

The relation between severe density of *Helicobacter pylori* in biopsy with cigarette smoking and age in infected patients

Heshmat Shahi¹, Mandana Moghni², Hedayatolah Shirzad¹

1. Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

2. Department of Pathology, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Article Information

Article history:

Received: 2014/07/01

Accepted: 2014/12/20

Available online: 2015/03/30

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 1394; 9(1): 1-5

Corresponding author at:

Dr. Hedayatolah Shirzad

Cellular and Molecular
Research Center, Shahrekord
University of Medical Sciences,
Shahrekord, Iran.

Email:

Shirzadeh@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Helicobacter pylori* infection is currently endemic worldwide health problem. The infection causes variety of gastrointestinal (GI) symptoms such as chronic gastritis, peptic ulcer, and gastric adenocarcinoma. It is clear that smoking is important to the development of disorders like intestinal disease. This study determines the relationship between *H.pylori* density and smoking.

Materials and Methods: The study was performed in 247 patients (20-80 years) both sexes, with dyspepsia symptoms referred to Hajar hospital. Demographic data were recorded, such as age and smoking history. Patients were checked by 16 SrRNA and glmM genes polymerase chain reaction for *H. pylori*. Density of *H.pylori* graded according to the number of *H.pylori* bacteria counted in light microscopy by (x1000 magnified).also patient had to have smoked for more than 1 year.

Results: We observed 67.61% of patients (167 of 247) were positive for *H. pylori*, and 32.39% were negative (80 of 247). In patients with dyspepsia, 36.4% in 20-40 age range, 42.1% in 41-61 and 21.5% in 62-80. Of total patients, 57.1% were smokers and in this number, 78.01% were *H. pylori* positive. Also study showed, in smokers and 3th age range, sever density of *H.pylori* was more than nonsmokers and other ranges. A significant difference ($P<0.05$) was observed when we compared density of bacteria by age and smoker with nonsmoker groups.

Conclusions: *H.pylori* sever density can be related by cigarette smoking and age.

Key Words: *Helicobacter Pylori*, Smoking, Age Factors

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Shahi H, Moghni M, Shirzad H. The relation between severe density of *Helicobacter pylori* in biopsy with cigarette smoking and age in infected patients. Iran J Med Microbiol. 2015; 1394 (1) :1-5

ارتباط بین تراکم شدید هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بیوپسی معده با مصرف سیگار و سن در افراد سیگاری آلوده به این باکتری

حشمت شاهی^۱، ماندانا مقنی^۲، هدایت اله شیرزاد^۱

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: عفونت هلیکوباکتر پیلوری درحال حاضر یک مسئله بهداشتی جهانی است. این عفونت می تواند باعث ناراحتی های مختلف دستگاه گوارشی مانند گاستریت، زخم معده و آدنوکارسینومای معده شود. اثرات مضر مصرف سیگار بر همه واضح هست که می تواند باعث ایجاد و پیشرفت ناراحتی های تنفسی و گوارشی شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین مصرف سیگار و سن با دانسیته و تراکم باکتری در افراد آلوده به این میکروارگانیسم است.

مواد و روش کار: این مطالعه به صورت مقطعی-تحلیلی روی ۲۴۷ بیمار که با نشانه های ناراحتی گوارشی به مرکز آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه کردن صورت گرفت. از این بیماران اطلاعات جمع آوری شد. بیماران از نظر آلوده بودن به باکتری از طریق تست اوره آز و وجود ژن 16SrRNA و glmM به روش PCR بررسی شد. تراکم باکتری نیز مطابق با تعداد باکتری در قطعه بافتی از طریق میکروسکوپ نوری براساس سیستم سیدنی تعیین و گزارش شد. بیماران مورد مطالعه نیز حداقل ۱ سال مصرف سیگار را داشته اند.

یافته ها: مشاهده شد که ۶۷/۶۱٪ از بیماران (۱۶۷ از ۲۴۷) آلوده به باکتری و ۳۲/۳۹٪ فاقد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری بودند. در بیماران با ناراحتی های گوارشی ۳۶/۴٪ در رده سنی ۲۰-۴۰ سال و ۴۲/۱٪ بین سالهای ۴۱-۶۱ و ۲۱/۵٪ نیز در رده ی سنی ۸۱-۶۱ بودند. از میان تمام بیماران ۵۷/۰۹٪ سیگاری بودند که در این بین ۷۸/۰۱٪ آلوده به باکتری بودند. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که تراکم شدید هلیکوباکتر پیلوری در سیگاری ها و رده ی سنی سوم بیشتر از غیر سیگاری ها و سایر رده های سنی است ($p > 0.05$).
نتیجه گیری: امکان تراکم بالای هلیکوباکتر پیلوری در بافت معده می تواند در ارتباط با مصرف سیگار و سن باشد.

کلمات کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، سیگار، سن

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۰
پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۲۹
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۰۱/۱۰
موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1394; 9(1): 1-5

نویسنده مسئول:

دکتر هدایت اله شیرزاد

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تلفن: ۰۹۱۳۱۸۵۹۵۱۰

پست الکترونیک:

Shirzadeh@yahoo.com

مقدمه

در کشورهای درحال توسعه آلوده به این باکتری اند (۳). عفونت هلیکوباکتر پیلوری در اکثر افراد آلوده بدون نشانه است (۴، ۵) که نشان دهنده ی تنوع ژنتیکی بالای هلیکوباکتر پیلوری است (۶). عفونت و التهاب در اپی تلیوم معده با تجمع نوتروفیل ها و ماکروفاژها همراه است، اما تعامل باکتری با هیپارین سولفات و اسید هیالورونیک مانع فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها می شود (۷).

هلیکوباکتر پیلوری از خانواده ی هلیکوباکتریاسه بوده و باسیل گرم منفی و میکروآئروفیلی ست که به مخاط معده انسان هجوم می برد. عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع ترین عفونت های باکتریایی در جهان به شمار می آید و عامل بیماری هایی مانند گاستریت و زخم های گوارشی می باشد (۱، ۲). تقریباً نصف انسان ها در کشورهای توسعه یافته و ۹۰-۵۶٪ افراد

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی - تحلیلی شامل ۲۴۷ بیمار می‌باشد که طی ۱۰ ماه در سال ۱۳۹۲ با علائم ناراحتی های گوارشی به مرکز آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد مراجعه کردند که تعداد ۱۴۱ نفر از بیماران سیگاری بودند. بیماران افرادی بودند که طی ۴ هفته گذشته، پادزیست و داروهای آنتی اسید مصرف نکرده بودند و بالای ۲۰ سال سن داشتند. براساس ناراحتی های گوارشی، توسط پزشک متخصص بعد از تکمیل رضایت نامه، تهیه بیوپسی از آنتروم معده انجام شد. از هر بیمار ۲ نمونه بیوپسی جهت انجام تست های اوره از سریع، PCR و انجام رنگ آمیزی پاتولوژی به روش نقره و همتوکسیلین اتوزین تهیه گردید. بررسی نتایج تست اوره از به این صورت بود که بعد از مجاورت نمونه بیوپسی با نوار کیت تغییر رنگ این نوار از زرد به صورتی به معنی حضور باکتری در نمونه بافتی می باشد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت bioflux ژاپن و طبق دستورالعمل آن انجام شد. واکنش PCR برای ژن های 16S rRNA و *glmM* بر روی DNA استخراج شده از نمونه های بیوپسی، طبق مطالعات قبلی صورت گرفت (۱۳). از دستگاه ترموسایکلر Corbet ساخت کشور استرالیا در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشکده پزشکی شهرکرد برای انجام واکنش PCR استفاده شد. (جدول ۱). 16S rRNA ژن کدکننده جزء 16S ریبوزومی می‌باشد که پرایمر مربوطه اختصاصی *H. pylori* می‌باشد. ژن *glmM* نیز کدکننده فاکتور *ureC* می‌باشد که از ژن های محافظت شده در باکتری است (۱۴، ۱۵). نمونه استاندارد در این مطالعه هلیکوباکتر ATCC266959 بود.

برای تایید PCR نیز محصولات واکنش با روش پلی اکریل آمید ژل الکتروفورزیس (PAGE) مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱). در نمونه های هیستوپاتولوژی حضور و دانسیته باکتری با استفاده از رنگ آمیزی نقره و همتوکسیلین اتوزین با میکروسکوپ نوری در بزرگ نمایی 400x و 1000x مورد بررسی و گزارش قرار گرفت که Grad های Mild, Moderate, sever بر اساس سیستم سیدنی به تعداد باکتری در نمونه ها داده شد (۱۶). برای تجزیه و تحلیل اطلاعات آماری به دست آمده نیز از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد که نتایج مقایسه ها در جدول ۳ و ۲ ذکر شده است.

۸). شناسایی درست و به موقع این باکتری می تواند در روند درمان مفید باشد. این باکتری برای فرار از شرایط اسیدی معده به حرکت توسط تاژک نیازمند است تا بعد از جایگیری در مخاط معده با کمک اوره‌آز محیط اسیدی معده را خنثی کند. همچنین با داشتن شکل اسپیرال به راحتی توسط فلاژل های قطبی خود در موکوس حرکت کرده و از سیستم ایمنی خود را محفوظ می کند. روش های تشخیصی این میکروارگانیزم مختلف بوده و می تواند شامل روش های ذیل باشد : ۱- روش تهاجمی مثل نمونه گیری از بافت معده و انجام آزمایشات بافت شناسی اوره از سریع RUT (Rapid urease test) و (Polymerase chain reaction) PCR است. این روش چون به طور مستقیم به دنبال شواهدی برای تشخیص آلودگی می باشد، از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است و روش مرجع برای شناسایی باکتری به حساب می آیند. ۲- روش غیر تهاجمی مانند: اوره از تنفسی UBT (Breath urease test)، تست سرولوژیک و آنتی ژن مدفوعی (Stool antigen) می باشند که به عنوان روش های غربالگری استفاده می شوند. روش های مبتنی بر PCR از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردارند و مستقیماً بر روی نمونه های بیوپسی انجام می شود. در مواردی که نمونه، آلودگی شدیدی غیر از هلیکوباکتر پیلوری داشته باشد و یا زمانی که تعداد باکتری کم باشد این روش حساسیت بالایی دارد (۹).

مطالعات بالینی که درمورد استعمال سیگار صورت گرفته است نشان داده که سیگار دارای اثرات متفاوتی بر روی موجودات زنده می باشد. ترکیبات سمی دود سیگار که به دستگاه تنفسی و گوارشی می‌رسد، اثرات مضر روی این اندام‌ها می‌گذارد (۱۰). مکانیسم تاثیر سیگار بر روی معده به خوبی روشن نیست اما فاکتورهای متنوعی مثل افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن ناشی از مصرف سیگار می‌توانند باعث رفلکس های معدی و اختلال در تخلیه محتوای معده شوند (۱۱). مصرف طولانی مدت سیگار در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری باعث افزایش خطر ایجاد آتروفی و متاپلازی در سلولهای موکوس معده و روده می‌شود (۱۲). هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین تراکم باکتری در افراد آلوده سیگاری و رده سنی آنها با گروه غیرسیگاری آلوده است.

جدول ۱: توالی پرایمرها جهت تکثیر با تکیک PCR

آل	پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
16SrRNA	HP1-F	5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3'	110
	HP2-R	5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'	
glmM	glmM1-F	5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'	161
	glmM2-R	5'-GCATTACAAACTTATCCCAATC-3'	

جدول ۲: رابطه بین سن و تراکم هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های بیوپسی معده

		سن			مجموع	
		20-40	41-61	62-80		
شدت تراکم	mild	Count	25	33	19	77
		within density%	٪32.5	٪42.9	٪24.7	٪100.0
	mod	Count	39	29	8	76
		within density%	٪51.3	٪38.2	٪10.5	٪100.0
	severe	Count	2	6	6	14
		within density%	٪14.3	٪42.9	٪42.9	٪100.0
	منفی	Count	24	36	20	80
		within density%	٪30.0	٪45.0	٪25.0	٪100.0
مجموع	Count	90	104	53	247	
	within density%	٪36.4	٪42.1	٪21.5	٪100.0	

یافته‌ها

جدول ۳: ارتباط بین مصرف سیگار و تراکم هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های

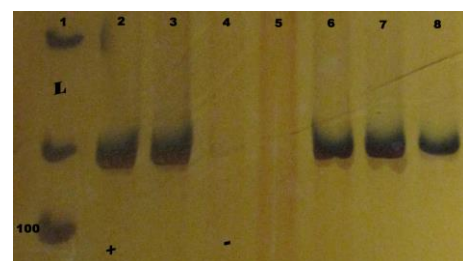
بیوپسی معده

		مصرف سیگار		مجموع	
		بله	خیر		
شدت تراکم	mild	Count	27	50	77
		within density/.	%35.1	%64.9	%100.0
	mod	Count	27	49	76
		within density/.	%35.5	%64.5	%100.0
	severe	Count	3	11	14
		within density/.	%21.4	%78.6	%100.0
	منفی	Count	49	31	80
		within density/.	%61.3	%38.8	%100.0
مجموع	Count	106	141	247	
	within density/.	%42.9	%57.1	%100.0	

بحث

با توجه به گزارش World Gastroenterology Organization (WGO) بیش از نیمی از جمعیت جهان مبتلا به این باکتری اند. ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری به اقلیم منطقه و شرایط اجتماعی و اقتصادی وابسته است (۱۷). با نظر به شیوع بالای آلودگی به *H.pylori* در اجتماع و عوارض پرهزینه آن تشخیص صحیح و به موقع باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر روش‌های آزمایشگاهی مختلفی برای تشخیص حضور و عفونت با هلیکوباکتر پیلوری موجود است و روش هیستوپاتولوژی یک روش حساس به شمار می آید (۱۸، ۱۹). در مطالعات مختلفی

در این مطالعه ۶۷/۶۱٪ از بیماران (۱۶۷ از ۲۴۷) آلوده به باکتری بودند. در این میان ۴۶/۷۴٪ مرد و ۵۳/۲۶٪ زن بودند. در بیماران با ناراحتی های گوارشی ۳۶/۴٪ در رده سنی ۲۰-۴۰ سال و ۴۲/۱٪ در رده سنی ۴۱-۶۱ و ۲۱/۵٪ نیز در رده ی سنی ۶۱-۸۱ بودند. از میان تمام بیماران ۵۷/۱٪ سیگاری بودند که در بین آنها ۷۸/۰۱٪ آلوده به باکتری بودند. این مطالعات نشان داد که تراکم شدید (Severe) هلیکوباکتر پیلوری در سیگاری‌ها و رده ی سنی سوم بیشتر از غیرسیگاری ها و سایر رده‌های سنی است (جدول ۳ و ۲). با مقایسه دانسیته باکتری، سن و سیگاری بودن رابطه بین مصرف سیگار و گذر سن با افزایش تراکم باکتری در بافت معده معنی دار شد ($P \text{ value} < 0.05$). در گروه سوم همه بیماران، سیگاری بودند.



شکل ۱: واکنش PCR انجام شده با پرایمر glmM. ستون ۱: لدر ۱۰۰ bp، ستون ۲: کنترل مثبت هلیکوباکتر پیلوری (۱۶۱ bp)، ستون ۳: نمونه مثبت کلینیکی، ستون ۴: کنترل منفی، ستون ۵: نمونه منفی کلینیکی، ستون ۶-۸: نمونه های مثبت کلینیکی

همکارانش نیز مانند مطالعات Li بر خلاف مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین سن و آلودگی به این باکتری نیافتند (۲، ۲۴، ۲۵، ۲۷). در مشاهدات Kim و همکارانش مانند مطالعه حاضر ارتباط معنی داری بین سن و آلودگی به این باکتری مشاهده شد (۲۹).

در نهایت این مطالعه نشان داد که تغییرات بافتی و هیستولوژیک بافت معده در افراد سیگاری آلوده به باکتری غالبتر و بیشتر از افراد غیر سیگاری بوده و تراکم باکتری بیشتر می‌باشد. این به بدان معنی است که مصرف سیگار در افراد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری در کنار فاکتورهای بیماریزایی باکتری می‌تواند باعث تشدید التهاب معده شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره ۱۸۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می‌باشد و بدین طریق از تمام همکاران مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی علوم پزشکی شهرکرد و مرکز آندوسکوپی بیمارستان هاجر شهرکرد و آزمایشگاه پاستور که صمیمانه ما را در این مطالعه همکاری کردند، کمال تشکر را داریم.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

نشان داده شده است که روش PCR به عنوان روش حساس‌تری نسبت به اوره‌آز سریع و آنتی ژن مدفوعی می‌باشد که برای تشخیص وجود هلیکوباکتر پیلوری و آلودگی به آن استفاده می‌شود (۲۰). مناسب‌ترین روش‌های مولکولی که برای تایید حضور باکتری انجام می‌شود اکثراً برپایه روش PCR با پرایمرهای 16SrRNA و *glmM* است (۲۱، ۲۲). در مطالعه Jang-jih و همکاران ژن *ureC* با اختصاصیت ۹۶٪ و حساسیت ۱۰۰٪ بهترین ژن مورد استفاده برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری گزارش شد (۲۳). مطابق با شواهد موجود مصرف سیگار می‌تواند اثرات سویی بر روی دستگاه تنفسی و گوارشی بگذارد که خود می‌تواند باعث آتروفی و متاپلازی سلول‌های مخاطی سیستم گوارشی شود (۱۲). دود سیگار خود نزدیک به ۴۰۰۰ نوع ماده مختلف مضر دارد که می‌تواند اثرات زیستی مخربی بر روی سلول‌های مخاطی بدن بگذارد. نتایج مطالعه حاضر بر آن است که مصرف سیگار می‌تواند باعث افزایش تراکم باکتری در بافت بیوپسی معده شود. در برخی مقالات نیز مانند مطالعات Zeng و همکاران مشابه مطالعه حاضر، بین مصرف سیگار و شدت آلودگی ارتباط معنی داری مشاهده شد (۲، ۲۴-۲۷). همچنین سن و افزایش آن نیز می‌تواند باعث تشدید التهاب و لوکالیزه شدن باکتری شود. به طوری که در این مطالعه مشاهده شد تراکم بالای باکتری در افراد بیش از ۶۰ سال سن در مقایسه با سایر گروه‌های سنی بیشتر دیده شد. در برخی مشاهدات نیز مانند مطالعات Monajemzadeh هیچ ارتباط معنی داری بین سن و آلودگی به این باکتری مشاهده نشد (۲۸). در مطالعات Erdogan و

References

- Shahi H, Reisi S, Sadeghiani M, Mahsa M, Bahreini R, Moghni M, et al. Prevalence of *cagA* and *babA2* genes in *Helicobacter Pylori* strains Isolated from Iranian gastrointestinal disorder patients and their gastritis classification. *Journal of biology and today's world*. 2014;3(12):256-60.
- Kim J, Cho YA, Choi IJ, Lee Y-S, Kim S-Y, Shin A, et al. Effects of Interleukin-10 Polymorphisms, *Helicobacter pylori* Infection, and Smoking on the Risk of Noncardia Gastric Cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e29643.
- F. M. Eidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Clin North Am* 1993;2(2):73-88.
- Wu TC, Chen LK, CR. L. Primary gastric lymphoma associated with *helicobacter pylori* in a child. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2001;3(2):608-10.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007;56(6):772-81.
- Peek RM, Jr., Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol*. 2006;208(2):233-48.
- Kusters JG, Van A, Ej. K. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;1(9):449-90.
- Bagheri N, Taghikhani A, Rahimian G, Salimzadeh L, Azadegan Dehkordi F, Zandi F, et al. Association between virulence factors of *helicobacter pylori* and

- gastric mucosal interleukin-18 mRNA expression in dyspeptic patients. *Microb Pathog*. 2013;65:7-13.
9. Marshall B, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*. 1984;323(8390):1311-5.
10. Armitage AK, Dollery CT, George CF, Houseman TH, Lewis PJ, DM. T. Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J* 1975;4(5992) 313-6.
11. Parasher G, Eastwood GL. Smoking and peptic ulcer in the *Helicobacter pylori* era. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2000;12(8):843-53.
12. Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Sumioka M, et al. Cigarette smoking promotes atrophic gastritis in *Helicobacter pylori*-positive subjects. *Dig Dis Sci*. 2002;47(3):675-81.
13. Madhi M, Moghim Sh, al. e. Evaluating *Helicobacter Pylori* FlaA in Clinical Isolates from Alzahra Hospital,. *Journal of Isfahan Medical School* 1392;31 (1):1-8 (persian).
14. Bagheri N, Salimzadeh L, Azadegan-Dehkordi F, Hashemzadeh M, Heydari S, Rahimian R, et al. Expression levels of mRNA cytokines of IL-17 and IL-23 in epithelial fiber of stomach inpatients with *Helicobacter pylori* using Real-Time PCR in Chahar Mahal and Bakhtiari province. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2014;15(6):124-31 (Persian).
15. Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer letters*. 2009;282(1):1-8.
16. Manxhuka-Kerliu S, Telaku S, Devolli-Disha E, Ahmetaj H, Sahatciu-Meka V, Kerliu A, et al. *Helicobacter pylori* gastritis updated Sydney classification applied in our material. *Prilozi*. 2009;30(1):45-60.
17. Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, et al. World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC):(a global perspective. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2010;19(3) (311-7).
18. Malik GM, Mubarik M, s. K. *Helicobacter pylori* infection in endoscopic biopsy specimens of gastric antrum. *Diagnostic and Therapeutic Endoscopy*. 1999;6 (1):25-9
19. Calvet X, Sanchez- Delgado J, Montserrat A, Lario S, Ramirez-Lazaro M.J., Quesada M, et al. Accuracy of diagnostic tests for *Helicobacter pylori*. *Clin Infect Dis*. 2009;48(10):1385-91
20. Kargar M, Baghernejad M, A. D. Compression of three methods of polymerase chain reaction, culture and rapid urease test in diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimen. *Koomesh*. 2010;11(3) 198-203
21. Espinoza MG, Vazquez RG, Mendez IM, Vargas CR, SG. C. Detection of the glmM gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *J Clin Microbiol*. 2011;49(4):1650-2.
22. Smith SI, Oyediji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, et al. Comprasion of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol*. 2004;10(58) 1958-60.
23. Jang-jih L, cherng-lih P, Rong-yaun S, Chi-hsiang C, Qinyuan L, Sonny K, et al. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *J Clin Microbiol*. 1999;37 (3):772.
24. Zeng H-M, Pan K-F, Zhang Y, Zhang L, Ma J-L, Zhou T, et al. Genetic Variants of Toll-Like Receptor 2 and 5, *Helicobacter Pylori* Infection, and Risk of Gastric Cancer and Its Precursors in a Chinese Population. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2011;20(12):2594-602.
25. Li M, Huang L, Qiu H, Fu Q, Li W, Yu Q, et al. *Helicobacter pylori* Infection Synergizes with Three Inflammation-Related Genetic Variants in the GWASs to Increase Risk of Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74976.
26. Khan N, Shabbir G, Zarif M, Khattak MI. Upper gastrointestinal endoscopic assessment of patients presenting with dyspepsia. *Journal of Postgraduate Medical Institute (Peshawar-Pakistan)*. 2011;21(3):1-5.
27. Erdogan Af, Asma S, Gerekliloglu C, Turan Ý, Abacı K. Significant Association Between *Helicobacter Pylori* Infection and Low Density Lipoprotein Cholesterol. *TJFMPC*. 2014;8(1):19-24.
28. Monajemzadeh M, Abbasi A, Tanzifi P, Taba Taba Vakili S, Irani H, Kashi L. The Relation between *Helicobacter pylori* Infection and Acute Bacterial Diarrhea in Children. *International Journal of Pediatrics*. 2014;2014(2):19-43.
29. Kim HL, Jeon HH, Park IY, Choi JM, Kang JS, Min KW. *Helicobacter pylori* infection is associated with elevated low density lipoprotein cholesterol levels in elderly Koreans. *J Korean Med Sci*. 2011;26(5):654-8.