تنوع ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش تایپینگ سکانس در چند لوکوس ژنی

سارا صیادی[۱]، لیلا شکرزاده[۲]، مسعود ال بویه[۳]، مجتبی داربویی[۴]، حسین دبیری[۵]، محمدرضا زالی[۶*]

۱ دکترای میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه میکروبیولوژی ، فارس، ایران
۲ کارشناس ارشد میکروبیولوژی مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳ دکترای باکتری شناسی پزشکی مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴ دکترای ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه میکروبیولوژی ، فارس، ایران
۵ دکترای باکتری شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۶ فوق تخصص گوارش و کبد مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان تابناک، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، تلفن: ۰۹۱۲۵۱۳۱۴۹۰، sara_sayyady@yahoo.com

دریافت مقاله: اسفند نود و دو پذیرش برای چاپ: اردیبهشت نود و سه

چکیده

سابقه و هدف: *هلیکوباکتر پیلوری عامل ایجاد کننده گاستریت مزمن و اولسر پپتیک بوده و به عنوان پاتوژن مهم ایجاد کننده بیماری های گاسترودئودنال مطرح می باشد. مقاومت به داروهای ضد میکروبی علت اصلی ناکارامدی درمان و کاهش میزان ریشه کنی در بسیاری از کشورها است. این مطالعه با هدف تایپینگ مولکولی ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری با استفاده از روش تایپینگ بر اساس سکانس چندین لوکوس(MLST) ، که مطمئن ترین روش تایپینگ بر اساس سکانس ژنوم است، صورت گرفت.*

روش کار: *چهل ایزوله هلیکوباکتر پیلوری از بیوپسی گاستریت بیماران بالای ۱۸ سال جدا شد. DNA ژنومی ایزوله های فوق استخراج شده و برای PCR ژن های ppa, yphC, trpC, efp, mutY, atpA, glmM و ureI به کار برده شد. محصول PCR تمامی ژن ها به جز glmM برای تعیین توالی فرستاده شدند. سپس با استفاده از نرم افزارهای مناسب بیوانفورماتیکی آنالیز شده و با سکانس ایزوله های سایر کشورها مقایسه گردید.*

یافته ها: *بر اساس نتایج حاصل از MLST ایزوله ها بسیار متنوع و متفاوت از الگوی ایزوله های سایر کشورها بودند.*

نتیجه گیری: *بر اساس ST های متفاوت به دست آمده از روش MLST در این تحقیق، ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری در ایران بسیار متنوع بوده که می تواند به علت مکانیسم های متعدد تبادل DNA در این باکتری باشد.*

واژگان کلیدی: *هلیکوباکتر پیلوری، تایپینگ مولکولی، تنوع ژنتیکی*

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری از بدو تولد می تواند فرد را آلوده کند و به نظر می رسد که تا کنون بیش از نیمی از مردم دنیا را درگیر کرده باشد(۱و۲). عفونت معمولا در طی دوران کودکی توسط انتقال درون خانواده ها رخ می دهد و در طول زندگی باقی مانده، تا زمانی که درمان آنتی بیوتیکی برای درمان و ریشه کنی آن صورت گیرد(۳و۴). مقاومت های آنتی بیوتیکی باکتری فوق هم روز به روز در حال افزایش است. بیماری زخم معده و سایر بیماری های وابسته به باکتری فوق معمولا یا پس از درمان کامل عفونت برطرف شده یا عود می یابد(۵و۶). میزان شیوع هلیکوباکتر پیلوری از ۲۵٪ در کشورهای توسعه یافته تا بیش از ۸۰٪ در مناطق در حال توسعه می باشد(۷و۸).

این باکتری عموما از طریق دهانی منتقل می شود و به عنوان یک باکتری است که تنوع و فرکانس نوترکیبی بالای آن به خوبی شناخته شده است. آنالیز سکانس DNA برای ژنهای house keeping و ژنهای ویرولانس نشان می دهد که درجه بالایی از تنوع ژنتیکی در میان سویه های این باکتری دیده می شود(۸و۹). تنوع ژنتیکی هلیکوباکتر پیلوری بر اساس مناطق جغرافیایی و جمعیت های مختلف بسیار متنوع می باشد بنابراین لزوم انجام مطالعات منطقه ای و برقراری ارتباط آن با سایر مناطق جغرافیایی ضروری می باشد. عفونت های مربوط به هلیکوباکتر پیلوری متنوع بوده و نیاز به درمان آنتی بیوتیکی دارد و از آنجا که مقاومت به دارو در آن دیده شده است و در حال افزایش است بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های آلوده کننده بیماران ضروری می باشد. در نقاط مختلف ایران شیوع ۹۰ درصدی هلیکوباکتر پیلوری را در بین افراد بالای ۳۵ سال نشان دادند(۱۰). در یک مطالعه که در اردبیل(شمال غرب ایران) انجام شد وجود باکتری در ۹۰٪ از افراد نرمال بالای ۴۰ سال اثبات شد(۱۱).

همان طور که در کشورهای در حال توسعه هلیکوباکترپیلوری اغلب جمعیت را آلوده می کند در ایران هم ۹۰٪ افراد دارای باکتری فوق می باشند(۱۰). در مطالعه دیگری در کودکان که در شیراز و توسط البرزی انجام شد شیوع باکتری ۸۲٪، ۹۸٪، ۸۸٪، ۸۹٪ و ۵۷٪ به ترتیب در سنین بالای ۹ ماه و ۲، ۶،۱۰ و ۱۵ سال بوده است. در مطالعه فوق شناسایی عفونت با الایزا و تشخیص آنتی ژن در مدفوع انجام شد(۱۲).

در تحقیق حاضر برای روشن شدن رابطه بین سویه ها با هم، به تایپینگ مولکولی سویه های جدا شده از بیماران پرداخته شد. این روش تایپینگ بر اساس توالی DNA بوده و از مطمئن ترین روش های تایپینگ مولکولی به شمار می رود.

روش کار

در این پژوهش، تعداد ۴۰ ایزوله هلیکوباکتر پیلوری از نمونه های بیوپسی بیماران بررسی شد. این نمونه ها ازبخش آندوسکوپی بیمارستان طالقانی و از مطب نویسنده مسئول مقاله جمع آوری گردید. قطعه بیوپسی این افراد درون محیط ترانسپورت تایو گلیکولات قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه ها به سرعت و ظرف حداکثر ۲ ساعت برای کشت آماده شده و اگر زمان انتقال بیشتر بود در سرما منتقل شدند. هم زمان تست اوره آز سریع هم از بیماران گرفته شد. نمونه ها با فاصله زمانی کم به محیط آزمایشگاه منتقل گردید ودر شرایط استریل روی محیط بروسلا بلاد آگار (Merck) که حاوی ۷٪ خون اسبی،۱۰٪ سرم جنین گوساله ، آمفوتریسین B (5µg/l) [Sigma-Aldrich,USA] ومکمل انتخابی کمپیلوباکتر (ونکومایسین۲.۰ mg، پلی میکسین 0.05mg، تری متوپریم 1 mg (Merck, Homburg, Germany)) بود ، کشت داده شد. پس از گرماگذاری در شرایط میکروائروفیل نمونه ها تا دو هفته تحت شرایط فوق نگهداری شدند تا کلنی ها ظاهر گردند. سپس شناسایی ایزوله ها با تست اوره و واکنش زنجیره ای پلیمراز برای ژن glmM(ureC) که مخصوص تعیین جنس و گونه هلیکوباکتر پیلوری است انجام شد.

برای استخراج ژنوم باکتری از کیت استخراج DNA به نام QIAamp (QIAGEN, Hilden, Germany) مطابق دستور شرکت سازنده استفاده شد. با وجود قطعه ۲۹۵ جفت بازی از ژن فوق ،هویت باکتری به عنوان هلیکوباکتر پیلوری مورد تایید قرار گرفت. توالی پرایمر ژن glmM(ureC) forward 5′ GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG-3′and reverse 5′ GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC-3′ است. واکنش در یک ترموسایکلر (AG 22331; Eppendorf, Hamburg, Germany) انجام شد.به منظور انجام تایپینگ مولکولی، از هر یک از سویه های کشت شده، طی پاساژهای مکرر کلنی تک به دست آورده و این تک کلنی هاکشت مجدد داده شد به طوری که در پلیت نهایی تکثیری از یک کلنی وجود داشته باشد(همه کلنی های آن دارای جد مشترک باشند). برای انجام این روش تایپینگ می بایست ۷ ژن مربوط به MLSTباکتری تکثیر و سکانس می شد. این ژنها شامل efp, atpA, mutY, trpC, ppa, ureI, yphC بوده(۱۳،۱۴)، غلظت مواد واکنش طبق جدول(۱) است و توالی پرایمرها(جدول ۲) و برنامه دمایی برای هر پرایمر در ادامه آمده است(۱۵،۱۳).

جدول۱ . غلظت مواد واکنش دهنده در تست PCR

نام ماده	میزان مورد نیاز	غلظت اولیه	غلظت نهایی
PCR buffer	2.5	10x	1x
dNTP	0.5	10mM	0.2mM
$MgCl_2$	1	50mM	1.5mM
-F	0.5	100 µM	0.2µM
-R	0.5	100 µM	0.2 µM
Taq DNA polymerase	0.2	5u/µl	1u/µl
Template DNA	1	0.5µg/ µl	0.02µg/ µl
DdH_2O	19		

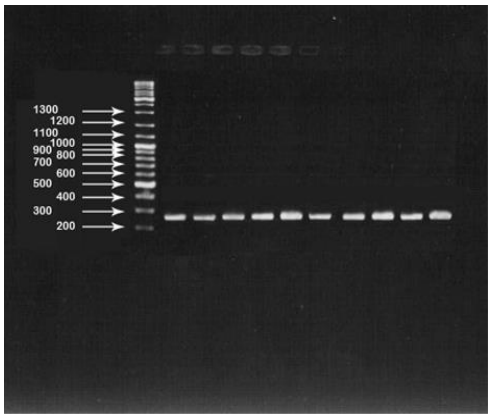
جدول ۲ .توالی پرایمرهای به کار رفته شده

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	محصول ژن	شماره نوکلئوتیدها از ابتدا تا انتهای محصول	اندازه محصول
atpA	F:GGACTAGCGTTAAACGCACG **R: CTTGAAACCGACAAGCCCAC**	ATP synthase F1alpha	۱۱۷۶۹۰۷..۱۱۷۷۷۴۲	جفت 835 باز
efp	F: GGCAATTTGGATGAGCGAGCTC **R: CTTCACCTTTTCAAGATACTC**	Elongation factor	۱۷۷۱۰۹..۱۷۷۶۵۷	جفت 548 باز
mutY	F:GTGGTTGTAGYTGGAAACTTTACAC **R: CTTAAGCGTGTGTYTTTCTAGG**	A/G specific adenine glycosilase	۱۴۶۶۶۸..۱۴۷۳۲۹	جفت 661 باز
ppa	F: TGGGGTTAARATCGTTAAATTG R: GGAGATTGCAATGAATTTAGA	Inorganic pyriphosphatase	۶۲۶۶۳۱...۶۲۷۳۴۲	جفت 711 باز
trpC	F:TAGAATGCAAAAAAGCATCGCCCTC **R: TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC**	Anthranilate isomerase	۱۳۳۳۳۷۴..۱۳۳۴۰۱۶	جفت 642 باز
ureI	F:AGGTTATTCGTAAGGTGCG **R:GTTTAAATCCCTTAGATTGCC**	Urease accessory protein	۷۲۲۲۰-۷۲۹۲۷	جفت 707 باز

پس از اتمام PCR و الکتروفورز محصول آن، به منظور تخلیص محصول و آماده سازی آن برای سکانس ازکیت High pure PCR product purification kit(Roche) استفاده شد. تعیین توالی نمونه ها به وسیله دستگاه ABI 3130xl sequencer انجام شد. سپس برای ویرایش سکانس ها از نرم افزارهای seqman, chromas, editseq استفاده شد. به این ترتیب می توان صدها توالی را align کرده و تفاوت ها وشباهت ها رامشاهده کرد.

یافته ها

در این مطالعه ۴۰ نمونه بیوپسی جدا شده از بیماران بیمارستان طالقانی تهران بررسی شد. در بین ۴۰ بیمار، یک نفر(۲،۵٪)دارای سرطان، دو نفر(۵٪) دارای اولسر، ۱۴ نفر(۳۵٪) مبتلا به گاستریت و دو نفر(۵٪) مبتلا به ازوفاژیت بود. برای تایید جنس و گونه هلیکوباکتر پیلوری تولید اوره از توسط باکتری و وجود ژن glmM در نمونه ها بررسی شد(عکس ۱).



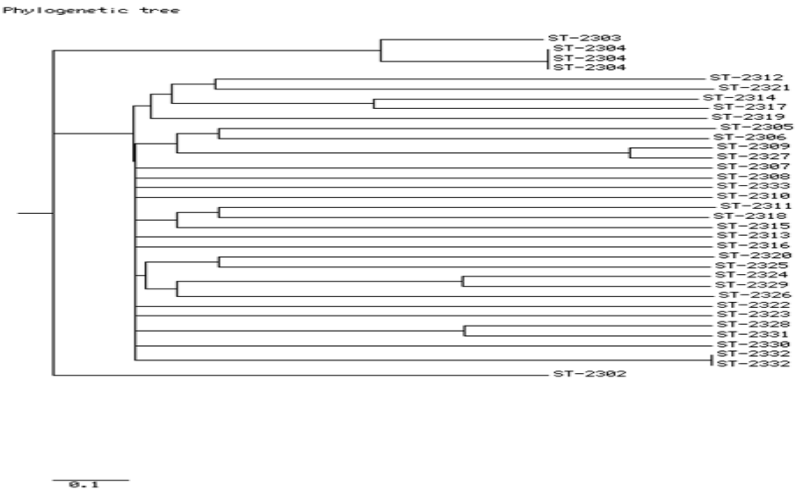
عکس ۱. محصول PCR ژن glmM : ستون اول از سمت چپ ladder ، ستون دوم تا یازدهم نمونه های دارای ژن glmM و ستون انتهایی سمت راست نمونه کنترل منفی می باشد.

برای انجام تایپینگ مولکولی از کشت خالص هر استرین استخراج ژنوم شده و برای ۷ ژن efp, atpA, mutY, trpC, ppa, ureI, yphC آن PCR و تعیین توالی انجام شد. به این ترتیب در این تحقیق برای ۲۸۰ ژن تعیین توالی انجام شد. سکانس ها به سایت www.pubmlst.org فرستاده شدند. در این سایت با استفاده از نرم افزارها، توالی ژنهای فرستاده شده، با توالی هایی که از تمام نقاط دنیا در سایت از قبل موجود بود، مقایسه شد وبرای هر کدام از ژنها شماره الل تعیین گردید جدول (۳).

جدول۳. شماره الل های به دست آمده با استفاده از سایت www.pubmlst.org

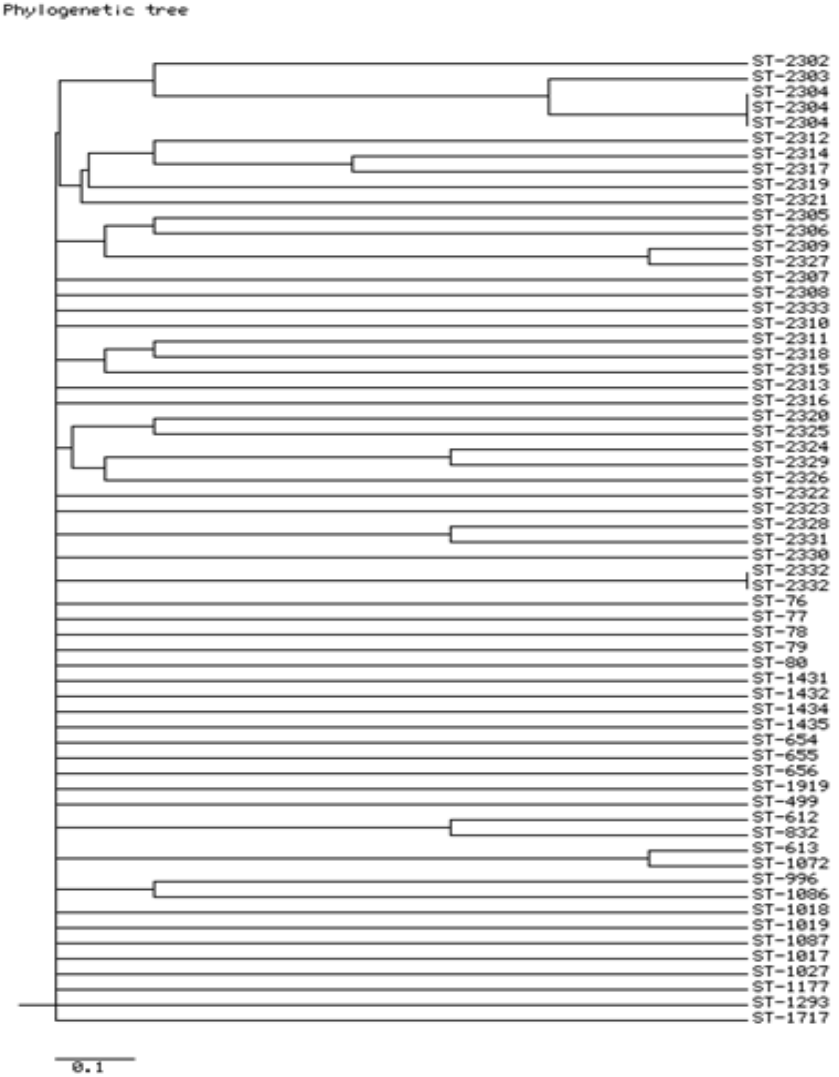
atpA	efp	mutY	ppa	trpC	ureI	yphC
1789	1848	1621	1904	2005	2041	2040
1790	1848	1995	1905	2006	1669	2041
1790	1848	1597	1905	2006	2042	2041
1790	1848	1597	1905	2006	2042	2041
1790	1848	1597	1905	2006	2042	2041
2054	1851	271	1988	2102	2044	2134
2055	1942	271	1909	2012	1680	2135
1971	1852	1983	71	2013	2045	2136
1632	1853	1649	1910	2014	2046	1705
1972	1854	1984	1911	2025	1680	2043
2056	1855	1985	1912	2015	2047	2045
2057	1850	1986	1989	2008	2043	2137
2058	1856	1987	1913	2103	2048	2053
2059	1857	1666	1990	2104	44	2052
2060	1500	2056	1991	2105	2139	2042
1973	1859	1981	1914	2020	1669	2052
1974	1520	2066	1915	2016	2140	2051
2061	1860	2067	1918	2017	2049	2138
2062	1859	1981	1919	2018	2050	2052
1975	1945	1988	1920	2019	2048	2051
2063	1861	1989	1921	2020s	2051	2139
2064	1527	1990	1922	2021	2052	2140
2065	1862	1991	1923	2022	44	2141
2066	1863	1982	1992	2031	2053	2044
2067	67	1992	1924	192	2054	2142
1976	1864	2068	1916	2023	2055	2143
1977	1865	1993	1917	2021	2055	2054
1978	1866	2069	1925	2024	1734	2046
1981	1867	1192	1994	2030	2058	2048
1789	1848	1621	1904	2005	2041	2040
2054	1851	271	1988	2102	2044	2134
1979	1944	2072	1926	2029	2057	2050

براساس این شماره الل ها به ازای هر استرین یک ST(sequence type) تعیین شد. با استفاده از نرم افزارهای موجود در سایت فوق بر اساس این ST ها دندروگرامی رسم گردید. دندروگرام حاصل از آنالیز سویه های هلیکوباکتر پیلوری بررسی شده در شکل (۱) آمده است(۱۵).



شکل ۱. دندروگرام حاصل از آنالیز سویه های هلیکوباکتر پیلوری بررسی شده در این تحقیق

برای مقایسه با توالی ایزوله های سکانس شده در کشورهای هم جوار دندروگرام دیگری به دست آمد که در آن سکانس های هلیکوباکتر پیلوری از کشورهای قزاقستان، لبنان، فلسطین و ترکیه هم راه با سکانس های به دست آمده در این تحقیق مقایسه شده اند(شکل۲).



شکل ۲. مقایسه سکانس سویه های هلیکوباکتر پیلوری بررسی شده در این تحقیق و هلیکوباکتر های کشورهای اطراف

بحث

هلیکوباکتر پیلوری، به عنوان یک پاتوژن مهم انسانی در دنیا مطرح بوده، شیوع این باکتری در ایران، همانند سایر کشورهای در حال توسعه، بالاتر از شیوع آن در کشورهای توسعه یافته است(۱۶).

در بیولوژی مولکولی، MLST تکنیکی برای تایپینگ باکتری ها در چندین لوکوس می باشد که در آن گونه های باکتریایی بر اساس تعیین توالی قطعات داخلی ژنهای housekeeping خود(معمولا ۶ ژن) دسته بندی می گردند. این قطعات داخلی تقریبا دارای طولی حدود ۴۵۰ تا ۵۰۰ جفت باز می باشند. ژن هایhousekeeping سازنده مواد اساسی و مورد نیاز سلول بوده و دائما در حال بیان شدن می باشند. از آن جایی که این ژن ها در طول زمان، کم تر دست خوش تغییرات ژنتیکی شده اند ابزار مناسبی برای تایپینگ مولکولی به شمار می روند. به ازای هر ژن housekeeping در هر ایزوله باکتریایی، سکانس متفاوتی وجود دارد(الل های مختلف) که پروفایل اللی و sequence type را تشکیل می دهند. از این روش اولین بار برای تیپ بندی نایسریا منتژیتیدیس ، عامل منتژیت و سپتی سمی استفاده شد(۱۵) . در این متد تغییرات تنوع ژنوم در ژنهای فوق به طور مستقیم مشخص شده و برای هر استرین یک پروفایل اللی منحصر به فرد تعریف می گردد. هلیکوباکتر پیلوری از نظر ژنتیکی نسبت به سایر گونه های باکتریایی دارای تنوع است(۱۷).

علت تفاوت بین ایزوله ها موتاسیون نقطه ای در ژن های حفاظت شده، وجود ژن های غیر حفاظت شده مانند cag ، وجود توالی های داخل شونده، پلازمیدها، موزائیسم ژنی، ناهمگونی سایز ژن ها و باز آرایی کروموزوم می باشد(۱۴). علت این تنوع شاید داستان تکاملی طولانی مدت باکتری، سطح بالای موتاسیون و انتقال مکرر افقی ژن ها بین استرین ها باشد(۱۴). هم چنین تنوع ژنتیکی منعکس کننده تنوع و تغییر محیط زندگی هلیکوباکتر پیلوری در میزبان باشد برای مثال افرادی که حامل هلیکوباکتر پیلوری بوده و در نهایت دچار تغییرات اتروفیک معده شده اند در ارتباط با کاهش تولید اسید معده می باشند(۱۴). به علاوه تنوع ممکن است نتیجه تجمع موتاسیون های پایدار که حاصل موتاسیون های خود به خودی و یا جذب افقی و یا ترکیب ژنوم هلیکوباکتر پیلوری های یک سان و یا متفاوت باشد. علاوه بر نکات ذکر شده در بالا هلیکوباکتر پیلوری ارگانیسمی است که به طور طبیعی توان دریافت DNA خارجی را طی پروسه کانجوگاسیون دارد(۱۴). هلیکوباکتر پیلوری به عنوان پاتوژن معده انسان احتمالا دارای تکامل هم زمان با میزبان خود است(۱۸) و به نظر می رسد که از میلیون ها سال قبل در معده انسان قرار دارد(۱۹). این امر اخیرا به عنوان یک مارکر بیولوژیکی قابل اعتماد برای تکامل هم زمان میزبان-پاتوژن و مهاجرت انسان اولیه مطرح است که بر اساس تنوع توالی در لوکوس ژن های خاصی می باشد.

میزان تنوع هلیکوباکتر پیلوری با توجه به اطلاعات ثبت شده در سایت www.pubmlst.net به اندازه ای است که تعداد پروفایل های ثبت شده سه برابر تعداد ایزوله ها می باشد. همان طور که در شکل ۱ دیده می شود در ایزوله های ایرانی هم تفاوت زیادی بین سویه ها وجود دارد. این امر در مورد هیچ یک از میکروارگانیسم های موجود در سایت دیده نمی شود. در بیشتر میکروارگانیسم ها تعداد پروفایل ها کمتر از تعداد ایزوله ها است که نشان دهنده تنوع ژنتیکی کم در میان آنها است. به همین ترتیب در نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز بیشتر ST ها از یک دیگر متفاوت می باشند. مقایسه استرین های ایرانی با سایر کشورها در قاره های مختلف نیز تفاوت فاحشی را بین آنها نشان داد.

همان گونه که در این شکل دیده می شود ST های۱۰۷۲متعلق به فلسطین و ۶۱۳ متعلق به لبنان، حدودا یک ژن با یکدیگرمتفاوت بوده اند. این دو ایزوله هم چنین مشابه ۲۳۰۹و۲۳۲۷ ایرانی می باشند. در واقع این چهار سویه از سه کشور تنها در یک ژن متفاوت و حدودا ۶ ژن یکسان دارند. این پدیده شاید به علت الگوی مهاجرتی افراد در این کشورها و ترکیب شدن سویه ها و ایجادژنوتیپ جدیدی باشد.

نتیجه گیری

باتوجه به تنوع ایزوله های جدا شده از بیماران به نظر می رسد که رعایت بهداشت فردی در افراد به خصوص میان خانواده ها در روند کاهش این تنوع و ایجاد سویه های جدید موثر بوده و هم چنین به ریشه کنی و درمان آنتی بیوتیکی آن هم کمک می کند. هم چنین می توان چنین تحقیقی را در بین جمعیت های مختلف از نظر جغرافیایی در ایران انجام داده و با مقایسه با کشورهای اطراف به نتایج کامل تری دست یافت.

REFERENCES

1. Covacci A, Telford JL, Giudice GD, Parsonnet J, Rappuoli R: Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science (1999), 284:1328-1333

2. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, te al. An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori. Nature (2007), 445:915-918

3. Mitchell HM: The epidemiology of Helicobacter pylori. In Gastroduodenal disease and Helicobacter pylori: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment Edited by: Nedrud JG, Westblom U, Czinn S. Heidelberg: Springer Verlag (1998); 11-30

4. Kuipers EJ, Israel DA, Kusters JG, Gerrits MM, Weel J, Ende A van der, Hulst RWM van der, Wirth HP, Höök-Nikanne JH, Thompson SA, et al.: Quasispecies development of Helicobacter pylori observed in paired Isolates obtained years apart from the same host. J Infect Dis (2000), 181:273-282

5. Bayerdorffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, and M. Stolte. 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of Helicobacter pylori infection. Lancet (1995) 345:1591-4

6. Sugiyama, T., N. Sakaki, H. Kozawa, R. Sato, T. Fujioka, K. Satoh, K. Sugano, H. Sekine, A. Takagi, Y. Ajioka, and T. Takizawa. Sensitivity of biopsy site in evaluating regression of gastric atrophy after Helicobacter pylori eradication treatment. Aliment. Pharmacol. Ther. (2002) 2:187-190.

7. Pounder RR: The prevalence of Helicobacter pylori in different countries. Aliment Pharmacol Ther (1995), 9:33-40

8. Parsonnet JE: The incidence of Helicobacter pylori infection. (1995)Aliment Pharmacol Ther, 9:45-52

9. Garner JA, TL C: Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin-producing Helicobacter pylori strains. J Infect Dis (1995), 172:290-293

10. Massarrat S, Saberi-Firoozi M, Soleimani A, Himmelmann GW, Hitzges M, Keshavarz H. Peptic ulcer disease, irritable bowel syndrome and constipation in two populations in Iran. Eur J Gastroenterol Hepatol (1995). 7: 427 – 33

11. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, Mikaeli J, Yazdanbod A, Merat S. Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the North-West of Iran. J Clin Pathol. (2004); 57: 37 – 42

12. Alborzi A, Soltani J, Pourabbas B, Oboodi B, Haghighat M, Hayati M, Rashidi M. Prevalence of Helicobacter pylori infection in children (south of Iran). Diagn Microbiol Infect Dis. (2006) 54(4):259-61

13- S Manjulata Devi, Irshad Ahmed, Aleem A Khan, Syed Asad Rahman, Ayesha Alvi1, Leonardo A Sechi and Niyaz Ahmed. Genomes of Helicobacter pylori from native Peruvians suggest admixture of ancestral and modern lineages and reveal a western type cag-pathogenicity island. BMC Genomics (2006), 7:191

14. S Manjulata Devi, Irshad Ahmed, Paolo Francalacci, M Abid Hussain,Yusuf Akhter, Ayesha Alvi, Leonardo A Sechi, Francis Mégraud, and Niyaz Ahmed. Ancestral European roots of Helicobacter pylori in India. BMC Genomics (2007), 8:184

15. www.pubmlst.org

16. Alarcon T, Domingo D, Lopez-Brea M. Antibiotic resistance problems with Helicobacter pylori. Int JAntimicrob Agents (1999); 12:19-26

17. Mark Achtman, Takeshi Azuma, Douglas E. Berg, Yoshiyuki Ito, Giovanna Morelli, Zhi-Jun Pan, Sebastian Suerbaum, Stuart A. Thompson, Arie van der Ende and Leen-Jan van Doorn Recombination and clonal groupings within Helicobacter pylori from different geographical regions. Molecular Microbiology (1999) 32(3), 459–470

18. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M: An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori. Nature (2007), 445:915-918

19.Covacci A,Telford JL, Giudice GD,Parsonnet J,Rappuoli R: Helicobacter pylori virulence and genetic geography. Science (1999) 284:1328-1333