

بررسی وجود ژن *cagE* در ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از بیماران مبتلا به زخمهای پپتیک، سرطان معده و سوء هاضمه های بدون زخم

محمد حسن شیرازی (Ph.D.)^{*} محمد رضا پورمند (Ph.D.)⁺
محمد رضا حق شناس (Ph.D.)^{**} وحیده آقارضایی محقق (M.Sc.)^{***}

چکیده

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری به عنوان عامل بیماریزایی جدی در دستگاه گوارشی انسان به شمار می رود و عفونت ناشی از آن ممکن است در ارتباط با وجود یا عدم وجود ژن *cagE* باشد. این مطالعه به منظور بررسی وجود ژن *cagE* در ایزوله های هلیکوباکتر پیلوری و ارتباط *cagE* با سوء هاضمه های بدون زخم، زخم های پپتیک و سرطان صورت گرفت.

مواد و روش ها: ۱۵۰ نمونه بیوپسی بیماران بر روی محیط های اختصاصی بروسلا آگار و کمپیلوباکتر واجد خون گوسفندی و آنتی بیوتیک های سه گانه کشت داده شد. پس از بررسی کلنی های به دست آمده توسط تست های بیوشیمیایی، استخراج ژنوم صورت گرفت، سپس به کمک پرایمرهای طراحی شده و روش PCR به بررسی وجود و یا عدم وجود ژن *cagE* انجام شد.

یافته ها: از ۹۲ کشت مثبت، ۳۴،۲۸،۲۰،۱۰ ایزوله به ترتیب از بیماران مبتلا به سوء هاضمه های بدون زخم، زخم اثنی عشر، زخم معده و سرطان معده به دست آمد. فراوانی ژن *cagE* در نمونه های فوق به ترتیب ۸۸/۲۳ درصد، ۱۰۰ درصد، ۸۵ درصد، ۱۰۰ درصد مشاهده گردید.

استنتاج: با توجه به حضور ژن *cagE* در غالب ایزوله های مورد بررسی حضور این ژن نمی تواند شاخصی جهت تفکیک ابتلاء به بیماری های فوق باشد.

واژه های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، *cagE*، زخم های پپتیک، سرطان

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل، مارپیچی و دارای تاژک می باشد که به طور مزمن در اپیتلیوم معده بیش از نیمی از مردم جهان قابل ردیابی است. این باکتری بیمارینا مسئول التهاب معده یا

⁺ مؤلف مسئول: دکتر محمد رضا پورمند- تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^{*} استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^{**} کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی قم
^{***} تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۶/۹/۲۶ تاریخ تصویب: ۸۶/۱۱/۳

E-mail: mpourmand@tums.ac.ir

^{**} استادیار گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

گاستریت مزمن می‌باشد و آلودگی با این ارگانیزم یک علامت خطر مهم برای زخم‌های گوارشی و سرطان معده است (۱،۲). فاکتورهای مهم بیماریزایی هلیکوباکتریلوری شامل: آوره آز، فلاژل، ادهزین، سیتوتوکسین واکوئل زا (*vacA*)، *cagA* و جزیره پاتوژنسیته (*cagPAI*) می‌باشد. که به نظر می‌رسد از همه مهمتر جزیره بیماریزایی *cagPAI* است (۳،۴).

cagPAI یک جایگاه ۴۰ کیلو جفت بازی از DNA می‌باشد که به وسیله انتقال افقی از یک قطعه ژنوم حاصل می‌شود. *cagPAI* به درون ژنوم گلو تامات راسماز کروموزومی وارد می‌شود (۵) و در انتهای 3' ژن گلو تامات راسماز قرار می‌گیرد. ناحیه *cag*، به وسیله جایگزینی قطعه‌ای به طول ۶۰۵ bp به دو قسمت *cagI* و *cagII* تقسیم می‌شود (۴). *cagPAI* شامل ۳۱ ژن می‌باشد که ۶ مورد از این ژن‌ها، سیستم ترش‌چی تیپ IV را رمزگذاری می‌کنند که برای انتقال مجموعه‌های ملکولی متنوع در طول غشاء باکتری به فضای خارج سلولی اختصاص یافته و ویژه می‌شود (۴).

در مطالعه انجام شده مشخص شد که ژن *cagI* شامل دو ژن *PigA* و *PigB* بوده که *picB* معادل *cagE* و *picA* معادل ژن‌های *cagD*، *cagC* می‌باشد (۵). ژن *cagA* در انتهای 3' و پائینی ترین بخش *cagPAI* قرار دارد (۵).

هلیکوباکتریلوری را بر اساس وجود و یا عدم وجود ژن‌های *cagA* و *vacA* به دو تیپ تقسیم‌بندی می‌کنند که تیپ I دارای ژن‌های *vacA* و *cagA* می‌باشد در حالی که تیپ II فاقد ژن *cagA* است. ثابت شده که سویه‌های تیپ I غالباً در ایجاد سرطان معده و زخم دوازدهه شرکت دارند (۶،۷).

براساس مطالعات انجام شده، محققین معتقدند که *cagE* نسبت به *cagA* مارکر بهتری از شاخص *cagPAI*

در ایزوله‌های هلیکوباکتریلوری منطقه شانگ‌های است (۸). در بررسی بعمل آمده مشخص شد که ژن *cagE* در نمونه‌های جدا شده از بیماران *H. Pylori* مثبت در ایالات متحده حدود ۶۲ درصد به همراه ژن *cagA* بوده است (۹) در حالی که در مطالعه انجام شده در ژاپن مشخص شد که میزان *cagE* در بیماران *H. pylori* مثبت ۹۸/۸ درصد بوده است (۱۰). در تحقیق انجام شده در ژاپن در نمونه‌های زخم معده و زخم اثنی عشر مشخص شد که ژن *cagE* به ترتیب در ۹۲/۹ درصد و ۹۱/۳ درصد از *H. pylori* جدا شده است (۱۱) و در چین مشخص شد که ژن *cagE* در *H. pylori* باعث افزایش سرطان معده می‌شود در حالی که ژن‌های *cagAs1* و *VacAm1* و *VacAm2* در نمونه‌های جدا شده از این باکتری در بیماران سرطان معده و دیسپلازی غیر زخمی *Non-Ulcer Dysplasia (NUD)* تفاوت ندارد (۱۲).

علاوه بر عوامل ذکر شده، عوامل ژنی میزبان به همراه عوامل محیطی شامل رژیم غذایی نیز شاید در بروز بیماری شرکت داشته باشند (۱۳). در این مطالعه ما به بررسی وضعیت سویه‌های هلیکوباکتریلوری جدا شده از بیماران همراه با بیماری‌های *NUD*، زخم‌های پپتیک و سرطان از نظر وجود ژن *cagE* پرداختیم.

مواد و روش‌ها

جدا سازی و کشت:

در این راستا ۱۵۰ بیوپسی از بیماران با مشکلات معده‌ای که توسط پزشک متخصص تشخیص داده شده بود از بخش‌های آندوسکوپی بیمارستان شریعتی مورد بررسی قرار گرفتند. این بیوپسی‌ها برای کشت با استفاده از سرم نرمال به آزمایشگاه میکروبیشناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال داده شد.

نمونه‌های بیوپسی سریعاً بر روی محیط بروسلا آگار و محیط کشت اختصاصی کمپیلوباکترسلکتیو آگار حاوی ۱۰ درصد خون گوسفند و آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین، تریمتوپریم و آمفوتریسین B، تلقیح گردیدند و سپس با استفاده از گازپک C و جار بی‌هوای در اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت قرار داده می‌شوند. کلنی‌های به دست آمده که حاوی باسیل گرم منفی، اسپیرال شکل، کاتالاز، اوره آز و اکسیداز مثبت بودند، به عنوان کلنی‌های هلیکوباکتریلوری تشخیص داده می‌شدند. سپس کلنی‌های موردنظر در آب مقطر استریل جمع‌آوری می‌گردید و در دمای ۲۰- برای انجام کارهای مولکولی نگهداری می‌شد.

(PCR) Polymerase Chain Reaction :

برای انجام تست PCR، ابتدا از نمونه‌های نگهداری شده در شرایط ۲۰- درجه سانتی‌گراد استخراج DNA به عمل آمده است. در این مطالعه به منظور استخراج DNA از DNA extraction Kit (Diatom Kit) (Sigma) استفاده شده است که بر مبنای استفاده از GUSCN-Silica gel طراحی شده بود برای انجام تست PCR و تکثیر قطعه ۵۰۰bp ژن *cagE* از پرایمرهای مناسب که قبلاً توصیف شده بود (جدول شماره ۱) و PCR Machin (master Gradient) از شرکت Ependrof (آلمان) استفاده شده است.

جدول شماره ۱: پرایمرهای طراحی شده ژن های *cagE* و *ureA*

<i>cagE</i> -F	5'-TTGAAACTTCAAGGATAGGATAGAGC-3'
<i>cagE</i> -R	5'-GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC-3'
<i>urea</i> -F (HPU-1)	5'-CCCAATGGTAAATTAGTT-3'
<i>urea</i> -R (HPU-2)	5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'

به منظور تأیید نتایج حاصل از PCR، از ژن *ureA* استفاده شد. پرایمر برای تکثیر ژن *ureA* (۴۱۱bp) قبلاً توصیف شده بود (۹) (جدول شماره ۱). این ژن به صورت حفاظت شده در تمام سویه‌ها وجود داشته و به منظور بررسی نمونه‌های منفی از نظر ژن *cagE* استفاده گردیده بود (جدول شماره ۱). از سوش هلیکوباکتریلوری ATCC 43504 نیز به منظور کنترل مثبت استفاده گردید.

واکنش PCR برای ژن *cagE* :

برای ۵۰ میکرولیتر محصول طبق دستورالعمل ژن فن‌آوران شامل: ۳۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر Mg^{2+} ، ۱ میکرولیتر $dNTP$ (200 μ M)، ۲ میکرولیتر (400ng) از مخلوط پرایمر (R و F) و ۰/۳ میکرولیتر *super taq* (2.5 U) *polymerase* و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. تکثیر قطعه در دستگاه ترموسایکلر با استفاده از برنامه: یک دمای ۹۵ درجه رسوب‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۲ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۱ دقیقه و در آخر ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام گردید.

واکنش PCR برای ژن *ureA* :

برای ۵۰ میکرولیتر محصول شامل: ۳۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۵ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر Mg^{2+} (3.5mM)، ۱ میکرولیتر $dNTP$ ، ۲ میکرولیتر از مخلوط پرایمر (Forward and Reverse primers) (400ng) و ۰/۳ میکرولیتر *super taq polymerase* (2.5U) و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده بود. برنامه مورد استفاده در دستگاه PCR برای تکثیر این ژن عبارت بود از: یک دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه اولیه به مدت ۵

در کل ۸۵ ایزوله (۹۲/۳۹ درصد) ژن *cagE* را حمل می کردند. فراوانی ژن *cagE* در سویه های مرتبط با هر گروه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

جدول شماره ۲: فراوانی ژن *cagE* در بیماران مبتلا به زخم های پپتیک، سرطان معده و NUD

	تعداد	<i>cagE</i> ⁺
Gastric Cancer	۱۰	۱۰ (۱۰۰٪)
Duodenal Ulcer	۲۸	۲۸ (۱۰۰٪)
Gastric Ulcer	۲۰	۱۷ (۸۵٪)
Non Ulcer Dyspepsia	۳۴	۳۰ (۸۸،۲۴٪)

بحث

در بررسی های بعمل آمده در این تحقیق مشخص شد که ژن *CagE* در ۹۲ درصد از *H. Pylori* بیماران جدا شده است. همانطور که در نتایج اشاره شد ژن *cagE* در هلیکوباکتریلوری بر روی *cagPAI* واقع شده و به عنوان یک فاکتور مهم محسوب می شود.

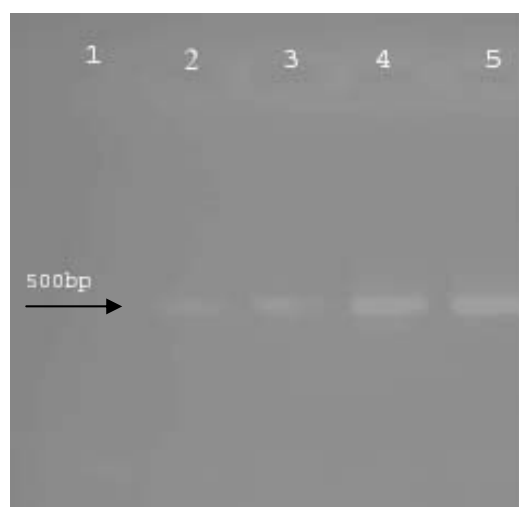
Day و همکارانش بیان کردند که هلیکوباکتریلوری های دارای ژن *cagE* در کودکان کانادایی با زخم دوازدهه مشاهده می شوند (۱۳). در مطالعه Jenks و همکارانش بیان گردید که حضور کامل جزیره بیماریزا در ایزوله های بیماران با زخم دوازدهه بیش از گاستریت است (۱۴). در همین حال آنها نشان دادند که هیچ ژن مناسب و قابل اعتمادی در *cagPAI* وجود ندارد که بتواند مرتبط با علائم بالینی باشد. میزان ایزوله های *cagE*⁺ در بیماران *H. Pylori* در ۳ جامعه Chinese، Indian، Malay در سال ۲۰۰۵ به ترتیب عبارت بود از: ۷۰، ۸۱/۶ و ۳۹ درصد (۱۵). در مطالعه دیگری توسط Tiwari و همکاران در سال ۲۰۰۵ حضور ژن *cagE* در ایزوله های بزاق بیماران هندی ۸۷/۵ nvwn گزارش شد که از این مقدار ۹۲/۵ درصد بیماران دارای زخم و ۷۷/۵ درصد بیماران NUD

دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۵ دقیقه برای ۱ دقیقه، ۴۵ درجه برای ۱ دقیقه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه و در نهایت یک دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه.

محصول PCR به دست آمده در ژل ۲ درصد آگاروز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با استفاده از الکتروفورز ران شد و سپس با استفاده از UV ترانس لومینیتور باندها مشاهده گردید.

یافته ها

از ۱۵۰ نمونه بیوپسی متعلق به ۷۸ مرد و ۷۲ زن، ۹۲ کشت مثبت بدست آمده که ۳۴ نمونه مربوط به افراد مبتلا به NUD، ۲۸ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم اثنی عشر، ۲۰ نمونه مربوط به افراد مبتلا به زخم معده و ۱۰ نمونه مربوط به افراد مبتلا به سرطان معده بود. بعد از PCR محصول ۵۰۰bp مشاهده شده در ژل آگارز به عنوان نمونه حاوی ژن *cagE* در نظر گرفته می شد (شکل شماره ۱) و نمونه های *cagE* منفی که حاوی محصول ۴۱۱bp ژن *ureA* بودند به عنوان نمونه *cagE* منفی تایید می شدند.



شکل شماره ۱: مشاهده باند متعلق به ژن *cagE* به اندازه ۵۰۰bp بر روی ژل الکتروفورز: ستون اول کنترل منفی و ستون های ۲، ۳، ۴ و ۵ ایزوله های *cagE* مثبت.

متوجه شدند که تمامی cagE مثبت‌ها، cagA مثبت نیز بودند(۹).

در مطالعه ما در میان ایزوله‌های cagE⁺ (۸۵)، ۱۰ بیمار دارای سرطان معده، ۲۸ بیمار دارای زخم دوازدهه، ۱۷ بیمار دارای زخم معده و ۳۴ بیمار دارای NUD بودند که فراوانی آنها به ترتیب، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۸۵ و ۸۸/۲۴ درصد بود که این مقادیر تفاوت معنی‌داری با مقادیر گزارش شده در چین (۰/۳ درصد)، میدوست ایالات متحده آمریکا (۶۲ درصد) و قومیت‌های مالزیایی (Malay ۷۰ درصد، Indian ۸۱/۶ درصد و chinese ۳۹ درصد) دارد و نشان می‌دهد که ژن cagE در ایزوله‌های H.pylori در ایران می‌تواند نقش مؤثر و مهمی در ایجاد زخم‌های پپتیک دارا باشد.

مطابق با نقش این ژن در سویه‌های مرتبط با بیماری‌های معده در این کشورها به نظر می‌رسد که وجود cagE می‌تواند به عنوان شناساگر در اکثر قریب به اتفاق سویه‌های هلیکوباکتریلوری در کشور ما نیز در نظر گرفته شود، همان‌طور که گفته شد فراوانی ژن cagE در ایران، تفاوت معنی‌داری با مقادیر گزارش شده در چین، مالزی و ایالات متحده آمریکا دارد ولی با توجه به مطالعه محققان در ژاپن با یافته‌های ما همخوانی دارد. باید توجه داشت با توجه به حضور ژن cagE در غالب نمونه‌های مورد بررسی حضور این ژن نمی‌تواند شاخصی جهت تمایز ابتلاء بیماران مبتلا به زخم‌های پپتیک، سرطان معده و سوءهاضمه‌های بدون زخم باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از آقای دکتر ناصر ابراهیمی دریانی متخصص گوارش جهت در اختیار گذاردن نمونه‌های بیوپسی کمال تشکر را داشته باشند.

بودند(۱۶). در بررسی‌های عمل آمده بر روی ۸۱ بیمار که از H.Pylori مثبت بوده اند در ۸۰ نمونه (۹۸/۸ درصد) ژن cagE جدا شده است(۱۰) و در مطالعه جداگانه از نمونه‌های زخم معده و زخم اثنی عشر ژن CagE به ترتیب در ۹۲/۹ درصد و ۹۱/۳ درصد از H.Pylori جدا شده است(۱۱). در تحقیق انجام شده در چین مشخص شد که ژن cagE باعث افزایش Gastric Cancer می‌شود(۱۲). در سال ۲۰۰۲ Fukuta و همکارانش متوجه شدند که حدود ۹۸/۸ درصد از ایزوله‌ها دارای ژن cagE بودند و یک بیمار فاقد cagE بود که مبتلا به گاستریت بود. بنابراین آنها بیان کردند که هیچ ارتباطی بین موقعیت cagE و علائم بالینی وجود ندارد(۱۷).

LI و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۶ پس از مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که فراوانی ژن cagE در بیماران در منطقه شانگهای چین ۹۹ درصد ($\frac{98}{99}$) بود که این میزان در مقایسه با cagA ($\frac{84}{99} = 84\%$) بیشتر بود. در میان بیماران cagE⁺، ۱۷ بیمار دارای گاستریت سطحی مزمن، ۲۱ بیمار دارای گاستریت آتروفی مزمن، ۱۸ بیمار دارای زخم معده، ۲۳ بیمار دارای زخم دوازدهه و ۱۹ بیمار دارای سرطان معده بودند و میزان فراوانی هر یک به ترتیب ۱۰۰، ۷، ۹۴/۱۰۰ و ۱۰۰ درصد بود. همچنین آنها متوجه شدند که از بین این cagE⁺ ها، ۱۴ سویه cagA⁻ بودند. بنابراین آنها به این نتیجه رسیدند که cagE شاخص مهمتر و بهتر از فاکتور cagPAI در بیماران آلوده به هلیکوباکتریلوری در منطقه شانگهای بود(۸).

Podzorski و همکاران وی در سال ۲۰۰۳ بر روی بیماران منطقه میدوست ایالات متحده آمریکا مطالعاتی انجام دادند. آنها میزان فراوانی ژن cagE را در این بیماران ۶۲ درصد تخمین زدند. آنها در تحقیقاتشان

References

1. Makola D, Peura DA, Crowe SE. Helicobacter pylori Infection and Related Gastrointestinal Diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41(6): 548-558.
2. Peter S, Beglinger C. Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion* 2007; 75(1): 25-35.
3. Kundu P, Mukhopadhyay AK, Patra R, et al. Cag pathogenicity island-independent up-regulation of matrix metalloproteinases-9 and -2 secretion and expression in mice by Helicobacter pylori infection. *J Biol Chem* 2006; 281(45): 34651-34662.
4. Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D et al. Analysis of the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori. *Mol Microbiol* 1998; 28: 37-53.
5. Tummura MK, Sharma SA, Blaser MJ et al. Helicobacter pylori picB, a homologue of Bordetella pertussis toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995; 18: 867-876.
6. Atherton JC, Cao P, Peek RM et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori: Association of specific vacA with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.
7. Weel JF, Van der Hulst RW, Gerrits Y et al. The interrelationship between cytotoxin- associated gene A, vacuolating cytotoxin, and Helicobacter pylori-related disease. *J Infect Dis* 1996; 173: 117-175.
8. Li X, Liu W, Xu W, Shi Y and 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): 133-136.
9. Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A & Tolia V. Analysis of the vacA, cagA, cagE, iceA, and babA2 genes in Helicobacter pylori from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46: 83-88.
10. Fukuta K, Azuma T, Ito Y, Suto H, Keida Y, Wakabayashi H, Watanabe A, Kuriyama M. Clinical relevance of cagE gene from Helicobacter pylori strains in Japan. *Dig Dis Sci* 2002; 47(3): 667-674.
11. Sadakane Y, Kusaba K, Nagasawa Z, Tanabe I, Kuroki S, Tadano J. Prevalence and genetic diversity of cagD, cagE, and vacA in Helicobacter pylori strains isolated from Japanese patients. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(10): 981-986.
12. Fock KM, Subbiah D, Ang TL, Ang DTL, Lim DT, Wong WK, Toh HC, Ng TM, Teo EK, Tan JY; Gastric cancer is associated with Helicobacter pylori cagE

-
- genotype in Chinese patients. 2003 ASCO Annual Meeting, *Proc Am Soc clin Oncol* 22: 2003 (abstract 1433).
13. Day AS, Jones NL, Lynett JT, Jennings HA, Fallone CA, Beech R & Sherman PM. cagE is a virulence factor associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulceration in children. *J Infect Dis* 2000; 181: 1370-1375.
14. Jenks PJ, Megraud F & Labigne A. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the cag pathogenicity island. *Gut* 1998; 43: 752-758.
15. Tan HJ, Rizal AM, Rosmadia MY et al. Distribution of *Helicobacter pylori* cagA, cagE and vacA in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Gastroen Hepatol* 2005; 20: 589-594.
16. Tiwari SK, Khan AA, Ahmed KS et al. Polymerase chain reaction based analysis the cytotoxin associated gene pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* from saliva. *Gastrol* 2005; 20: 1560-1566.
17. Fukuta K, Azuma T, Ito Y et al. Clinical Relevance of cagE gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *Dig Dis Sci* 2002; 97(3): 667-674.