

# GASTRİK KARSİNOMALI HASTALAR İLE EPİGASTRİK YAKINMALARI OLAN OLGULARDA *HELICOBACTER PYLORI* ANTİJENLERİNE KARŞI ANTİKOR VARLIĞININ SAPTANMASINDA WESTERN BLOT YÖNTEMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ\*

## EVALUATION OF WESTERN BLOT METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO *HELICOBACTER PYLORI* ANTIGENS IN PATIENTS WITH GASTRIC CARCINOMA AND CASES WITH EPIGASTRIC COMPLAINTS

Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU<sup>1</sup>, Mustafa BERKTAŞ<sup>1</sup>, Hamza BOZKURT<sup>2</sup>, Türkan TOKA ÖZER<sup>1</sup>,  
Gülay BULUT<sup>3</sup>, Öznur ÖZTÜRK<sup>1</sup>, Mahmut İLHAN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.  
(hguducu@hotmail.com)

<sup>2</sup>Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

<sup>3</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Van.

<sup>4</sup>Florence Nightingale Hastanesi, Medikal Onkoloji Ünitesi, İstanbul.

### ÖZET

*Helicobacter pylori* VacA (vacuolating cytotoxin A) ve CagA (cytotoxin associated gene A) proteinleri, bakterinin virülans faktörleri arasında yer almaktadır. Özellikle CagA geni taşıyan *H.pylori* suşlarının gastrik adenokarsinom gelişiminde potansiyel risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada, mide kanseri tanısı almış hastalarda ve malignansisi olmayan kontrol grubunda çeşitli *H.pylori* antijenlerine karşı özgül antikorların saptanmasında Western Blot (WB) yönteminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, kanserli 99 hasta (94 adenokarsinom, 2 adenoskuamöz hücreli karsinom, 3 non-Hodgkin lenfoma) ile kontrol olarak bulantı, kusma, ishal, regürjitasyon ve karın ağrısı gibi epigastrik şikayetleri olan 150 olgu alınmıştır. Hasta (yaş ortalaması: 56.7 ± 1.2 yıl; 62'si erkek) ve kontrol (yaş ortalaması: 24.2 ± 1.3 yıl; 64'ü erkek) gruplarındaki tüm olgularda ELISA yöntemiyle *H.pylori* IgG pozitifliği mevcuttur. *H.pylori* CagA, VacA, OMP-67 (outer membrane protein), üreaz A, üreaz B, flajellin ve HSP (heat shock protein) antijenlerine karşı antikor varlığı, ticari bir test (RIDA Blot Helicobacter; R-Biopharm GmbH, Almanya) kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmamızda, ilginç olarak hasta ve kontrol bireylerin hiçbirisinde anti-VacA pozitifliği saptanmamış; CagA, OMP, üreaz A, üreaz B, flajellin ve HSP'ye özgül antikor pozitiflik oranları hasta grubunda sırasıyla; %78, %54, %37, %60, %53 ve %82; kontrollerde ise sırasıyla %85,

\* Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

%71, %55, %43, %61 ve %75 olarak tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında CagA, HSP ve flajellin antikorlarının pozitiflik oranları istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermezken ( $p > 0.05$ ); anti-OMP67, anti-ürez A ve anti-ürez B pozitiflik oranları arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0.01$ ). Sonuç olarak, *H.pylori* antijenlerine karşı oluşan özgül antikorların saptanması ve ayırt edilmesinde WB temelli bu testin, özellikle vacA antikorlarını saptama açısından üretici firma tarafından bir kez daha değerlendirilmesinin gerekli olduğu kanaatine varılmış ve *H.pylori*'nin virülansını ve enfeksiyonun prognozunu belirlemede önemli olan faktörlerin aydınlatılmasında daha ileri moleküler ve klinik çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Mide kanseri, *Helicobacter pylori*, cagA, vacA, Western Blot.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* proteins CagA (cytotoxin-associated gene A) and VacA (vacuolating cytotoxin A) are among the virulence factors of this species. CagA gene carrying *H.pylori* strains are particularly associated with gastric adenocarcinoma. This study was conducted to evaluate Western Blot (WB) method to determine specific *H.pylori* antibodies in a group of patients with gastric cancer and in a control group with no malignancy. A total of 99 patients with gastric cancer (94 adenocarcinoma, 2 adenocarcinoma, 3 non-Hodgkin lymphoma) and 150 control cases with epigastric complaints such as nausea, vomiting, diarrhea, gastroesophageal reflux and abdominal pain, were included to the study. *H.pylori* IgG-ELISA was positive in all study (mean age:  $56.7 \pm 1.2$  years, 62 male) and control (mean age:  $24.2 \pm 1.3$  years, 64 male) patients. Specific antibodies against CagA, VacA, OMP (outer membrane protein)-67, urease-A, urease-B, HSP (heat shock protein) and flagellin antigens determined by a commercial WB-based kit (RIDA Blot Helicobacter, R-Biopharm GmbH, Germany). Interestingly, no anti-VacA positivity was detected in none of the patient and control groups. The positivity rates for *H.pylori* CagA, OMP-67, urease A, urease-B, flagellin and HSP specific antibodies were as 78%, 54%, 37%, 60%, 53% and 82% in the gastric cancer group and 85%, 71%, 55%, 43%, 61% and 75% in the control group, respectively. There was no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between gastric carcinoma and control groups in terms of CagA, HSP and flagellin antibodies ( $p > 0.05$ ). On the other hand, a statistically significant difference was found between the 2 groups in terms of urease-A, urease-B and OMP-67 ( $p < 0.01$ ). These results suggested that this test should be assessed again by the manufacturer for its detection power directed towards specific *H.pylori* antibodies, especially for Vac-A. Further molecular and clinical studies are necessary to determine the factors that affect *H.pylori* virulence and disease prognosis.

**Key words:** Gastric carcinoma, *Helicobacter pylori*, cagA, vacA, Western Blot.

## GİRİŞ

*Helicobacter pylori* enfeksiyonları özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır<sup>1</sup>. Bu bakterinin mide kanseri ve MALT (mukoza ile ilişkili lenfoid doku) lenfoması ile ilişkili olduğunun düşünülmesine karşın, *H.pylori* ile enfekte olan kişilerin çok azında mide kanseri gelişmektedir. Bu durum, *H.pylori* enfeksiyonunun patogenezi, konağın genetik ve immün yeterlilik durumu ve çevresel faktörler arasındaki ilişkiye bağlanmaktadır<sup>2,3</sup>.

VacA (vacuolating cytotoxin A) ve CagA (cytotoxin associated gene A), *H.pylori*'nin patogenezinde rol oynayan önemli proteinlerdir. 87 kDa molekül ağırlığında potent bir sitotoksin olan ve hücre içi vakuolizasyonu indükleyen VacA proteini, hemen bütün

*H.pylori* enfeksiyonlarında saptanmasına karşın, sadece bazı enfeksiyonlarda aktivite gösterir<sup>3</sup>. *VacA* geninin, *H.pylori*'nin hedef hücrelere saldırma kabiliyetini artıran bir protein kodladığı, ancak patogeneizde önemli bir role sahip olmayan mutant gen olduğu gösterilmiştir<sup>4</sup>. Günümüzde bu genin gerçek bir virülans faktörü olup olmadığına dair tartışmalar halen devam etmektedir. 120-140 kDa molekül ağırlığındaki bir proteini kodlayan *CagA* geni ise *H.pylori* suşlarının %60-70'inde bulunmaktadır<sup>5</sup>. *CagA* proteini, mide adenokarsinomunun gelişmesine yol açan başlıca virülans faktörü olup, bu genin varlığında atrofik gastrit ve mide karsinomu gelişme oranının arttığı bildirilmektedir<sup>4</sup>. *H.pylori*'de *cagA* ve *vacA* genleri dışında, *cagPAI* (*cag* pathogenicity island), dış membran proteini, flajellin, adezin, nötrofil aktivasyon proteini (NAP), porinler, lipopolisakarit, ısı şok proteini, üreaz A ve B gibi faktörler de bulunmakta ve bunlar genellikle inflamatuvar olaylarda görev almaktadırlar<sup>4</sup>.

Bu çalışmada, mide kanseri tanısı almış hasta grubu ile epigastrik şikayetleri olan kontrol grubunda *H.pylori* *CagA*, *VacA*, OMP (outer membrane protein), üreaz A, üreaz B, flajellin ve HSP (heat shock protein) antijenlerine karşı antikor varlığının Western Blot (WB) yöntemiyle araştırılması ve testin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

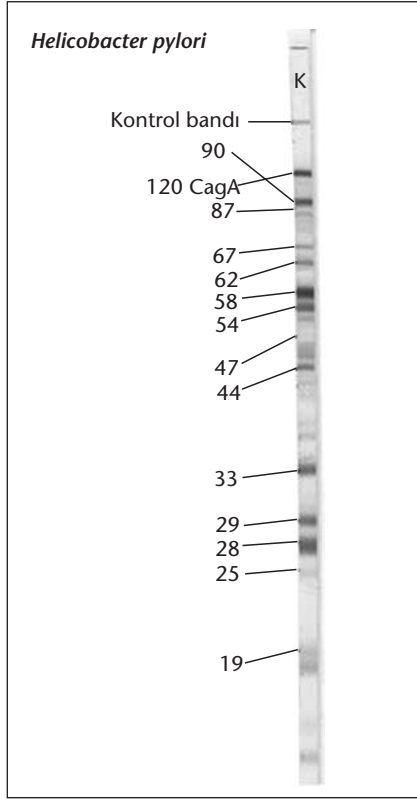
## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, mide kanseri tanısı alan ve bu nedenle tedavi görmekte olan 99 hasta ile kontrol olarak çeşitli kliniklerden laboratuvarımıza *H.pylori* IgG taraması için gönderilen 150 olguya ait serum örnekleri dahil edildi. Patolojik olarak hastaların 94 (%95)'ü adenokarsinom (23'ü intestinal, 5'i difüz, 66'sı sınıflandırılmayan tip), 2 (%2)'si adenoskuamöz hücreli karsinom ve 3 (%3)'ü non-Hodgkin lenfoma tanısı almıştı. Bulantı, kusma, ishal, regürjitasyon ve karın ağrısı gibi epigastrik şikayetler ile başvuran kontrol grubundaki olguların hiçbirisinde ise malignansi yoktu. Hasta ve kontrol gruplarındaki tüm olgularda ELISA yöntemiyle *H.pylori* IgG pozitifliği mevcuttu.

Serum örneklerinde *H.pylori* *CagA*, *VacA*, OMP-67, üreaz A, üreaz B, flajellin ve HSP antijenlerine karşı antikor varlığı, ticari bir WB yöntemiyle (RIDA Blot Helicobacter; RBiopharm GmbH, Darmstadt, Almanya) üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırıldı. Her çalışmaya kit içeriğindeki pozitif ve negatif kontrol serumlar da dahil edildi ve sonuçlar firma tarafından sağlanan standart kontrol bantlarına göre değerlendirildi (Şekil 1).

Yöntemde kısaca; moleküler ağırlıklarına göre elektroforetik olarak elde edilen *H.pylori* antijenlerini içeren nitroselüloz şeritler hasta serumlarıyla birlikte 1 saat inkübe edildi. Daha sonra yıkama ile özgül olmayan antikorlar uzaklaştırıldı ve peroksizid ile işaretli anti-insan IgG konjugatı ile 45 dakika ikinci inkübasyon gerçekleştirildi. Yıkama işlemi ve substrat (tetramethylbenzidine) reaksiyonundan (5-15 dakika) sonra *H.pylori* antijenlerine karşı antikor varlığında şeritlerin üzerinde oluşan koyu renkli bantlar değerlendirildi<sup>6</sup>. Değerlendirmede, üretici firma tarafından önerilen "bant puanlama sistemi" kullanıldı ve toplam puanın > 12 olması halinde sonuç pozitif olarak kabul edildi ([www.r-biopharm.com; L2313-\\_2323\\_Helicobacter\\_05-06-27\\_GB\\_final\[1\].pdf](http://www.r-biopharm.com; L2313-_2323_Helicobacter_05-06-27_GB_final[1].pdf)).

İstatistiksel analiz için Z testi kullanıldı.



Şekil 1. WB temelli yöntemde kullanılan *H.pylori* antijenleri ve molekül ağırlıkları. CagA: 120 kDa; VacA: 87 kDa; OMP67: 67 kDa; üreaz B: 62 kDa; "heat shock protein": 58 kDa; flajellin: 54 kDa; üreaz A: 29 kDa.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri ile farklı *H.pylori* antijenlerine karşı saptanan antikor pozitiflik oranları Tablo I'de gösterilmiştir.

Hastaların %78 (77/99)'inde *H.pylori* CagA antikor pozitifliği saptanmış; bu oran adenokarsinomlu hastalar için %74.7 (18 intestinal, 4 difüz ve 52 tiplendirilemeyen adenokarsinomlu hasta), adenokarsinom dışındaki tipler (adenoskuamöz ve non-Hodgkin lenfoma) için %3 (n= 3) olarak bulunmuştur.

Hasta ve kontrol bireylerin hiçbirisinde anti-VacA pozitifliği saptanmamış, gruplar arasında CagA, HSP ve flajellin antikor pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ). Buna karşın, anti-OMP67, anti-üreaz A ve anti-üreaz B pozitiflik oranlarının hasta ve kontrol gruplar arasında anlamlı bir fark gösterdiği izlenmiştir ( $p < 0.01$ ) (Tablo I).

**Tablo I. Çalışma Gruplarının Demografik Özellikleri ve Farklı *Helicobacter pylori* Antijenlerine Karşı Antikor Pozitiflik Oranları**

	Hasta grubu (n= 99)	Kontrol grubu (n= 150)	Z değeri
Cinsiyet (K/E)	37/62	86/64	
Yaş aralığı	15-83 yıl	1 ay-69 yıl	
Yaş ortalaması	56.7 ± 1.2 yıl	24.2 ± 1.3 yıl	
Anti-CagA pozitif (%)	78	85	1.35
Anti-VacA pozitif (%)	0	0	-
Anti-OMP67 pozitif (%)	54	71	2.75*
Anti-ürez A pozitif (%)	37	55	2.73*
Anti-ürez B pozitif (%)	60	43	2.66*
Anti-HSP pozitif (%)	82	75	1.36
Anti-flajelin pozitif (%)	53	61	1.27

\* p< 0.01 (istatistiksel olarak anlamlı).

## TARTIŞMA

*H.pylori* enfeksiyonlarının prognozu, bakterinin virülansı, konağın genetik yapısı (mide sıvısının asidite, mukus ve tampon içeriği vb.) ve kişisel/çevresel faktörler (diyet, yemek alışkanlıkları, alkolizm, oral hijyen, su hijyeni, kişisel hijyen, kırsal veya kalabalık yaşam, hayvan teması vb.) tarafından karmaşık bir şekilde yönlendirilmektedir<sup>4</sup>. Bakterinin virülansının önemli oranda *CagA* geni varlığına bağlı olduğu bilinmekte ise de, bazı araştırmacılar duodenal ülserli ve ülersiz hastalar, ülersiz dispepsili hastalar ve mide kanserli ya da MALT lenfomali hastalar arasında *CagA* prevalansı açısından anlamlı bir fark olmadığını rapor etmektedir<sup>7-10</sup>. Buna karşın bazı çalışmalarda da, *CagA* pozitif *H.pylori* suşlarının mide kanseri gelişme riskini önemli derecede artırdığı ileri sürülmektedir<sup>11-17</sup>.

Sunulan çalışmada, gastrik kanserli hastalar ile sadece epigastrik şikayetleri olan kontrol olgularda, bakterinin virülans faktörü olabilecek bazı antijenlerine karşı antikor varlığı WB yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmaya alınan tüm bireyler *H.pylori* ELISA-IgG antikorları pozitif olgulardır. Çalışmamızda, hasta ve kontrol grupları arasında *CagA*, HSP ve flajelin antikorlarının pozitiflik oranları istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermezken ( $p > 0.05$ ); anti-OMP67, anti-ürez A ve anti-ürez B pozitiflik oranları arasında anlamlı bir fark saptanmıştır ( $p < 0.01$ ) (Tablo I). Buna karşın hasta ve kontrol bireylerin hiçbirisinde anti-VacA pozitifliğinin tespit edilememiş olması dikkat çekici bulunmuştur. Her ne kadar üretici firmanın prospektüsünde, VacA bandının çok zayıf reaksiyon verdiği, nadiren görülebileceği ve sadece *CagA* bandı ile birlikte saptanabileceği belirtilmişse de, bu durum, bu testin VacA antikorlarını saptamada yetersiz kaldığını ya da bir değerlendirme hatası olduğunu düşündürmüştür. Zira 87 kDa'luk VacA bandının, hemen üzerinde bulunan 90 kDa'luk özgül olmayan bir bant ile yakın komşuluğu, yanlış okumalara neden olabilir (Şekil 1). Bununla birlikte bu yöntemin kullanıldığı bazı çalışmalarda<sup>6,18</sup> VacA pozitifliği, *CagA* pozitifliği ile benzer oranda bulunmuştur.

laquinto ve arkadaşları<sup>7</sup>, *H.pylori*'nin bir diğer antijeni olan HSP'ye karşı antikor pozitiflik oranını duodenal ülserli hastalarda %36.7 ve ülseri olmayan dispepsili olgularda %52.5 olarak saptamışlar; buna karşın mide kanseri olan hastalarda %78.6 gibi oldukça yüksek bir oran bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise anti-HSP pozitifliği, kanserli hastalar (%82) ile kontrol grubu (%75) arasında anlamlı bir fark göstermemiştir ( $p > 0.05$ ).

Bilindiği gibi, *H.pylori* enfeksiyonlarının tanısında invazif olan (kültür, histopatoloji, hızlı üreaz testi, polimeraz zincir reaksiyonu) ve olmayan (serolojik testler, üre nefes testi) yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle 45 yaşın altındaki hafif-orta şiddette dispeptik yakınmaları olan olgularda tarama amacıyla invazif olmayan testlerin kullanılması önerilmekte ve bu testler içinde de ELISA yöntemi, hasta serumunda *H.pylori* IgG antikorlarının saptanması için tercih edilmektedir<sup>19</sup>. WB yöntemi ise, gerek ELISA ile alınan pozitif sonuçların doğrulanmasında gerekse bakterinin majör proteinlerine (örn. CagA, VacA vb.) karşı oluşan antikor tiplerinin ayırt edilmesinde kullanılmaktadır<sup>19</sup>. Ancak bu yöntemin, yüksek özgüllüğüne karşın bazı sınırlamaları vardır. Örneğin; WB testinde tek bir suştan elde edilen antijenler kullanılmakta ve böylece protein çeşitliliğinde sınırlamalar oluşmaktadır. Dolayısıyla farklı *H.pylori* suşlarının farklı antijenlerine karşı oluşan antikorlar, bu testte kullanılan antijenleri tanıyamamaktadır. Yöntemin bir diğer sınırlaması, lineer yapıdaki antijenik epitopların kullanılmasıdır. Örneğin; *Escherichia coli*'de rekombinant tekniğiyle üretilip WB testinde kullanılan VacA antijeni, hastalarda oluşan antikorlar tarafından saptanamayabilmektedir; zira birçok protein üç boyutlu yapısı ile tanınır. Benzer olarak WB yöntemi ile, bakteri tarafından az miktarlarda üretilen ya da serumda düşük miktarlarda bulunan proteinlere (örn. üreaz enzimi) karşı antikorların tespit edilmesi de mümkün olmamaktadır<sup>19</sup>. Nitekim çalışmamızda da, *H.pylori* suşlarının tümünün üreaz enzimi ürettiğinin bilinmesine<sup>20</sup> rağmen, anti-üreaz A ve anti-üreaz B pozitifliği sıklığıyla hastalarda %37 ve %60, kontrollerde ise %55 ve %43 olarak saptanmıştır.

WB testi, maliyetinin yüksek, uygulamanın emek-yoğun olması nedeniyle çok sayıda örneğin çalışılmasını gerektiren taramalarda tercih edilmemektedir. Bunun yanı sıra kalitatif sonuç vermesi de tedavinin izleminde kullanılmasını sınırlamaktadır. Ancak bu yöntemin, CagA antikorlarının tespitinin klinik öneme sahip olduğu durumlarda (peptik ülser, gastrik karsinoma), hastanın *CagA* geni pozitif bir suşla enfekte olduğunun belirlenmesi açısından değer taşıdığı ifade edilmektedir<sup>19,21,22</sup>. Oysa bizim çalışmamızda, hasta (%78) ve kontrol (%85) grupları arasında anti-cagA pozitiflik oranları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Tablo I). Çalışmamızın en önemli sınırlaması, çalışma gruplarında antikor pozitifliğinin saptandığı proteinleri kodlayan gen varlığının moleküler yöntemlerle araştırılmamış olmasıdır. Bu nedenle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanan anti-OMP67, anti-üreaz A ve anti-üreaz B pozitiflik oranlarının yorumlanması mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, *H.pylori*'nin çeşitli antijenlerine karşı oluşan özgül antikorların saptanması ve ayırt edilmesinde WB temelli bu testin, özellikle VacA antikorlarını saptama açısından üretici firma tarafından bir kez daha değerlendirilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür. *H.pylori*'nin virülansını ve enfeksiyonun prognozunu belirlemede

önemi olan bakteriye ve konağa ait faktörlerin anlaşılabilmesi için ise daha ileri moleküler ve klinik çalışmalara gereksinim vardır.

## TEŞEKKÜR

İstatistiksel analizlerin yapılmasındaki katkıları nedeniyle Biyoistatistik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Sıddık Keskin'e teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

1. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev* 2000; 22: 283-97.
2. Sugiyama T. Development of gastric cancer associated with *Helicobacter pylori* infection. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54: 12-20.
3. Sezikli M, Gulter S, Apan TZ, Aksoy A, Keles H, Ozkurt ZN. Frequencies of serum antibodies to *Helicobacter pylori* CagA and VacA in a Turkish population with various gastroduodenal diseases. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 1239-43.
4. Akhter Y, Ahmed I, Devi SM, Ahmed N. The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. *Infect Agent Cancer* 2007; 2: 2.
5. Bülent K, Murat A, Esin A, et al. Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1580-3.
6. Ece F, F Hatabay N, Erdal N, Gedik C, Güney C, Aksoy F. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in lung cancer? *Respir Med* 2005; 99: 1258-62.
7. laquinto G, Todisco A, Giardullo N, et al. Antibody response to *Helicobacter pylori* CagA and heat-shock proteins in determining the risk of gastric cancer development. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 378-83.
8. Mitchell HM, Hazell SL, Li YY, Hu PJ. Serological response to specific *Helicobacter pylori* antigens: antibody against CagA antigen is not predictive of gastric cancer in a developing country. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1785-8.
9. Lamarque D, Gilbert T, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Chaumette MT, Delchier JC. Seroprevalence of eight *Helicobacter pylori* antigens among 182 patients with peptic ulcer, MALT gastric lymphoma or non-ulcer dyspepsia. Higher rate of seroreactivity against CagA and 35-kDa antigens in patients with peptic ulcer originating from Europe and Africa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 721-6.
10. Elitsur Y, Neace C, Werthammer MC, Triest WE. Prevalence of CagA, VacA antibodies in symptomatic and asymptomatic children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 1999; 4: 100-5.
11. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5791-5.
12. Schumann C, Triantafilou K, Rasche FM, et al. Serum antibody positivity for distinct *Helicobacter pylori* antigens in benign and malignant gastroduodenal disease. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 223-38.
13. Wong BC, Lam SK, Ching CK, et al. Seroprevalence of cytotoxin-associated gene A positive *Helicobacter pylori* strains in Changle, an area with very high prevalence of gastric cancer in south China. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1295-302.
14. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 297-301.
15. Lawniczak M, Starzyńska T. *Helicobacter pylori* CagA (+) infection in gastric cancer patients. *Pol Merkur Lekarski* 2002; 13: 216-20.
16. Held M, Engstrand L, Hansson LE, Bergström R, Wadström T, Nyrén O. Is the association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer confined to CagA-positive strains? *Helicobacter* 2004; 9: 271-7.
17. Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, Faúndez G, Acuña R. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* VacA and CagA and gastric diseases in Chile. *J Med Microbiol* 2002; 51: 300-4.

18. Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low-molecular-weight (33-35 K) antigen. Dig Dis Sci 1998; 43: 1482-7.
19. Herbrink P, van Doorn LJ. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 164-73.
20. Salyers AA, Whitt DD (eds). Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach, pp: 339-351. 2002, 2<sup>nd</sup> ed. ASM Press, Washington DC.
21. Beales IL, Crabtree JE, Scunes D, Covacci A, Calam J. Antibodies to CagA protein are associated with gastric atrophy in *Helicobacter pylori* infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8: 645-9.
22. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 1777-80.