

بررسی ارتباط ژن های *cagA* و *cagE* موجود در هلیکوباکتر پیلوری با مشکلات معده در بیماران ایرانی

دکتر کاوه بقایی^{۱*}، لیلا شکرزاده^۲، فرشته جعفری^۳، مهدی بلفیون^۴، دکتر رضا مشایخی^۵، دکتر همایون زجاجی^۶، دکتر محمدرضا زالی^۵

- ۱- محقق، دکترای زیست شناسی سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۲- محقق، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۳- متخصص پاتولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۴- استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
- ۵- استاد، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری از باکتری های مهم بیماریزا و یکی از عوامل ایجاد سرطان معده در دنیا محسوب می شود. بیماریزایی این باکتری را به طور عمده به جزایر پاتوژنیک موجود در ژن های این باکتری نسبت می دهند که شناخته شده ترین ژن ها در این جزایر، ژن های *cagA* و *cagE* می باشند. هدف این مطالعه، تعیین ارتباط این جزایر پاتوژنیک با علائم کلینیکی در میان بیماران ایرانی بوده است.

مواد و روشها: شناسایی هلیکوباکتر پیلوری توسط کشت و ژن *glmM* صورت گرفت. تکثیر توالی DNA برای دو ژن *cagA* و *cagE* به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) انجام شد.

یافته ها: از مجموع ۳۱۱ بیمار مراجعه کننده به بخشهای گوارش، ۲۳۱ بیمار هلیکوباکتر پیلوری مثبت گزارش شدند که از این تعداد ۱۵۴ (۶۶٪) مورد با *cagA* و ۹۰ (۳۹٪) مورد با ژن *cagE* همراه بود. ارتباط معنی داری میان ژن های *cagA* و *cagE* و تظاهرات بالینی بیماران از جمله گاستریت، زخم معده و سرطان معده به دست نیامد.

نتیجه گیری: ارتباط معنی داری میان ژن های *cagA* و *cagE* و تظاهرات بالینی بیماران به دست نیامد و این ژن ها به عنوان فاکتورهایی به منظور افتراق منشاء بیماریها تشخیص داده نشدند؛ این نتایج با نتایج مطالعات قبلی انجام شده در کشور تطابق داشت. همچنین برخلاف برخی مطالعات ژن *cagA* نسبت به ژن *cagE* به عنوان مارکر بهتری برای *cagPAI* تشخیص داده شد.

واژگان کلیدی: *cagA*، *cagE*، هلیکوباکتر پیلوری، اختلالات گوارشی.

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Bolfion M, Mashayekhi R, Zojaji H, Zali MR. Association between gastric disorders and *cagA* or *cagE* in Iranian patients. *Pejouhandeh* 2010;15(4):137-42.

مقدمه

اگرچه روند بیماریزایی هلیکوباکتر به صورت کامل شناخته نشده است اما چندین فاکتور از جمله جزایر بیماریزای *cag* (*cag pathogenicity island* (*cag PAI*)) به عنوان عوامل مهم بیماریزایی شناخته شده اند (۲). جزایر پاتوژنیک یا *cagPAI* با اندازه ای در حدود ۴۰ کیلو باز (Kb) سیستم ترشحی تیپ IV مربوط به هلیکوباکتر پیلوری را کد می کنند که از طریق آن پروتئین *cagA* به داخل سلول میزبان منتقل می گردد و پس از آن با فسفریله شدن انتهای ژن *cagA* (توالی EPIYA) که بر روی جزایر پاتوژنیک قرار گرفته، سلول به سمت بی نظمی

هلیکوباکتر پیلوری پاتوژن بسیار مهمی برای بیماران گوارشی محسوب می شود. در اکثر موارد این باکتری باعث التهابات مزمن معدی بدون علائم بالینی می گردد؛ همچنین می تواند باعث ایجاد بیماریهای جدی از قبیل زخم معده، مالت و سرطان معده در برخی افراد گردد (۱).

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر کاوه بقایی؛ تهران، ولنجک، خیابان یمن، بیمارستان طالقانی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دپارتمان اسهال و بیماریهای ناشی از غذا؛ پست الکترونیک: kavehbaghai@gmail.com

شبانه روز در محلول فرمالین قرار داده شد تا تثبیت گردند. سپس به ضخامت ۳ میکرومتر برش داده شدند تا تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین قرار گیرند. سپس این برشها توسط دو متخصص پاتولوژی بررسی گردیدند. درجه التهاب مخاط معده، گلاندولار آتروفی و اینتستینال متاپلازیا برحسب سیستم سیدنی تقسیم‌بندی شدند (۱۵).

جهت بررسی ژنتیک باکتری، نمونه‌ها در محیط انتقالی شامل تایوگلیکولات با ۱/۳ گرم آگار و ۳٪ عصاره مخمر از محل آندوسکوپی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس نمونه‌های انتقالی بر روی محیط Brain Heart Infusion agar (BHI) با ۱۰٪ خون گوسفند دفیبرینه و همراه با مکمل کمپیلوباکتر (Merck Co Humburg, Germany) کشت داده شدند. پس از آن پلیت‌های کشت داده شده در ۳۷ درجه به مدت ۳ تا ۷ روز در شرایط میکروآتروفیلیک (O2 ۵٪، Co2 ۱۰٪ و N2 ۸۵٪) انکوبه شدند. سپس باکتری مورد نظر بر اساس تست‌های اکسیداز، کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم تشخیص داده شد. در نهایت DNA این باکتری‌ها توسط کیت استخراج QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany) استخراج شد و برای تأیید مولکولی باکتری هلیکوباکتریلوری از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر ژن *glmM* استفاده شد. همچنین برای شناسایی ژن‌های *cagA* و *cagE* از تکنیک PCR استفاده شد. پریمرهای ژن‌های ذکر شده در جدول ۱ موجود است (۱۶-۱۷). واکنش‌های PCR همگی در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل 10 X PCR buffer، 500 nM از هر پرایمر، 2 mM MgCl2، 200 uM از هر dNTP، 1.5 U Taq DNA polymerase و 200 ng از DNA نمونه بود. حجم نهایی واکنش با آب مقطر اتوکلاو شده به ۲۵ میکرولیتر رسید.

شرایط تکثیر رشته DNA در دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر بهینه شد: ذوب اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت، سپس ۳۰ دور شامل دمای ذوب ۹۳ درجه به مدت ۱ دقیقه و دمای چسبندگی (Tm) به ترتیب ۵۸، ۵۷ و ۶۳ درجه برای ژنهای *cagA*، *glmM*، *cagE* استفاده شد. همچنین دمای اتساع (extension) به مدت ۱ دقیقه و به دنبال آن دمای اتساع نهایی در ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه دنبال شد. سپس محصول PCR بر روی ژل ۱/۲٪ توسط UV مشاهده شد. DNA سویه H. pylori 26695 به عنوان کنترل مثبت برای *cagPAI* به کار رفت.

پیش می‌رود (۳). ژن *cagA* در بخش فرودست یعنی در ناحیه *cagI* قرار گرفته است و به عنوان مارکری برای این ناحیه به حساب می‌آید. ارتباط میان حضور گونه‌های *cagA* مثبت با بیماریهای جدی گوارشی به خصوص در کشورهای غربی و همچنین کشورهای آسیای شرقی مانند ژاپن به طور مکرر گزارش شده است (۴-۷). از طرف دیگر، اکثر مطالعات قبلی در ایران ارتباطی میان *cagA* و تظاهرات بالینی در بیماران را نشان نداده‌اند (۸-۱۳).

ژن *cagE* نیز بر روی ناحیه *cagI* و در نزدیکی ژن *cagA* قرار گرفته است و حضور آن برای تحریک ترشح IL-8 از سلول‌های اپیتلیال ضروری است (۲). در برخی مطالعات ژن *cagE* به عنوان مارکر مناسب‌تری نسبت به *cagA* برای ناحیه *cagI* و بیماریزایی *cagPAI* شناخته شده است. همچنین این ژن را شاخص بهتری برای بررسی روند بیماریزایی هلیکوباکتریلوری دانسته‌اند (۱۴). این نتایج نشان می‌دهد که نه تنها حضور *cagA* بلکه همچنین وجود *cagE* و بررسی نقش آنها برای درک روند بیماریزایی *cag PAI* ضروری است، از آنجا که گزارشات زیادی پیرامون اهمیت ژن‌های *cagA* و *cagE* در ایران وجود ندارد، هدف از این مطالعه بررسی ارتباط *cagA* و *cagE* و تظاهرات بالینی در بیماران ایرانی است.

مواد و روشها

در فاصله زمانی فروردین تا دی ماه ۱۳۸۷، ۳۱۱ بیمار به دلیل مشکلات گوارشی به بیمارستان طالقانی و مهرداد تهران مراجعه کردند که همگی آنها تحت آندوسکوپی قرار گرفتند و برای همگی آنها فرم اخلاق و فرم جمع‌آوری اطلاعات تهیه شد. بر این اساس، افرادی برای این مطالعه انتخاب شدند که با هلیکوباکتریلوری آلوده بودند و حداقل تا یک ماه قبل از آندوسکوپی دارو مصرف نکرده بودند.

تظاهرات بالینی در میان بیماران شامل زخم معده، گاستریت و سرطان بود. تشخیص زخم معده هنگام آندوسکوپی و توسط پزشک متخصص صورت گرفت، همچنین سرطان و میزان شدت گاستریت توسط روشهای پاتولوژی تشخیص داده شد. سپس به منظور بررسیهای ژنتیکی و پاتولوژیک در هنگام آندوسکوپی نمونه‌برداری شد که در مجموع از سه بیوپسی گرفته شده از ناحیه آنتروم، از دو بیوپسی برای بررسیهای پاتولوژیک و از یک بیوپسی برای بررسیهای میکروبی استفاده شد. دو نمونه گرفته شده برای بررسی پاتولوژی به مدت یک

جدول ۱- پرایمرهای به کار رفته در مطالعه حاضر

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمر (5'-3')	اندازه محصول PCR [†]	منابع
glmM	glmM1-R	GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC	۲۹۶	۱۶
	glmM2-F	GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG		
cagA	cagA F1	AACAGGACAAGTAGCTAGCC	۳۴۹	۱۶
	cagA R1	TATTAATGCGTGTGTGGCTG		
cagE	cagE F	GTTACATCAAAAAATAAAAGGAAGCG	۷۳۳	۱۷
	cagE R	CAATAATTTGAAGAGTTTCAAACG		

†PCR: Polymerase Chain Reaction

بر اساس تظاهرات بالینی به سه گروه گاستریت، زخم معده (PUD) و سرطان معده (GC) تقسیم شدند. از میان ۱۸۲ بیمار مبتلا به گاستریت ۱۲۷ نفر (۶۹/۷٪)، از میان ۴۱ بیمار مبتلا به زخم معده ۲۲ نفر (۵۳/۶٪)، و از میان ۸ نفر مبتلا به سرطان معده ۵ نفر (۶۲/۵٪) با سویه‌های cagA مثبت آلوده بودند. هیچ ارتباط معنی‌داری بین حضور ژن cagA و تظاهرات بالینی (جدول ۲) و همچنین میان تظاهرات بالینی با سن و جنس (جدول ۳) به دست نیامد. لازم به ذکر است موارد گاستریت بر اساس دستاوردهای پاتولوژی تقسیم‌بندی گردید که شامل موارد زیر بود: -عدم التهاب، که به صورت No acute inflammation (Polymorph nuclear cell infiltration) none to mild گزارش گردید، -حالت میانی که شامل chronic inflammation (mononuclear cell infiltration) بود و -عدم آتروفی معدی و یا بی‌نظمی روده‌ای، که به عنوان mild gastritis در نظر گرفته شد.

ژن cagE در ۳۹٪ (۹۰/۲۳۱) سویه‌های جدا شده از بیماران یافت شد. شیوع ژن cagE در بیماران مبتلا به گاستریت ۳۹٪ (۷۱/۱۸۲) و در مبتلایان به زخم معده ۴۳/۹٪ (۱۸/۴۱) بود. همچنین تنها در یک مورد از بیماران مبتلا به سرطان معده این ژن یافت شد (۱۲/۵٪). ژن cagE نیز همانند cagA هیچ ارتباط معنی‌داری را با علائم بالینی نشان نداد (جدول ۲). همچنین حضور همزمان cagA و cagE در ۳۰٪ (۱۳) بیمار گزارش شد.

متغیرهایی همچون جنسیت، میانگین سنی و شیوع ژن‌های cagE، cagA (مثبت یا منفی) در این مطالعه لحاظ گردید. تفاوت‌های آماری در شاخصهای دموگرافیک در میان گروه‌های مختلف بیماران به وسیله تست Chi-square بررسی شد. همچنین ارتباط میان ژنوتایپ باکتری و تظاهرات بالینی به وسیله تست‌های Student's-t و Chi-square محاسبه گردید. آنالیز کلیه اطلاعات به وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد. p معنی‌دار برای کلیه محاسبات زیر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

هلیکوباکتریپیلوری از ۲۳۱ بیمار شامل ۹۵ مرد و ۱۳۶ زن با میانگین سنی ۴۳/۹ سال جدا شد. تظاهرات بالینی این بیماران شامل ۱۸۲ مورد گاستریت، ۱۶ مورد دئودنال اولسر، ۲ مورد گاستریک اولسر و ۲۳ مورد حضور همزمان دئودنال اولسر و گاستریک اولسر بود. همچنین در ۸ مورد سرطان معده گزارش گردید. از آنجایی که تعداد بیماران با حضور همزمان گاستریک و دئودنال اولسر غالب بود و تعداد بیمارانی که تنها مبتلا به گاستریک اولسر بودند بسیار کم بود، در تقسیم‌بندی کلیه آنها در گروه افراد مبتلا به زخم معده (PUD) بررسی شدند.

از میان ۲۳۱ بیمار هلیکوباکتریپیلوری مثبت مطالعه شده، در مجموع ۱۵۴ (۶۶/۷٪) بیمار با سویه‌های cagA مثبت آلوده بودند (جدول ۲). تمامی بیماران مورد بررسی در این مطالعه

جدول ۲- توزیع بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی بر اساس نوع بیماری و حضور ژن‌های مختلف در جزایر پاتوژنیک

گاستریت (تعداد: ۱۸۲)	زخم معده (تعداد: ۴۱)	سرطان معده (تعداد: ۸)	مجموع (تعداد: ۲۳۱)
۱۲۷ (۶۹/۷٪)	۲۲ (۵۳/۶٪)	۵ (۶۲/۵٪)	۱۵۴ (۶۶/۷٪)
۷۱ (۳۹/۰٪)	۱۸ (۴۳/۹٪)	۱ (۱۲/۵٪)	۹۰ (۳۹/۰٪)
۲۴ (۱۳/۲٪)	۶ (۱۴/۶٪)	۰ (۰/۰٪)	۳۰ (۱۳/۰٪)
۱۲ (۶/۶٪)	۳ (۷/۳٪)	۰ (۰/۰٪)	۱۵ (۶/۵٪)
۵۹ (۳۲/۴٪)	۶ (۱۴/۶٪)	۵ (۶۲/۵٪)	۷۰ (۳۰٪)
۳۴ (۱۸/۷٪)	۱۱ (۲۶/۸٪)	۲ (۲/۵٪)	۴۷ (۲۰/۳٪)

جدول ۳- توزیع بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی بر اساس نوع بیماری، سن و جنس

سن	گاستریت (تعداد: ۱۸۲)		زخم معده (تعداد: ۴۱)		سرطان معده (تعداد: ۸)	
	مردان	زنان	مردان	زنان	مردان	زنان
۱۵-۳۰	۶ (٪۸/۸)	۱۳ (٪۱۱/۴)	۲ (٪۸/۶)	۳ (٪۱۶/۶)	۰	۱ (٪۲۵)
۳۰-۴۵	۱۸ (٪۲۶/۴)	۳۵ (٪۳۰/۷)	۹ (٪۳۹/۱)	۵ (٪۲۷/۷)	۱ (٪۲۵)	۰
۴۵-۶۰	۲۱ (٪۳۰/۰۸)	۲۷ (٪۲۳/۶)	۷ (٪۳۰/۰۴)	۸ (٪۴۴/۴)	۱ (٪۲۵)	۲ (٪۵۰)
> ۶۰	۲۳ (٪۳۳/۸)	۳۹ (٪۳۴/۳)	۵ (٪۲۱/۷)	۲ (٪۱۱/۱)	۲ (٪۵۰)	۱ (٪۲۵)
مجموع	۶۸	۱۱۴	۲۳	۱۸	۴	۴

بحث

ژن های موجود بر روی *cagPAI* تنوع بسیار زیادی را در سراسر دنیا نشان می دهند. گزارشاتی وجود دارد که تنوع ژنتیکی جزایر بیماریزا را بر اساس فاکتورهای جغرافیایی مختلف و دفاع سیستم ایمنی میزبان در برابر عفونت طولانی مدت هلیکوباکتر پیلوری توجیه می کند؛ این تغییر ژنتیکی در تغییر فنوتیپی بیماریهای گوارشی مؤثر است (۱۸). مطالعات به ویژه در کشورهای اروپایی نشان داده است که حضور ژن *cagA* با تظاهرات بالینی شدید و با کلونیزه شدن این باکتری در معده افراد همراه است؛ همچنین باکتری های حامل این ژن باعث تحریک بیشتر پاسخهای التهابی نسبت به باکتری های *cagA* منفی می شوند (۲۰-۱۹). اما از سوی دیگر این مشاهدات در کشورهای آسیایی تأیید نشده است، در حالیکه شیوع ژن *cagA* در این کشورها بالاست (۲۲-۲۱). همچنین بر اساس مطالعاتی که به تازگی در کره، ژاپن و چین انجام شده است ارتباط میان بیماریزایی ژن *cagA* و تظاهرات بالینی مانند سرطان معده پس از آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری مشخص نشده است (۲۳). در این مطالعه نیز ارتباطی میان *cagA* با علائم بالینی در بیماران ایرانی به دست نیامد که البته این نتیجه با نتایج قبلی گزارش شده از ایران هماهنگ بود (۹، ۱۳-۱۲). همچنین ساب تایپ های ژن *cagA* که بر اساس توالیهای تکراری انتهای آنها به دو فرم شرقی و غربی تقسیم بندی می شوند نیز در شدت بیماریزایی باکتری مؤثرند (۲۵-۲۴)؛ به طوری که ژن *cagA* با تکرارهای بالاتر توالیهای انتهایی (تیپ شرقی) دارای قدرت بیماریزایی بیشتری از تیپ غربی (با توالیهای کمتر) هستند (۲۴ و ۲۶). از اینرو مطالعات بیشتری برای تعیین زیرگونه های ژن *cagA* و بررسی ارتباط آن با شدت بیماری در بیماران ایرانی کاملاً ضروری است.

نتیجه گیری

با توجه به یافته های مطالعه حاضر، ارتباط معنی داری میان حضور ژن *cagA* و علائم بالینی بیماران بدست نیامد، اما از سوی دیگر همچنان می توان ژن *cagA* را مارکر بهتری برای تعیین حضور *cagPAI* در مقایسه با *cagE* درسویه های جدا شده از بیماران ایرانی دانست.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه محققین دپارتمان بیماریهای ناشی از غذا و همچنین دپارتمان آمار مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به ویژه آقای دکتر پور حسینقلی کمال تشکر و قدردانی را می نمایند. همچنین لازم به ذکر است مقاله حاضر نتیجه طرح تحقیقاتی به شماره ۳۸۱ مصوب مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

ژن های موجود بر روی *cagPAI* تنوع بسیار زیادی را در سراسر دنیا نشان می دهند. گزارشاتی وجود دارد که تنوع ژنتیکی جزایر بیماریزا را بر اساس فاکتورهای جغرافیایی مختلف و دفاع سیستم ایمنی میزبان در برابر عفونت طولانی مدت هلیکوباکتر پیلوری توجیه می کند؛ این تغییر ژنتیکی در تغییر فنوتیپی بیماریهای گوارشی مؤثر است (۱۸). مطالعات به ویژه در کشورهای اروپایی نشان داده است که حضور ژن *cagA* با تظاهرات بالینی شدید و با کلونیزه شدن این باکتری در معده افراد همراه است؛ همچنین باکتری های حامل این ژن باعث تحریک بیشتر پاسخهای التهابی نسبت به باکتری های *cagA* منفی می شوند (۲۰-۱۹). اما از سوی دیگر این مشاهدات در کشورهای آسیایی تأیید نشده است، در حالیکه شیوع ژن *cagA* در این کشورها بالاست (۲۲-۲۱). همچنین بر اساس مطالعاتی که به تازگی در کره، ژاپن و چین انجام شده است ارتباط میان بیماریزایی ژن *cagA* و تظاهرات بالینی مانند سرطان معده پس از آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری مشخص نشده است (۲۳). در این مطالعه نیز ارتباطی میان *cagA* با علائم بالینی در بیماران ایرانی به دست نیامد که البته این نتیجه با نتایج قبلی گزارش شده از ایران هماهنگ بود (۹، ۱۳-۱۲). همچنین ساب تایپ های ژن *cagA* که بر اساس توالیهای تکراری انتهای آنها به دو فرم شرقی و غربی تقسیم بندی می شوند نیز در شدت بیماریزایی باکتری مؤثرند (۲۵-۲۴)؛ به طوری که ژن *cagA* با تکرارهای بالاتر توالیهای انتهایی (تیپ شرقی) دارای قدرت بیماریزایی بیشتری از تیپ غربی (با توالیهای کمتر) هستند (۲۴ و ۲۶). از اینرو مطالعات بیشتری برای تعیین زیرگونه های ژن *cagA* و بررسی ارتباط آن با شدت بیماری در بیماران ایرانی کاملاً ضروری است.

در مطالعات قبلی، ژن *cagE* نسبت به *cagA* مارکر بهتری برای *cagPAI* گزارش شده است. همچنین در بررسیهای انجام شده در ژاپن، نقش آن در پیشرفت بیماری مهمتر از *cagA* تشخیص داده شده است (۱۴). اما مطالعه حاضر نشان داد که ژن *cagA* همچنان به عنوان مارکر بهتری برای *cagPAI* به

REFERENCES

1. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002;347(15):1175-86.
2. 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 U S A* 1996;93(25):14648-53.
3. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol* 2008;10(8):1573-81.
4. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55(10):2111-5.
5. Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(23):1777-80.
6. Nomura AM, Lee J, Stemmermann GN, Nomura RY, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* CagA seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. *J Infect Dis* 2002;186(8):1138-44.
7. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40(3):297-301.
8. Mansour-Ghanaei F, Abbasi R, Joukar F, Besharati S, Askari-Jirhandeh N. Anti CagA antibody among patients with non-cardia gastric cancer in comparison with non-ulcer dyspepsia in an area with high incidence of gastric cancer. *Saudi Med J* 2008;29(11):1606-10.
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):1774-9.
10. Talebkhan Y, Mohammadi M, Mohagheghi MA, Vaziri HR, Eshagh Hosseini M, Mohajerani N, et al. *cagA* gene and protein status among Iranian *Helicobacter pylori* strains. *Dig Dis Sci* 2008;53(4):925-32.
11. Farshad S, Japoni A, Alborzi A, Hosseini M. Restriction fragment length polymorphism of virulence genes *cagA*, *vacA* and *ureAB* of *Helicobacter pylori* strains isolated from Iranian patients with gastric ulcer and nonulcer disease. *Saudi Med J* 2007;28(4):529-34.
12. Kamali-Sarvestani E, Bazargani A, Masoudian M, Lankarani K, Taghavi AR, Saberifirooz M. Association of *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2006;12(32):5205-10.
13. Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K, Yamaoka Y, Zojaji H, et al. *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in relation to *cagA* status and clinical outcomes in Iranian populations. *Jpn J Infect Dis* 2008;61(4):290-3.
14. Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y, et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(1):181-6.
15. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20(10):1161-81.
16. Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Srinivas S, Devi SM, Majeed AA, et al. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005;5:32.
17. Matteo MJ, Granados G, Pérez CV, Olmos M, Sanchez C, Catalano M. *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island genotype diversity within the gastric niche of a single host. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 5):664-9.
18. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001;107(7):767-73.
19. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A, Marchet A, Rhead JL, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135(1):91-9.
20. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J Clin Pathol* 1998;51(10):761-4.
21. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999;37(7):2274-9.

22. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut* 1998;42(3):338-43.
23. Li X, Liu W, Xu W, Shi Y, Xiao S. Clinical implications and prevalence of *cagA*, *cagE* and *cagT* genes in the pathogenicity island of *Helicobacter pylori* strains isolated from Shanghai patients. *Chin J Dig Dis* 2001;2(3):133-6.
24. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Sepulveda AR. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 1998;36(8):2258-63.
25. Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, et al. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett* 2002;517(1-3):180-4.
26. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, et al. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999;117(2):342-9.
27. Shirazi MH, Pourmand MR, Haghshenas MR, Rezaee VA. Prevalence of *Helicobacter pylori* CagE genotypes, in patients with non-ulcer dyspepsia. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2008;18(64):37-43. (Full text in Persian)
28. Kauser F, Khan AA, Hussain MA, Carroll IM, Ahmad N, Tiwari S, et al. The *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* Is Disrupted in the Majority of Patient Isolates from Different Human Populations. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5302-8.