

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng multiplex-PCR xác định kiểu gen CagA và VacA của *Helicobacter pylori* gây bệnh lý dạ dày

Nguyễn Linh Toàn^{*}; Đặng Thành Chung^{*}

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là nguyên nhân chính gây bệnh lý dạ dày và là một yếu tố nguy cơ sớm phát triển ung thư dạ dày. Gần đây, các gen CagA và VacA của *H. pylori* đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh bệnh lý dạ dày. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định độ nhạy và độ đặc hiệu của phản ứng multiplex-PCR để phát hiện và phân biệt kiểu gen CagA và VacA-(s1/s2, m1/m2) của *H. pylori*. Độ nhạy và đặc hiệu của phản ứng multiplex-PCR là 100% và ngưỡng phát hiện là 10^{-6} ng ADN plasmid.

^{*} Từ khóa: *Helicobacter pylori*; Kiểu gen CagA, VacA; Bệnh lý dạ dày; Phản ứng multiplex-PCR.

The sensitivity and specificity of multiplex-PCR assay for genotyping of CagA and VacA genes of *Helicobacter pylori* associated to gastric diseases

SUMMARY

The gastric pathogen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) caused gastritis and peptic ulcer disease and is an early risk factor for development of gastric adenocarcinoma. Recently, the CagA and VacA genes of *H. pylori* have been demonstrated an important role in mechanism pathogenesis of gastric diseases. In this study, we have examined the sensitivity and the specificity of multiplex-PCR assay for detection and genotyping of CagA và VacA-(s1/s2, m1/m2) genes of *H. pylori*. The sensitivity and the specificity of this multiplex-PCR assay were 100% and the low detection threshold of the multiplex-PCR assay is 10^{-6} ng DNA plasmid.

^{*} Key words: *Helicobacter pylori*; CagA, VacA gene; Gastric disease; Multiplex-PCR.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) là một trong những nguyên nhân chính gây bệnh lý dạ dày-tá tràng. Theo ước tính khoảng 50% dân số thế giới nhiễm *H. pylori*. Tỷ lệ lưu hành *H. pylori* tăng theo tuổi: 5 - 7%

ở thời thơ ấu và > 70% ở người ngoài 50 tuổi. Ở nước ta, tỷ lệ nhiễm *H. pylori* ở người khỏe mạnh khoảng 75%, trong đó nam 76,4% và nữ 74,7% (Nguyễn Khánh Trạch, 2001) và tỷ lệ có kháng thể kháng *H. pylori* ở nhóm người có bệnh dạ dày - tá tràng

^{*} Học viện Quân y

Phân biện khoa học: TS. Trần Văn Khoa

lên tới 98,2%, ở người khỏe mạnh là 77,4% và tỷ lệ nhiễm mới ở cả 2 nhóm từ 6,5 -

7,3% (Sơn NT và CS, 2001). Bộ gen (genome) của *H. pylori* có khoảng 1,6 - 1,73

triệu nucleotide (nu.), tạo thành trên 1.500 gen khác nhau, trong đó có > 60 gen đã xác định được chức năng. Tuy nhiên, người ta thấy rằng chỉ có một số ít gen của *H. pylori* có liên quan đến sinh lý bệnh dạ dày-tá tràng, nhất là ung thư dạ dày như gen VacA (vacuolating cytotoxin gen A) và gen CagA (cytotoxin-associated gen A). Gen VacA mã hóa cho độc tố VacA có khả năng làm bào mòn lớp biểu mô dạ dày, từ đó gây tổn thương tế bào niêm mạc và hình thành nên những không bào (hốc) trong tế bào niêm mạc dạ dày. Mặc dù cơ chế gây ung thư dạ dày của VacA chưa rõ, nhưng những người mang kiểu gen VacA s1/m1 có nguy cơ cao gây ung thư dạ dày (Bolek và CS, 2007). Gen VacA có ở tất cả các chủng *H. pylori*, nhưng VacA chỉ xuất hiện ở khoảng 40 - 50% số chủng lưu hành (Dunn BE và Grütter MG, 2001). Gen VacA không có một vị trí cố định trên bộ gen nhưng luôn nằm cách xa tiểu đảo sinh bệnh và thay đổi tùy thuộc từng chủng *H. pylori*.

Do vai trò quan trọng của CagA và VacA của *H. pylori* trong bệnh lý dạ dày nên việc phát hiện chủng *H. pylori* mang những gen này có vai trò quan trọng trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh. Xuất phát từ những vấn đề nêu trên nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu: *Xác định những điều kiện chuẩn, độ nhạy và độ đặc hiệu kỹ thuật multiplex-PCR xác định kiểu gen CagA và VacA của H. pylori.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

* *Vi khuẩn:*

30 chủng *H. pylori* được phát hiện từ các mẫu sinh thiết của bệnh nhân (BN) loét dạ dày (15 BN) và ung thư dạ dày (15 BN) thu thập tại Bệnh viện 103 và Bệnh viện TWQĐ 108 bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang và ure test. Sử dụng các chủng *H. pylori* làm tách dòng (cloning) gen VacA và CagA, làm mẫu chuẩn để đánh giá độ nhạy của phản ứng. 30 chủng chuẩn gồm 24 chủng *V. cholerae* phân lập từ BN tả, 6 chủng chuẩn *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi A*, *Salmonella typhi B*, *Salmonella typhi C* và *E. coli* được sử dụng để đánh giá độ đặc hiệu của kỹ thuật và làm chứng âm.

* *Tế bào khả biến:*

Tế bào khả biến *E. coli* dòng DH5 α dùng tách dòng (cloning) các đoạn gen VacA và CagA của *H. pylori* phân lập từ BN bị bệnh lý dạ dày.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Tách và tinh sạch ADN vi khuẩn từ mảnh sinh thiết dạ dày:*

Lấy một mẫu nhỏ mảnh sinh thiết đem nghiền cùng với 500 μ l dung dịch PBS bằng chày trong ống eppendorf 1,5 ml. Sau đó, hút lấy phần dung dịch lỏng chứa mô nghiền để tách ADN ngay hoặc lưu mẫu - 20°C đến khi sử dụng. Tách và tinh sạch ADN, sử dụng phương pháp dùng Clorofom-Phenol-Isoamyl (25:24:1). Quy trình theo thường quy tại phòng thí nghiệm và hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN tổng số sau khi tách, kiểm tra độ tinh sạch và nồng độ ADN, dùng hệ thống quang phổ Nano Drop tại Trung tâm Sinh-Y-Dược học quân sự, Học viện Quân y.

* *Mồi (primer):*

Cặp mồi dùng xác định gene *VacA* và *CagA* của *H. pylori* trong mẫu bệnh phẩm được mô tả chi tiết trong bảng 1 (Atherton và

CS, 1999 và Chattopadhyay và CS, 2004, Bolek BK và CS, 2007).

Bảng 1: Trình tự các cặp mồi dùng khuếch đại gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) và *CagA*.

VÙNG GENE	TÊN MỒI	TRÌNH TỰ MỒI	KÍCH TH- ỚC (bp)
<i>VacA</i> <i>s1/</i> <i>VacA</i> <i>s2</i>	VAI-F VAI-R	5'-TGGAAATACAACAAACACAC-3' 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	259/286
<i>VacA</i> <i>m1/</i> <i>VacA</i> <i>m2</i>	VAG-F VAG-R	5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3' 5'-GCGTCAAAATAATTCCAAGG-3'	567/642
<i>CagA</i>	Cag5c-F Cag3c-R	5'-GTTGATAACGCTGTCGCTTC-3' 5'-GGGTTGTATGATATTTCCATAA-3'	350

Phân biệt các kiểu gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) và *CagA* dựa vào kích thước sản phẩm PCR trên gel agarose. Hỗn hợp mồi cho mỗi phản ứng multiplex-PCR chỉ pha đủ cho một lần chạy, đông tan chỉ một lần không dùng lại cho lần sau.

*** Phản ứng PCR:**

Kỹ thuật multiplex-PCR sử dụng enzym Taq ADN polymerase (New England Biolabs).

Bảng 2: Thành phần và thể tích các thành phần của phản ứng PCR.

TT	Thành phần	Thể tích (µl)/1 phản ứng PCR
1	Nước khử ion	15,35
2	dNTPs (2,5 mM/µl)	2,0
3	Mồi VAI-F và VAI-R (10 pmol/µl)	0,5 x 2
4	Mồi VAG-F và VAG-R (10 pmol/µl)	0,5 x 2
5	Mồi Cag5c-F và Cag3c-R (10 pmol/µl)	0,5 x 2
6	Taq DNA polymerase (NEB)	0,15
7	Dung dịch đệm (bao gồm ion Mg++)	2,5
ADN tổng số		2,0
Thể tích của phản ứng PCR (µl)		25

Thực hiện chu trình luân nhiệt của phản ứng multiplex-PCR sau khi tìm được nhiệt độ và thời gian gắn mồi phù hợp với 40 chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ qua 3 giai đoạn cơ

bản: biến tính ADN, gắn mồi và tổng hợp. Phản ứng PCR thực hiện trên máy GeneAmp PCR System 9700 và iCycler. Tối ưu hoá nhiệt độ và thời gian gắn mồi bằng cách chạy gradient nhiệt thực hiện trên máy GeneAmp PCR iCycler. Điện di sản phẩm cADN trên gel agarose 1,5% nhuộm ethidium bromide (0,5 mg%) trong môi trường đệm 1 x TBE, 110 V, dòng 80 mA, trong 45 phút, quan sát và chụp ảnh bằng máy soi Gel-Dolphil.

*** Tách dòng sản phẩm multiplex-PCR của gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) và *CagA*:**

Sản phẩm PCR thu được là đoạn gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) và *CagA* của *H. pylori* được chèn vào vector pGEM-T easy (promega) bằng phản ứng lai phân tử. Qui trình theo hướng dẫn của nhà sản xuất (<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf>). Sau đó, biến nạp các sản phẩm lai vào tế bào khả biến *E. coli* dòng DH5α bằng sốc nhiệt. Tế bào *E. coli* sau biến nạp sản phẩm lai cấy trải trên thạch LB đặc có X-gal, IPTG, ampicilin rồi ủ ở 37°C qua đêm. Sau đó chọn đơn khuẩn lạc trắng đem cấy vào 5 ml dung dịch LB lỏng có ampicilin (100 µg/ml), lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Lấy 200 µl dịch khuẩn

tách ADN-plasmid, dùng kit của hãng Fermentas (Miniprep kit). Quy trình tách theo hướng dẫn của nhà sản xuất (<http://www.fermentas.com/en/products/all/nucleic-acid-purification>). Kiểm tra sản phẩm chèn PCR bằng enzym giới hạn FastDigest *EcoRI*. Kết quả sau khi thực hiện phản ứng cắt sẽ thu được 2 phần: một là sản phẩm PCR và phần lớn còn lại là của plasmid trên gel agarose 1%.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả tách dòng sản phẩm PCR của gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) và *CagA*.

Để có được các panel chuẩn là sản phẩm plasmid mang đoạn gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*) và *CagA*, đánh giá độ nhạy và đặc hiệu của phản ứng multiplex-PCR và làm chứng dương kiểm soát phản ứng PCR chúng tôi tách dòng sản phẩm gen này. Sau khi thực hiện phản ứng PCR trên mẫu ADN bệnh phẩm có *H. pylori* của BN loét dạ dày. Sản phẩm PCR thu được là đoạn gen *VacA* (*s1/s2*, *m1/m2*), hoặc *CagA* của *H. pylori* được chèn vào vector pGEM-T easy. Kiểm tra sản phẩm ADN-plasmid bằng enzym *EcoRI*. Kết quả, sau khi thực hiện phản ứng cắt bằng enzym *EcoRI* sẽ thu được 2 sản phẩm ADN, mảnh nhỏ có kích thước 259/286 bp của gen *VacA-s1/s2* hoặc 567/642 bp của gen *VacA-m1/m2* hoặc 350bp của gen *CagA* và phần còn lại của vector (hình 1).

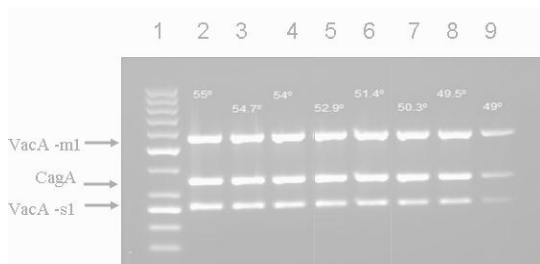


Hình 1: Hình ảnh sản phẩm ADN chèn vào vector pGEM T easy. Kiểm tra bằng enzyme *EcoRI* cho sản phẩm gen *VacA-s2* (286bp) của *H. pylori* và vector pGEM T easy.

Trong điều kiện nuôi cấy *H.pylori* khó khăn, tốn kém và đảm bảo an toàn vi sinh khác, việc tách dòng sản phẩm PCR làm chứng dương cũng như chuẩn hóa điều kiện phản ứng PCR là phổ biến và được nhiều labo sinh học phân tử áp dụng.

2. Tối ưu hóa nhiệt độ và thời gian gắn môi cho phản ứng multiplex PCR.

Để tìm nhiệt độ gắn môi phù hợp cho phản ứng multiplex-PCR đối với gen đích *CagA* và *VacA*-(*s1/s2*, *m1/m2*), thực hiện bằng chương trình gradient nhiệt. Dựa vào nhiệt độ nóng chảy trung bình của mỗi cặp môi (Tm), nhiệt độ gắn môi được chọn từ 49 - 55°C với các điểm đặt nhiệt là: 49; 49,5; 50,3; 51,4; 52,9; 54; 54,7 và 55°C. Sử dụng mẫu plasmid đã tách dòng chứa các gen *CagA*, *VacA-s1/s2* và *VacA-m1/m2*. Xác định nhiệt độ gắn môi, chuẩn bị 24 phản ứng PCR giống nhau về thành phần, trong đó có 8 phản ứng PCR nhân gen *CagA*, 8 phản ứng nhân gen *VacA-s1/s2* và 8 phản ứng cho *VacA-m1/m2* của *H. pylori* tương ứng với các điểm nhiệt độ xác định ở trên. Thực hiện phản ứng multiplex-PCR đồng thời trong cùng một điều kiện, chỉ khác nhau về nhiệt độ gắn môi.



Hình 2: Hình ảnh điện di phát hiện kiểu gen CagA, VacAm1, VacAs1 sau khi thực hiện gradient nhiệt tìm nhiệt độ gắn mồi phù hợp. Cột 1: thang chuẩn ADN, các cột 2 - 9: các nhiệt độ gắn mồi tương ứng là 55; 54,7; 54; 52,9; 51,4; 50,3; 49,5 và 49 °C.

Kết quả thấy hình ảnh điện di rõ nét nhất ở cột số 5 và số 6, theo thứ tự tương ứng với nhiệt độ ở 51,4°C và 52,9°C, đối với đồng thời cả 3 gen CagA, VacA-s1, VacA-m1 của *H. pylori* (hình 2). Đối với thời gian gắn mồi, thí nghiệm được chuẩn bị cho 12 phản ứng PCR trên các panel chuẩn giống hệt nhau về thành phần ứng, mốc thời gian gắn mồi 30, 45, 60, 90 giây cho đồng thời các cặp mồi khuếch đại gen CagA, VacA-s1, VacA-m1. Kết quả cho thấy: sản phẩm PCR của cả 3 gen rõ nét nhất ở thời gian gắn mồi 60 giây. Như vậy, chu trình luân nhiệt tốt nhất để thực hiện multiplex-PCR nhân gen đích phân biệt kiểu gen CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 của *H. pylori* là: một chu kỳ 94°C x 3 phút, 35 chu kỳ (94°C x 30 giây, 52°C x 60 giây, 72°C x 90 giây) và 72°C x 7 phút.

Để thực hiện phản ứng multiplex-PCR thành công đối với các gen đích phụ thuộc nhiều yếu tố, nhiệt độ và thời gian gắn mồi đóng vai trò khá quan trọng. Trong thí

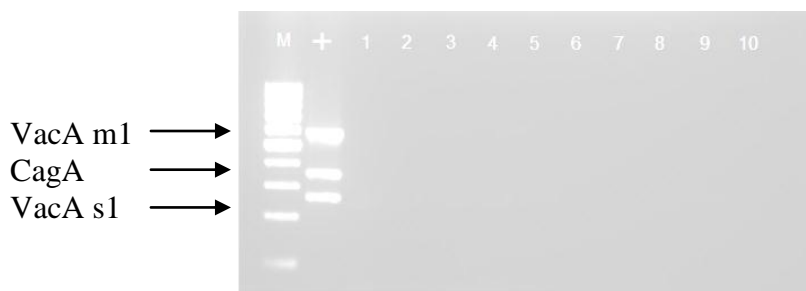
th nghiệm này, nhiệt độ gắn mồi cho sản phẩm PCR rõ nét, đồng đều giữa các gen là 51,4 và 52,9°C và trong các thực nghiệm trên mẫu BN chúng tôi chọn nhiệt độ trung bình 52°C. Thời gian duy trì nhiệt độ gắn mồi phụ thuộc số lượng các nucleotid G và C trên trình tự primer. Các mồi CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 có độ dài 19 và 23 bp được thử nghiệm với 4 mốc thời gian gắn mồi là 30, 45, 60 và 90 giây. Kết quả chứng minh thời gian gắn mồi phù hợp đối với đồng thời 3 cặp primer cho sản phẩm PCR đạt hiệu suất cao nhất ở 60 giây. Kết quả này tương tự với của một số tác giả công bố gần đây (Atherton và CS, 1999; Chattopadhyay và CS, 2004). Tuy nhiên, có một số khác biệt như nhiệt độ gắn mồi trong nghiên cứu này thấp hơn của các tác giả trên 2°C và thời gian bắt mồi tương đương 60 giây. Có sự khác biệt này là do sử dụng Taq polymerase và hóa chất của các hãng sản xuất khác nhau.

3. Xác định độ nhạy và độ đặc hiệu kỹ thuật multiplex-PCR phát hiện kiểu gen CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 của *H. pylori*.

Thí nghiệm thực hiện trên 30 mẫu hỗn hợp plasmid mang gen CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 của *H. pylori*, với 30 mẫu chuẩn *Salmonella* và *E. coli* đã xác định bằng nuôi cấy và phân lập. Kết quả điện di cho thấy 30/30 (100%) mẫu plasmid mang kiểu gen CagA, VacA-s1 và VacA-m1 dương tính (hình 3). Trong khi đó 30/30 (100%) mẫu *V. cholerae*, *Samonella* và *E.coli* đều âm tính (hình 4).



Hình 3: Hình ảnh điện di phát hiện kiểu gen CagA, VacA-m1, VacA-s1 trên plasmid tái tổ hợp mang gen đích tương ứng. Cột 1: thang chuẩn ADN, cột 2: chứng âm, cột 3 - 12: cho kết quả dương tính với plasmid mang gen CagA, VacA của *H. pylori*.



Hình 4: Hình ảnh điện di phát hiện kiểu gen CagA, VacA-m1, VacA-s1 trên các chủng *Salmonella* và *E.coli*. Cột 1: thang chuẩn ADN, cột 2: kết quả dương tính với *H. pylori*, các cột 1 - 10: kết quả âm tính với các mẫu *V. cholerea*, *Salmonella* và *E.coli*.

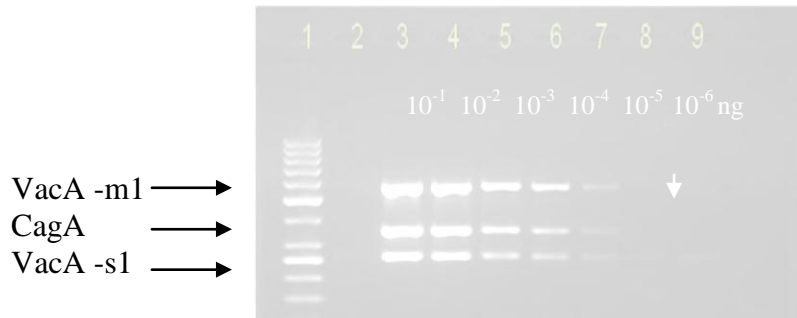
Bảng 3: Kết quả thực hiện phản ứng multiplex-PCR nhân gen CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 của *H. pylori*, *V. cholerea*, *Salmonella* và *E. Coli*

MẪU NGHIÊN CỨU	PHẢN ỨNG MULTIPLEX-PCR		CỘNG
	(+)	(-)	
<i>H. pylori</i> (plasmid)	30	0	30
<i>V. cholerea</i> , <i>Salmonella</i> và <i>E. coli</i>	0	30	30
Cộng	30	30	60

(* Độ nhạy: Se = $[30/30] \times 100\% = 100\%$;
độ đặc hiệu: Sp = $[30/30] \times 100\% = 100\%$.)

Kết quả trên cho thấy kỹ thuật multiplex-PCR xác định được các gen CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 của *H.pylori* bằng cặp

primer đặc hiệu. Trong khi đó các mẫu chuẩn chứa ADN của loài vi khuẩn *V. cholerea*, *Salmonella* và *E. Coli* đều âm tính. Vì vậy, phản ứng Multiplex-PCR có độ nhạy và đặc hiệu 100%. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Chattopadhyay S và CS (2004) đối với kỹ thuật Multiplex-PCR nhân đồng thời các gen CagA, VacA-s1/s2, VacA-m1/m2 của *H. pylori*. Khi so sánh với ure test chỉ có độ nhạy 95,3%; độ đặc hiệu 91,5% và phương pháp nuôi cấy có độ nhạy 100%, độ đặc hiệu chỉ 91,8% (Chattopadhyay S. và CS, 2004). Đánh giá khả năng phát hiện của multiplex-PCR chúng tôi hòa loãng nồng độ ADN của plasmid mang các kiểu gen của *H. pylori* và thực hiện phản ứng multiplex-PCR. Kết quả cho thấy ngưỡng phát hiện của phản ứng PCR này với nồng độ 10^{-6} ng ADN plasmid .



Hình 5: Khả năng phát hiện của phản ứng multiplex-PCR. Nồng độ tối thiểu ADN của plasmid mang gen CagA, VacA-s1, VacA-m1 phản ứng multiplex-PCR phát hiện được. Cột 1: thang ADN, cột 2: chứng âm, cột 3 - 9: tương ứng 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ng ADN.

Trên 30 BN có *H. pylori* dương tính xác định bằng nhuộm huỳnh quang và soi dưới kính hiển vi. Trong đó, 15 BN loét dạ dày và 15 ung thư dạ dày (hình 6). Bằng kỹ thuật multiplex-PCR đã được tối ưu hóa về thời gian và nhiệt độ gắn mỗi cũng như đánh giá độ nhạy, đặc hiệu phản ứng sử dụng nhân các gen đích đặc hiệu của *H. pylori* trên 30 BN (đã xác định nhiễm *H. pylori* bằng miễn

dịch huỳnh quang và ure test). Điều này chứng tỏ, phản ứng multiplex-PCR với chu trình luân nhiệt đã xác định áp dụng tốt trên các mẫu lâm sàng để phát hiện và phân biệt kiểu gen của *H. pylori*. Kết quả nghiên cứu này tương tự như một số tác giả gần đây công bố với cùng kỹ thuật multiplex-PCR (Atherton và CS 1999, Chattopadhyay và CS, 2004; Bolek BK và CS, 2007).



Hình 6: Hình ảnh thực hiện phản ứng multiplex-PCR trên các mẫu ADN tách chiết từ bệnh phẩm sinh thiết dạ dày BN. Cột 1 và 18, thang chuẩn ADN; cột 8, mẫu âm tính; cột số 2 đến 7 và 9 - 17 là mẫu của các BN bệnh lý dạ dày. Mẫu 5 (+) với VacA s1, m1 và CagA; Mẫu 13 và 15 (+) với VacA s1, m2 và CagA; Mẫu 10 (+) với VacA-m2.

KẾT LUẬN

Chu trình luân nhiệt thực hiện multiplex-PCR phát hiện và phân biệt kiểu gen CagA và VacA-(s1/s2, m1/m²) của *H. pylori* cho sản phẩm PCR rõ nét nhất là: 1 chu kỳ ở 94⁰C x 3 phút; 35 chu kỳ (94⁰C x 30 giây, 52⁰C x 60 giây, 72⁰C x 1 phút 30 giây) và 1 chu kỳ 72⁰C x 7 phút và giữ ở 4⁰C.

Kỹ thuật multiplex-PCR đối với gen đích CagA và VacA-(s1/s2, m1/m²) của *H. pylori* có độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 100% và ngưỡng phát hiện là 10⁻⁶ ng ADN plasmid.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thái Sơn, Phùng Đắc Cam, Kiều Chí Thành, Hoàng Ngọc Hiến. Lưu hành kháng thể kháng *H. pylori* ở các BN viêm loét dạ dày-tá tràng và ở người Việt Nam bình thường khỏe mạnh. Tạp chí Thông tin Y Dược. 2001, tr.25-28.

2. [Atherton JC](#), [Cover TL](#), [Twells RJ](#), [Morales MR](#), [Hawkey CJ](#), [Blaser MJ](#). Simple and accurate PCR-based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. [J Clin Microbiol](#). 1999, Sep, 37 (9), pp.2979-82.

3. [Bolek BK](#), [Salih BA](#), [Sander E](#). Genotyping of *Helicobacter pylori* strains from gastric biopsies by multiplex polymerase chain reaction. How advantageous is it? [Diagn Microbiol Infect Dis](#). 2007, May, 58 (1), pp.67-70. Epub 2007, Feb 14.

4. [Bruce E. Dun](#) & [Markus G. Grütter](#). *Helicobacter pylori* springs another surprise. [Nature Structural Biology](#). 2001, 8, pp.480-482.

5. [Hatakeyama, M](#). *Helicobacter pylori* CagA - a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis. [Int J Cancer](#). 2006, 119, pp.1217-1223.

6. [Marshall BJ](#), [McGeachie DB](#), [Francis GJ](#), [Uttley PJ](#). Pyloric campylobacter serology. [Lancet](#). 1984, Aug, 4, 2 (8397), p.281.

7. [Nguyen LT](#), [Uchida T](#), [Murakami K](#), [Fujioka T](#), [Moriyama M](#). *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. [J Med Microbiol](#). 2008, Dec, 57 (Pt 12), pp.1445-1453.

8. [Plummer M](#), [van Doorn LJ](#), [Franceschi S](#), [Kleter B](#), [Canzian F](#), [Vivas J](#), [Lopez G](#), [Colin D](#), [Muñoz N](#), [Kato I](#). *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. [J Natl Cancer Inst](#). 2007, Sep, 5, 99 (17), pp.1328-1334.

9. [Saadat, I](#), [Higashi, H](#), [Obuse, C](#), [Umeda, M](#), *et al*. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. [Nature](#). 2007, 447, pp.330-333