



Prevalence of *Helicobacter pylori vacA* alleles and *cagA* gene in the feces of seropositive children in Kermanshah city

Elahe Tajbakhsh¹, Mahmood Shahveh¹, Sara Tajbakhsh², Faham Khamesipour³

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
2. University of Medical Sciences, Shahre-kord, Iran.
3. Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Article Information

Article history:

Received: 2014/06/12

Accepted: 2015/02/19

Available online: 2015/11/29

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 1394; 9(3): 54-65

Corresponding author at:
Dr. Elahe Tajbakhsh

Department of Microbiology,
Faculty of Basic Sciences,
Islamic Azad University,
Shahrekord Branch,
Shahrekord, Iran

Email:

ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Helicobacter pylori* is the most common cause of Gastritis and indigestion in the human. Considering the importance of this infection and its different prevalence in different regions of Iran, this study was conducted to determine the prevalence of *H. pylori vacA* alleles and *cagA* gene in the feces of seropositive children in Kermanshah city as a high-risk province

Materials and Methods: In this study, 300 children aged 2 to 9 years were examined and tested for detection of anti IgG. Then DNA extracted from stools of seropositive patients and at the present of specific primers prevalence of *cagA* gene and *vacA* alleles including (*s1a*, *s1b*, *s1c*, *s2*, *m1* and *m2*) and were determined.

Results: A total of 300 serum samples, 50 cases (16.66%) positive for anti IgG against *H. pylori*. The findings showed that most strains of *H. pylori* genotypes *vacA s2/m2* are isolated. But the frequency of *cagA* gene sees in only 10 %.

Conclusions: According to the results, the most frequent allele of the gene *vacA s2/m2* this area has existing children. To ensure these wider molecular studies in other populations is recommended.

Key Words: Serum positive children, Stool, *Helicobacter pylori*, PCR

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

How to cite this article:

Tajbakhsh E, Shahve M, Tajbakhsh S, khamesipour F. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA* alleles and *cagA* genes in the feces of seropositive children in Kermanshah city. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :54-65

بررسی فراوانی آلل های ژن *vacA* و *cagA* هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع اطفال سرم مثبت شهرستان کرمانشاه

الهه تاج بخش^۱، محمود شهوه^۱، سارا تاج بخش^۲، فهام خامسی پور^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: هلیکوباکتر پیلوری مهم ترین عامل التهاب معده و سوء هاضمه در انسان. با توجه به اهمیت این باکتری و شیوع متفاوت آن در مناطق مختلف کشور، هدف از این پژوهش، بررسی فراوانی آلل های ژن *vacA* و *cagA* هلیکوباکتر پیلوری در مدفوع اطفال سرم مثبت شهرستان کرمانشاه به عنوان یک منطقه پرخطر می باشد.

مواد و روش کار: این تحقیق بر روی ۳۰۰ کودک ۲ تا ۹ ساله شهرستان کرمانشاه صورت گرفت. نمونه ها ابتدا به روش سرولوژی از نظر وجود آنتی بادی IgG علیه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفتند پس از استخراج DNA از نمونه های مدفوع، به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) وجود ژن های *vacA* به همراه آلل های *(s2/s1c/s1b/s1a)* و *(m2 و m1)* و ژن *cagA* مورد بررسی قرار گرفتند و ارتباط آن ها با متغیرهایی مثل سن، جنس، تعداد افراد خانواده و ... بررسی شد

یافته ها: از ۳۰۰ کودک مورد بررسی ۵۰ نمونه (۱۶/۶۶٪) از نظر وجود آنتی بادی IgG علیه هلیکوباکتر پیلوری مثبت تشخیص داده شدند. در این تحقیق مشخص گردید که اغلب سویه های جدا شده ی هلیکوباکتر پیلوری ژن *vacAs2/m2* را دارند؛ ولی فراوانی ژن *cagA* در این سویه ها تنها ۱۰٪ تشخیص داده شد...

نتیجه گیری: طبق نتایج به دست آمده، آلل *s2/m2* می تواند شاخصی برای پیش بینی آلودگی و خطر بیماری های ناشی از عفونت با هلیکوباکتر پیلوری در این منطقه در نظر گرفته شود. برای اطمینان از این موضوع انجام مطالعات ملکولی وسیع تری در سایر جمعیت ها پیشنهاد می گردد.

کلمات کلیدی: کودکان، سرم مثبت، مدفوع، هلیکوباکتر پیلوری، PCR.

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

پیلوری تنها در ۲۰-۱۰ درصد این جمعیت ها دیده می شود. بیماری زایی هر سویه باتوجه به میزان تبادل علائم بین باکتری و سلول های پوششی میزبان متفاوت است. عفونت هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع ترین عفونت های مزمن باکتریایی در جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد. الگوی اپیدمیولوژیک این عفونت در کشورهای صنعتی و در حال توسعه متفاوت است. به طوری که در کشورهای صنعتی به تدریج و با افزایش سن، شیوع عفونت افزایش می یابد، اما در کشورهای در

هلیکوباکتر پیلوری باسیل گرم منفی و میکروآتروفیلی است که در مخاط معده اغلب به صورت مارپیچی و در محیط کشت به صورت خمیده دیده می شود. این باکتری عامل بیماری هایی مانند گاستریت، زخم های گوارشی، سرطان معده و سرطان غدد لنفاوی دستگاه گوارش است. عفونت با این باکتری در سراسر جهان گسترده است به طوری که در کشورهای در حال توسعه به بیش از ۸۰ درصد می رسد (۱)، اما بیماری های مربوط به هلیکوباکتر

حال توسعه بیشتر افراد در سن کودکی و درصد زیادی از افراد جوان نیز پس از بزرگسالی عفونی می شوند (۲).

بررسی های متعددی در ارتباط با فاکتورهای مؤثر در بروز این علائم انجام شده که از آن جمله می توان به ژنتیک میزبان، عوامل محیطی و فاکتورهای ویروالانس باکتری مانند ژن های *vacA* و *cagA* اشاره نمود. مهم ترین تفاوت های بین سویه های هلیکوباکتر پیلوری، دو ژن *vacA* (کد کننده سیتوتوکسین واکوتلزا) و ژن *cagA* (کدکننده پروتئین وابسته به سیتوتوکسین) است (۳،۴). ژن *vacA* که سیتوتوکسین واکوتلزا را کد می کند. در تمامی سویه های هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد اما سم آن تنها در ۵۰ درصد از سویه ها بیان می شود و این به دلیل تنوع در توالی اسیدهای آمینه ژن *vacA* در سویه های مختلف است. این ژن دارای دو ناحیه ی متغیر سیگنالینگ و ناحیه میانی می باشد. ناحیه سیگنالینگ رمزکننده بخش پپتید سیگنالی انتهایی آمینی توکسین بالغ است و ۲ تیپ *s1* و *s2* می باشد. *vacA* در ناحیه *m* خود نیز دارای تنوع است دو شکل آلی *m1* و *m2* در ناحیه *m* قابل تشخیص می باشند.

آل های ژن *vacA* دارای نوعی تنوع ژنتیکی موزائیکی هستند به طوری که در میان توالی سیگنال آن ها ۴ ناحیه ی *s1a* *s1b* *s1c* *s2* و در توالی میانی آن ها تاکنون ۳ ناحیه ی *m1a* *m1b* *m2* کشف شده است. براساس گزارش های به دست آمده سویه هایی با ژنوتیپ های *s1/m1* و *s1/m2* دارای حداکثر فعالیت سیتوتوکسیک و سویه هایی با ژنوتیپ *s2/m2* و *s2/m1* دارای حداقل فعالیت سیتوتوکسیک یا بدون فعالیت می باشند (۵، ۶).

cagA نام ژنی است که پروتئین ۱۳۰-۱۲۰ کیلو دالتونی به همین نام را رمز دهی می کند. در جوامع غربی تقریباً ۷۰٪ از کل سویه های هلیکوباکتر پیلوری دارای این ژن هستند، بیش از ۹۰٪ سویه هایی که از بیماران مبتلا به زخم اثنی عشر و سرطان جدا شده اند *CagA* مثبت هستند. این پروتئین یکی از مهم ترین پروتئین های ایمونوژنیک این باکتری است که تولید آنتی بادی و لمفوسیت اختصاصی *TCD4+* را در سطح مخاط معده تحریک می کند. *CagA* دارای دو ساب تایپ مهم آسیای شرقی و غربی است و در فاگوسیتوز هلیکوباکتر پیلوری موثر می باشد. سلول های فاگوسیتوز کننده تک هسته ای تقریباً در عرض ۴ دقیقه هلیکوباکتر پیلوری را هضم می کنند. استثنا در این میان

سوش هایی که واجد *cagA* هستند به درون مخاط نفوذ کرده و از فاگوسیتوز در امان می مانند (۷). پروتئین *cagA* پس از ورود به سیتوزول سلول میزبان فسفریله شدن فعال گشته و تغییرات عملکردی و مورفولوژیکی زیادی را درون سلول میزبان باعث می شود (۸،۹). نشان داده اند که سویه های هلیکوباکتر پیلوری *cagA+* با توان بیشتری در مقایسه با سویه های *cagA-* مرگ برنامه ریزی شده را در سلول های مخاطی معده القا می نمایند؛ اما مطالعات اخیر حاکی از آن است که ژن *cagA* به تنهایی نمی تواند به عنوان یک شاخص برای پیش بینی بیمار های گوارشی در نظر گرفته شود. (۱۰،۴).

روش های متعددی جهت تشخیص عفونت هلیکوباکتر پیلوری موجود است که به دو دسته عمده روش های تهاجمی و غیرتهاجمی تقسیم بندی می شود؛ از بین روش های تشخیصی تهاجمی روش آندوسکوپ و بیوپسی از مخاط معده و بررسی نمونه پس از انجام رنگ آمیزی اختصاصی و نیز کشت و روش آزمون اوره آز PCR باکتریال نمونه اخذ شده، قابل ذکر است در بین روش های تشخیصی غیرتهاجمی می توان به بررسی سرولوژی آنتی بادی ها در خون به روش الیزا و روش آزمون اوره آز تنفسی و نیز بررسی آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری به روش ایمونواسی در نمونه مدفوع بیماران اشاره کرد. با توجه به این که تشخیص زودهنگام عفونت با روش های تشخیصی متعدد موجود بوده و در دسترس می باشد، ترجیحاً روش های تشخیصی غیرتهاجمی راحت تر و برای کودکان و والدینشان قابل قبول تر است (۱۱). با توجه به شیوع بالای این عفونت در کشورهای در حال توسعه، لزوم تشخیص هرچه سریع تر عفونت با این ارگانیزم با روش های غیر تهاجمی در کودکان، از دلایلی بود که ما را برآن داشت تا به تشخیص این باکتری در مدفوع کودکان دارای تیتراژ آنتی بادی علیه این باکتری بپردازیم.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۲ بر روی ۳۰۰ کودک ۲ تا ۹ ساله با علائم دل درد و دل پیچه مراجعه کننده به کلینیک شماره ۲ شهرستان کرمانشاه صورت گرفت. هنگام نمونه گیری اطلاعات مربوط به هر بیمار از قبیل سن، جنس، داشتن حالت تهوع و استفراغ، تعداد افراد خانواده، داشتن درد ناحیه شکم، برگشت اسید معده، نفخ شکم و... در پرسشنامه ای ثبت می شد. جهت

دمای ۲۰- قرار داده و در $12000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم بعد از دور ریختن محلول رویی ۱۰۰۰ میکرولیتر Wash buffer را به رسوب اضافه نمودیم و بعد از ۳-۵ ثانیه ورتکس در $12000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم بعد از خالی کردن محلول رویی، نمونه مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه به صورت در باز قرار دادیم. به رسوب باقی مانده ۵۰ میکرولیتر Solvent buffer اضافه نمودیم و تکان داده و در ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. سپس ۳۰ ثانیه در $12000 \times g$ سانتریفیوژ نمودیم. محلول رویی حاوی DNA می باشد که به منظور تأیید صحت استخراج ۲ میکرولیتر DNA از نمونه مورد نظر را روی ژل آگارز ۱٪ برده و پس از انجام الکتروفورز با نور UV مورد مطالعه قرار دادیم. به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های مدفوع از توالی *16SrRNA* استفاده گردید. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. به منظور تشخیص ژن های *vacA* و *cagA* هلیکوباکتر پیلوری و هم چنین آلل های *(S2S1cSalbS1a)* و *(m2m1)* از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ استفاده گردید. حجم نهایی و برنامه دمایی مورد استفاده برای هر ژن در جدول ۲ نشان داده شده است.

انجام آزمون سرولوژی، نمونه های سرم از نظر وجود آنتی بادی IgG علیه هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از کیت الیزای (ساخت شرکت IBL آلمان) مطابق دستورالعمل کیت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های مدفوع کودکانی که دارای واکنش سرمی مثبت بودند، در ظروف استریل حاوی محلول بافری (۱۰ میلی مول NaCl، ۱۰ میلی مول Tris-HCl (pH= 8.0)، ۲۵۰ میلی مول EDTA (pH= 8.0) و ۱٪ Sodium lauryl sarcosine) نگهداری شده و تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- نگهداری شدند و جهت انجام آزمون های مولکولی در مجاورت یخ به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند (۱۲). استخراج DNA از نمونه های مدفوع از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNPTM) مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت که برای این منظور ابتدا ۲۵-۵۰ میلی گرم از نمونه مدفوع را در ۱۰۰ میکرولیتر Protease buffer حل نموده و به مدت ۳-۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه قرار دادیم سپس ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر را با ۴۰۰ میکرولیتر Lysis solution مخلوط کرده و ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس کردیم در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر Precipitation solution را به مخلوط اضافه نموده و بعد از ۳-۵ ثانیه ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری در نمونه های مدفوع

GENE	Primer name	Sequence (5' - 3')	Ampilimer size (bp)
<i>16srRNA</i>	HP1F	CTGGAGAGACTAAGCCCTCC	109
	HP2R	ATTACTGACGCTGATTGTGC	
<i>cagA</i>	<i>cagA</i> F	TTGACCAACAACCACAAACCGAA	183
	<i>cagA</i> R	CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC	
<i>vacA</i>	VA1 F	ATGGAAATACAACAAACACAC	136
	V136 R	CAACAATGGCTGGAATGAT	
<i>vacA m1</i>	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	570
	VAG-R	GCGTCAAAATAATTCCAAGG	
<i>vacA m2</i>	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	645
	VAG-R	GCGTCAAAATAATTCCAAGG	
<i>vacA s1a</i>	SS1F	GTCAGCATCACACCGCAAC'	190
	VA1R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA s1b</i>	SS3F	AGCGCCATACCGCAAGAG	187
	VA1R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
<i>vacA s2</i>	SS2F	GCTAACACGCCAAATGATCC	199
	VA1R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	

جدول ۲ شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز چندتایی جهت تشخیص ژن های مختلف هلیکوباکتر پیلوری

نام ژن	برنامه واکنش زنجیره ای پلی مرز	حجم واکنش (۲۵ میکرولیتر)
<i>16srRNA</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 5 min. 60 cycle: 94 ^{0C} ----- 60 s 55 ^{0C} ----- 60 s 65 ^{0C} ----- 60 s	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>cagA</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 7 min. 60 cycle: 95 ^{0C} ----- 60 s 65 ^{0C} ----- 60 s 65 ^{0C} ----- 60 s	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>vacA</i>	1 cycle: 95 ^{0C} ----- 5 min. 30 cycle: 94 ^{0C} ----- 50 s 56 ^{0C} ----- 60 s 52 ^{0C} ----- 70 s	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>vacA m1</i>	1 cycle: 94 ^{0C} ----- 10 min. 35 cycle: 94 ^{0C} ----- 45 s 55 ^{0C} ----- 70 s 66 ^{0C} ----- 45 min	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>vacA m2</i>	1 cycle: 94 ^{0C} ----- 10 min. 35 cycle: 94 ^{0C} ----- 45 s 55 ^{0C} ----- 70 s 66 ^{0C} ----- 45 min	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>i vacA s1a</i>	1 cycle: 94 ^{0C} ----- 10 min. 35 cycle: 94 ^{0C} ----- 45 s 55 ^{0C} ----- 70 s 60 ^{0C} ----- 45 min	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>vacA s1b</i>	1 cycle: 94 ^{0C} ----- 10 min. 35 cycle: 94 ^{0C} ----- 45 s 55 ^{0C} ----- 70 s 60 ^{0C} ----- 45 min	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template
<i>vacA s2</i>	1 cycle: 94 ^{0C} ----- 10 min. 35 cycle: 94 ^{0C} ----- 45 s 55 ^{0C} ----- 70 s 60 ^{0C} ----- 45 min	2.5 μL PCR buffer 10X 2 mM MgCl ₂ 1 μL dNTP (Fermentas) 1 μM of each primers F & R 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 2.5 μL DNA template

یافته‌ها

در این تحقیق از ۳۰۰ کودک مورد بررسی که در محدوده سنی ۲-۹ سال قرار داشتند، ۵۰ نفر (۱۶/۶۶٪) در بررسی‌های سرولوژیک از نظر وجود آنتی بادی IgG علیه هلیکوباکتر پیلوری مثبت تشخیص داده شدند. از ۵۰ کودک که دارای واکنش سرولوژی مثبت بودند، ۲۳ نفر دختر و ۲۷ نفر پسر بودند آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در جنس دختر ۴۶٪ و در جنس پسر ۵۴٪ برآورد گردیده. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است. میانگین سنی کودکان مورد مطالعه در تحقیق ما ۵/۶۴ بود که به ۳ گروه سنی ۲-۴ سال، ۴-۶ سال و ۶-۹ سال طبقه‌بندی شدند. بیش‌ترین فراوانی آلودگی در گروه سنی ۶-۹ سال در جنسیت دختر ۱۴٪ و در جنسیت پسر ۳۰٪ برآورد گردید در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA ارتباط معنی داری بین جنسیت و گروه سنی مشاهده نگردید ($P=0.093 > 0.05$). نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳: فراوانی و نسبت درصد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در دو جنس دختر و پسر

جنسیت	تعداد و درصد موارد مثبت (N=۵۰)
دختر	۲۳ (۴۶٪)
پسر	۲۷ (۵۴٪)

جدول ۴: فراوانی و درصد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در گروه‌های سنی مورد بررسی

گروه سنی	دختر	پسر	تعداد کل
۲-۴	۴ (۸٪)	۶ (۱۲٪)	۱۰ (۲۰٪)
۴-۶	۸ (۱۶٪)	۱۰ (۲۰٪)	۱۸ (۳۶٪)
۶-۹	۷ (۱۴٪)	۱۵ (۳۰٪)	۲۲ (۴۴٪)
مجموع	۱۹ (۳۸٪)	۳۱ (۶۲٪)	۵۰ (۱۰۰٪)

در این تحقیق بر اساس تعداد افراد خانواده کودکان مورد بررسی در گروه‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ نفری تقسیم بندی شدند. کمترین میزان آلودگی در خانواده‌های ۷ و ۸ نفره (۴٪) و بیش‌ترین میزان آلودگی در خانواده‌های ۴ نفره (۴۲٪) برآورد گردید. بیشترین فراوانی مربوط به خانواده‌های ۴ عضوی و

کمترین فراوانی مربوط به خانواده‌های بیش از ۸ نفر بود. در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA ارتباط قابل ملاحظه‌ای بین تعداد افراد خانوار و عفونت با هلیکوباکتر پیلوری مشاهده نگردید ($P=0.06 > 0.05$). نتایج در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۵: فراوانی و درصد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری بر اساس تعداد افراد خانوار

تعداد افراد خانواده	دختر	پسر	تعداد کل
۳	۸ (۱۶٪)	۹ (۱۸٪)	۱۷
۴	۱۰ (۲۰٪)	۱۱ (۲۲٪)	۲۱
۵	۲ (۴٪)	۳ (۶٪)	۵
۶	۱ (۲٪)	۲ (۴٪)	۳
۷	۱ (۲٪)	۱ (۲٪)	۲
۸	۱ (۲٪)	۱ (۲٪)	۲
مجموع	۲۳ (۴۶٪)	۲۷ (۵۴٪)	۵۰

افراد مورد بررسی در این تحقیق بر اساس علائم بالینی از قبیل درد شکم، تهوع، بی‌اشتهایی، برگشت اسید معده، استفراغ و نفخ شکم نیز مورد بررسی قرار گرفتند که در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA ارتباط معنی داری بین آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری و علائم گوارشی مشاهده گردید ($P=0.002 < 0.05$). نتایج به تفکیک در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۶: فراوانی و درصد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری بر اساس علائم بالینی

علائم بالینی	دختر	پسر	تعداد کل
درد	۲ (۴٪)	۳ (۶٪)	۵
تهوع	۴ (۸٪)	۵ (۱۰٪)	۹
بی‌اشتهایی	۵ (۱۰٪)	۵ (۱۰٪)	۱۰
برگشت اسید معده	۴ (۸٪)	۵ (۱۰٪)	۹
استفراغ	۴ (۸٪)	۵ (۱۰٪)	۹
نفخ شکم	۴ (۸٪)	۴ (۸٪)	۸
جمع کل	۲۳ (۴۶٪)	۲۷ (۵۴٪)	۵۰

های ۹ و ۱۰ نشان داده شده است فراوانی آلل $s2/m2$ درجنس دختر در گروه های سنی مختلف در ۱۴ مورد و در جنس پسر در ۱۸ مورد گزارش گردید... نتایج در جدول ۱۱ نشان داده شده است.

جدول ۱۰: فراوانی آلل $s2/m1$ درجنس دختر و پسر در گروه های سنی

$s2/m1$	۲-۴ (%)	۴-۶ (%)	۶-۹ (%)	جمع کل
دختر	۰	۰	۱	۱
پسر	۰	۰	۱	۱

جدول ۱۱: فراوانی آلل $s2/m2$ درجنس دختر و پسر در گروه های سنی

$s2/m2$	۲-۴ (%)	۴-۶ (%)	۶-۹ (%)	جمع کل
دختر	۲	۳	۹	۱۴
پسر	۲	۴	۱۲	۱۸

جدول ۱۲: علائم بالینی در ژنوتیپ های مختلف در جنس پسر و دختر

علائم بالینی	ژنوتیپ	دختر	پسر
درد	$s1a/m2$	۰	۰
	$s1b/m2$	۰	۰
	$s2/m1$	۰	۰
	$s2/m2$	۲	۳
تهوع	$s1a/m2$	۱	۰
	$s1b/m2$	۰	۰
	$s2/m1$	۰	۰
	$s2/m2$	۳	۲
بی اشتها	$s1a/m2$	۰	۰
	$s1b/m2$	۰	۰
	$s2/m1$	۰	۰
	$s2/m2$	۱	۵
برگشت اسید معده	$s1a/m2$	۱	۰
	$s1b/m2$	۰	۰
	$s2/m1$	۱	۱
	$s2/m2$	۶	۷
استفراغ	$s1a/m2$	۰	۱
	$s1b/m2$	۱	۱
	$s2/m1$	۰	۰
	$s2/m2$	۳	۳
نفخ شکم	$s1a/m2$	۰	۰
	$s1b/m2$	۰	۰
	$s2/m1$	۰	۰
	$s2/m2$	۳	۲
جمع کل		۱۸	۲۲

جدول ۷: فراوانی و نسبت درصد ژن $vaca$ در افراد دارای واکنش PCR مثبت

جنسیت	تعداد و درصد موارد مثبت
دختر	۱۸ (۴۵٪)
پسر	۲۲ (۵۵٪)
جمع کل	۴۰ (۱۰۰٪)

در این تحقیق پس از انجام آزمون PCR به منظور تشخیص قطعی هلیکوباکتر پیلوری در حضور توالی $16SrRNA$ ژن $vaca$ از ۵۰ نمونه سرم مثبت در ۴۰ نمونه مثبت تشخیص داده شدند نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. فراوانی ژن $vaca$ درجنسیت دختر ۴۵٪ و در جنسیت پسر فراوانی این ژن ۵۵٪ گزارش گردید. نتایج در جدول ۷ و شکل ۲ نشان داده شده است. در بین آلل های مورد بررسی ژن $vaca$ بیشترین فراوانی مربوط به آلل $s2/m2$ گزارش گردید به طوری که در جنسیت دختر در ۱۸ نمونه (۳۵٪) و در جنسیت پسر در ۲۲ نمونه (۵۵٪) گزارش گردید. نتایج در جدول ۸ نشان داده شده است.

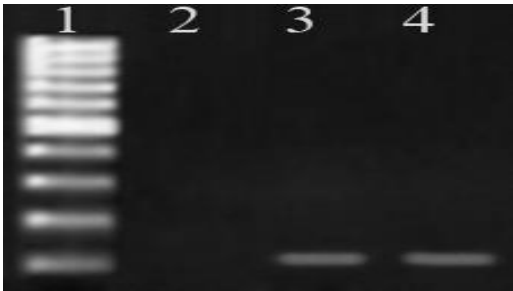
جدول ۸: فراوانی و نسبت درصد آلل های ژن $vaca$ در افراد دارای واکنش PCR مثبت

$vaca$	دختر (%)	پسر (%)	تعداد کل (%)
$s1a/m2$	۱	۱	۲
$s1b/m2$	۲	۲	۴
$s2/m1$	۱	۱	۲
$s2/m2$	۱۴	۱۸	۳۲
جمع کل	۱۸	۲۲	۴۰

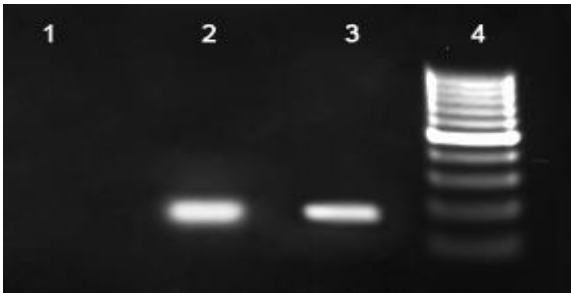
جدول ۹: فراوانی آلل $s1a/m2$ درجنس دختر و پسر در گروه های سنی

$s1a/m2$	۲-۴ (%)	۴-۶ (%)	۶-۹ (%)	جمع کل
دختر	۰	۰	۱	۱
پسر	۰	۰	۱	۱

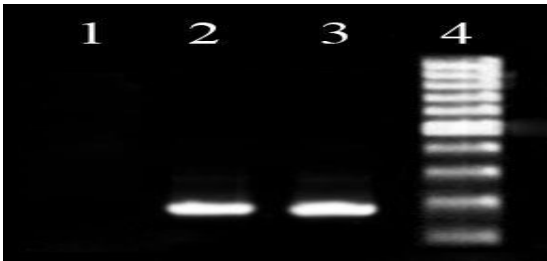
در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA ارتباط معنی داری بین جنسیت و آلل های $vaca$ ($P=0.25>0.05$). ارتباط معنی داری مشاهده نگردید. فراوانی آلل های $s2/m1$ و $s1a/m2$ در دو جنس دختر و پسر در گروه سنی ۶-۹ سال در یک مورد (۲/۵٪) گزارش گردید. نتایج در جدول



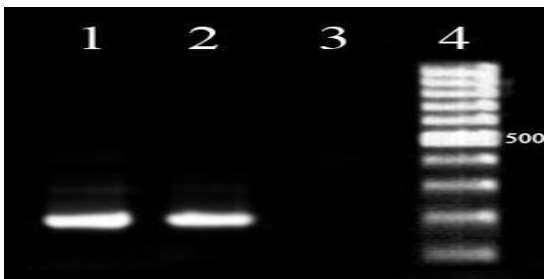
شکل ۲: ژل حاصل از PCR ژن *vacA* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱ مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)، ستون ۲ کنترل منفی، ستون‌های ۳ و ۴ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *vacA*



شکل ۳: ژل حاصل از PCR ژن *cagA* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *cagA*، ستون ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)



شکل ۴: ژل حاصل از PCR ژن *vacA s1a* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱: کنترل منفی، ستون‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *vacA s1a* ستون ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)

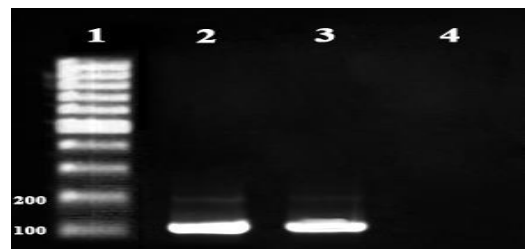


شکل ۵: ژل حاصل از PCR ژن *vacA s2* هلیکوباکتر پیلوری. ستون‌های ۱ و ۲ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *vacA s2*. ستون ۳ کنترل منفی، ستون ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)

جدول ۱۳: فراوانی و نسبت درصد ژن *cagA* در افراد دارای واکنش PCR مثبت

جنسیت	تعداد و درصد موارد مثبت	تعداد و درصد موارد منفی
دختر	۲ (%۴)	۲۱ (%۴۲)
پسر	۳ (%۶)	۲۴ (%۴۸)
جمع کل	۵ (%۱۰)	۴۵ (%۹۰)

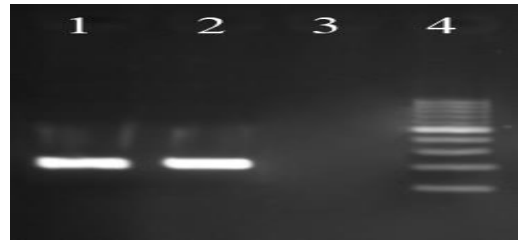
فراوانی آلل *s2/m2* در جنسیت دختر با علائم درد شکم در ۲ مورد و در جنسیت پسر با علائم درد شکم در ۲ مورد گزارش گردید و سایر آلل‌ها گزارش نگردیدند. فراوانی آلل *s2/m2* در جنسیت دختر با علائم تهوع در ۳ مورد و در جنسیت پسر با علائم تهوع در ۲ مورد گزارش گردید و سایر آلل‌ها گزارش نگردیدند. فراوانی آلل *s2/m2* در جنسیت دختر با علائم بی‌اشتهایی در ۱ مورد و در جنسیت پسر در ۵ مورد گزارش گردید و سایر آلل‌ها گزارش نگردیدند. فراوانی آلل *s2/m2* در جنسیت دختر با علائم برگشت اسید معده در ۶ مورد و در جنسیت پسر در ۷ مورد گزارش گردید. فراوانی آلل *s2/m2* در جنسیت دختر با علائم استفراغ در ۳ مورد و در جنسیت پسر در ۳ مورد گزارش گردید. فراوانی آلل *s2/m2* در علائم نفخ شکم در ۳ مورد و در جنسیت پسر با ۲ مورد گزارش گردید. نتایج در جدول ۱۲ نشان داده شده است. در صورتی که ژن *cagA* تنها در ۵ نمونه ژن تشخیص داده شد. مشاهده باند ۱۸۳ جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن این تست است. نتایج در جدول ۱۳ و شکل ۳ نشان داده شده است. شکل‌های PCR مربوط به آلل‌های *s1a*، *s1b*، *s2*، *m1* و *m2* در شکل‌های ۴-۸ نشان داده شده است.



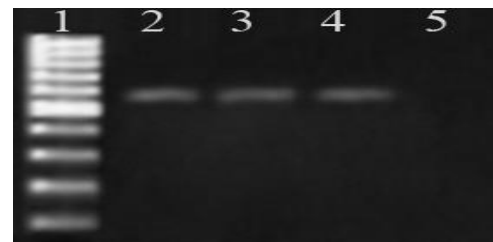
شکل ۱: ژل حاصل از PCR ژن *16SrRNA* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱ کنترل منفی، ستون‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مثبت از نظر ژن *16SrRNA*. ستون ۴ مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز

زمانی با هلیکوباکتر پیلوری در ۹۰٪ موارد سرطان معده شامل لنفوم های معده وجود دارد (۱۵). در کشورهای در حال توسعه ارگانسیم در اوایل کودکی فرد را مبتلا می کند طوری که میزان آن تا ۱۰ سالگی ۶۰-۵۰٪ و در بزرگسالی تا ۹۰٪ می رسد. برخلاف این، در کشورهای توسعه یافته میزان شیوع عفونت در کودکان بسیار کم و با افزایش سن شیوع تدریجی دارد طوری که میزان آن تا ۲۰ سالگی به ۳۰-۲۰٪ و تا ۶۰-۵۰ سالگی به ۵۰٪ می رسد. شیوع عفونت هم چنین به عوامل دیگری هم چون نژاد، جنس، موقعیت جغرافیایی، سطح تحصیلات و درآمد جاری و نیز شرایط اقتصادی - اجتماعی دوران کودکی از قبیل شلوغی، بهداشت ضعیف و تماس نزدیک با افراد عفونی فاکتور خطر مهمی محسوب می شود (۱۵). عوامل دیگری چون فقر، مشکلات اجتماعی، زندگی در مکان های شلوغ مانند پانسیون ها، سربازخانه ها و عفونت خوشه ای بین خانواده ها با حضور یک کودک مبتلا به عفونت، هم چنین محرومیت های اجتماعی و خانواده های پر جمعیت، پزشکان و پرستارانی که با بیماران گوارشی سر و کار دارند و نیز بین مادران و کودکان که از ظروف مشترک استفاده می نمایند به صورت انتقال دهان به دهان، همه می تواند از عوامل خطرزای عفونت باشد (۱۶). عفونت در جمعیت های بدون امکانات فاضلاب نیز دیده شده است و هلیکوباکتر پیلوری را توانسته اند از مخاط معده حیوانات اهلی چون گربه و خوک جدا کنند، بنابراین حیوانات می توانند به عنوان یک منبع عفونت باشند (۱۷). میزان شیوع عفونت ناشی از این باکتری در نقاط مختلف جهان، متفاوت است. در طی چند سال گذشته، مطالعات بسیاری برای شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در شهرهای مختلف ایران به روش های مختلفی صورت گرفته است. در بررسی حاضر میزان شیوع عفونت در اطفال در منطقه کرمانشاه، بر اساس تست سرولوژی، ۱۶/۶۶٪ برآورد گردید. در مطالعه انجام شده توسط Mohsenzadeh و همکاران که بر روی ۲۴۰ نمونه کودک مبتلا به اسهال صورت گرفت، ۱۶/۷٪ از نظر وجود آنتی بادی علیه هلیکوباکتر پیلوری مثبت تشخیص داده شدند که با نتایج سرولوژی تحقیق ما مشابه می باشد. در این مطالعه بین ابتلا به هلیکوباکتر پیلوری و بروز اسهال رابطه معنی داری به دست نیامد (۱۸).

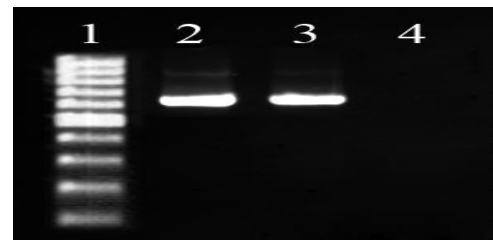
در مطالعه انجام شده توسط Rafeey و همکاران که بر روی ۱۰۰ کودک زیر ۱۶ سال با علائم گاستریت و زخم معده صورت گرفت، ۶۰٪ بیماران از نظر عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بیوپسی



شکل ۶: ژل حاصل از PCR ژن *vacA s1b* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱: کنترل منفی، ستون های ۲ و ۳ نمونه های مثبت از نظر ژن *vacA s1a* ستون ۴: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)



شکل ۷: ژل حاصل از PCR ژن *vacA m1* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز، ستون های ۲، ۳، ۴ نمونه های مثبت از نظر ژن *vacA m1* ستون ۵ کنترل منفی.



شکل ۸: ژل حاصل از PCR ژن *vacA m2* هلیکوباکتر پیلوری. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)، ستون های ۲ و ۳ نمونه های مثبت از نظر ژن *vacA m2*. ستون ۴: کنترل منفی.

بحث

عفونت هلیکوباکتر پیلوری شایع ترین بیماری باکتریال معده روده ای در سرتا سرجهان است. این عفونت در ۹۵٪ از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه و در ۸۰-۷۰٪ از بیماران مبتلا به زخم معده دیده می شود. تقریباً ۱۷٪ از افراد هلیکوباکتر پیلوری مثبت، مبتلا به زخم می شوند و هر ساله ۲-۱٪ از این افراد مبتلا به خونریزی، سوراخ شدگی و یا انسداد خروجی معده می شوند. در سوراخ شدگی بدون زخم حدود ۵۰٪ از بیماران مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری می باشند مطالعات نشان داده که عفونت هم

در مورد فراوانی آلل های ژن *vacA* نتایج به دست آمده از کشورهای جهان کاملاً متفاوت است. بر اساس مطالعات *Lopea* و همکارانش از مکزیک سوش غالب *s1b/m1* معرفی گردید (۲۳). *Chang* و همکارانش از کشور چین آلل های *s1*، *s2*، *m1* و *m2* را روی ۹۷ نفر بررسی کردند. آن ها سوش غالب در این مناطق را *s1/m* معرفی نمودند و ارتباط معنا داری بین این ژنوتیپ و بیماری های گاستروانتریتی یافتند (۲۴). *Khayat* و همکارانش از کشور لبنان به بررسی آلل های *s1a*، *s1b*، *s1c* و *s2* روی ۷۱ بیمار پرداختند. فراوانی آلل *s1a* بیش از سایر آلل ها گزارش گردید (۲۵). در سال ۲۰۰۸ نیز *Micivleviciene* و همکارانش از لیتوانی *s1a*، *s1b*، *s1c*، *m1* و *m2* را روی ۸۱ بیمار بررسی کردند. سوش غالب در منطقه آن ها نیز *s1a/m2* بود. این گروه بین آلل *s1* و بیماری PUD ارتباط قابل ملاحظه ای پیدا کردند (۲۶). در کشور نیجریه نیز *Smith* و همکارانش روی ۴۰ بیمار آلل های *s1*، *s2*، *m1* و *m2* را بررسی نمودند و سوش غالب را *s1/m2* معرفی کردند. این گروه ارتباط قابل قبولی بین آلل های *vacA* و بیماری های گوارشی پیدا نکردند (۲۷). در کشور انگلستان *Vandoorn* و همکارانش مطالعات زیادی روی *vacA* به تنهایی انجام دادند. در این مطالعه آلل *s1/m1* از بیشترین فراوانی برخوردار بود (۲۸). *Mattana* و همکارانش از کشور آرژانتین، *Zhang* و همکارانش از کشور سنگاپور، *Datta* و همکارانش از هندوستان *s1/m1* را به عنوان آلل غالب معرفی کردند (۲۹، ۳۰).

Molaei و همکارانش از تهران و *Jafari* و همکارانش آلل های *s1a*، *s1b*، *s1c*، *m1b*، *m1a*، *s2* و *m2* را به ترتیب روی ۱۶۶ و ۱۶۷ بیمار بررسی کردند. آن ها سوش غالب در این منطقه را *s1a/m2* معرفی کردند (۳۲، ۱). *Kamali* و همکاران ژنوتیپ *s1/m2* را به عنوان ژنوتیپ غالب معرفی نمودند (۳۳). *Nahaei* و همکارانش در تبریز به بررسی آلل های *s1a*، *s1b*، *s1c* و *m1b*، *m1a*، *s2* و *m2* بر روی ۱۵۰ بیمار پرداختند. آن ها سوش غالب را *s1a/m2* معرفی کردند و معتقد بودند که *s1* و *s2* شاخص هایی برای بیماری های PUD و NUD است (۳۴) در پژوهش حاضر که به بررسی آلل های *s1a*، *s1b*، *s1c*، *m1* و *m2* بر روی ۵۰ بیمار پرداخته ایم، سوش غالب *s2/m2* است که همین سوش در ارتباط با بیماری ها و علائم گوارشی می تواند باشد؛ که در تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA ارتباط معنی داری بین جنسیت و آلل های *vacA* ارتباط معنی داری

مثبت بودند در این مطالعه آزمون اوره آز با حساسیت ۵۸ و ویژگی ۹۰٪ به دست آمد. آزمون سرولوژی با حساسیت ۵۵ و ویژگی ۸۷٪ و آزمون آنتی ژن هلیکوباکتریپیلوری در مدفوع با حساسیت ۵۴/۸٪ و ویژگی ۷۹/۴٪ به دست آمد (۱۱). در مطالعه دیگری که توسط *Baghri* و همکاران بر روی ۶۷۶ فرد آلوده به هلیکوباکتر پیلوری در استان گلستان طی سال ۱۳۸۷ انجام گرفت، وجود آنتی بادی IgG ضد *CagA* به روش الیزا ۵۷/۷٪ گزارش شد (۱۹). از ۵۰ نمونه مورد بررسی در این تحقیق ۲۳ نمونه (۴۶٪) مربوط به جنسیت دختر و ۲۷ نمونه (۵۴٪) مربوط به جنسیت پسر بودند که تنها در ۱۰٪ از نمونه ها ژن *cagA* تشخیص داده شد که نسبت به تحقیقات سایر محققین از فراوانی کمتری برخوردار می باشد. میانگین سنی کودکان مورد مطالعه در تحقیق ما ۵/۶۴ بود که به ۳ گروه سنی ۲-۴ سال، ۴-۶ سال و ۶-۹ سال طبقه بندی شدند. بیشترین فراوانی آلودگی در گروه سنی ۶-۹ سال در جنسیت دختر ۱۴٪ و در جنسیت پسر ۳۰٪ برآورد گردید در تجزیه و تحلیل آماری ارتباط معنی داری بین جنسیت و گروه سنی مشاهده نگردید ($P=0.093>0.05$).

در این تحقیق بر اساس تعداد افراد خانواده کمترین میزان آلودگی در خانواده های ۷ و ۸ نفره (۴٪) و بیشترین میزان آلودگی در خانواده های ۴ نفره (۴۲٪) برآورد گردید. بیشترین فراوانی مربوط به خانواده های ۴ عضوی و کمترین فراوانی مربوط به خانواده های بیش از ۸ نفر بود. در تجزیه و تحلیل آماری ارتباط قابل ملاحظه ای بین تعداد افراد خانوار و عفونت با هلیکوباکتر پیلوری مشاهده نگردید.

افراد مورد بررسی در این تحقیق بر اساس علائم بالینی از قبیل درد شکم، تهوع، بی اشتها، برگشت اسید معده، استفراغ و نفخ شکم نیز مورد بررسی قرار گرفتند که در تجزیه و تحلیل آماری ارتباط معنی داری بین آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری و علائم گوارشی مشاهده گردید.

در بررسی *Alavi* و همکارانش در اهواز، *Mikail* و همکارانش از مازندران، *Rasmi* و همکارانش از اردبیل تعداد بیماران زن بیش از مرد گزارش گردید ولی در مطالعه *Jafari* و همکارانش از تهران تعداد مردان بیش از زنان گزارش گردید (۲۰، ۱-۲۰).

این که شیوع سوش های *cagA* مثبت ۷۶/۶٪ بود، ارتباط معنی داری بین عدم حضور این ژن با حضور آلل *s2* از ژن *vacA* وجود داشت (۳۳). در بررسی‌هایی انجام شده در این پژوهش، تنها در ۱۰٪ از نمونه‌ها ژن *cagA* تشخیص داده شد. به این ترتیب بر اساس مطالعات انجام شده در این منطقه می‌توان ژنوتیپ *vacAs2/m2* را غالب در نظر گرفت. هم چنین ادعان کرد که می‌تواند بیش‌ترین ارتباط با بیماری‌ها و علائم گوارشی در اطفال را داشته باشد. حضور ژن *cagA* به تنهایی شاخصی برای بیماری‌زایی این باکتری نیست.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و تقدیر را از کارشناس مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به عمل می‌آورند.

تعارض منافع:

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

مشاهده نگردید ($P=0.25>0.05$).. فراوانی آلل‌های ژن *vacA* در دو جنس دختر و پسر به تفکیک در جدول ۸ نشان داده شده است.

در حالی که Gatti و همکارانش از برزیل و Bindayana و همکارانش از کشور هندوستان فراوانی ژن *cagA* را به ترتیب ۷۰٪ و ۵۹٪ گزارش نمودند، (۳۵،۳۶). Bazargan و همکارانش از شیراز ژن *cagA* را در نمونه‌های PUD و NUD بررسی نمودند. ۸۲/۳٪ از نمونه‌های PUD و ۵۹/۹٪ از نمونه‌های NUD دارای ژن *cagA* بودند. آن‌ها معتقد بودند که این ژن با بیماری‌های PUD ارتباط بیشتری دارد و ممکن است در تشخیص بیماری‌زایی حائز اهمیت باشد (۱۶).

بر اساس گزارش Molaei و همکارانش از تهران، ۷۶/۷٪ از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری مثبت دارای ژن *cagA* بودند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که حضور ژن *cagA* به تنهایی با علائم کلینیکی و آلل‌های *vacA* در ارتباط نیستند (۳۲). Jafari و همکارانش نیز از تهران ارتباطی بین ژنوتیپ‌های هلیکوباکتر پیلوری و بیماری‌های کلینیکی نیافتند و *cagA* و *vacA* را شاخص‌های مناسبی برای پیش‌بینی بیماری‌های گوارشی ندانستند (۱). Kamali و همکارانش از شیراز با توجه به

References

- Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, Baghaei K, Yamaoka Y, Zojaji H, Molaei M, Zali MR. *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* in relationship to *cagA* status and clinical outcomes. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61(7): 290-293.
- Kargar M, Souod N, Ghorbani-Dalini S, Doosti A. Epidemiological evaluation of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastrointestinal disorders in Chahar Mahal and Bakhtiari province. *JFUMS*. 2012; 2 (4): 266-271.
- Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review. *Helicobacter*. 2004; 9 (7):115-23.
- Parsonnet J. *Helicobacter pylori*. *Infect Dis*.1998; 12 (1). 185-197
- Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL. Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun*. 1998; 66 (7): 3088-3094.
- Van Doorn L, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol*. 1998; 36 (5): 2597-2603.
- Doreghi M, Mohamadi M, Shirai MH, Esmaeili M, Baba beyk M, Saberi Kashani S, Aghlaei A, Mohajerani N. Relationship between *cagA* gene and Gastrointestinal Disorders in patients with *h. pylori*. *Iran J Med Microbiol*. 2009; 2 (1): 31-36.
- Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *Embo J*. 2003; 22 (3): 515-528.

9. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c- Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mole Microbiol*. 2002; 43 (4): 971-980.
10. Bitzan MM, Gold BD, Philpott DJ, Mortin M, Karch H, Clifford A. Inhibition of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* binding receptors by bovine colostrum. *J Infect Dis*. 1998; 177 (4):955-961.
11. Rafeey M, Abdinia B MD. Comparison of invasive with noninvasive diagnostic tests of *Helicobacter pylori* in children. *ZJRMS*. 2005; 2: 125-130.
12. Momtaz H, Souod N, Dabiri H, Sarshar M. Study of *Helicobacter pylori* genotype status in saliva, dental plaques, stool and gastric biopsy samples. *World J Gastroenterol*. 2012; 7: 18(17): 2105-2111.
13. Sicinschi LA, Correa P, Bravo LE, Peek RM, Wilson KT, Loh JT, Yepez MC, Gold BD, Thompson DT, Cover TL, Schneider BG. Non-invasive genotyping of *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, and *hopQ* from asymptomatic children. *Helicobacter*. 2012; 17(2): 96-106.
14. Krashias G, Bashiardes S, Potamitou A, Potamitis GS, Christodoulou Gh. Prevalence of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genes in Cypriot patients. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 7(9):642-650.
15. Mansour-Ghanaei F, Yousefi M, Joukar F. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children in Rasht, Northern Iran. *MEJDD*. 2009; 1(2): 84-88.
16. Bazargani A, Ekrami A, Bassiri E, Saber Firoozi M. Frequency of *cagA* in *Helicobacter pylori* isolates of patients with peptic ulcer disease (PUD) and none ulcer dyspepsia (NUD) at Namazi hospital, Shiraz. Iran. *Govaresh*. 2005; 10 (2): 116-119.
17. Klein PD, Gilman RH, Leon-Barua R, Diaz F, Smith EO, Graham DY. The epidemiology of *Helicobacter pylori* in Peruvian children between 6 and 30 months of age. *Am J Gastroenterol*. 1994; 89 (7): 2196-2200.
18. Mohsen zadeh A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children with acute diarrhea and its association with diarrhea. *Yafteh*. 2013; 14(2): 37-43.
19. Bagheri H, Ghaesemi Kebria F, Semnani Sh, Livani S, Rafiei S, Behnampour N, Ghaemi E. The frequency of Anti- Cytotoxin associated Gene A (CagA) antibody in Golestan province of Iran. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2010; 12 (3): 74-78.
20. Alavi M, Adel M, Rajabzadeh H. Seroprevalance study of *Helicobacter pylori* infection among visitors of cardiac patients in Razi hospital in Ahwaz, Iran. *JJM*. 2010; 3(1): 28-31.
21. Mikail J, Malekzadeh R, Ziadalizadeh B, Valizade Toosi M, Khoncheh A, Masserat S. Prevalence of *Helicobacter pylori* in two Iranian provinces with high and low incidence of gastric carcinoma. *Tehran Univ Med J*. 1999; 57(1): 34-38.
22. Rasmi Y, Sadreddini M, Shahsavari Z, Sadredin M. Prevalence of *Helicobacter pylori* and *cagA* gene in Iranian patients with none-erosive and erosive reflux disease. *Indian J Med Sci*. 2009; 63(3): 402-407.
23. Lopea-Vidal Y, Leon S, RogasG, Zuriga R, Delgadillo A. High diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* genotypes in patients with and without gastric cancer. *Plos One*. 2008; 3(12):1-7.
24. Chang Y, Wang L, Lee M, Cheng CW, Wu CY. Genotypic characterization of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* from biopsy specimens of patients with gastroduodenal diseases. *Mt Sinai J Med*. 2006; 73(3): 622-626.
25. Khayat A, Soweid A, Katte M, Tahwil A, Elhaji A. Prevalence and clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genes in Lebanese patients with gastritis and peptic ulcer diseases. *J Infect Dev Ctries*. 2007; 1(1): 55-61.
26. Micivleviciene J, Calkauskas H, Jonaitis L, Kiadelis G, Tamosiunas V, Praskevicius A, Berg D. *Helicobacter pylori* genotypes in Lithuanian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer. *Medicina*. 2008; 44(6): 449-454.
27. Smith S, Kirsch Ch, Oyedeji K, Arigbabu A, Coker A, Bayerdoffer E, Miehle S. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol*. 2002; 51: 851-854.
28. Van Doorn N, Namavar F, Van Doorn L, Durrani Z, Kuper S.E, Vandenbrocke C. Analysis of *vacA*, *cagA* and *is605* genotypes and those determined by PCR amplification of DNA between repetitive sequence of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with nonulcer dyspepsia or mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Microbiol*. 1999; 37 (7): 2348-2349.

29. Mattana C, Vega A, Escobar F, Sabini L, Zanon S. Genotypic, phenotypic and clinical characteristics of isolates of *Helicobacter pylori* from San Luis, Argentina. *Folia Microbiol.* 2007; 52(5): 519-524.
30. Datta S, Chattopadhyay S, Balatrish G, ukhopadhyay A.K, Hembram J, Duglas E, Saha R, Santra A. Virulence genes and neutral DNA markers of *Helicobacter pylori* isolates from different Ethnic communications of West Bengal, India. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(8):3737-3743.
31. Zheng P, Hva J, Yeoh K, Ho B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigen but not *cagA*, *iceA* and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asia population. *Gut.* 2000; 47: 18-22.
32. Molaei M, Foroughi F, Mashayekhi R, Jafari F. *Helicobacter pylori cagA* status *vacA* subtypes and histopathologic findings in Iranian patients with chronic gastritis. *Iranian j Path.* 2009; (1):19-25.
33. Kamali-Sarvestani E, Bazargani A, Masudian M, Lankarani K, Taghavi AR, Saberi Firoozi M. Association of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genotypes and IL-8 gene polymorphism with clinical outcomes of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World j Gastroenterol.* 2006; 12(32): 5205-5210.
34. Nahaei M, Sharifi Y, Taghi Akhi M, Asgharzadeh M, Fatahi E. *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genotypes and their relationship to peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. *Research J Microbiol.* 2008; 3(5): 386-394.
35. Gatti L, Labio R and Payao S. *cagA*- positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. *Braz J Infect Dis.* 2006; 10(4): 254-258.
36. Bindayna KM, Al Baker WA, Botta GA. Detection of *Helicobacter pylori cagA* gene in gastric biopsies, clinical isolates and faeces. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24(3): 195-200.