

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 میکروبی‌شناسی 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 ویروالانس 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 ارگانسیم‌های 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 پلیمرز 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 ($P < 0.05$). با بررسی ژنوم سوشهای جدا شده از بیماران بر اساس سه ژن مورد مطالعه، هشت ژنوتیپ مختلف شناسایی گردید. شیوع ژنوتیپ $UreAB^+ VacA^+ CagA^+$ در بیماران دارای زخم معده نسبت به بیماران فاقد زخم بصورت معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، تصور می‌شود که در جمعیت مورد بررسی، آلودگی با سوش هلیکوباکترپیلوری دارای ژنوتیپ $UreAB^+ VacA^+ CagA^+$ 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 میکروبی‌شناسی

بالینی استاد البرزی - دانشگاه

علوم پزشکی شیراز

شیراز - ایران

تلفن: +۹۸ ۷۱۱ ۶۴۷۲۰۴

پست الکترونیکی:

S_farshad@yahoo.com

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

مقدمه:

کلینیکی بارزی مانند بیماری زخم معده یا سرطان معده ایجاد می‌شود.

مکانسیم‌های 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 (*VacA*) (۴،۵)، و سیتوتوکسین واکوئله‌کننده (*CagA*)

ارگانسیم 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

ژن CagA یک پروتئین ۱۲۰ کیلو دالتونی با عملکرد نامشخص را در ۷۰-۶۰٪ از سوشهای هلیکوباکترپیلوری 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 آلی در ژن VacA (ترکیب موزائیکی تایپ‌های آلی نواحی سیگنالی و نواحی میانی) شناسایی شده است و کوشش‌هایی برای یافتن ارتباط بین ژنوتیپ‌های خاص VacA و علائم مختلف بیماری انجام شده است (۸-۱۱). 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 میکروبیولوژی 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 41.3 ± 14 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

میکروبیولوژی 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 (۲ mg/lit) (۱۰)، تری متوپریم (۵ mg/lit) و آمفوتریسین B (۲ mg/lit) (کمپانی سیگما) کشت داده شدند. کشت‌ها در شرایط اتمسفر میکروانروفلیک (۷٪ اکسیژن، ۷٪ هیدروژن، ۷۹٪ نیتروژن) (دستگاه ANOXOMAT Mart II, Mart Microbiology BV, Netherlands) در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۰-۷ روز نگهداری شدند و ارگانسیم‌های 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 تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری شستشو شدند. جهت لیز باکتریها رسوب حاصل را در ۲۸۳ میکرو لیتر بافر TE Tris- Hcl- [10mM (PH=8), 1mM EDTA, 10% SDS] مخلوط کرده و به آن ۲ میکرو لیتر محلول پروتئیناز K (۲۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) اضافه کرده و در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس DNA ژنومی به روش فنل کلروفرم استخراج گردید و ۱۰ میکرو لیتر از DNA تخلیص شده بعنوان الگو در PCR بکار رفت (۱۴).

تعیین ژنهای UreAB, VacA, CagA به روش واکنش زنجیرهای پلیمران، توالی پرایمرها در مقالات قبلی گزارش شده بودند و از کمپانی TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (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 برومید رنگ‌آمیزی و تصویربرداری شد.

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 ۶۰٪، ۸۰٪ و ۷۳٪) نسبت به بیماران فاقد زخم بیشتر بود (به ترتیب ۳۷٪، ۱۴٪ و ۵۷٪). اما تنها تفاوت معنی دار بین گروهها در ژن *VacA* مشاهده شد ($P < 0.05$).

در این مطالعه ۸ ژنوتیپ با مشخصات $CagA^+$ - $UreAB^+$ - $VacA^+$ (ژنوتیپ ۱)، $CagA^+$ - $UreAB^+$ - $VacA^-$ (ژنوتیپ ۲)، $CagA^+$ - $UreAB^-$ - $VacA^+$ (ژنوتیپ ۳)، $CagA^+$ - $UreAB^-$ - $VacA^-$ (ژنوتیپ ۴)، $CagA^+$ - $UreAB^+$ - $VacA^-$ (ژنوتیپ ۵)، $CagA^-$ - $UreAB^-$ - $VacA^+$ (ژنوتیپ ۶)، $CagA^-$ - $UreAB^-$ - $VacA^-$ (ژنوتیپ ۷) و $CagA^-$ - $UreAB^+$ - $VacA^-$ (ژنوتیپ ۸) شناسایی شدند (جدول شماره ۲).

ژنوتیپ یک در ۲۶/۱۵ درصد از بیماران (۴۰٪ بیماران دارای زخم و ۱۴/۲۸٪ بیماران بدون زخم) مشاهده شد. شیوع این ژنوتیپ در بیماران دارای زخم نسبت به بیماران فاقد زخم بطور معنی داری بیشتر بود. ژنوتیپ ۸ نیز تنها در گروه بیماران فاقد زخم دیده شد. هیچ تفاوت معنی داری بین دو گروه از نظر ژنوتیپهای دیگر مشاهده نگردید.

جدول شماره ۱- ترادف پرایمرهای مورد استفاده در PCR جهت تکثیر قطعات ژنی *VacA*, *CagA* و *UreAB* در سوشهای هلیکوباکتر پیلوری

VacA	F	GCTTCTCTTACCACCAATGC	۱/۱۶۲
	R	TGTCAGGGTTGTTCCACCATG	
CagA	F	AGTAAGGAGAAACAATGA	۱/۳۲۰
	R	AATAAGCCTTAGAGTCTTTTGGAAATC	
UreAB	F	AGGAGAATGAGATGA	۲/۴۲۰
	R	ACTTTATTGGCTGGT	

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده از بیماریها و گروههای مختلف از نرم افزار SPSS11.5 و آزمون آماری دقیق فیشر استفاده شد. مقدار ارزش p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار 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 پیلراز از ۶۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده ۳۱ (۴۷/۶۹٪) سوش دارای ژن *CagA* و ۳۷ (۵۶/۹۲٪) سوش دارای ژن *VacA* و ۴۲ (۶۴/۶۱٪) 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 ۲۴ 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 معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$). ۱۳ سوش از ۳۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری 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 جدا شده از بیماران دارای زخم بیشتر از بیماران فاقد زخم بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود. ۲۰ سوش از ۳۵ سوش هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران فاقد زخم و

جدول شماره ۲- فراوانی ژنهای *UreAB* و *CagA*, *VacA* در سوش‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از بیماران

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

بحث و نتیجه‌گیری:

بنظر می‌رسد که سوش‌های بیماری‌زای هلیکوباکتر پیلوری می‌توانند حالت‌های مختلفی از بیماری‌های گاستروئودنرال را ایجاد نمایند. 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٪ و ۷۵-۳۷ درصد می‌باشد (۱۷-۱۹). در تمام مطالعات انجام شده درصد مثبت بودن سوش‌های دارای *VacA*, *CagA* در بیماران دارای زخم بیشتر بوده که در برخی موارد در مقایسه با گروه فاقد زخم این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار شده است (۲۰، ۲۱). اما در برخی دیگر این تفاوت معنی‌دار نبوده است (۲۲-۲۴). 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*, *CagA* در بیماران فاقد زخم در مقایسه با

بیماران دارای زخم پائین‌تر بوده اگر چه این تفاوت در برخی مطالعات از نظر آماری معنی‌دار بوده (۲۶-۲۸) اما در برخی دیگر هیچ 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. معیاد، تعیین ژنوتیپ *VacA* و حضور ژن *CagA* با یکدیگر ممکن است در تعیین نتیجه علائم کلینیکی بیمارانی که تحت تأثیر میزان مختلف از عوامل خطر ساز 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 (۳۱-۳۳) 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 دارای *VacA* *CagA* می‌توانند سبب زخم‌های

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 میکروبیشناسی 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.

گاستروئودنالی 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 پراکنندگی ژنوتیپ $CagA^+$ - $UreAB^+$ - $VacA^+$ در بیماران فاقد زخم و دارای زخم (۱۴٪ در برابر ۴۱٪) نشان داد که بیشتر سوشهای هلیکوباکتر پیلوری بیمارها 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

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. *Cag*, 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.

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. Ruzsovcics 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.