, Bhakdi S, Loos M, Maeurer MJ. VacA genotypes and genetic diversity in clinical isolates of Helicobacter pylori. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5:139-145.

16. 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;45:499-450.

17. Lamarque D, Gilbert T, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Chaumette MT, Delchier JC. Seroprevalence of eight higher rate of seroreactivity against CagA and 35-kDa antigens in patients with peptic ulcer originating from Europe and Africa. *Eur J Gastroenterol Hepato*. 1999;11:721-726.

18. Brito CA, Silva LM, Juca N, Leal NC, de Souza W, Queiroz D,et al. Prevalence of CagA and VacA genes in isolates from patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:817-821.

19. Hennig EE, Trzeciak L, Regula J, Butruk E, Ostrowski J. VacA genotyping directly from gastric biopsy specimens and estimation of mixed Helicobacter pylori infections in patients with duodenal ulcer and gastritis. *Scand J Gastroenterol*. 1999;34:743-749.

20. Lin CW, Wu SC, Lee SC, Cheng KS. Genetic analysis and clinical evaluation of vacuolating cytotoxin gene A and cytotoxin-associated gene A in Taiwanese Helicobacter pylori isolates from peptic ulcer patients. *Scand J Infect Dis*. 2000;32:51-57.

21. Kodama KA Ito, Nishizono A, Fujioka T, Nasu M, Yahiro K, Hirayama T, et al. Divergence of virulence factors of Helicobacter pylori among clinical isolates does not correlate with disease specificity. *J Gastroenterol*. 1999;34:6-9.

22. Mahachai V, Tangkijvanich P, Wannachai N, Sumpathanukul P, Kullavanijaya P. CagA and VacA: virulence factors of Helicobacter pylori in Thai patients with gastroduodenal diseases. *Helicobacter*. 1999;4:143-147.

23. Audibert C, Janvier B, Grignon B, Salaun L, Burucoa C, Lecron JC, et al. Correlation between IL-8 induction, CagA status and VacA genotypes in 153 French Helicobacter pylori isolates. *Res Microbiol*. 2000;151:191-200.

24. Weel JF, van der Hulst RW, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and Helicobacter pylori-related diseases. *J Infect Dis*. 1996;173:1171-1175.

25. Ito A, Fujioka T, Kodama K, Nishizono A, Nasu M. Virulence-associated genes as markers of strain diversity in Helicobacter pylori infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 1997;12:666-669.

26. Tan HJ, Rizal AM, Rosmadi MY, Goh KL. Role of Helicobacter pylori virulence factor and genotypes in non-ulcer dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:110-115.

27. Chen XJ, Yan J, Shen YF. Dominant CagA/VacA genotypes coinfection frequency of Helicobacter pylori in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang Province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases. *Chin Med J (Eng)*. 2005;118:460-467.

28. Bulent K, Murat A, Esin A, Fatih K, Murat H, Hakan H, et al. Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol*. 2003;9:1580-1583.

29. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by CagA gene positive Helicobacter pylori strains. *Gut*. 1997;41:442–451.

30. Evans DG, Queiroz DM, Mendes EN, Evans DJ. Helicobacter pylori CagA status and s and m alleles of VacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori-associated gastric diseases. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3435-3437.

31. Stephens JC, Stewart JA, Folwell AM, Rathbone BJ. Helicobacter pylori CagA status, VacA genotypes and ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10:381-384.

32. Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. Direct determination of Helicobacter pylori VacA genotypes and CagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:1525-1531.

33. Faundez G, Troncoso M, Figueroa G. CagA and VacA in strains of Helicobacter pylori from ulcer and nonulcerative dyspepsia patients. *BMC gastroenterology*. 2000;10;2:20.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 0:05 +0430 on Wednesday August 22nd 2018