

幽门螺杆菌外膜蛋白对 *Helicobacter pylori* 感染的诊断

姜 政, 黄爱龙, 郑 健, 陶小红, 蒲 丹, 王丕龙

姜政, 陶小红, 蒲丹, 王丕龙, 重庆医科大学第一附属医院消化科
重庆市 400016
黄爱龙, 郑健, 重庆医科大学肝炎研究所 重庆市 400010
姜政, 男, 1965-06-06, 四川省武胜县人, 汉族, 2003 年重庆医科大学博士
毕业, 副教授, 主要从事胃肠疾病的研究。
重庆市科委应用基础研究计划项目, No. [2002]18-86
国家自然科学基金资助, No. 30371318
项目负责人: 姜政, 400016, 重庆市渝中区医学院路 1 号, 重庆医科大学第
一附属医院消化内科. jiangz@mail.china.com
电话: 023-68891218
收稿日期 2004-03-20 接收日期 2004-04-13

Helicobacter pylori outer membrane proteins in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection

Zheng Jiang, Ai-Long Huang, Jian Zheng, Xiao-Hong Tao,
Dan Pu, Pi-Long Wang

Zheng Jiang, Xiao-Hong Tao, Dan Pu, Pi-Long Wang, Department of
Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical
University, Chongqing 400016, China
Ai-Long Huang, Jian Zheng, Institute of Viral Hepatitis, Chongqing
Medical University, Chongqing 400010, China
Supported by the Basic Research Fund of Science and Technology Com-
mittee of Chongqing, No.[2002]18-86; National Natural Science Foun-
dation of China, No. 30371318
Correspondence to: Dr. Zheng Jiang, Department of Gastroenterology,
the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing
400016, China. jiangz@mail.china.com
Received: 2004-03-20 Accepted: 2004-04-13

Abstract

AIM: To examine the serological response of patient with various upper gastrointestinal diseases and *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection to *H pylori* outer membrane proteins (OMP) with M_r 18 000 and 26 000 acquired by gene recombinant technique, and to determine its diagnostic significance.

METHODS: The recombinant vectors encoding OMP of *H pylori* with M_r 18 000 and 26 000 identified by restriction enzyme or PCR were used to transform and express in BL21 (DE3) *E. coli* respectively. After purification with Ni^{2+} -NTA agarose resin, the colloid gold kits were prepared with purified recombinant proteins to detect *H pylori* infection and disease associated with *H pylori* by immunity-marker technology. We selected 150 patients with *H pylori* infection and digestive symptoms without previous treatment, including chronic superficial gastritis ($n=60$), duodenal ulcer ($n=30$), gastric ulcer ($n=30$), and gastric cancer ($n=30$) during one year. Simultaneously, 33 cases without digestive symptoms and *H pylori* infection were used as controls. All sera were collected and the antibody responded to specific proteins of *H pylori* was tested with the colloid gold test kit. Taking as reference a combination of standard diagnostic methods (^{13}C urea breath test, cultivate) and the classic enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serological tests was com-

pared with the results of this technique, and the sensitivity, specificity and accuracy of the colloid gold test were evaluated.

RESULTS: After purification with Ni^{2+} -NTA agarose resin, the purities of recombinant fusion proteins were all about 95%. The ELISA results showed that recombinant fusion proteins could be recognized by monoclonal antibody of anti-*H pylori* with M_r 18 000 and 26 000 respectively. The results detected using colloid gold kits were as follows: all patients' sera infected with *H pylori* showed response to recombinant protein with M_r 26 000 were 94.0%, while 95.0%, 96.7%, 96.7% and 90.0% of patients with *H pylori*-infected chronic superficial gastritis, duodenal ulcer, gastric ulcer, and gastric cancer respectively, showed responses. Compared with the serum-based ELISA results in detecting *H pylori*-infection, there was no significant difference with the colloid gold kits ($P > 0.05$). The sensitivity, specificity, and accuracy of the rapid test kit with M_r 26 000 protein were 94.0%, 97.0%, and 94.5%, respectively; To recombinant protein with M_r 18 000, 52.0%, 40.0%, 40.0%, 53.3% and 86.7%, of patients with *H pylori*-infected chronic superficial gastritis, duodenal ulcer, gastric ulcer, and gastric cancer respectively, showed responses. There were a significant difference ($P < 0.05$) in the detecting rates of *H pylori* infection between gastric cancer (86.7%) and the other diseases (43.3%). The results showed the colloid gold kits with M_r 26 000 proteins of *H pylori* could be used as a conventional examination method, with similar sensitivity and specificity as other conventional examination method, and simultaneously a significant association was found between the serologic response to M_r 18 000 OMP antigen and malignant outcome of *H pylori* infection.

CONCLUSION: The two colloid gold kits with M_r 18 000 and 26 000 proteins of *H pylori*, can be a useful tool for detecting *H pylori* infection, as well as predicting *H pylori* related gastrointestinal diseases, such as gastric malignancy and peptic ulcer.

Jiang Z, Huang AL, Zheng J, Tao XH, Pu D, Wang PL. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1588-1592

摘要

目的: 通过检测伴有 *H pylori* 感染的上消化道疾病患者血清对 *H pylori* OMP 的反应性, 来探讨基因重组 *H pylori* OMP 对 *H pylori* 感染及其相关性疾病的诊断价值, 为进一步开发诊断试剂盒及其临床应用奠定基础。

方法: 分别将已鉴定、测序的含 *H pylori* M_r 为 18 000, 26 000 OMP 重组质粒转化表达菌 - 大肠杆菌 BL21 中, 让其大量表达、纯化, 制备金标免疫检测试纸; 选择 2002-01/2002-12 因消化道症状来我院就诊的 *H pylori* 阳性患者 150 例, 经胃镜证实: 慢性浅表性胃炎 60 例;

胃溃疡 30 例; 十二指肠球部溃疡 30 例; 胃癌 30 例, 以及 33 例 H pylori 阴性的健康者作为对照, 分别采用以 H pylori M_r 为 18 000, 26 000 OMP 为抗原制备金标免疫检测试纸, 对 183 例受试者血清进行特异性抗体检测。

结果: 重组蛋白经 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖树脂纯化后, 其纯度高达 95% 以上, 经检测其抗原性良好. 用金标免疫试纸对 H pylori 感染的上消化道疾病患者 150 例, 以及 H pylori 阴性的健康者 33 名进行了检测, 其结果为: 26 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 94.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡以及胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 95.0%, 96.7%, 96.7% 和 90.0%, 与常规 ELISA 方法检测结果相比, 二者无显著性差异(χ^2 检验, $P > 0.05$), 其敏感性、特异性和准确性分别为 94.0%、97.0%、94.5%; 而 18 000 OMP 对 H pylori 感染患者的检出率为 52.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡和胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 40.0%、40.0%、53.3% 和 86.7%, 对胃癌患者中 H pylori 感染检出率 86.7% 与慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡总检出率 43.3% 相比, 具有显著的差异性($P < 0.05$). 因此以 26 000 OMP 的金标免疫检测试纸可以作为 H pylori 感染的常规检测方法, 他与常规 ELISA 检测方法相比具有可靠的特异性以及敏感性, 同时与 18 000 OMP 金标免疫检测试纸一起, 对胃癌患者中 H pylori 感染检出率高对胃肠道肿瘤特别是胃癌的诊断及预测方面具有独特之处, 这值得进一步的研究。

结论: H pylori M_r 18 000, 26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染及其相关性疾病, 尤其对消化道恶性肿瘤的诊断及预测具有重要的价值, 可以作为常规检测手段对消化道溃疡及肿瘤高危人群进行检测。

姜政, 黄爱龙, 郑健, 陶小红, 蒲丹, 王丕杰. 幽门螺杆菌外膜蛋白对 Helicobacter pylori 感染的诊断. 世界华人消化杂志 2004;12(7):1588-1592
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1588.asp>

0 引言

自 1983 年 Marshall 和 Warren 从慢性活动性胃炎患者的胃黏膜中分离出 H pylori 之后, H pylori 与上胃肠道疾病之间的关系受到消化学界和微生物学界的极大关注. 我国普通人群的感染率为 50-80%^[1], 每年新增感染人数近千万. H pylori 感染不但与 B 型胃炎、消化性溃疡、MALT 淋巴瘤、胃癌的发生有密切关系^[2-13], 而且与肠外疾病的发生也有重要作用^[14-16], 在动物实验中已证明 H pylori 的致癌性^[17], 世界卫生组织已明确指出 H pylori 为第一类致癌因子. 因此对 H pylori 感染的诊断及其治疗显得十分必要。

常规诊断方法有着各自的适应范围和特点^[18-23]. 鉴于 ELISA 可同时处理大量标本, 适合流行病学调查、研

究等特点, 应用较为广泛^[24]. 目前 H pylori 血清 ELISA 抗原主要采用 H pylori 的培养所得, 由于 H pylori 培养条件比较苛刻, 需要用特殊的厌氧培养设备, 不易获得大量的有效抗原成分; 而基因重组的纯化抗原, 目前 H pylori 多种 OMP 基因已被克隆, 并在大肠杆菌中得到了成功表达^[25-30], 但低分子 OMP 应用于 H pylori 的诊断, 目前国内外很少报道. 为了获得大量的纯化 H pylori 低分子的 OMP 抗原, 我们采用了基因重组技术, 分别构建了 H pylori M_r 为 18 000, 26 000 OMP 编码基因重组载体, 并在大肠杆菌中得到了高效表达, 对其抗原性进行了鉴定^[31-34]. 因此我们将纯化的重组融合 OMP 用于以抗原抗体反应及胶体金标记技术为基础的金标免疫检测试纸, 对 H pylori 感染及其相关疾病的诊断价值进行了研究如下。

1 材料和方法

1.1 材料 BL21/pET32a(+)/Omp₂₆, BL21/pET32a(+)/Omp₁₈ 和 H pylori 18 000, 26 000 低 M_r OMP mAb 由本实验室构建、鉴定; 收集 2002-01/2002-12 上消化道症状就诊 H pylori 阳性患者血清 150 例, 以及 H pylori 阴性健康者血清 33 名, 要求所有受试者在 4 wk 内未服用抗生素、糖皮质激素、 H_2 受体拮抗剂以及质子泵抑制剂. ¹³C 尿素呼吸实验由海德威公司提供; 金标免疫检测试纸(分别以 H pylori M_r 为 18000, 26 000 OMP 制作金标免疫检测试纸, 由肝炎所提供); Ni^{2+} -NTA 多聚组氨酸蛋白纯化试剂盒为 QIAGEN 产品; 超声破碎液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 7.0); 洗涤液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L 的 NaCl, 20 mmol/L imidazole, pH7.8); 洗脱液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , imidazole 300 mmol/L 的 NaCl, 250 mmol/L Imidazole, pH7.8)由肝炎研究所提供。

1.2 方法 将酶切、PCR 鉴定的重组载体转化大肠杆菌 BL21, 随后分别挑选含重组载体 pET32a (+)/Omp₁₈ 和 pET32a(+)/Omp₂₆ 的单克隆菌落于盛有 2 mL LB 培养基的各试管中(含氨苄青霉素 100 mg/L), 于 37 °C, 250 r/min 培养过夜, 次日将过夜培养液加入盛有 100 mL LB(含氨苄青霉素 100 mg/L)、容积为 500 mL 的三角瓶中, 各培养 500 mL 细菌液, 于 37 °C 培养至 A_{600} 为 0.4-0.6 时, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h, 以 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 于 -20 °C 冻存备用; 由于重组载体表达的融合蛋白质 C 端带有 6 聚组氨酸, 故表达产物用 Ni^{2+} -NTA 树脂纯化. 分别制备 500 mL 细菌培养液, 离心, 菌体混悬于 50 mL 超声破碎液中, 在 35% × 600 W 低温条件下, 超声破碎 40 min, 以 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min, 将上清液按常规方法过滤柱子(Ni^{2+} -NTA agarose), 以 10 mL 洗涤液洗脱 2 次, 然后以 10 mL 洗脱液洗脱并分 3 段收集过滤液, 分别取 3 段收集液 10 μ L 以等量 2 × 蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min, 进行 15% SDS-PAGE 凝胶电泳. 同时

采用相应的单克隆抗体以及免疫的动物血清，以 Western blot 方法检测表达的目的蛋白的生物活性。同时进行蛋白质含量的检测；H pylori 外膜蛋白金标免疫检测试验是采用高度特异性的抗原抗体反应及胶体金标记技术，通过双抗原夹心法(抗原 - 抗体 - 抗原)，实现对 H pylori 抗体特异检测。即：将重组 H pylori 抗原包被在反应膜 - 硝酸纤维素膜上作为检测带，同时将重组 H pylori 抗原标记上胶体金作为显色剂，利用双抗原夹心法原理，一步检测血清样品中的 H pylori 抗体。关于金标免疫检测试纸组装示意图如图 1 所示。其结果判断标准为：阴性(-)，表示出现一条紫红色条带，位于质控区(C)内。如样本中不含特定的 H pylori 抗体蛋白，胶体金抗体在层析过程中不会被固定在膜上检测带内的单抗免疫，因而测试区内(T)不会出现一条紫红色检测带。质控区内(C)所显现的紫红色条带是判定是否有足够的样品液，层析过程是否正常的标准，同时也作为试剂的内控标准。阴性结果表明，待测样品中不含 H pylori 抗体蛋白；阳性(+)则表示质控区(C)出现一条紫红色条带，同时在测试区(T)内也出现一条紫红色条带。如果待测样品中 H pylori 抗体蛋白浓度高于其检测阈值时，抗原免疫金与检测带上的另一单抗结合，因此在测试区内(T)出现紫红色检测带。阳性结果表明，特定 H pylori 抗体蛋白含量在阈值以上；无效则是在质控区(C)未出现紫红色条带，表明不正确的操作过程(图 2)；所有受试者经 ¹³C 呼吸试验、细菌学培养上述检查方法中，任意一种检测为阳性，被确定为 H pylori 感染；而前二种检测手段中任意一种检测为阴性，说明该患者无 H pylori 的感染。若 H pylori 感染患者，H pylori OMP 金标免疫检测为阴性，则视为假阴性；若无 H pylori 感染患者，H pylori OMP 金标免疫检测出现阳性，则视为假阳性，以此来判断 H pylori OMP 金标免疫检测试纸在临床中的应用价值。

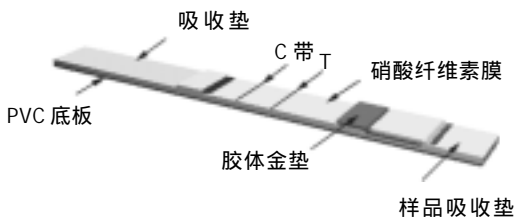


图 1 金标免疫检测试纸组装示意图

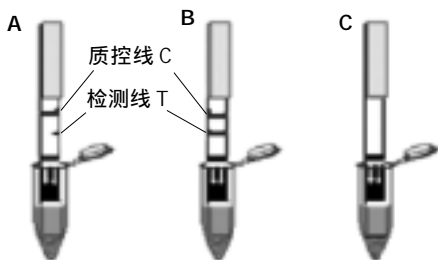


图 2 H pylori 外膜蛋白金标试纸检测示意图。A: 阴性; B: 阳性; C: 无效。

2 结果

2.1 重组融合蛋白的质和量 分别收集BL21/pET32a (+)/Omp₁₈ 和 BL21/pET32a(+)/Omp₂₆ 菌体，进行 15% SDS-PAGE，结果发现，经 IPTG 诱导后，融合蛋白的表达量分别占菌体总蛋白的 18.96%，26.38%。同时分别将 LB 培养基制备的大量细菌混悬于超声破碎液中，在 35% × 600 W 低温条件下，超声破碎 40 min，以 4 10 000 r/min 离心 15 min，将上清液按常规方法过柱 (Ni²⁺-NTA agarose resin)，以洗涤液洗涤 2 次，然后洗脱液洗脱，并分 3 段收集，分别取 3 段收集液 20 μL 以等量 2 × 蛋白上样缓冲液混匀，煮沸 5 min，以 150 g/L SDS-PAGE 进行凝胶电泳，通过染色、脱色，可见大部分目的蛋白在第 2 段收集液中，通过 Image Master Totallab v1.11 软件进行凝胶自动扫描分析，分别获得了纯度达 95% 以上的 1.25 g/L 的重组融合蛋白，其 M_r 为 3 8000，46 000 的融合蛋白，其中 M_r 20 000 的蛋白为 pET32a(+) 所表达。目的蛋白能够被相应 H pylori M_r 为 18 000，26 000 的 OMP mAb 以及免疫的动物血清所识别，说明表达的目的蛋白的生物活性良好。

2.2 金标免疫检测 H pylori 感染 对 H pylori 感染的上消化道疾病患者 150 例，以及 H pylori 阴性的健康者 33 名进行了金标免疫试纸检测，其结果为：26 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 94.0%，对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡以及胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 95.0%，96.7%，96.7% 和 90.0%，与常规的 ELISA 检测方法相比，二者无显著性差异(χ² 检验，P >0.05)，其敏感性、特异性和准确性分别为 94.0%，97.0%，94.5%；而 18 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 52.0%，对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡和胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 40.0%，40.0%，53.3% 和 86.7%，对胃癌患者中 H pylori 感染检出率 86.7% 与慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡总检出率 43.3% 相比，具有显著的差异性(P <0.05，表 1-2)。分别采用 M_r 18 000，26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测结果比较(见图 3)。

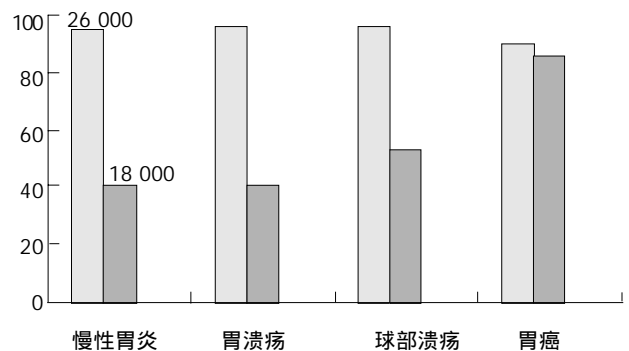


图 3 M_r 18 000，26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测结果比较。

表1 Mr 18 000, 26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测的结果

试验方法	受试者例数	阳性	阴性	假阳性	假阴性
ELISA	183	144	32	1	6
26 000 胶体金	183	141	32	1	9
18 000 胶体金	183	78	33	0	72

表2 Mr 18 000, 26 000 OMP 金标免疫检测试纸对 H pylori 感染检测的结果

试验方法	受试者例数	年龄	阳性	阴性
Mr 26 000 OMP				
慢性浅表性胃炎	60	50.3±15.9	57	3
胃溃疡	30	57.3±13.2	29	1
十二指肠球部溃疡	30	46.5±14.2	29	1
胃癌	30	64.7±17.4	27	3
Mr 18 000 OMP				
慢性浅表性胃炎	60	50.3±15.9	24	36
胃溃疡	30	57.3±13.2	12	18
十二指肠球部溃疡	30	46.5±14.2	16	14
胃癌	30	64.7±17.4	26	4

3 讨论

所有 H pylori 都表达 Mr 18 000、26 000 外膜蛋白, 而且与其他菌群的外膜蛋白无交叉反应^[33]. 我们在大肠杆菌中表达了完整的 H pylori Mr 18 000, 26 000 OMP, 经 Western-blot 鉴定, 有很强的抗原性. 分别将重组蛋白作为抗原, 采用高度特异性的抗原-抗体反应及胶体金标记技术, 通过双抗原夹心法(抗原-抗体-抗原), 一步检测血清样品中的 H pylori 抗体, 建立检测 H pylori 特异性 IgG 的金标免疫检测试纸, 从而实现了 H pylori 特异抗体的检测. 我们通过 Ni²⁺-NTA agarose resin, 将重组蛋白进行纯化, 并且将蛋白浓度调整到 1 g/L, 同时将胶体金的颗粒直径调整到 40-60 nm, 并将抗体的浓度调至最佳, 获得稳定性的胶体金标记物以及满意的实验效果.

本实验我们选择了 H pylori 感染的上消化道疾病患者 150 例, 以及 H pylori 阴性的健康者 33 名作为对照, 金标免疫检测试验结果为: 26 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率为 94.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡以及胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 95.0%, 96.7%, 96.7% 和 90.0%, 与常规的 ELISA 检测方法相比, 二者无显著差异(χ^2 检验, $P > 0.05$), 其敏感性、特异性和准确率分别为 94.0%, 97.0%, 94.5%; 而 18 000 OMP 对 H pylori 感染患者的检出率为 52.0%, 对慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡和胃癌患者中 H pylori 感染的检出率分别为 40.0%, 40.0%, 53.3% 和 86.7%, 对胃癌检出率 86.7% 与慢性浅表性胃炎、胃溃疡、十二指肠球部溃疡总检出率 43.3% 相

比, 具有显著的差异性($P < 0.05$). 因此以 26 000 OMP 的金标免疫检测试纸可以作为 H pylori 感染的常规检测方法, 与常规的检测方法相比具有可靠的特异性以及敏感性, 同时与 18 000 OMP 金标免疫检测试纸一起, 在胃肠道肿瘤的诊断和预测方面具有独特之处, 这值得进一步的研究, 上述结果与文献^[35]报道一致. 据 Raymond et al 报道, 以免疫印迹方法检测 H pylori 血清抗体, 发现对 H pylori Mr 26 000 OMP 抗原敏感性 89.4%, 特异性 87.9%, 正确率为 88.7%; 同时 Shiesh et al 报道, H pylori 阳性患者的血清对 H pylori 低分子量 OMP 116 000 (CagA), 89 000 (VacA), 60 000 (Hsp), 45 000, 35 000, 30 000, 26 500 和 19 500 的反应性分别为 76.5%, 42.9%, 23.6%, 46.7%, 84.1%, 76.5%, 82.9% 和 32.4%, 同时提出 H pylori 低分子量 OMP 19 500, 26 500 对上消化道溃疡、恶性肿瘤的高危人群可以作为有效的检测抗原.

研究发现表明, 虽然所有的 H pylori 菌株都能表达 Mr 为 18 000, 26 000 的 OMP, 刺激机体产生相应的抗体, 但抗体的产生与抗原分子大小、机体的免疫状态等诸多因素有关, 而且抗体滴度的衰减与相应抗体分子大小等密切相关, 本实验结果也表明, 26 000 OMP 对 H pylori 感染患者的阳性检出率(86.7%)明显高于 18 000 OMP 对 H pylori 感染的检出率(52%); 而胃癌的发生是一个多因素、多阶段的过程, 在慢性胃炎-萎缩性胃炎-肠上皮化生-异型增生-胃癌这样一个漫长的过程中, 各种致病因子可能单独或协同作用于癌变的起始阶段, 实验结果也表明 18 000 OMP 对胃癌的 H pylori 感染的检出率(86.7%)与 26 000 OMP 对胃癌的 H pylori 感染的检出率(90.0%)几乎一致, 综上所述, Mr 为 18 000, 26 000 的 OMP 不仅可作为检测 H pylori 感染的一种标志性抗原, 同时对胃癌以及胃癌高发人群的筛选具有重要的价值.

总之, 用 OMP 作为抗原而建立的金标免疫检测试验用于检测抗 H pylori IgG 抗体是可行的. 该方法体现了快速、简单以及无痛苦, 具有可靠的特异性, 而且与其他检测方法相比, 具有对胃癌患者 H pylori 感染检出率高对胃肠道肿瘤特别是胃癌的诊断及预测方面具有独特之处.

4 参考文献

- Chen M, Chen J, Liao W, Zhu S, Yu J, Leung WK, Hu P, Sung JJ. Immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing catalase in protection against gastric *Helicobacter pylori* infection in mice. *Helicobacter* 2003;8:613-625
- Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Takeshita M, Hizawa K, Kawasaki M, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M, Fujishima M.

- Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001; 48:454-460
- 4 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 5 Kate V, Ananthkrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88: 1054-1058
- 6 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 7 Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepman NY, Sugg JE, Hopkins RJ. *Helicobacter pylori* and early duodenal ulcer status post-treatment: a review. *Helicobacter* 2001;6:84-92
- 8 Hurenkamp GJ, Grundmeijer HG, Van Der Ende A, Tytgat GN, Assendelft WJ, Van Der Hulst RW. Arrest of chronic acid suppressant drug use after successful *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer disease: a six-month follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1047-1054
- 9 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- 10 Morgner A, Miehke S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001;19:2041-2048
- 11 Rieder G, Hofmann JA, Hatz RA, Stolte M, Enders GA. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in *Helicobacter pylori*-associated gastritis may represent an increased risk factor to develop gastric carcinoma of the intestinal type. *Int J Med Microbiol* 2003;293:403-412
- 12 Brenner H, Arndt V, Stegmaier C, Ziegler H, Rothenbacher D. Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am J Epidemiol* 2004;159:252-258
- 13 Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003;125:1636-1644
- 14 Ojetti V, Armuzzi A, De-Luca A, Nucera E, Franceschi F, Candelli M, Zannoni GF, Danese S, Di-Caro S, Vastola M, Schiavino D, Gasbarrini G, Patriarca G, Pola P, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection affects eosinophilic cationic protein in the gastric juice of patients with idiopathic chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:66-72
- 15 Emilia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara L, Amari S, Cagossi K, Torelli G. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;97:812-814
- 16 Choe YH, Kwon YS, Jung MK, Kang SK, Hwang TS, Hong YC. *Helicobacter pylori*-associated iron-deficiency anemia in adolescent female athletes. *J Pediatr* 2001;139:100-104
- 17 Crabtree JE, Court M, Aboshkiwa MA, Jeremy AH, Dixon MF, Robinson PA. Gastric mucosal cytokine and epithelial cell responses to *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *J Pathol* 2004;202:197-207
- 18 Chua TS, Fock KM, Teo EK, Ng TM. Validation of 13C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the Singapore population. *Singapore Med J* 2002;43:408-411
- 19 Kawai T, Kawakami K, Kudo T, Ogiyama S, Handa Y, Moriyasu F. A new serum antibody test kit (E plate) for evaluation of *Helicobacter pylori* eradication. *Intern Med* 2002;41: 780-783
- 20 Day AS, Sherman PM. Accuracy of office-based immunoassays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *Helicobacter* 2002;7:205-209
- 21 Oyediji KS, Smith SI, Arigbabu AO, Coker AO, Ndububa DA, Agbakwuru EA, Atoyebi OA. Use of direct Gram stain of stomach biopsy as a rapid screening method for detection of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer and gastritis patients. *J Basic Microbiol* 2002;42:121-125
- 22 Wong WM, Wong BC, Tang VS, Lai KC, Yuen ST, Leung SY, Hu WH, Lam SK. An evaluation of the PyloriTek test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Chinese patients before and after eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:976-980
- 23 Fujisawa T, Kaneko T, Kumagai T, Akamatsu T, Katsuyama T, Kiyosawa K, Tachikawa T, Kosaka O, Machikawa F. Evaluation of urinary rapid test for *Helicobacter pylori* in general practice. *J Clin Lab Anal* 2001;15:154-159
- 24 Miwa H, Akamatsu S, Tachikawa T, Sogabe T, Ohtaka K, Nagahara A, Sugiyama Y, Sato N. On-site diagnosis of *H pylori* infection by urine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:95-97
- 25 Yan J, Liang SH, Mao YF, Li LW, Li SP. Construction of expression systems for flaA and flaB genes of *Helicobacter pylori* and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins. *World J Gastroenterol* 2003;9:2240-2250
- 26 Liu X, Hu J, Zhang X, Fan D. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1513-1516
- 27 Bai Y, Li LR, Wang JD, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2711-2714
- 28 Yan J, Mao YF. Construction of a prokaryotic expression system of vacA gene and detection of vacA gene, VacA protein in *Helicobacter pylori* isolates and ant-VacA antibody in patients' sera. *World J Gastroenterol* 2004;10:985-990
- 29 Mao YF, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:977-984
- 30 Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M,1 8 000 OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- 31 Jiang Z, Huang A, Wang P. Gene cloning and expression of outer membrane protein of *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:1416-1419
- 32 Jiang Z, Tiao XH, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective *H pylori* antigens. *World J Gastroenterol* 2002;8:308-311
- 33 Jiang Z, Pu D, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction, expression and antigenic study of bivalent vaccine candidate with 26,000 OMP and heat shock protein A of human *Helicobacter pylori*. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:862-867
- 34 Bode G, Piechotowski I, Rothenbacher D, Brenner H. *Helicobacter pylori*-specific immune responses of children: implications for future vaccination strategy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9: 1126-1128
- 35 Chua TS, Fock KM, Chan YH, Dhamodaran S, Sim CS, Ng TM, Teo EK. Seroreactivity to 19.5-kDa antigen in combination with absence of seroreactivity to 35-kDa antigens is associated with an increased risk of gastric adenocarcinoma. *Helicobacter* 2002;7:257-264