

T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

***HELICOBACTER PYLORI*'NİN VİRULANS
FAKTÖRLERİ VE İLAÇ DİRENÇLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

(DOKTORA TEZİ)

ZEHRA KİPRİTÇİ

DANIŞMAN
DOÇ.DR. YEŞİM GÜROL

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü



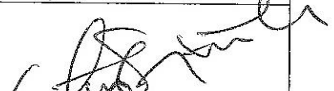
Program : Multidisipliner Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Tez Başlığı : Helicobacter pylori'nin Virulans Faktörleri ve İlaç Dirençlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Tez Sahibi : Zehra Kipritçi

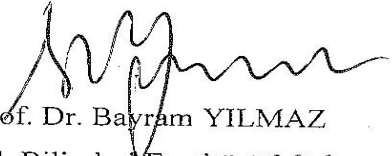
Sınav Tarihi : 28 Ekim 2016

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)	İmza
Jüri Başkanı	Prof Dr Turgay İsbir Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD /Sağlık Bilimleri Enstitüsü /Moleküler Tıp ABD	
(Tez danışmanı) Üye:	Doç. Dr. Yeşim Gürol Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Fakültesi Tıbbi mikrobiyoloji A.D.	
Üye:	Prof. Dr. Gülden Çelik Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Fakültesi Tıbbi mikrobiyoloji A.D.	
Üye:	Prof. Dr. Oğuz Öztürk İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp A.D	
Üye:	Prof. Dr. Sesin Kocagöz Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları A.D	

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09./11./2016. tarih ve 2016/22.-09.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Bayram YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ZEHRA KİPRİTÇİ



AİLEME ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Gerek tez konumun seçimi ve yürütülmesinde, gerekse doktora eğitimim süresince desteğini ve teşviklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yeşim Gürol'a,

Multidisipliner Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülden Çelik'e,

Destek, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. İskender Karaltı, Bil. Uzm. Biyo. Yasemin Öztürk, Biyo. Burcu Öksüz, Bil. uzm Biyo. Deniz Karadeniz, Lab. Hilal Özbey, Uzm Dr. Caner Yürüyen'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgileri ile bana katkıda bulunan Multidisipliner Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda bulunan bütün hocalarıma

Değerli arkadaşlarım Selvi Duman, Seda Güleç Yılmaz, Tuba Akdeniz, Zeynep Akbulut'a

Mide biyopsi örneklerinin alınması aşamasında her türlü imkanı sağlayan Yeditepe Üniversitesi Gastroenteroloji Bilim Dalı doktorlarına,

Büyük bir sabır ve anlayış ile her zaman yanımda olan başta oğlum Mehmet Erdem'e, eşim Öner Kipritçi'ye, ailem ve eşimin ailesine her türlü destekleri için TEŞEKKÜR ederim.

İÇİNDEKİLER

<u>Tez Onayı</u>	II
<u>Beyan</u>	III
<u>İthaf</u>	IV
<u>Teşekkür</u>	V
<u>İçindekiler</u>	VI
<u>Tablolar listesi</u>	VIII
<u>Şekiller listesi</u>	IX
<u>Semboller / Kısaltmalar Listesi</u>	X
<u>Özet</u>	XIII
<u>Abstract</u>	XV
<u>1. Giriş ve Amaç</u>	1
<u>2. Genel Bilgiler</u>	
<u>2.1.Tarihçe</u>	3
<u>2.2. Genel Bilgiler</u>	5
<u>2.3. Mikrobiyolojik Özellikleri</u>	6
<u>2.4. H.pylori'nin Sınıflandırılması</u>	10
<u>2.5. Konak ve Çevre</u>	11
<u>2.6. Patogenez</u>	12
<u>2.6.1. Bab A</u>	15
<u>2.6.2. Sab A</u>	15
<u>2.6.3. Alp A/B</u>	15
<u>2.6.4. Hop Z</u>	15
<u>2.6.5. Oip A</u>	15
<u>2.6.6. Mide Epitelini Etkileyen H.pylori Virulans Faktörleri</u>	
<u>2.6.6.1. Cag PAI</u>	16
<u>2.6.6.2. Cag A</u>	18
<u>2.6.6.3. Vac A</u>	20
<u>2.6.6.4. Üreaz</u>	23
<u>2.6.6.5. Htr A</u>	23
<u>2.6.7. H.pylori Tarafından İndüklenen Epitelyum Sinyali</u>	23
<u>2.6.8. Diğer Virulans Faktörleri</u>	

<u>2.6.8.1. Dup A</u>	24
<u>2.6.8.2. HP-NAP</u>	25
<u>2.6.8.3. İce A</u>	25
<u>2.7. Tanı</u>	26
<u>2.7.1. Non İnvaziv Testler</u>	
<u>2.7.1.1. Üre Nefes Testi</u>	26
<u>2.7.1.2. Dışkıda Antijen Testi</u>	27
<u>2.7.1.3. Serolojik Testler</u>	27
<u>2.7.2. İnvaziv Testler</u>	
<u>2.7.2.1. Histopatolojik İnceleme</u>	28
<u>2.7.2.2. Üreaz Testi</u>	28
<u>2.7.2.3. Kültür</u>	29
<u>2.7.2.4. Moleküler Testler</u>	29
<u>2.8. Tedavi</u>	30
<u>2.8.1. Duyarlılık Testi</u>	32
<u>2.8.1.1. Fenotipik Metodlar</u>	32
<u>2.8.1.2. Genotipik Metodlar</u>	32
<u>2.8.2. Antibiyotiklerin Etki ve Direnç Mekanizmaları</u>	33
<u>2.8.3. H.pylori Tedavisinde Kullanılan Adjuvan Ajanlar</u>	
<u>2.8.3.1. Bizmut</u>	35
<u>2.8.3.2. H, K, ATPaz, PPI</u>	35
<u>2.8.4. Antibiyotik Direncinin Prevalansı</u>	37
<u>2.9. Korunma</u>	37
<u>3. Gereç ve Yöntem</u>	39
<u>3.1. DNA Ekstraksiyonu</u>	39
<u>3.2. Genotype® HelicoDR kiti ile Hibridizasyon</u>	40
<u>3.3. Realtime PCR ile Klaritromisin Direncinin Saptanması</u>	41
<u>3.4. Multipleks PCR ile Virulans Faktörlerinin Saptanması</u>	43
<u>3.5. İstatistiksel Analiz</u>	45
<u>4. Bulgular</u>	46
<u>5. Tartışma</u>	51
<u>Kaynaklar</u>	60
<u>Özgeçmiş</u>	72

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: <i>H.pylori</i> 'nin bazı temel özellikleri.....	9
Tablo 2: <i>H.pylori</i> 'nin sınıflandırması.....	10
Tablo 3: <i>H.pylori</i> 'nin virulans faktörleri.....	14
Tablo 4: <i>H.pylori</i> tanısı için kullanılan testler.....	26
Tablo 5: <i>H.pylori</i> enfeksiyonlarında kullanılan antimikrobiyallerin etki ve direnç mekanizmaları ile prevalansları.....	37
Tablo 6: Multiplex PCR için kullanılan primerler.....	44
Tablo 7a. Virulans faktörlerin multipleks PCR yöntemi ile elde edilen miktarları.....	47
Tablo 7b. VacA allellerinin birlikte bulunma oranları.....	47
Tablo 8. 78 <i>H.pylori</i> pozitif hastanın antibiyotik direnç oranları.....	50
Tablo 9: Türkiye'de <i>H.pylori</i> izolatları ile yapılan çalışmalarda vacA ve cagA virulans faktörlerinin görülme oranları.....	54
Tablo 10. Türkiye'de <i>H.pylori</i> 'de ilaç direnç oranları.....	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. A. <i>H.pylori</i> 'nin mikroskopik görüntüsü	
B. <i>H.pylori</i> kolonisinin selektif <i>H.pylori</i> agardaki görüntüsü.	8
Şekil 2. <i>H.pylori</i> 'nin basil formundan kokoid forma geçişi.....	8
Şekil 3. <i>H. Pylori</i> virulansında bakteriyel tutunmanın rolü.....	16
Şekil 4. CagA ve peptidoglikan hücreyi birçok yolla etkiler.....	18
Şekil 5. VacA'nın genetik ve protein yapısı.....	22
Şekil 6. Multifonksiyonel bir toksin olan VacA-VacA vakuoller oluşturabilir, endozomlar ve erken lizozomlar oluşturabilir. Hücre tarafından alınarak mitokondride lokalize olur. Bu da apoptoza neden olur. Hücre membranındaki bir proteine bağlanır, inflamasyonu indükler ve T-hücre aktivasyonunu ve proliferasyonu engeller.....	22
Şekil 7. Realtime PCR ile klaritromisin direncinin değerlendirilmesi.....	43
Şekil 8. Multipleks PCR ile virulans faktörlerin değerlendirilmesi.....	44
Şekil 9. CagA virulans faktörü ile birlikte saptanan VacA allellerinin oranları.....	47
Şekil 10. <i>H.pylori</i> virulans faktörlerinin multipleks PCR çalışıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde 100bp ladder kullanılarak görüntülenmesi.....	48
Şekil 11. Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile çalışılmış <i>H.pylori</i> pozitif ve negatif olan hastalar.....	49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
Alp A/B	Adherence associated lipoprotein
ATP	Adenozin trifosfat
Bab A	Blood group antigen binding adhesine
BFA	Brefeldin A
Cag A	cytotoxin-associated gene A
Cag PAI	cag patojenite adası
CD	cluster of differentiation
CD2AP	CD2 ilişkili protein
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
DFA	Direkt floresan antikor
Dup A	Duodenal ulcer promoting gene A
EGFR	Epitelial growth factor receptor
EIA	Enzim immunoassay
F-aktin	Filamentöz aktin
FISH	floresan in situ hibridizasyon
GSK-3b	Glikojen sentaz kinaz- 3b
GTP	Guanozin trifosfat
Hop	Helicobacter dış membran proteini
Hor	Hop ilişkili
HP-NAP	H.pylori nötrofil aktive edici protein
Hsp	Isı şok proteinleri

Htr A	High temperature requirement A
Ice	The induced by contact with epithelium gene
Ig	İmmunglobulin
IL	İnterlökin
JAM	Junctional Adhesion Molecule
Le^b	Lewis ^b
LPS	Lipopolisakkarit
MALT	Mukoza ilişkili lenfoid doku
MAP	Mikrotübül ilişkili protein
MHC	Major histokompatibilite kompleks
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MMP	Matriks metalloproteinaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NFAT	Nükleer faktör aktive edici T hücreleri
NF-KB	Nuclear Factor kappa B
Oip A	Outer membrane inflammatory protein
OMP	Dış membran proteini
PAMP	patojen-ilişkili moleküler patern
PAR1	partitioning defective 1)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PCR-RFLP	PCR-restriction fragment length polymorphism
PI3K	Fosfotidilinositol 3-kinaz
PPI	Proton pompa inhibitörü
PÜH	Peptik ülser hastalığı

RNA	Ribonukleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
Sab A	Siyalik asit bağlayıcı adezin
SOD	Süperoksit dismutaz
T4SS	Tip IV sekresyon sistemi
Th	T- helper
Treg	T regülatuar
VacA	Vakuolize Edici Sitotoksin A

ÖZET

Kipritçi Z. *Helicobacter pylori*'nin Virulans Faktörleri ve İlaç Dirençlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2016

H.pylori dünya popülasyonunun yaklaşık %50'sini infekte eden insan midesindeki bakteriyel bir patojendir. Tedavi edilmezse kansere kadar giden değişik hastalıklara sebep olabilir. Yapılan çalışmalarla *H.pylori* suşlarının bazılarının asemptomatik bulunmasına karşın bazılarının daha ağır hastalıklara neden olduğu görülmüştür. Bunun da nedeninin bakterinin virulans faktörlerinden kaynaklandığı bilinmektedir. *H.pylori* için bilinen en etkin virulans faktörleri *cagA* ve *vacA*'dır. *VacA*'nın da *s1*, *s2*, *m1* ve *m2* allelleri en çok karşılaşılanlardır.

Bu çalışmamızda Yeditepe Üniversitesi Gastroenteroloji bölümüne başvuran ve endoskopi işlemi sırasında biyopsi örneği alınan 140 hastayı değerlendirdik. Kumar S. ve ark.'nın yaptığı çalışma referans alınarak multipleks PCR yöntemi ile *H. Pylori* varlığı ve *cag A* ve *vacA* virulans faktörlerinin varlığı araştırıldı. 69(%49,3) hasta *H.pylori* pozitif olarak saptanmıştır. Bu hastaların 25(%36,2)'i *cagA* pozitif olup *vacA* *s1*, *s2*, *m1* ve *m2* allellerinin bulunma oranı ise sırasıyla 16 (%23,2), 23 (%33,3), 16 (%23,2) ve 10 (%14,5)'dur.

H.pylori enfeksiyonunun tedavisi için standart olarak kullanılan tedavi protokolü, üçlü tedavi şeklindedir. Omeprazol gibi bir proton pompa inhibitörü (PPI) ve genelde amoksisilin, klaritromisin veya metranidazolü içeren iki antibiyotikten oluşur. Fakat son yıllarda antibiyotiklere karşı gelişen direnç nedeniyle tedavide başarı oranı düşmektedir. Bu nedenle çalışmaya aldığımız hastalardan Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti kullanılarak florokinolon ve klaritromisin direnci, realtime PCR yöntemi ile de sadece klaritromisin direnci incelenmiştir. Buna göre 20 (%25,6) hastada florokinolon direnci saptanmıştır. Klaritromisin direncine ise hibridizasyon yöntemi ile

31(%39,7) hastada, realtime PCR yöntemi ile 26(%33,3) hastada rastlanmıştır. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *H.pylori*, virulans faktörleri, cagA, vacA, antibiyotik direnci



ABSTRACT

Kipritçi Z. Investigation of Drug Resistance and Virulence Factors of *Helicobacter pylori* with Molecular Methods. Yeditepe University, Institute of Health Science,, Molecular Medicine Department. PhD Thesis. İstanbul. 2016

Helicobacter pylori, a bacterial pathogen of the human stomach, infects an estimated 50% of the population worldwide. Infection by *H. pylori* causes gastritis initially and, if allowed to persist, can induce a range of pathologies. Although most infected individuals remain asymptomatic, some *H. pylori* positive individuals develop at least one of the associated diseases at some point in their lives. The clinical outcome of *H. pylori* infection is determined by multiple factors including *H. pylori* related virulence factors. The most effective virulence factors of *H. pylori* is *cagA* and *vacA*. *VacA* also has the most widely encountered alleles are s1, s2, m1 and m2.

In the present study inverse biopsy specimens which were obtained from the 140 patients at the Gastroenterology Department of Yeditepe University Hospital were studied by multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *vacA* and *cagA* virulence factors with Kumar S. et.al.'s study. 69(49,3%) of patients found *H.pylori* positive. 25(36,2%) of them were *cagA* positive and *vacA* s1, s2, m1 and m2 alleles found respectively 16 (23,2%), 23 (33,3%), 16 (23,2%) ve 10 (14,5%).

Standard treatment protocol used for the treatment of *H. pylori* infection is triple therapy, which include omeprazole as a proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics usually consist of amoxicillin and clarithromycin or metronidazole. In recent years, however increase rate of antibiotic resistance, eradication rate is decrease. Because of we analysed fluoroquinolone and clarithromycin resistance with using GenoType® HelicoDR(Hain Life Science, Germany) test kit, and also we used realtime method for only clarithromycin resistance. For this studies, we found the rate of fluoroquinolone resistance 20 (25,6%), and clarithromycine resistance 31(39,7%), also in 26(33,3%) patients with realtime PCR method.

Key words: *H.pylori*, Virulence factors, *cagA*, *VacA*, Antibiotic resistance

1. GİRİŞ VE AMAÇ

H.pylori, dünya popülasyonunun yaklaşık %50'sini enfekte eden insan midesindeki bakteriyel bir patojendir. *H.pylori* enfeksiyonu ilk olarak gastrite neden olur ve tedavi edilmezse peptik ülser ve atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve gastrik kanser gibi uzun süreli başka enfeksiyonlara da sebep olabilir. Bu hastalıkların organizma tarafından üretilen spesifik faktörlere mi bağlı yoksa gastrik mukozada uzun süre kolonizasyon ve etkisinin neden olduğu kronik inflamasyondan mı kaynaklandığı henüz bilinmemektedir (1).

Bakteriye bağlı çeşitli virulans faktörlerinin konak hücre epiteline tutunması için önemli olduğu düşünülmektedir. Salgılanan bir protein olan vacA, konak hücreye tutunmak için membran insersiyonu, anyon- idareli kanal aktivitesi, transepitelyal direnci değiştirme, antijen prosesinin inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi gibi birçok aktiviteye sahiptir. Konak hücrede membran bütünlüğünün bozulmasının konak hücre yüzeyinde bakterinin varlığını arttırdığı düşünülmektedir. Bakterinin patojenitesinden sorumlu olduğu düşünülen diğer bir gen bölgesi olan Cag PAI varlığı birçok hastalığın meydana gelmesi ile ilişkilidir. Cag A proteini (adada da kodlanır) konak hücre sitoplazmasına tip IV sekresyon sistemi (T4SS) ile geçer. CagA epitel hücrenin içine bir kere geçtikten sonra, konak hücre membranı ile bağlantıda kalır. *H.pylori* enfeksiyonu boyunca artan hücre proliferasyonunun, prekanseröz olduğunu göstermek için iyi bir gösterge olduğu düşünülmektedir (1). Oip A, Dup A, SabA, Alp A/B, Hop Z bakterinin patojenitesinden sorumlu olduğu düşünülen diğer virulans faktörleridir (2,3).

Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde *H.pylori* enfeksiyonuna daha sıklıkla rastlanmaktadır. CagA geni taşıyan *H.pylori* izolatları mide mukozasında daha yaygın inflamasyona neden olur. CagA pozitif suşlar, cagA negatif olanlara göre atrofik gastrit ve gastrik adenokarsinom gelişimine daha çok neden olurlar (4,5). Bu nedenle hastalık riskine katkıda bulunmak için *H.pylori* virulans faktörlerini çalışmak önemlidir. Bu konuda Türkiye'de yapılmış çalışmalar olmakla beraber yeterli değildir. Bu nedenle biz de patogenezi açısından en önemli iki virulans faktörü olan vacA ve cagA genlerinin izole ettiğimiz hastalardaki oranını saptamak istedik.

H.pylori'nin eradikasyonu için genelde proton pompa inhibitörü (PPI) veya ranitidin bizmut ve iki antibiyotiği içeren üçlü tedavi kullanılır. Genelde amoksisilin ve klaritromisin tercih edilir. Kullanılan antibiyotikler makrolidler (klaritromisin veya azitromisin), imidazol (metranidazol veya tinidazol), amoksisilin veya tetrasiklidir (6).

H.pylori izolatlarında klaritromisin direnci artmaktadır. Prevalans gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha fazladır. Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde antibiyotik direncinin saptanması tedavinin etkinliği açısından önemlidir. Levofloksasin bir florokinolondur, *H.pylori*'ye karşı aktivitesi önemlidir. *H.pylori* eradikasyonu başarısızlığında ikincil ilaç olarak kullanılmaktadır (7).

Zor üreyen bir bakteri olması nedeniyle *H.pylori*'nin kültürü ve antibiyogram uygulamalarındaki teknik zorluklar, direncin belirlenmesinde kolay uygulanabilir ve ucuz yöntemlerin gerekli olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalarda, tedavi öncesi direnç varlığının saptanmasının önemi gösterilmiştir (8). Klaritromisin direncinin belirlenmesinde fenotipik ve genotipik olarak birçok yöntem vardır. Moleküler olarak A2143G, A2144G gibi mutasyonlarla direnç tespiti yapılması daha kolay ve doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (9). *H.pylori*'de florokinolon direnci ise *gyrA* geninde 87 ve 91. Pozisyonlardaki mutasyonlarla ilişkilidir ve moleküler yöntemlerle tespit edilmesi gerektiği gösterilmiştir (10).

Antibiyotiklere direnç oranları bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. Türkiye'de de farklı bölgelerde farklı direnç oranlarına rastlanmaktadır. Bizim de amacımız *H.pylori* eradikasyonu için en sık kullanılan antibiyotikler olan klaritromisin ve florokinolonlara direnci moleküler bir yöntem olan hibridizasyon yöntemi ile belirlemek ve realtime PCR yöntemi ile karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk kez gastrik ülser 1586 yılında İtalyan bir doktor tarafından tanımlanmış, bunu takiben 1688 yılında İsveç'ten Johannes ve Muralt duodenal ülserden bahsetmiştir. 1761'de üst abdominal ağrı ve mide şikayeti olan hastalarda mide ve duodenumda eritema ve erozyonlar tanımlanmıştır. 18. ve 19. yüzyıllar boyunca, midede hidroklorik asitin ve mide sekresyonlarının sindirim özelliklerinin tanımlanmasıyla üst gastrointestinal yolun fonksiyonu daha iyi anlaşılmıştır.

Midede spiral bakterilerin varlığını ilk kez 1893 yılında İtalyan bir patolog olan Bizzozero, köpek midesinde tanımlamıştır. İnsan midesinde ise ilk kez 1896 yılında gösterilmiştir. Ve ilk rapor gastrik karsinom olan hastalara ilişkindir. Bundan 9 yıl sonra, mide ve duodenal ülseri olan hastaların midelerinde spiral mikroorganizmalar olduğu bildirilmiştir. Fakat rapor edilen bu mikroorganizmaların ağız boşluğundaki kontaminantlar olduğu saptandığından çalışmalar başarısız olmuştur. Bu arada insan midesindeki üreaz aktivitesinin varlığı rapor edilmiş ve bu üreaz aktivitesinin mide mukoza hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmüş bu nedenle bakteri varlığı ile ilişkilendirilmemiştir.

1938 yılında 242 otopsi midesinde hematoksilin ve eozin boyası ile yapılan incelemelerde %43 oranında spiroketlere rastlanmıştır. Bunu takip eden yılda spiroketler 35 gastrik ülser veya karsinoma olan hastanın mide biyopsi materyalinde %37 oranında bildirilmiştir. 1954 yılında 1000 mide biyopsi örneği ile yapılan çalışmada aynı sonuçlar elde edilmeyince mide bakterileri ile ilgilenilmesinden vazgeçilmiştir.

1950 yılında Fitzgerald ve Murphy gastrik ülserli hastaların midelerinde yaptıkları çalışma ile üreaz aktivitesinin üre ve hidrojen iyonları arasındaki bir reaksiyon nedeniyle mide mukozasını koruduğunu saptamışlardır. Yani mide asidini amonyak üreterek nötralize ediyordu. Ve ülser hastalarına üre verildiğinde mide asidinde nötralizasyonla sonuçlandığını görmüşlerdir. Bundan 9 yıl sonra tetrasiklin verildikten sonra mide üreaz aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Midede üreazın bakteriyel kaynaklı olduğu, 1968 yılında bakteri olmayan hayvanların midelerinde üreaz

aktivitesinin yokluğu gösterildiğinde doğrulanmıştır. 1975'te gastrik ülserli hastaların mide materyallerinin %80'indeki gastritle bakterilerin ilişkisi olduğu rapor edilmiştir.

Batı Avusturalya'da bir histopatolog olan Robin Warren mide biyopsi örneklerini Warthin-Starry boyası ile boyamış ve mukozal bakterilerin varlığını göstermiştir. Marshall ise gastrit ve gastrik bakterileri olan Rus bir hastayı tetrasiklin ile tedavi etmiş, enfeksiyonun yok olduğunu ve gastritin iyileştiğini gözlemlemiştir. 1981'de Barry Marshall ve Robin Warren'in birlikte klinik bir çalışma başlatması ile modern çağ başlamıştır. Bakteri, morfolojik olarak *Campylobacter* cinsine benzediği için araştırmacılar mide biyopsi örneklerini selektif besiyerlerine ekip kültürleri mikroaerofilik koşullarda inkübe etmişlerdir. 1982 yılının Nisan ayına kadar yapılan çalışmalarda bu basillerin kültürleri iki gün inkübe edildiği için başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Fakat yapılan bir çalışma sırasında kültür plaklarının Paskalya tatili nedeniyle 6 gün boyunca inkübe edilmesi sonucunda bu bakteri 1983 yılında ilk kez izole edilmiş olur. Marshall, izole edilen bakterinin hastalık etkeni olduğunu kanıtlamak için bir hastadan izole edilen suşu ağız yoluyla alır ve bu araştırmacıda yaklaşık 14 gün sonra gastrit belirtileri görülür. Böylece, Koch postulları doğrulanıp bakterinin gastrit etkeni olduğu gösterilmiştir (11, 12). Bu bakterilerin gastrit ile ilişkisi olduğu ilk kez Royal Australian College of Physicians'ta 22 Ekim 1982'de sunulmuş, 1983'te yayınlanmıştır. Bu 'Campylobacter benzeri organizmalar' *Campylobacter pyloridis* olarak adlandırılmıştır. Çünkü mikroaerobik, kıvrık, Gram negatif bakterilerdi, morfolojik ve guanin/sitozin içerikleri olarak da *Campylobacter*'e benziyordu. Diğer *Campylobacter*'lerden farklı olarak flajellalarının varlığı gösterilmiştir. 1987'de ismi *Campylobacter pylori* olarak değiştirilmiştir. Sonraları *C.pylori*'nin *Campylobacter* cinsinden olmaması gerektiği düşünülerek 1989'da ismi, iki farklı morfolojik yapısından dolayı; *in vivo* helikal, fakat *in vitro*da çomak şeklinde olduğundan *Helicobacter* olarak düşünülmüştür.

Enfektif bir organizma ve gastroduodenal hastalık arasındaki ilişki ile ilgili ilk bildirilere gastroenteroloji birliğinde ilk başta şüpheli yaklaşmıştır. Asit baskılayıcı ajanlarla etkili bir şekilde tedavi edilebildiği görüldüğünde daha iyi anlaşılmıştır. Peptik ülserasyonla ve muhtemelen gastrik adenokarsinoma ile ilişkisi olduğu ilk kez Marshall ve arkadaşları tarafından öne sürülmüştür. 1987 yılında Kopenhag'ta bir grup enfeksiyon uzmanının Avrupa *H.pylori* çalışma grubunu kurması ile gastroduodenal

hastalıklarda bakterilerin rolü ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Bu grup aynı zamanda gastroenteroloji topluluğunda enfeksiyonun öneminin farkındalığının artmasına bir yanıttır. Bazı öncü gruplar ülkelerinde *Helicobacter* çalışma grubunu kurarak Avrupa çalışma grubunda kendi ülkelerini temsil etmektedirler. Avrupa *Helicobacter* ve Mikrobiyota çalışma grubu (EHMSG) şu anda varlığını Fransa'da sürdürmektedir. Ülkemizde ise Türk Gastroenteroloji derneğinin Türk *Helicobacter pylori* çalışma grubu bulunmaktadır.

H.pylori yeni genusun ilk üyesidir, diğer üyeleri olan *H.mustelae* (dağ gelinciği), *H.muridarum* (fare), *H.felis* (kedi ve köpekler), *H. nemestrinae* (makak maymunu), *H. acinonyx* (çita), *H.rappini* (kuzu), ayrıca *H.cinaedi* ve *H.fennelliae* (gastroenteritli insanlarda) sonraları tanımlanmıştır.

1944 yılında *H.pylori* 1.derece karsinojen olarak tanımlanmıştır. Gastrik veya duodenal ülseri olan ve aynı zamanda *H.pylori* olan her hastanın bakterileri eradike edilmesi için tedavi edilmesi önerilmiştir. 1997'de bir Avrupa topluluğu panelinde *H.pylori* enfeksiyonu olan hastalarda, peptik ülserli hastalarda, düşük düzey mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomalı hastalarda, ağır makroskopik veya mikroskopik gastrit veya son günlerde erken gastrik kanserde proton pompa inhibitörü temelli üçlü tedavi verilmesi gerektiği önerilmiştir (12).

2.2. Genel Bilgiler

Gram negatif spiral şekilli mikroaerofilik bir bakteri olan *H.pylori*, 1982'de ilk kez gastritli bir hastanın midesinden izole edilmiştir. 30 yıl sonra *H.pylori*'nin dünya popülasyonunun yarısından fazlasında kolonize olduğu gösterilmiştir. Enfekte kişilerin yaklaşık %20'sinde gastrit, gastrik adenokarsinom, peptik ülser, MALT lenfoma ve gastrik kanser gibi hastalıklara sebep olmaktadır (13,14). MALT lenfoma ve gastrik kanser hastalıkları, *H.pylori*'nin Dünya Sağlık Örgütü tarafından sınıf 1 karsinojen olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur. Enfekte bireylerin %80'i gastrik mukozada *H.pylori* tarafından indüklenen kronik inflamatuvar yanıtı oluşturmakta ve açık klinik semptomlar göstermemektedir (14).

H.pylori midede kolonize olur ve genelde çocuklukta kazanılır. Antibiyotik ile tedavi edilmezse hayat boyu kolonizasyon meydana gelir (14,15). Bütün enfekte

insanlar inflamasyon ve bakteriye karşı immün yanıt geliştirir ve bunun patogeneizde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. *H.pylori* ile indüklenen hastalıkların çoğu erişkinlikte meydana gelir ve sıklıkla daha yaşlı yetişkinlerde inatçı enfeksiyon şeklinde görülmektedir. *H.pylori* ile ilişkili en önemli hastalıklar, duodenal ve gastrik ülserasyon, distal gastrik adenokarsinom ve primer gastrik lenfomadır. Buna karşılık, *H.pylori* ile enfekte insanların büyük bir kısmında (>%80) bu hastalıkların hiçbiri gelişmez ve hayatları boyunca asemptomatik olarak taşırlar. Enfeksiyona karşı gelişen inflamatuvar yanıt, konağın hastalığa genetik yatkınlığı ve çevresel faktörlerle değişir (15).

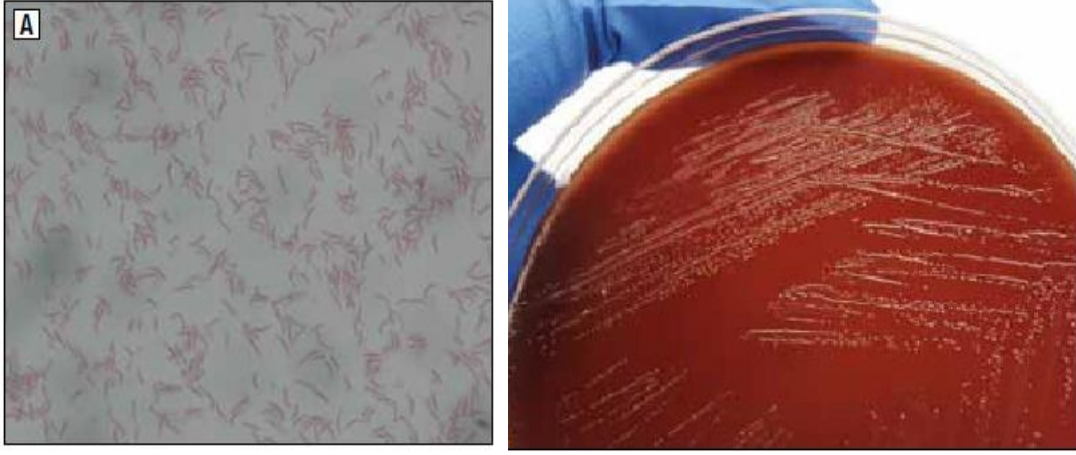
H. pylori enfeksiyonunun bulaş yolu kesin olarak bilinmemekle birlikte, bilinen tek rezervuarının insan olmasından dolayı enfeksiyonun insandan insana bulaştığı kabul edilmektedir. Çoğu gastrointestinal enfeksiyon gibi bu bakterinin de kalabalıkta, yetersiz dezenfeksiyonla ve aile içi geçişi ile bulaşının arttığı düşünülmektedir (16). İnsandan insana bulaşta rol oynayabilecek fekal-oral yol, oral-oral yol ve iatrojenik yol olmak üzere başlıca 3 bulaş mekanizması üzerinde durulmaktadır (17, 18). *H.pylori*'nin ağız boşluğu, tükürük ve dental plaklardan kültürü yapılarak izole edilmesinin oral-oral yolla geçişinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca Afrika'lı kadınların ağızlarında ezdikleri besinleri bebeklerine vermesiyle de enfeksiyonun geçtiğine dair çalışmalar bunu desteklemektedir (18). En önemli bulaş yolu ise fekal-oral yoldur. *H.pylori* ile enfekte çocukların dışkılarından bakterinin izole edilmiş olması, dışkı ile kontamine suların kullanımı ile bulaşın olabileceğini düşündürmektedir. Fakat sulardan bakteri izolasyonu yapılamamıştır. Diğer bir bulaş yolu ise iatrojenik yoldur. Bu da tüp, dezenfeksiyonu iyi yapılmamış endoskop, gastrik mukozaya temas etmiş örneğin başka birine teması ile meydana gelmektedir (17).

H.pylori yüksek oranda heterojendir, yaklaşık 1600 genlik bir genoma sahiptir, %5-%10 kadarı *H.pylori*'ye spesifik görünür. Genlerin *VacA*, *cagA*, *oipA* ve *dupA* gibi virulans faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (2).

2.3. Mikrobiyolojik Özellikleri

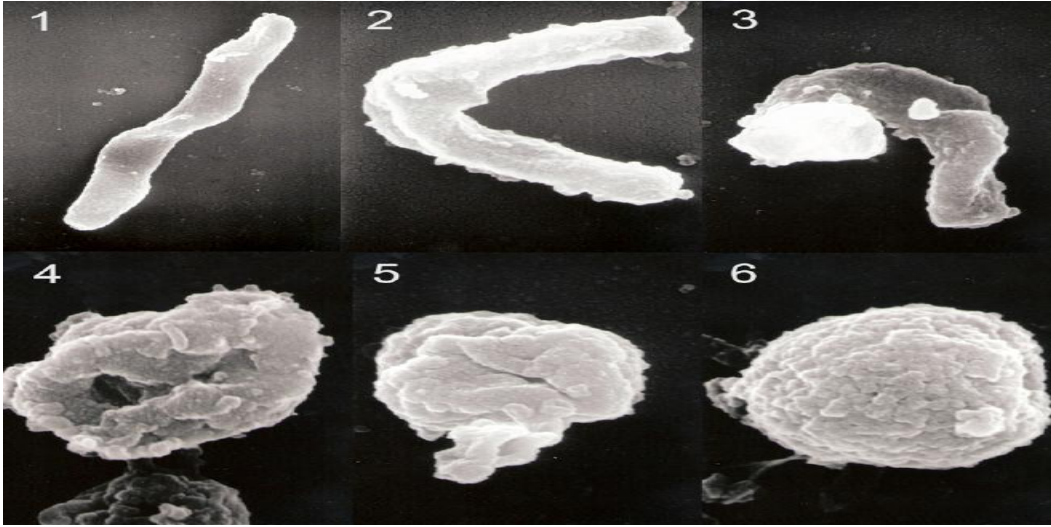
H.pylori, kısa sarmallı ve S harfi şeklinde, katalaz, oksidaz ve üreaz pozitif, 2,5-5,0 µm uzunluğunda, 0,5-1,0 µm genişliğinde, Gram negatif bir mikroorganizmadır. Tek uçtan çıkan 4-7 unipolar flajeli ile lofotriköz görünümdeki bu bakteri hareketlidir

(19). *H.pylori*'nin flajelası bakteri hücre duvarının devamı olan dış membran komponentlerinden oluşan bir kılıfla çevrilmiştir. Elektron mikroskopisi çalışmaları aynı zamanda flajelladaki hücre membranının üzerinde 40nm kalınlığında glikokaliks ya da kapsül benzeri polisakkaritçe zengin bir tabakanın varlığını göstermiştir (20, 21) Katı besiyerindeki kültürlerinde çomak şeklinde görünmekle birlikte spiral şekli kaybolur. Uzun süreli kültürlerinde besin yetersizliği, artan oksijen miktarı, alkali PH, yüksek sıcaklık, farklı antibiyotiklere maruz kalma gibi durumlarda kokoid formlar baskın hale gelir (17, 20). Elektron mikroskobunda incelendiğinde kokoid formdaki bakterilerin iki kolu membranöz bir yapı ile bağlanmış U şekilli basiller olduğu görünür. Kokoid formlar metabolik olarak aktiftir fakat kültürü yapılamaz (17). Zorunlu mikroaerofilik bir mikroorganizma olup %5-10'luk CO₂'li ortamlara gereksinim duyar. *H.pylori*, %5-7 at kanlı agarda zayıf da olsa bir hemoliz oluşturur. Üremesi için uygun diğer besiyerleri Brucella, çukulata, Colombia ve Skirrow agarlardır. Kan, hemin, serum, nişasta, kömür içeren besiyerlerini daha çok sever. Katı besiyerlerinde ise hareket yeteneğini yitirir. En iyi üreme ortamlarından biri de nemlendirilmiş çukulata agardır. İdeal olarak 37°C'de, %98 nemli ve %5- 15 CO₂'li ortamlarda 4-7 günde yaklaşık 1-15 mm çapında, yuvarlak, dışbükey, şeffaf koloniler yapar. *H.pylori*, üreaz, katalaz, DNAase, alkalin fosfataz, lösinaminopeptidaz, gamaglutamil aminopeptidaz enzimleri salgılayabilir. Bunlardan, özellikle 'üreaz testi'nin pozitifliğine yol açan üreaz enzimi, mide örneklerinden bakterinin doğrudan tanımlanmasında kullanılmaktadır. *H.pylori*, antibiyotiklere duyarlılık bakımından da *Campylobacter fetus*'e benzer. Penisilinler, sefalosporinler, tetrasiklinler, eritromisin, rifampisin, aminoglikozoidler, metronidazol ve bizmut bileşiklerine duyarlıdır. Kotrimoksazol, sefsulodin ve polimiksin dirençlidir. Ayrıca, safra tuzlarına duyarlılığı nedeni ile bağırsaklarda üremesi de mümkün değildir (19).



Şekil 1. A. *H.pylori*'nin mikroskopik görüntüsü

B.*H.pylori* kolonisinin selektif *H.pylori* agardaki görüntüsü. (22)



Şekil 2. *H.pylori*'nin basil formundan kokoid forma geçişi (23).

Tablo 1: *H.pylori*'nin bazı temel özellikleri (19, 24)

Özellik	Etki
Spiral şekil	Mukus içinde kolay hareket edebilmesini sağlar.
Flagella	Mukus tabakasının derinliklerine hareketi sağlar.
Lipopolisakkaritler; GM3 gangliozid ve Lewis B antijenlerine özgül bağlanmayı sağlar.	Gastrik mukus algılayan hücrelere selektif kolonizasyon
Üreaz A ve B	Gastrik ortamda yaşam sürdürme (bazı deneysel çalışmalarda amonyağın epitel hücresine toksik etkisi gösterilmiş)
SOD, Katalaz, ATPaz	Gasrik ortamda ve muhtemelen de fagositik vakuollerde (H_2O_2 'den korunarak) yaşamı sürdürme
Fosfolipaz A ve B	Mukusun epitel hücre membranını sindirimi, mukus ıslaklığının artışı
Proteaz	Mukusun ve epitel hücre membranını sindirimi, mukusun eriyebilirliğinin artışı.
Vakuol yapıcı sitotoksin (Vac A)	Epitel hücresi zararlanması (Vakuolizasyon)
Düşük molekül ağırlıklı kemoatraktif proteinler (porinler)	Nötrofil ve mononükleer hücreleri kendine çekerek reaktif oksijen bileşikleri ve interlökinlerin salınması
Cag A (Sitotoksin ilişkili gen A)	Sitotoksin oluşumu ve peptik ülserle ilişkili olduğu düşünülüyor.
Isı şok proteinleri (Hsp A ve B)	Otoimmünitede rol oynar
LPS (Lipopolisakkarit) (Endotoksin)	Pepsinojen stimülasyonu, enfeksiyonun devam etmesi

Tablo-1’de gösterilen özellikler bu mikroorganizmanın virulans ve patojenitesinde çok önemli rol oynamaktadır. Fenotipik düzeyde tüm *H.pylori*’ler aynı olmakla birlikte genotiplerinde bazı farklılıklar vardır ve bu farklılığın ülser yapıcı etki ile de ilgisinin olduğu düşünülmektedir. *H.pylori*’lerin; lipopolisakkarit yapısı, vakuol yapıcı sitotoksin (*vacA*), sitotoksin ilişkili gen A (*cagA*) ve nötrofil aktivasyonu bakımından farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Bakteri, lipopolisakkarit antijenlerine dayanılarak tiplendirilebilir. Flajeller antijenleri ise hem *Campylobacter*’lerle hem de tür içinde ortak yapıdadır. Ayrıca ‘vakuol yapıcı sitotoksin’ *H.pylori*’lerin %65’inde vardır ve epitel hücrelerinde vakuol oluşumu ile karakterli bir zararlanmaya yol açmaktadır (19).

2.4. *H.pylori*’nin Sınıflandırılması

Warren ve Marshall tarafından izole edilen bakterilerin ilk adı *Campylobacter* cinsine ait olduğu düşünüldüğünden *Campylobacter pyloridis*’tir (Daha sonra dilbilgisi kurallarına uygun olmadığından *C.pylori* olarak değiştirilmiştir). Elektron mikroskopi ve genetik çalışmalarla *C.pylori*’nin 16S rRNA sekansının, flajella yapısının ve dış membran yapısının farklı olduğu görülmüştür. Bu spiral bakterilerin *Campylobacter* cinsi değil yeni bir cins bakteri olduğu düşünülmüş ve *Helicobacter* adı verilmiştir (28).

Tablo 2: *H.pylori*’nin sınıflandırması (25)

Domain	Eubacteri
Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class:	Epsilonproteobacteria
Order	Campylobacterales
Family	Helicobacteraceae
Genus	Helicobacter
Species	<i>Helicobacter pylori</i>

H.pylori yüksek çeşitlilik gösteren, neredeyse her izolatinın birbirinden farklı olduğu, 4kb’lık bir genom bölgesi içinde 1400’den fazla polimorfik bölge içeren bir genoma sahiptir (20, 26, 27). Bu heterojenite sınıflandırma sisteminin temelini oluşturmaktadır ve suşlar arasındaki ayırım için kullanılır. İlk olarak *H.pylori* suşları

cag PAI ve vacA'nın varlığına göre tip 1 veya tip 2 olarak sınıflandırılır. Bunu takiben cagA'nın allelik varyasyonu, cag PAI'da taşınan ve cagA toksini kodlayan suşlar, sonra cag A alleli taşıma oranlarına göre Doğu Asya ve Batılı suşlar olarak sınıflandırılır. Bu sistem spesifik olarak proteinin C-ucundaki varyasyona göre suşları ayırmak için kullanılır. Doğu Asya suşları predominant olarak Japonya, Kuzey Kore ve Çin'de görülür, buna karşın, Batılı suşlar daha çok ABD, Avrupa ve Avustralya'da görülür (14).

2.5. Konak ve çevre

H.pylori'nin insanlarda yaklaşık 58000 yıl önce insan göçlerinden önce Afrika'da görüldüğü düşünülmektedir. Afrika'dan farklı yerlere göç eden insanların *H.pylori*'yi taşıdıkları ve bugünkü suşların yayılmasına neden olduğu düşünülmektedir. Kolonize bireylerin çok sayıda olmasından dolayı, çoğunluğu hastalık geliştirmez çünkü *H.pylori* insanlarla birlikte yüzyıllar içinde gelişmiş, bu da *H.pylori*'nin normal flora olarak sınıflandırılmasına neden olmuştur (14).

Gastrik kanser ve *H.pylori* ile meydana gelen birçok hastalığın multifaktoriyel bir etyolojisi olduğu düşünülmektedir ve organizmanın spesifik özelliklerine ve konak genetik faktörlerine bağlı olmakla birlikte diyet gibi çevresel faktörler, bakteri suşunun tipi, konak genotipi ve çevresel faktörlerin hepsinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir (5,29). Çevresel açıdan, diyet ve coğrafik lokasyonun hastalık üzerine büyük etkisi olduğu görünmektedir. Yapılan birçok çalışmaya göre, işlenmiş et ve sebzelerde nitrozaminlerin tüketimi aynı zamanda yüksek oranda tuz tüketimi *H.pylori* indüklenmiş hastalık riskini arttırmaktadır (14).

Dünyada kanser insidansındaki farklılıklar, *H.pylori* enfeksiyonuna karşı gelişen hücrel immun yanıtın tipine de bağlıdır (15).

Konak polimorfizmi, bakteriyel polimorfizm ve çevresel koşulların hepsi *H.pylori*'yi kommensalden patojene dönüştüren etkiler arasında bulunmaktadır. Fakat açık mekanizma net değildir. Fakat hastalığın şiddetinin birçok *H.pylori* virulans faktörünün üretimine bağlı olduğu çok açıktır (14). Farklı derecelerde virulansı olan farklı *H.pylori* suşlarının varlığı ispatlanmıştır (29). Farklı suşlarda cagA ve vacA gibi

toksinler, dış membran proteini, HomB, BabA, IceA, SabA/B, Dup A ve OipA gibi virulans faktörlerin herbiri çeşitlilik göstermektedir. (14).

Enfeksiyonun belirtileri ve *H.pylori*'ye immün sistemin nasıl yanıt verdiği açıktır. T hücrelerinin varlığı *H.pylori*'nin indüklediği kronik aktif gastriti iletir. Peptik ülserli hastalarda Th1 ve Th2 hücre sel yanıtta artış gösterir. Bu, daha sonra gastrik hastalıklarla ilişkili patolojiye katkıda bulunur. Karşılaştırıldığında, *H.pylori* enfeksiyonunda T-regülatuar (Treg) hücrelerinin rolü koruyucu görünmektedir. Yapılan çalışmalarda Treg hücrelerinin *H.pylori* enfeksiyonuna karşı efektör T hücre yanıtını kontrol ettiği gözlenmiştir. CD4⁺CD25^{hi} Treg hücrelerinin artışı ile immüno supresif sitokin IL10'un salgılanmasının IL-8 ekspresyonu ile ilişkili olduğu ve asemptomatik taşıyıcılarda NF-KB aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *H.pylori*'nin konak hücrede IL-8 ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (14). IL-8 üretiminin artması, mukozal inflamasyon ve enfeksiyonun klinik belirtileri ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (29). Muhtemelen, Treg hücre yanıtının varlığı IL-8 ekspresyonunu ve NF-KB aktivasyonunu regüle eder, proinflamatuvar sitokin IL-17'yi baskılayarak hastalığın ortaya çıkışını engeller. T hücre immün yanıtının *H.pylori* enfeksiyonunun belirtilerini ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Th17 hücreleri *H.pylori* ilişkili patolojiyi yönetmektedir (14).

2.6. Patogenez

H.pylori dünya popülasyonunun yaklaşık %50'sini enfekte eden insan midesindeki bakteriyel bir patojendir. *H.pylori* enfeksiyonu ilk olarak gastrite neden olur ve tedavi edilmezse peptik ülser, atrofik gastrit, intestinal metaplazi ve gastrik kanser gibi uzun süreli başka enfeksiyonlara da sebep olabilir. Bu hastalıkların organizma tarafından üretilen spesifik faktörlere mi bağlı yoksa gastrik mukozada uzun süre kolonizasyon ve etkisinin neden olduğu kronik inflamasyondan mı kaynaklandığı henüz bilinmemektedir (1).

Kolonize olan bakterilerin sadece %20'sinin epitelle direkt etkileşimde bulunduğu tahmin edilmektedir (3). *H.pylori* kolonizasyonu esas olarak midenin antrumunda sınırlıdır. Bu bölge paryetal hücrelerden yoksundur. Gastrik epitelyum hücreleri sindirim işleminden sorumlu olmakla birlikte bu onların tek fonksiyonu

değildir. Mukozal epitelyum hücrelerin kesin fonksiyonu alt tabakadaki dokuları lümeneye geçebilen patojenik mikroorganizmalardan korumaktır (3).

H.pylori, mide epitel hücrelerinin apikal yüzeyine ve koruyucu mukus tabaka arasında yerleşir. Bakteriler oral kaviteyi ve özofajiyal yolu hidrolitik enzimleri ve nötral PH varlığı ile geçerler. Pilonusu geçtikten sonra bakteriler PH'ı 1-4 olan midenin asidik lümeni ile karşılaşılır. Asidik koşullar, çoğu proteini denatüre ederek gastrik proteazlarla hidrolize eder (30). *H.pylori*, midedeki zor koşullara adaptasyonuna yardımcı olması için birçok karışık mekanizmayı kullanır (3). *H.pylori* bu zorlu koşullara karşı üreazın amonyak ve bikarbonat iyonlarını üreten enzimatik aktivitesi aracılığı ile kendini korur. *H.pylori*'nin mukus tabakasına girmek için mide lümenini hızlıca geçtiği tahmin edilmektedir. Hidrolize edici enzimler salgılaması, helikoidal bir şekle sahip olması ve flajella ile hareket etmesi gibi özellikleri sayesinde mukusa girebilir, adezinlerle apikal hücre membranına güçlü bir şekilde tutunur ve konak gastrik epitel hücrelerinin plazma membranının bütünlüğünün bozulmasını indükler (30).

Farklı çalışmalar *H.pylori*'nin mide epitelyum hücreleri üzerinde apoptozun indüklenmesi, hücre proliferasyonu ve epitelyum hücre bağlantılarının bozulması gibi birçok etkisinin olduğunu göstermiştir. *H.pylori*'nin hücre yüzeyi ile ilişkisinde virulans ürünleri ile ya konak sitokine geçer yada *H.pylori* tarafından salgılanan ve spesifik yanıtları destekleyen gastrik epitel hücreleri ile sinyal proseslerini aktive eder (3).

H.pylori epitelyum hücre-hücre bağlantılarını, hücre polaritesini bozar, epitelyum hücre reseptörlerine bağlanır ve fonksiyonel yolaklarını stimüle ederek hücre proliferasyonunu da bozar (3).

Patojen ve konak arasındaki ilişkide virulans mekanizması tam anlaşılmiş değildir. Enfeksiyonun başlamasına neden olduğu düşünülen bazı önemli mekanizmalar tanımlanmıştır. *H.pylori*'nin midedeki asidik lümeneye maruz kaldığı müddetçe organizmanın etrafındaki PH'ı nötralize eden önemli bir enzim olan üreazın üretiminden görevli olan bir gen ailesine mutlaka ihtiyacı vardır. Ayrıca flajellumunu başarılı bir şekilde üretilip yönetebilmesi için geniş bir motilite gen setine ihtiyacı vardır.

Motilite olmazsa *H.pylori* mide epitelini kendi ürettiği asitten koruyan mukus tabakasına penetre olamaz (1). Bakteri mukus tabakasında kaldığı müddetçe, gastrik epitel hücrelere sıkı bağlanmaya izin veren birçok klasik yüzey adezinleri eksprese eder. *H.pylori* genomu 30'dan fazla dış membran proteini (OMPs) kodlar, bunlar Helicobacter dış membran proteinleri (Hop) ve Hop ilişkili (Hor) ailesi olarak ikiye ayrılır. Hop grubu proteinlerde tanımlanmış birçok hücre adezyon faktörü vardır; BabA, SabA, AlpA/B, HopI, HopQ, HopZ ve OipA (3, 31). İlk tanımlanan *H.pylori* adezinleri olan BabA ve SabA, gastrik epiteldeki hücresel subpopulasyon üzerinde bulunan oligosakkarit antijenlerine bağlanırlar. Bunun çeşitli virulans faktörlerinin konak hücre epiteline tutunması için önemli olduğu düşünülmektedir (1).

Tablo 3: *H.pylori*'nin virulans faktörleri (32)

Virulans Faktörleri	Patogenezdaki rolü
Üreaz	Midedeki asidik ortama karşı direnç sağlar, enfeksiyonun erken fazlarında doğal bağışıklık
Flajella	Bakterinin hareketinden sorumludur, kolonizasyonda önemlidir.
BabA	78 kDa dış membran proteini, flukozillenmiş Lewis ^b kan grubu antijenine bağlanır, epitel hücrelerine adezyonda görevlidir.
OipA	Dış membran proteini, proinflamatuvar sitokin ekspresyonu ile MMP-1'in uyarılmasında rol oynar, beta kateninin nukleusa göçüne yol açar.
SabA	Dış membran proteini, epitel hücresindeki siyalize-Le ^{x2} e bağlanır, nötrofillerin aktivasyonunda rol oynar.
VacA	95 kDa salınan toksin, konak hücre polaritesini bozar, apoptozu indükler, T hücre proliferasyonunu ve efektör fonksiyonunu baskılar
Cag PAI	37 kb genomik fragman, Tip IV sekresyon sistemini (T4SS) kodlayan 29 geni içeren bölge
CagA (Sitotoksinle ilişkili gen A)	140 kDa protein, T4SS aracılığıyla konak hücreye girer, konak hücrelerinin sıkı bağlantılarını parçalar, kanser oluşumuna yol açar.

2.6.1. BabA (Blood Group Antigen Binding Adhesin)

Kan grubu bağlayan antijeni kodlayan adezin, BabA, ilk keşfedilen *H.pylori* adezinidir (3). Bu proteinler sayesinde bakteri mide peristaltizmi ve ortamın asidine karşı korunur. Lewis b'ye bağlanmada daha etkin olduğu düşünülen *babA* aynı zamanda flajellindir (33). BabA, *babA2* geni tarafından kodlanır ve konak hücredeki fukozillenmiş (Le^b) antijenine bağlanır. BabA2'nin bulunması duodenal ülser hastalığı ve mide kanseri ile ilişkili olup, *cagA* ve *VacA* s1 allelleriyle bir arada bulunduğu daha ağır hastalıkların oluşumuna neden olur (32).

2.6.2. SabA (Sialic Acid Binding Adhesin)

Siyalik asit bağlayıcı adezin (SabA), *H.pylori*'nin mide epitel hücrelerindeki siyaliye olan Le^x 'e bağlanmasında rol oynar. *H.pylori*'nin iltihaplanmış gastrik mukozaya tutunmasını artırır. *H.pylori*'den kaynaklanan kronik gastritin tipik özelliği nötrofillerin mide mukozasına infiltre olmasıdır. SabA, siyaliye olan Le^x aracılığıyla nötrofillere bağlanarak mide epitel hücrelerinde oksidatif patlamaya (oxidative burst) yol açar. Bunun sonucu olarak, mide epitelinde oksidatif hasar oluşur. *H.pylori*'de *sabA*'nın varlığı, mide kanseri, intestinal metaplazi ve korpus atrofisiyle ilişkiliyken yokluğu duodenal ülser oluşumu ve nötrofil infiltrasyonu ile bağlantılıdır (3,32).

2.6.3. Alp A/ B (Adherence Associated Lipoprotein)

AlpA ve AlpB, *H.pylori* adezyonundaki OMP'leri kodlayan homolog 2 genidir. AlpA ve AlpB hücresel adezyonda bulunur ve proinflamatuvar sinyal kodlarını yönetir ve IL-6'nın daha düşük mukozal düzeylerini indükler (3).

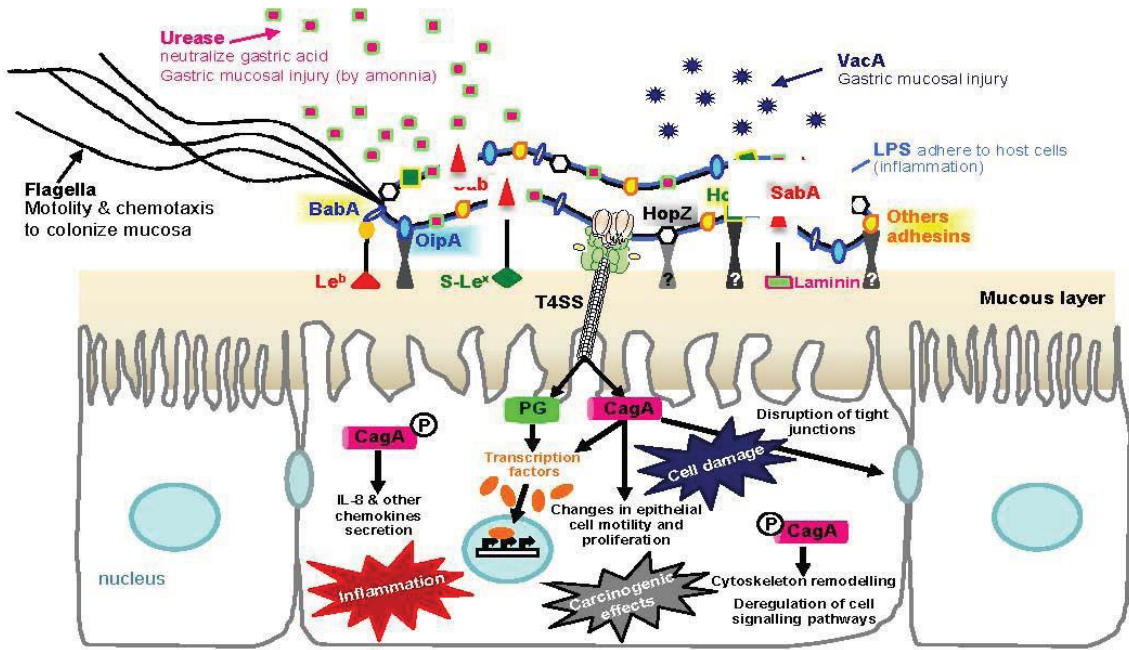
2.6.4. HopZ (Helicobacter Outer Membrane Protein)

HopZ geni ürünü bakterilerin yüzeyinde bulunan diğer bir *H.pylori* adezin proteindir. HopZ bakteriyel adezin proteini olarak tanımlanmıştır fakat hopZ mutant suşlar AGS hücrelerine tutunmayı azaltır. AlpA/B'ye benzer şekilde HopZ için konak bağlama reseptörü hala bilinmemektedir (3).

2.6.5. OipA (Outer Membrane Inflammatory Protein)

Dış membran inflamatuvar proteini (OipA), 34kDa, hücre yüzey proteindir. Mide epitel hücrelerine *H.pylori*'nin tutunmasında rol oynar. Fakat OipA adezyonu için konak reseptörü henüz tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, OipA, matriks

metalloproteinaz 1 (MMP-1)'in artışı, glikojen sentaz kinaz 3b (GSK-3b)'nin inhibisyonunda ve β katenin'in nukleusa translokasyonunda görev alır. β katenin'in nukleusa translokasyonu karsinogenezde etkin olan genlerin ekspresyonuna neden olur. Aynı zamanda oipA, proinflamatuvar sitokinlerden IL-8, IL-6 ve RANTES'in ekspresyonunu cagA ile birlikte regüle ederek inflamatuvar yanıt oluşumuna ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlemesine yol açar. Fonksiyonel OipA'nın bulunmasıyla duodenal ülser, mide kanseri ve nötrofil infiltrasyonunun arasında bağlantı gösterilmiştir (3, 32).



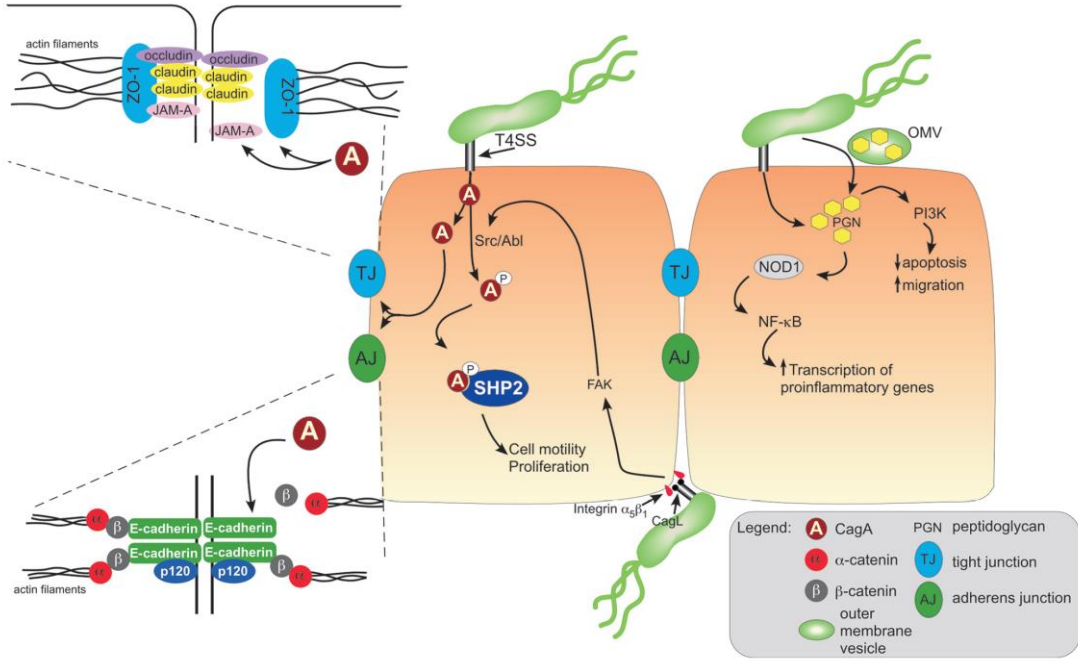
Şekil 3. *H. pylori* virulansında bakteriyel tutunmanın rolü (34).

2.6.6. Mide Epitelini Etkileyen *H.pylori* Virulans Faktörleri

2.6.6.1. Cag PAI (Sitotoksin İlişkili Gen-Patojenite Adası)

Cag PAI muhtemelen en çok çalışılan *H.pylori* virulans faktörüdür. Cag PAI, 40kb'lık bir DNA parçasıdır ve 31 gen grubu içerir; cagA proteinini ve tip IV sekresyon sisteminin(T4SS) bileşenlerini kodlar. CagA proteini, epitelyal hücrelerin içine girer, T4SS'i geçerek bakteriyel onkoprotein gibi davranır (1, 3, 13). T4SS aslında iğne benzeri yapıdadır. T4SS, Src ailesi kinazlarla fosforilasyondan sonra epitelyum hücre membranına bağlanır ve SHP-2'yi aktive ederek çoklu hücresel yanıtı başlatır. SHP-2, fosfatı aktive eden çoklu etkilere sahiptir. Mide epitel hücrelerin tight junctionları ve

aderens junctionlarında değişikliklere neden olur. CagA bu değişiklikleri E-kaderin, ZO-1 ve JAM gibi farklı junction proteinleri ile etkileşerek yapar, normal epitelyum yapısını, tight ve aderens junctionların normal fonksiyonlarını etkiler. β -katenin, bir transmembran proteini olan E-kaderin ile bağlantı kurarak hücre-hücre fonksiyonlarında lokalizedir. E-kaderin/ β katenin kompleksinin epitelyum hücre-hücre bağlantısında esansiyel bir rolü vardır ve epitelyum hücre dokusunun normal yapısında bulunur. *H.pylori* enfeksiyonu boyunca fosforilasyon bağımsız bir yolla, cagA'nın translokasyonu ile E-kaderin/ β katenin kompleksi bozulur. E-kaderin/ β katenin kompleksinin cagA ile bozulması mekanizması henüz bilinmemektedir, fakat cagA'nın E-kaderine bağlanmak için β katenin ile yarıştığı düşünülmektedir. Aynı zamanda cagA, E-kaderin ile indirekt olarak bağlanır ve bu bağlantı E-kaderin/ β katenin kompleksini bozar. E-kaderin/ β katenin kompleksindeki bozukluk cagA'nın E-kaderin ile etkileşmesi ile gerçekleşir, aderent kompleksten E-kaderin salınımına öncülük eder, sitoplazma ve nukleusta β katenin yapımı ve β katenin aracılı sinyalin aktivasyonu, bu gastrik epitelyum hücrelerin transformasyonunu indükler. İlâveten, tight junction yapı proteini ZO-1'in yeri, cagA eksprese eden hücrelerde taşınan cag ve ZO-1'in bazolateral membranda yer değiştirilmesi ile ilişkilidir. Epitelyal bağlantısal defektlerin indüklenmesine ilâveten, cagA aynı zamanda PAR1/MARK kinaz bağlantı yolu ile polarite defektlerine de yol açar. Epitelyum hücrelerin polaritesinin korumasında bölünmüş defektif-1 (partitioning defective 1) kinazlar (PAR1), mikrotübül ilişkili proteinlerin (MAP's) fosforilasyonu ile önemli bir rol oynar. PAR1, epitelyal polariteyi sağlamak için tight junctionlardan salınır. PAR1'in tight junctionlardan ayrılması atipik proteinkinaz C ile meydana gelir, bu da PAR1'i tight junctionlarda bağlar ve fosforile eder. Membrandan PAR1'in salınımı PAR1'in apikal membrana penetrasyonunu inhibe eder. *H.pylori* enfeksiyonu boyunca taşınan cagA PAR1 ailesi kinazların 4 üyesinden biri olan PAR1b'ye bağlanır, (PAR1b'nin aktivitesinin inhibisyonu ve fosforilasyonu bir PKC ile meydana gelir) sonunda bağlantısal ve polarite defektlerine neden olur (3). *H.pylori* enfeksiyonu boyunca artan hücre proliferasyonu, prekanseröz olduğunu göstermek için iyi bir göstergedir (1).



Şekil 4. CagA ve peptidoglikan hücreyi birçok yolla etkiler (35).

2.6.6.2. CagA (Sitotoksin İlişkili Gen)

CagA pozitif *H.pylori* ile gastrik kanser gelişiminin moleküler mekanizması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. CagA sebebiyle tümörögenезisin ilk aşaması CagA'nın gastrik epitelyal hücrelere translokasyonudur. *H.pylori*, integrinler ve fosfolipazların gibi konak hücre moleküllerini CagA'nın konak hücreye girişi için kullanır. İlâveten CagA translokasyonu, endositik yoldan sağlanan enerji bağımlı konak hücre prosesine ihtiyaç duyar. Sitomembran kolesterol ve aktin polimerizasyonu da cag A translokasyonu için önemlidir (13).

CagA, *H.pylori*'nin en iyi çalışılan virulans faktörlerinden biridir; bunun toksini 120-145 kDa büyüklüğündedir. Ve cag PAI üzerinde taşıyan cagA tarafından kodlanır. PAI taşıyan *H.pylori* suşların taşımayanlara göre çok daha virulent olduğu bilinmektedir. Tip IV sekresyon sistemi (T4SS) ile konak hücreye translokasyonunu takiben, cagA etkisini direkt olarak ökaryotik hücre üzerinde gösterir. Rolü multifaktöriyel görünmektedir ve cagA bakterilerin devamlılığına yardımcı olmak için konak immün yanıtını da regüle etmektedir (14).

CagA, Cag PAI'nın bir ucundan kodlanır ve diğer bakteri türlerinde homoloğu görülmez. CagA muhtemelen *H.pylori* ile ilişkili en virulent faktördür ve enfekte eden

türde varlığı peptik ülser hastalığı ve gastrik kanser için bir risk faktörüdür. Ökaryotik hücrelere T4SS ile translokasyonunu takiben, cagA konak hücrede plazma membranındaki fosfotidilserine bağlanır ve tirozin kaynaklarından fosforillenir. CagA'nın tirozin fosforilasyon bölgesinin karakteristik özelliği proteinin karboksi polimorfik bölgesinde Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifinin varlığıdır (20, 36). EPIYA motifinde bulunan tirozin; konak hücre kinazları C-Src ve c-Abl fosforilasyonundan sorumludur. Fosfo-cagA SHP-2 ile bir kompleks oluşturur. –SHP-2 bir tirozin fosfataz proteinidir. Bu kompleksin oluşumu sonuçları alınır ve SHP2'nin konak hücre membranında asıl aktivasyonu sağlar. Birçok sinyal yolağı cagA ile indüklenmiş SHP-2 aktivasyonunun sonucudur. cagA tarafından SHP-2'nin dereglasyonu hücrede uzama ile sonuçlanır bu, “hummingbird fenotipi” olarak adlandırılır. İnfekte hücrelerin uzun görünmesi ve Ras bağımsız Erk modifikasyonuna bağımlı, cagA ile PAR1/MARK ile aynı zamanda translokasyon devam eden ökaryotik hücrede cagA'nın stabilizasyonu içinde önemlidir; C-terminal EPIYA motifinde delesyon cagA'nın yarılanma ömründe önemli derecede düşüşe neden olmaktadır (3, 14).

EPIYA motiflerinin 4 büyük tipi vardır. (A, B, C ve D) EPIYA-A, EPIYA-B ve EPIYA-C motifleri ardarda “batılı suşlar”da bulunur. EPIYA-A, EPIYA-B ve EPIYA-D motifleri “Doğu Asya” suşlarında bulunur. Bu motifler polimorfizme katkıda bulunur, proteinin C ucunda ve ard arda 1'den 7'ye kadar olan tekrarları bulunur. EPIYA motiflerin miktarı fosforilasyon seviyeleri ile ve epitelyum hücrelerinde görülen etkilerle orantılıdır (3).

Diğer yandan fosforile olmayan cagA, Met, E-kaderin, Grb2 ve Par1b gibi çeşitli sinyal proteinleri ile etkileşir ve Fosfotidilinositol 3-kinaz/Akt (PI3K/Akt) sinyal yolu, nükleer faktör KB (NF-KB) sinyal yolu ve diğerleri gibi benzer sinyal yollarını aktive eder. Bu etkileşimler ve bu sinyal yollarının aktivasyonu hücre-hücre bağlarının kesilmesi veya hücre polaritesinin kaybolması gibi epitelyal proliferasyon ve pro-inflamatuar prosese katkıda bulunur (13).

CagA proteinine ilaveten, peptidoglikan ve muropeptidler gibi bakteriyel hücre duvarı komponentleri de T4SS aracılığı ile konak epitel hücresinin içine geçer. *H.pylori* peptidoglikanı, NOD1 tarafından tanınır, intrasellüler patojen-ilişkili moleküler patem

(PAMP) tanıma reseptörü, peptidoglikana duyarlı olan, NF-KB aktivasyonunu indükler ve proinflamatuvar immun yanıtları upregüle eder (3).

2.6.6.3. VacA (Vakuolize Edici Sitotoksin A)

VacA proteini, konağa bağlanması için geniş bir dizi aktiviteye sahiptir; membran insersiyonu, anyon- idareli kanal aktivitesi, transepitelyal direnci değiştirme, antijen prosesinin inhibisyonu ve apoptozun indüklenmesi gibi. Muhtemelen konak hücrede membran bütünlüğünün bozulması, konak hücre yüzeyinde doğal olarak varlığı artırır (1).

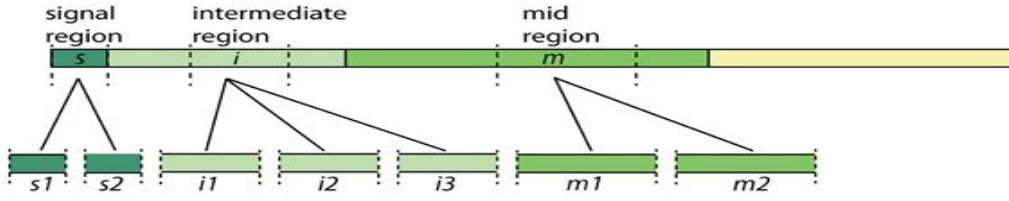
H.pylori'nin ikinci önemli bir toksini, virulans faktörü vacA'dır. VacA 1988'de bulunmuştur ve her suşta bulunmayan cagA'nın aksine hemen bütün *H.pylori* suşlarında bulunur. VacA hücre membranında por oluşturarak konak hücreden üre ve anyonların salınımını uyarır. Geisse ve ark vacA'nın lipid tabakasına etkin bağlanmasında kolesterolün gerekliliğini göstermişlerdir. VacA ayrıca kolesterol, sfingomiyelin ve dioleoilfosfatidilkolinden oluşan iki katmanlı yapı ile etkileşim halindedir ve genellikle sfingomiyelince zengin bölgeleri hedef aldığı bilinmektedir (37). İlk olarak 140kDa büyüklüğünde bir protoksin eksprese eder ve bir ototransporter mekanizması ile 88kDa'luk matur bir toksine dönüşür. Bu sekrete edilen form 33kDa (p33) ve 55kDa (p55) fragmentlik formlara dönüşür. VacA'nın, AB toksini ile yapısal benzerliği olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalara göre, vacA yeni AB toksinleri içeren yeni bir subtip modelidir. P33'den oluşan A subuniti por formasyonu için yanıtıdır, enzimatik aktiviteye göre ve p55'den oluşan B subuniti konak hücre membranındaki etkisine yanıtıdır (3, 14).

VacA geni bütün *H.pylori* suşlarında bulunur ve suşlar arasında önemli sekans farklılıkları gösteren iki bölge içermektedir. S(sinyal) bölgesi ve m (medium) bölgesi. Genin 5' ucunda yerleşmiş olan s bölgesinin iki büyük tipi, s1 ve s2'dir. S1 bölgesinin ise bilinen 3 subtipi (s1a, s1b, s1c) vardır. m bölgesinin de iki büyük tipi vardır, m1 ve m2. Bütün *H.pylori* suşları vac A geni içermesine rağmen, sitotoksin üretme özellikleri farklıdır. m1 suşları m2'ye göre daha çok toksin aktivitesi gösterir. s1a tipi s1b'ye göre daha aktiftir ve s2 tipinin farkedilir bir aktivitesi yoktur (29).

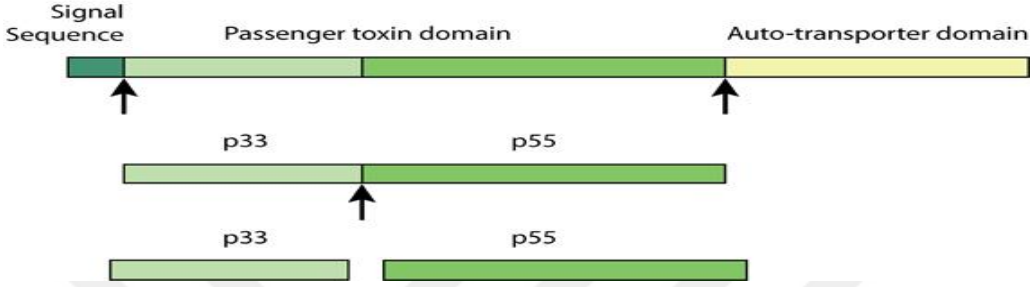
VacA'nın ilk olarak Rac1 GTPaz ile kontrol edilen F-aktin yapısının altındaki plazma membran bölgesine bağlandığı bildirilmiştir. VacA daha sonra klatrinden

bağımsız Cdc24 ile kontrol edilen erken endositik kompartman içinde pinositoz edilir ve vakuol oluşumunu uyaran geç endozom oluşur (37, 38). CD2-ilişkili proteininin (CD2AP) VacA içeren erken endozom ile filamentöz aktin (F-aktin) arasında köprü kurduğu bildirilmiştir. CD2AP, F-aktin yapısını düzenler ve VacA'nın erken endozomdan geç endozoma transferi için gereklidir (37, 40). *H. pylori* ile enfekte epitel hücre kültüründe kullanılan golgi parçalama ajanı Brefeldin A (BFA)'nın VacA'nın indüklediği hücre vakuolasyonunu artırdığı ve ayrıca vacA'nın düşük toksik formları ile hücrel vakuolizasyonu indüklediği gösterilmiştir (37, 41). VacA, T hücre proliferasyonu inhibisyonunda rol alır. Transforme T hücre hattında, VacA optimal T-hücre aktivasyonu için gerekli olan transkripsiyon faktörü nükleer faktör aktive edici T hücreleri'ni (NFAT) inhibisyonu ile T-hücresi canlılığı ve proliferasyonu için gerekli olan IL-2 salınımını bloke eder. Sundrud ve ark (37, 42) VacA'nın NFAT aktivasyonu ve IL-2 ekspresyonundan bağımsız olarak, aktif CD4+ T-hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. VacA sitozol içine geçer, mitokondri iç membranında toplanarak endojen mitokondri kanalları aktive olur ve böylece apoptoz uyarılır. VacA'nın proapoptotik etkisi hücre tipine bağlıdır ve gastrik epitel hücrelerde sınırlı kalacağı düşünülmektedir. CagA'dan farklı olarak VacA'nın T hücre apoptozunu uyarmadığı ve T hücre proliferasyonunu önemli derecede azalttığı düşünülmektedir (37). Ayrıca, VacA, Bax ve Bak proapoptotik proteinlerini aktive ederek mitokondriden sitokrom-c salınımını uyarır ve böylece vacA ile uyarılmış apoptozun hücrenin vakuolizasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir (37, 38).

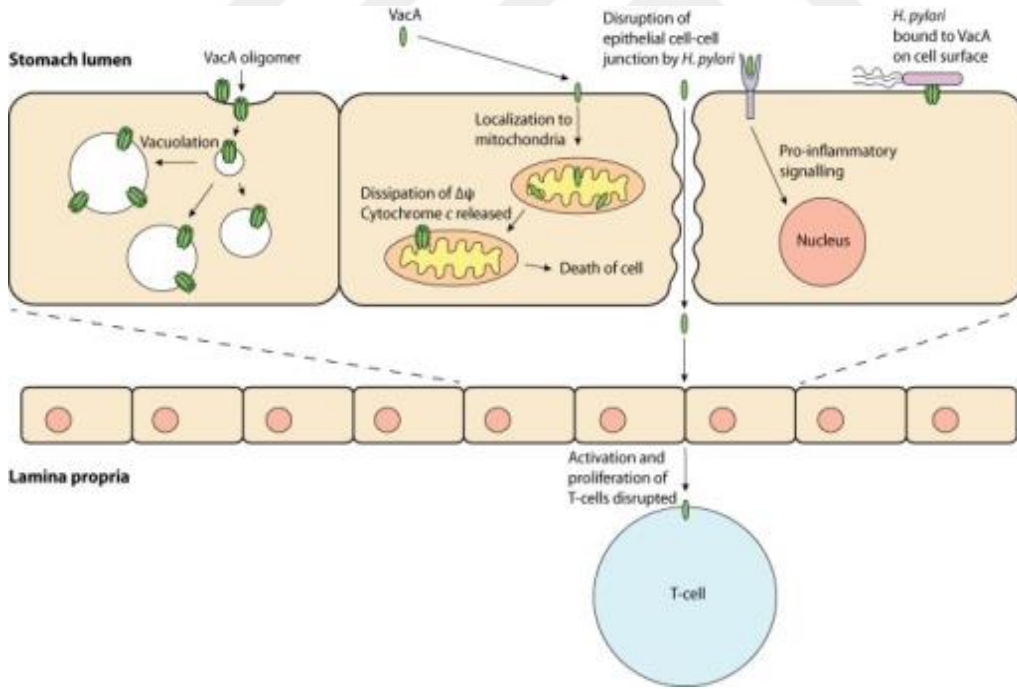
A Gene architecture



B Protein architecture



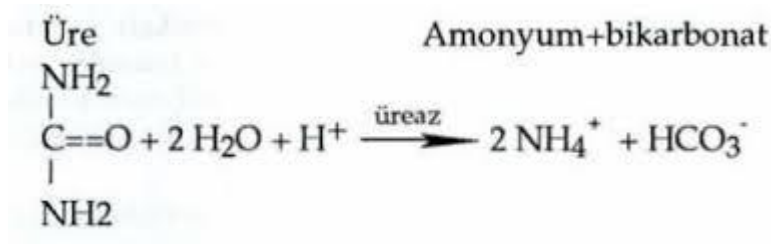
Şekil 5. VacA'nın genetik ve protein yapısı (39).



Şekil 6. Multifonksiyonel bir toksin olan VacA-VacA vakuoller oluşturabilir, endozomlar ve erken lizozomlar oluşturabilir. Hücre tarafından alınarak mitokondride lokalize olur. Bu da apoptoza neden olur. Hücre membranındaki bir proteine bağlanır, inflamasyonu indükler ve T-hücre aktivasyonunu ve proliferasyonu engeller (39).

2.6.6.4. Üreaz

H.pylori üreyi amonyağa çevirerek mide asiditesini nötralize eden ve böylece kendisine hayatta kalmak için daha uygun bir PH sağlayan üreaz enzimine sahiptir (20). *H.pylori* üreazı muhtemelen bakterilerden en çok miktarda eksprese olan proteindir, toplam protein ağırlığının %10'u kadardır. Üreaz yüksek moleküler ağırlıklı bir multisubunit enzimdir. A ve B olmak üzere iki subuniti vardır. Moleküler ağırlıkları sırasıyla 29,5 ve 66 kDa'dur. Enzim bir dodecameric agregatı içerir. Üreaz enzimatik aktivitesi en iyi bilinendir, üreyi amonyak ve bikarbonata hidrolize eder, bu da lokal mikroçevrede PH'nı dengelenmesine yardımcı olur (3).



Üreaz aynı zamanda Class II major histokompatibilite kompleks (MHC) molekülü ve CD74'ün her ikisine de direkt olarak bağlanarak bir adezin görevi de yapar. Üreazın bakteriyel adezin görevine destek, bazı çalışmalar göstermiştir ki, üreaz mutantları hidroklorik koşullarda kolonize olamazlar. Diğer bir çalışma göstermiştir ki, üreaz aktivitesinin %50'sinden fazlası bakterilerin yüzeyinde çevrilidir (3).

2.6.6.5. Htr A (High temperature requirement A)

HtrA, *H.pylori*'nin salgıladığı, son tanımlanan ürünlerden biridir ve enzimatik aktivitesi vardır. HtrA'nın serin proteaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir ve bunun üzerindeki substratlardan biri adezin molekülü olan E-kaderindir. E-kaderinin ektodomaini ve proteolizisinin, aderens bağlantılarının yıkımına katkıda bulunduğu ispatlanmıştır. HtrA, epitel bariyeri bağlantılarını keser ve *H.pylori*'nin epitelyum hücrelerinin arasından hücreler arası boşluğa girmesine izin verir. Salınan E-kaderin ektodomaini gastrik kanserde anahtar bir prognostik indikatördür (3).

2.6.7. *H.pylori* Tarafından İndüklenen Epitelyum Sinyali

H.pylori'nin etkilediği sinyal yolları, en çok çalışılan, cagPAI pozitif suşları tarafından etkilenmektedir, bu suşlar daha virulan ve önemli inflamatuvar yanıtları

indükler. CagA ve muropeptidler T4SS vasıtası ile konak epiteline geçer. Bunlar daha sonra birçok sinyal yollarını tetikler, epitelyum hücre gen ekspresyonu ve proinflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin üretimi ile sonuçlanır. Bu sitokinlerin/kemokinlerin ekspresyonunun merkezi bir medyatörü NF-KB'dir. Proinflamatuvar sitokinler/ kemokinleri indüklemesi rolüne ilaveten, onun hedef genlerinden biri Bcl-XL, mitokondriyal apoptoz yolağını baskılayabilir, kontrolsüz proliferasyona öncülük yapabilir (3).

Epitelyal hücre sinyalizasyonunun *H.pylori* tarafından indüklenmesinin önemli bir sonucu, gastrik epitel hücrelerde EGFR transaktivasyonudur. Bunun için önerilen mekanizmalardan biri HB-EGF sinyalini takiben ekstrasellüler transmembran parçalanması ile gerçekleşmektedir. Parçalanma metalloproteinlerin ADAM ailesi aracılığı ile gerçekleşir, bunlar çinko bağımlıdır. Diğer olası mekanizma, NADPH oksidaz aracılığı ile ROS oluşumu, EGFR transaktivasyonuna öncülük eder. Bu transaktivasyon hem cagPAI pozitif hem de negatif suşlarda meydana gelir. Buna ilaveten, *H.pylori* ile γ -glutamiltranspeptidaz eksprese eder, bu gastrik epitel hücrelerde HP-EGF'nin bir upregülatörü olabilir. ADAM ailesi proteinler aynı zamanda IL-8, PGE-2, gastrin, ve pipo içimi ile oksidatif hasarı içeren EGFR transaktivasyon yolağında bulunmaktadır (3).

H.pylori infeksiyonu boyunca aktive olan farklı sinyal yollarını anlamak, sadece hastalık mekanizmasını anlamak için değil, potansiyel ilaç hedeflerini tanımlamak için de önemlidir.

2.6.8. Diğer Virulans Faktörleri

2.6.8.1. DupA (Duodenal Ulcer Promoting Gene A)

2005'te tanımlanan bir virulans faktördür. Duodenal ülseri arttıran dupA geni, *H.pylori* genomunun yumuşak bölgesinde bulunur. DupA patogenezi antrumda IL-8 indüksiyonunda görünür. Antrum ağırlıklı gastrite öncülük eder, duodenal ülser gelişiminde karakteristiktir. İlaveten monositlerdeki IL-12'yi indüklediği düşünülmektedir (43).

2.6.8.2. HP-NAP (Nötrofil aktive edici protein)

HP-NAP (*H.pylori* nötrofil aktive edici protein), üreaz enzimi ile birlikte midedeki fagosit ve mast hücrelerinin lamina propria tabakasına göçünde rol oynar (44). T4SS ve ferritin ailesine ait demir bağlayan, 150-kDa'luk kemotaktik HP-NAP lamina propriada inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunda önemli rol oynar. *H.pylori* suşları yüzey hemagglütininleri ve heparan sülfat bağlayan proteinleri eksprese ederler ve bu şekilde fagositler ile etkileşime girerler. Hemagglütininler *H.pylori*'nin nötrofillere adezyonuna yardımcı olur. HP-NAP, nötrofilleri uyararak reaktif oksijen ara ürünlerini üretmesine, Ca^{2+} ve fosforilat sitozolik hücre sel sinyal moleküllerini serbest bırakmasına ve nötrofillerin yüzeyindeki $\beta 2$ integrinlerin eksprese edilmesine neden olur. Nötrofillerden reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri ile proteazların salınması, epitel hücrelerine direk toksik etki yaparak epitel hasarında temel bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda, *H.pylori* dış membran proteini SabA'nın, nötrofillere *H.pylori* bağlanması ile G proteinine bağlı sinyal yolağını ve PI-3K'ın daha sonraki basamaklarının aktivasyonunu uyarabildiği gösterilmiştir (44).

2.6.8.3. İce A (The induced by contact with epithelium gene)

Son zamanlarda tanımlanan diğer bir virulans faktörlerden biri ice A'dır. Vac A gibi bütün *H.pylori* suşlarında vardır. İce A ve ice B olmak üzere iki allelik formu bulunmaktadır. Peptik ülser hastalığı için marker olabileceği düşünülmektedir. İce A prevalansı Türkiye'de fazla çalışılmamıştır. Hollanda ve Amerika'da yapılmış çalışmalarda ice A1 allelinin peptik ülser hastalığının gelişmesi ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Erzin ve ark. Türkiye'de yaptıkları çalışmada da Hollanda'dakine benzer şekilde ice A1 alleli yüksek oranda saptamışlardır (29).

İce A1, *Neisseria lactamica*'nın bir geni olan, CTAG-spesifik bir endonukleazı kodlayan n1aIIIR ile sekans homolojisi göstermektedir. Diğer taraftan, ice A2'nin homoloji gösterdiği bilinen bir gen yoktur. İce A2 geni ürününün fonksiyonu bilinmemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda ice A1'in varlığı ile peptik ülser arasında önemli bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. İce A1'in ekspresyonu, *H.pylori* ve insan epitelyum hücrelerinin teması ile kontrol edilmektedir ve ice A1 genotipi mukozal IL-8 ekspresyonu ve akut antral inflamasyon gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Shiota ve ark.'nın yaptığı bir metanaliz çalışmasında ice A1'in Asya ülkelerinde batılı ülkelere göre daha fazla oranda görüldüğü saptanmıştır. Bunun aksine ice A2 alleli prevalansının

ise batılı ülkelerde Asya ülkelerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca A1'in peptik ülserle önemli derecede ilişkisi olduğu fakat gastrik kanserle bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır (45).

2.15. Tanı

Genel olarak, *H.pylori* tanısı için kullanılan testler invaziv ve noninvaziv testler olmak üzere ikiye ayrılır. İnvaziv testler, mide dokusundan kültür, PCR, hızlı üreaz testi ve histopatolojik testleri içerir, noninvaziv testlerde ise *H.pylori* antijenleri için dışkı, antikor tetkikleri için serum, idrar ve oral örneklerle ihtiyaç vardır (46, 47).

Tablo 4: *H.pylori* tanısı için kullanılan testler

İNVAZİV TESTLER	NONİNVAZİV TESTLER
<ul style="list-style-type: none">• Direkt Mikroskopik İnceleme ve Direkt Floresan Antikor (DFA) Yöntemi• Kültür• Hızlı Üreaz Testi• Histolojik İnceleme	<ul style="list-style-type: none">• Serolojik Testler• Üre nefes Testi• İdrarda veya Kanda C₃ Ölçümü• Dışkıda Antijen Testi
<ul style="list-style-type: none">• Moleküler Yöntemler	

2.7.1. Non-İnvaziv Testler

2.7.1.1. Üre Nefes Testi

Üre Nefes testi non-invaziv testler arasında en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu amaçla hastaya C13 ve C14 izotopları ile işaretlenmiş üre solüsyonu içirildikten sonra nefesle dışarı verdiği hava bir torbada toplanarak, işaretli CO₂ ölçülür. Midede *H.pylori* varlığında, bakterinin üreaz enzimi üreyi parçalayarak amonyak ve işaretli CO₂ oluşturur ve bu CO₂ nefeste saptanır. Radyoaktif CO₂ ölçümü en sık kütle spektrofotometresi ile yapılmaktadır, ancak infrared spektrofotometreler ile de daha düşük maliyette ve benzer performansta sonuçlar alınmaktadır. Bu testin sensitivitesi %98, spesifitesi %100 olarak bildirilmektedir. En iyi sonuç, üre solüsyonunun sitrik asit ile verilmesi ve üre içilmesinden 20-25 dakika sonra nefes testinin yapılması ile alınmaktadır. Cut-off değeri her protokolda farklılıklar göstermektedir. *H.pylori*

tedavisinin takibinde de öncelikle önerilen testtir. Ancak yalancı pozitif sonuçları ekarte etmek için üre nefes testi eradikasyon tedavisinin bitiminden en erken 4-6 hafta sonra yapılmalıdır (48).

2.7.1.2. Dışkıda Antijen Testi

Dışkıda antijen testi uygulaması kolay ve hızlı sonuç veren bir yöntemdir. Maastricht III kriterlerinin “test ve tedavi” stratejisinde önerilen test olmasına ve üre nefes testi kadar başarılı sonuçlar alınmasına rağmen maalesef yaygın kullanılmamaktadır. İlk üretilen kitlerde poliklonal antikorların kullanılması sonucu yalancı pozitif reaksiyonların yüksek oranda görülmesi nedeniyle son yıllarda monoklonal antikor içeren kitler piyasaya sürülmüştür. Bu testlerin duyarlılığı %58-96, özgüllüğü ise %67-100 olarak bildirilmektedir. Klinisyenin hasta başında uygulayabileceği monoklonal antikor içeren immunokromatografik kart testler geliştirilmiştir. Ancak standart laboratuvar Enzimimmünassay (EIA) testlerinin daha doğru sonuç verdiği bildirilmektedir. Enfeksiyon prevalansının yüksek olduğu bölgelerde dışkıda antijen testleri ile oldukça verimli sonuçlar alınmasına rağmen bu testler ile karşılaşılan problemlerden birisi prevalansın düşük olduğu bölgelerde performanslarının düşük olmasıdır. Bu nedenle prevalansın düşük olduğu bölgelerde bu testlerin üre nefes testi veya serolojik testlerle kombine edilerek kullanılması önerilmektedir. Monoklonal antikorları içeren antijen testleri eradikasyon tedavisinin takibinde de önerilmektedirler. Tedavi bitiminden 4-8 hafta sonra yapılmalıdırlar. Çocuklarda dışkıda antijen testleri kullanıldığında dikkatle değerlendirilmelidir. Çocuk hastalarda “geçici *H.pylori* enfeksiyonları” olabilmekte ve bu nedenle antijen testleri ile bu dönemde yalancı pozitif sonuç alınmaktadır. Çocuklarda eğer semptom varsa testin güvenilirliği artmaktadır, asemptomatik çocuklarda ise test sonuçları dikkatle değerlendirilmelidir (48).

2.7.1.3. Serolojik Testler

Kanda *H.pylori*'ye karşı oluşmuş antikorları saptayan bu testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygulaması kolay ve diğer yöntemlere göre ucuz olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler. EIA en sık kullanılan yöntemdir. Bu testlerin uygulanmasında kullanılan antijenin seçimi çok önemlidir. Asya ve Avrupa'da enfeksiyon oluşturan suşların farklılıkları nedeniyle lokal antijenlerden hazırlanmış kitlerin tercih edilmesi önerilmektedir. Ayrıca testin cut-off değerinin bölgesel ve yaşa bağlı olarak modifiye

edilmesinin test performansını artırdığı gösterilmiştir. Serolojik testlerin duyarlılığı %88-95, özgüllüğü %86-95 dir. Özgül IgM antikorları enfeksiyonun 18. gününden itibaren yükselir ve kısa sürede kaybolurlar, IgG ve IgA antikorları ise 60. günden sonra genellikle birlikte yükselmeye başlar ve enfeksiyon tedavi edilmedikçe yüksek kalırlar. Tüm IgG pozitif hastalarda IgA yanıtının oluşmadığı, vakaların %5'inde ise IgG yanıtı olmadan sadece IgA yanıtının olabileceği gösterilmiştir. IgM antikorları akut enfeksiyonun göstergesidir, ancak *H.pylori*'nin kronik seyirli enfeksiyon oluşturması nedeniyle semptomatik hastalarda bu antikorlar düşük oranda (%10) pozitif saptanırlar. IgG ve IgA antikorları ise aktif enfeksiyonu göstermezler. Eradikasyon tedavisinden sonra uzun süre (6-12 ay) pozitif sonuç verebilirler. Bu nedenle serolojik testler eradikasyon tedavisinin takibinde önerilmezler. Hastanın antibakteriyel ajan veya PPI kullanması durumunda *H.pylori* enfeksiyonlarının tanısında serolojik testler tercih edilmelidir. Bu testler dışındaki tüm diğer tanı yöntemlerinde ilaç kullanımı test sonucunu etkilemektedir. İdrar, tükürük ve parmaktan alınan kanda *H.pylori* antikorlarını saptayan testler de mevcuttur ancak bunların duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür (48).

2.7.2. İnvaziv testler

2.7.2.1. Histopatolojik inceleme

H.pylori enfeksiyonunun tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Antral biyopsi örnekleri hematoksilin-eozin, Warthin-Starry gümüşleme, akrinin oranj veya Giemsa ile boyandıktan sonra mukus içinde yüzey epiteline tutunmuş olan bakteri araştırılır. Bu teknikle midede oluşan değişikliklerin de gösterilebilmesi önemli bir tercih nedenidir. Bu nedenle *H.pylori* enfeksiyonlarının tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemin duyarlılığı %93-98, özgüllüğü %95-98'dir. Mide mukozasında *H.pylori*'yi endoskopi esnasında gösterilebilmesi olanağını sağlayacak olan mikroskopik endoskopi yönteminin üzerinde çalışmalar sürmektedir ve yakın gelecekte kullanılması planlanmaktadır (48).

2.7.2.2. Üreaz Testi

Endoskopi sırasında alınan antral biyopsi örneklerinde *H.pylori*'nin salgıladığı bir enzim olan üreaz enziminin gösterilmesi esasına dayanır. Üreaz enziminin varlığında ortamdaki üre amonyak ve bikarbonata parçalanarak, ortamın pH'ını yükseltir ve bu değişim pH indikatörü ile gözlenir. Pozitif sonuçların %90'ı ilk yarım saatte bulunur,

kalanlar ise ertesi gün okunur. Hızlı ve pratik bir yöntem olması nedeniyle çok kullanılmaktadır. Duyarlılığı %89-98, özgüllüğü %93-98 arasındadır (48).

2.7.2.3. Kültür

Tanıma altın değerinde bir test olarak kabul edilmekle birlikte uygulanmasındaki zorluklardan dolayı rutin uygulamalarda tercih edilmemektedir. Ancak son yıllarda tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişmiştir. Antibiyotik direnci tedavinin başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Tedavide kullanılan antibiyotiklerden birisi olan klaritromisine karşı dünyada %2-30, ülkemizde de %20-35 oranında direnç geliştiği bildirilmektedir. Bu nedenle özellikle tedaviye yanıt alınamayan vakalarda biyopsi örneklerinin kültürü ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. *H.pylori*'nin oksijene duyarlı bir bakteri olmasından dolayı, eğer kültür çalışılacaksa antral biyopsi örneklerinin hızlı bir şekilde ve transport besiyerinde (%20 gliserollü Brucella broth/serum fizyolojik) laboratuvara ulaştırılması gerekmektedir. Örnekler en fazla 4 saat içinde ekilmeli, eğer hemen ekilemeyecekse +4°C'de bekletilmelidir. At veya koyun kanı ile zenginleştirilmiş Beyin-kalp infüzyon agar (BHI), Columbia agar, Brucella agar gibi besiyerleri kullanılabilir. Mikroaerofilik ortamda 3-7 günde üreme sağlanır. Tiplendirme gram boyama, katalaz, oksidaz ve üreaz aktiviteleri değerlendirilerek yapılabilir. Duyarlılığı %77- 95, özgüllüğü %100 olarak bildirilmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testi için Clinical Laboratory Standarts Institute(CLSI) kriterlerine göre agar dilüsyon tekniği önerilmektedir. Ayrıca E-test tekniği de dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (48).

2.7.2.4. Moleküler Testler

H.pylori enfeksiyonlarının tanısında ve antimikrobiyal direncin gösterilmesinde bakterinin kültürde üretiminin zor olması nedeniyle moleküler tekniklerin kullanımı yönünde hızla ilerlenmektedir. Bu amaçla mide biyopsi örneklerinde bakterinin 16S RNA'sının ve klaritromisin direncine neden olan 23S RNA'daki mutasyonların PCR, real-time PCR veya floresan insitu hibridizasyon (FISH) ile gösterilmesi çok duyarlı ve hızlı sonuç veren tekniklerdir. Ayrıca özellikle çocuk hastalarda yararlı olacağı düşünülen dışkıda real-time PCR ile bakterinin ve klaritromisin direncini gösteren teknik geliştirilmiştir. Maliyetlerinin yüksek olması moleküler testlerin önemli bir dezavantajıdır (48, 49).

2.8. Tedavi

Bir bakteri olması nedeniyle *H. pylori* tedavisinin temeli antibiyotiklerdir. Çocuklarda *H. pylori* eradikasyon oranı düşüktür ve reenfeksiyon sıktır. Eradikasyon için çeşitli tedavi protokolleri kullanılmaktadır (50). Bugün hala %100 başarılı olabilen bir tedavi rejimi henüz oluşturulamamıştır. İnvitro çalışmalarda bakterinin pek çok antibiyotiğe hassas olmasına karşın invivo sonuçlar farklı olmuştur. Bakterinin mukus tabakasının altında kolonize olması antibiyotiğin direkt etkisini azaltmaktadır. Bakteri mukozaya invaze olmadığı için de antibiyotiğin kan yolu ile bakteriye ulaşması zor olmaktadır. Mide asidinin antibiyotik etkisini azaltması, bakterinin kolayca antibiyotiklere direnç oluşturması da tedavide başarısızlıkların nedenleri arasında sayılabilir. Tek antibiyotikle yapılan monoterapiler başarısızdır, bu yüzden çok çeşitli kombinasyonlar denenmiştir (51).

H.pylori'nin eradikasyonu için genelde 3'lü tedavi kullanılır. Bu, PPI veya ranitidin bizmut ve iki antibiyotik içerir, antibiyotiklerden genellikle amoksisilin ve klaritromisin tercih edilir (6). Üçlü tedavinin süresi de halen tartışmalı olup merkezlere göre 7-14 gün arasında değişmektedir (50). En sık kullanılan antibiyotikler makrolidler (klaritromisin veya azitromisin), imidazol (metranidazol veya tinidazol), amoksisilin veya tetrasiklidir (6). Hızla gelişen direnç sorunu, ülkeden ülkeye/bölgeden bölgeye değişmekle birlikte, üçlü tedavi alan hastaların %10-45'inde *H. pylori* eradike edilememektedir (50). Antibiyotik tedavisi hastaların yaklaşık %20'sinde başarısızdır. Farklı hastalıklarda benzer antibiyotiklerin kullanılması, sıklıkla bu antibiyotiklere fazla maruz kalmış topluluklarda direnç gelişimini artırır (6). Eradikasyonu etkileyen diğer faktörler ise tedaviye uyumun yeterli olmaması, yan etkiler nedeniyle ilaçların yeterli sürede alınmaması olarak sayılabilir (50).

H. pylori, glikopeptidler, nalidiksik asit, trimetoprim, sulfonamidler, nistatin, amfoterisin B ve sikloheksimide doğal dirençlidir. Bu ajanlardan bazıları, besiyerlerinde *H. pylori*'yi izole etmek için kullanılmaktadır (52).

H. pylori, *M. tuberculosis* gibi mutasyonlarla direnç kazanan bir bakteridir. Direnç mekanizmasında plazmidler yer almaz; nokta mutasyonları yer alır. Pek çok bakteride olduğu gibi ilaç atım proteinleri (drug efflux proteins) de dirençte önemli rol oynar (52).

H.pylori'ye karşı en sık kullanılan antibiyotik, 3'lü tedavinin bir parçası olan klaritromisindir. Konsensus konferanslarına göre, direnç oranı %15'ten %20'lere ulaştığında bu antibiyotik kullanılmamalıdır. Avrupa'daki faz 3 denemeleri göstermiştir ki, klaritromisin dirençli *H.pylori* suşlarının prevalansı arttığında 4'lü tedavi yöntemi olan, iki antibiyotik, PPI ve bizmut, birinci sıra tedavi yöntemi olmalıdır. Klaritromisin direnci nedeniyle yerine metronidazol kullanılabilir. Gelişmekte olan ülkeler artan oranda antibiyotik direncine alternatif antibiyotik tedavileri denemektedir. Bunlar 4'lü tedavi, ardışık tedavi ve levofloksasin, rifabutın ve furazolidan gibi diğer antibiyotiklerle 3'lü tedavidir. 4'lü tedavi bizmut, PPI, metronidazol ve tetrasiklin içermektedir (6).

Antibiyotik tedavisinin ağızda metalik tat, bulantı, kusma, baş ağrısı, diyare, kabızlık ve mide ağrısı gibi birçok yan etkisi olabilmekte ve ayrıca *Candida albicans* gibi fırsatçı patojenlerin artmasına neden olarak vajinit ve diğer şikayetlere neden olabilmektedir. Antibiyotik kullanımı psödomembranöz kolite de neden olabilmektedir. Ayrıca sık antibiyotik kullanımı antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı araştırmacılar *H.pylori* enfeksiyonu için farklı tedavi yöntemleri geliştirmenin yollarını da aramışlardır. Şimdilerde siyah üzüm çekirdeği yağı ve balık yağı karışımından oluşan doğal tedavi yöntemi önerilmektedir. Yapılan bir çalışmada bu yöntemle vakaların %20'sinde *H.pylori*'nin ekarte edilebildiği saptanmıştır (53). Ayrıca probiyotik ve prebiyotiklerin de antibiyotiklerin yan etkilerini azalttığı ve tedavinin etkinliğini arttırdığına dair bilgiler vardır. Hipertiroidizm tedavisinde kullanılan radyoterapi sırasında radyoiodinin %15 kadarının midede bulunduğu bilinmektedir. Bu bilgidен yola çıkarak Usluoğulları ve ark. radyoterapinin *H.pylori* üzerine etkinliği üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu yöntemin *H.pylori* ve diğer enfeksiyonların üzerinde bir etkinliği olmadığı sonucuna varmışlardır (54). Bu bilgilere göre *H.pylori*'nin eradikasyonu için şu anda antibiyotik tedavisinden başka alternatif bir yol bulunmamaktadır.

H.pylori'nin antibiyotiklere direnci dünyada düzenli değildir, gelişmekte olan ülkelerde yüksek, gelişmiş ülkelerde reçete sıklığıyla uyumlu olarak düşüktür. Bu nedenle tedavi rejimine başlamadan önce duyarlılık testi önerilmektedir (6).

2.8.1. Duyarlılık Testi

İnvitro olarak *H.pylori* için duyarlılık testi fenotipik veya genotipik metodlarla yapılır. CLSI, *H.pylori*'nin direnç tespiti için agar dilüsyon yöntemini standardize etmiş ve kullanımını önermiştir, fakat E-test yöntemi hem kullanım kolaylığı açısından hem de agar dilüsyonla benzer sonuçlar verdiği için direnç tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yine de fenotipik testler zordur çünkü organizma optimal kültür koşullarında yavaş üremektedir. Bu mikroorganizmadaki antibiyotik direncinin nokta mutasyonuna bağlı olması nedeniyle genotipik metodlar, fenotipik metodlara göre daha çok tercih edilir. Bu metodlar direkt biyopsi materyaline uygulandığından daha hızlı sonuç alınır.

2.8.1.1. Fenotipik Metodlar

1. Agar dilüsyon metodu; CLSI tarafından *H.pylori* antibiyotik duyarlılığı için önerilen bir metoddur.
2. Broth dilüsyon metodu; Otomasyona uyarlanabilmesi avantajdır fakat *H.pylori* zor ürettiği için bu geçerli değildir.
3. Disk difüzyon metodu; Genel olarak ekonomiktir fakat yavaş üreyen bakteriler için uygun değildir (6).

Antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonunu (MİK) saptayan bu testler zaman alıcıdır ve sonuçlar değişkenlik gösterir. Hücre geçirgenliği, inokulasyon miktarı, inkübasyon şartları ve üreme ortamı gibi faktörler sonucu etkileyebilir. Moleküler yöntemler bu faktörlerden bağımsızdır, tekrarlanabilir sonuçlar verir ve kolaylıkla standardize edilebilir. Ayrıca fenotipik testlerden daha hızlıdır ve gastrik biyopsi örneklerine direk olarak uygulandığı zaman, sonuç endoskopinin yapıldığı gün elde edilebilir (8).

2.8.1.2. Genotipik Metodlar

Şimdiye kadar moleküler tarama testleri klaritromisin, florokinolonlar ve tetrasiklinler için geliştirilmiştir. İki ana metod kullanılır, PCR-RFLP ve realtime PCR.

H.pylori'de makrolidlere direnç 23S rRNA'daki peptidiltransferaz kodlayan bölgedeki nokta mutasyonlarına bağlıdır. 23s rRNA da 2 pozisyonda 3 major nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Guanin veya sitozinle yer değiştirmiş adenin görünür; A2142G, A2142C, A2143G. Bu mutasyonlar restriksiyon endonukleazlar kullanılarak

PCR-RFLP ile aranır. Genelde, A2142G mutasyonu için BsaI, A2143G mutasyonu için BsbI ve A2142C için BceAI restriksiyon enzimleri kullanılır. Bu mutasyonlar realtime PCR'la da araştırılabilir, *H.pylori*'de makrolid direnci için birçok prob tanımlanmıştır. Diğer genotipik metod FISH metodlarını içerir. Bunlar, DNA amplifikasyonu olmadan oligonukleotid ligation assay, DNA enzim assay, reverse hibridizasyon-based line probe assay ve dual priming oligonukleotid- based multiplex PCR'dır (6).

H.pylori'de antibiyotik direncinin moleküler mekanizmaları tanımlanmış olup, çoğu kromozomda lokalize olan nokta mutasyonlarına bağlıdır. Bu durum, diğer bakterilerde plazmidler, transpozonlar ve integronlarda lokalize olan antibiyotik direnç mekanizmalarından farklıdır. *H.pylori*'de antibiyotik direncinin temeli muhtemelen “de novo” (doğal, yapısal) olmasına rağmen, dirençli ve duyarlı suşlar arasında in vivo horizontal gen transferi olduğu belirtilmiştir (8).

2.8.2. Antibiyotiklerin Etki ve Direnç Mekanizmaları

Makrolid grubu antimikrobiyal ajanlar yaklaşık 30 yıllıktır. Klaritromisin, 14 makrolid üyesinden biridir. Asit ortamda yüksek oranda stabilite göstermesi ve iyi farmakokinetiği ile insanda mikrobiyolojik olarak aktif bir metabolit olarak görünen, Gram pozitif ve Gram negatif organizmalar, bazı anaeroplara ve atipik patojenler üzerinde etkili geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Bazı vakalarda eritromisinden daha etkilidir. Klaritromisin semisentetik bir makrolid antibiyotiktir. 23S rRNA molekülünün V ve VI domainin peptidiltransferaz bölgesine bağlanan makrolid grubuna ait bakteriyostatik bir antibiyotiktir (55). Bu bağlanma, protein elongasyonunu engeller ve böylece bakteriyel protein sentezi durur. Klaritromisinin antibakteriyel aktivitesi diğer makrolidlerle benzerdir, ancak klaritromisin asidik gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe olur ve bu nedenle *H.pylori*'ye karşı daha etkilidir. *H. pylori*'de klaritromisin direnci genellikle çok yakın iki 23S rRNA nükleotidinde (2142 ve 2143) nokta mutasyonu ile oluşur. 2142. pozisyonda bir adeninin sitozin ile yer değiştirmesi ya da 2142 ve 2143. pozisyonlarından birinde adeninin guanin ile yer değiştirmesi söz konusudur. Bu mutasyonlar birçok makrolid için ribozomların afinitesinin azalmasına neden olur ve direncin artışıyla sonuçlanır (8, 52, 56). Genellikle A2144G, A2143G, A2142G ve A2143C mutasyonlarına rastlanmaktadır. A2142C, A2115G, G2141A, A2142T ve T2717C mutasyonları da tanımlanmıştır fakat peptidiltransferazda seyrek görünmektedir (55). *H.pylori* izolatlarında klaritromisin direnci artmaktadır. Prevalans

gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha fazladır. Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde antibiyotik direncinin saptanması tedavinin etkinliği açısından önemlidir (8).

Amoksisilin, penisilin bağlayıcı protein (PBP) denen taşıyıcıları bloke ederek peptidoglikan sentezini bozar. *H. pylori*'de amoksisilin direnci nadir görülür ve bu dirençli suşlarda *pbp-1a* geninde, penisilin içeri alınmasını engelleyen bir mutasyon saptanmıştır (48).

Tetrasiklinler, ribozomun 30 S alt birimine bağlanarak protein sentezini engellerler. Üçlü nükleotid AGA-926'nın 9283TTC'ye değişimi, tetrasiklinin ribozoma bağlanmasını engeller. Tetrasiklin direncinde ilaç atım proteinleri, ilacın yeterli konsantrasyona ulaşmasını engelleyerek de önemli bir rol oynar (57).

Florokinolonlar *gyrA* geni tarafından kodlanan DNA giraz enziminin A subünitesini inhibe ederek etki ederler. Kinolon dirençli *H. pylori*'lerde bu gene mutasyonlar saptanmıştır (52). Florokinolonlar antiHelicobacter aktivitesi ile iyi etkili oral bir ilaçtır. Fakat çalışmalarla *H.pylori*'nin florokinolonlara yüksek oranda direnç gösterdiği saptanmıştır (56). Levofloksasin bir florokinolondur ve *H.pylori*'ye karşı aktivitesi önemlidir. *H.pylori* eradikasyonu başarısızlığında ikincil ilaç olarak kullanılmaktadır (7).

Nitroimidazol grubu antibiyotikler bakteriyel DNA ile etkileşime girerek etkilerini gösterirler. Bu etkileşim için *rdxA* önemli bir proteindir. Bu proteindeki mutasyonlar bu ilaçları etkisiz hale getirebilir (58). Ayrıca ilaç atım proteinlerinin de nitroimidazol direncinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (52).

Rifampin, *rpoB* geni ile kodlanan DNA bağımlı RNA polimeraz B subünitesini inhibe ederek etki gösterir. *M. Tuberculosis* ve *E.coli*'de de olduğu gibi *H. pylori*'de de bu bölgedeki mutasyonlar rifampin direncinden sorumludur (52, 59)

2.8.3. *H.pylori* Tedavisinde Kullanılan Adjuvan Ajanlar

2.8.3.1. Bizmut

Bizmut tuzları topikal antimikrobiyal ajanlar olup, direkt olarak bakteri hücresinin membranını etkilerler. Bu etki periplazmik bölge ve membran boyunca birikerek hücre bütünlüğünün bozulmasını sağlamak şeklinde gerçekleşir. Bizmut sub-salisilat (Pepto-Bis-mol), daha az sıklıkla da bizmut sitrat şeklinde kullanılmaktadır. Bizmut, tedaviden 2 saat sonra antral mukusta antibakteriyel konsantrasyona ulaşır. İki bizmut tuzunun da yan etkileri minimaldir (60). *H.pylori* tedavisinde bizmut temelli dörtlü tedavide kullanılır ve genelde antibiyotik direncinden bağımsız olarak eradikasyon oranını arttırmaktadır (61).

2.8.3.2. H, K ATPaz, PPI

Gastrik paryetal hücrede kanalikül membran enzimi olan proton pompa inhibitörleri (PPI) paryetal hücrede H^+/K^+ ATPaz'ı inhibe eder ve gastrik asit sekresyonunun son basamağından sorumludur. Bu enzimin inhibisyonu gastrik asit sekresyonunu baskılamakta H_2 reseptör antagonistlerinden daha etkilidir (61).

Omeprazol ilk bulunan benzimidazol olup, proton pompa inhibitör tedavisinin bir modeli olarak kullanılabilir. İnvitro olarak *H.pylori*'nin üremesini inhibe etmekle birlikte, düşük PH'larda diğer bakterilere etkisi daha azdır. Omeprazolün aktif sulfenamid formu yalnızca 7 PH'da *H.pylori*'nin üremesini engellemektedir. Omeprazolün inhibitör etkisinin *H.pylori*'nin üreaz bulunmayan zincirinde ya da üre yokluğunda görülmesi, etkisinin üre inhibisyon yolu ile olmadığını gösterir. Omeprazolün in-vivo olarak *H.pylori* üzerine etkisinin az olduğu söylenebilir. Omeprazol ya da diğer PPI'ler in-vivo olarak yalnız başına kullanıldığında *H.pylori* suprese olmaktadır. *H.pylori* infeksiyonunda PPI ajanlar kombine antimikrobiyal tedavinin bir parçası olarak kullanılabilir.

Aktivitesinde en önemli faktör yüksek intragastrik PH olup, bu durumda lokal immun yanıtın aktarılmasının yanı sıra antibiyotiklerin mukozadan salınımının azalması ve PH duyarlı antibiyotiklerin minimal inhibisyon konsantrasyonlarının sağlanması da mümkün olmaktadır. Antisekretuar özellikteki bu ilaçların gastrik sıvı hacmini azaltması, aynı zamanda antimikrobiyal ajanların intragastrik konsantrasyonunu da arttırmaktadır (60)

Normal şartlarda, herhangi bir ilaca karşı direnç olması, o ilacın tedaviden tamamen çıkmış olması anlamına gelmektedir. Ancak tinidazol grubu bu konuda istisnadır. Çünkü bu grup ilaçlar ön-ilaçtır ve bakteriyel enzimler tarafından aktive edilirler. *H. pylori*'de bu enzimlerden çok miktarda bulunduğu için, ilacın dozu arttırılarak direnç problemi de çözülmeye çalışılabilir. Tedaviye yanıtı belirlemede hastaya ait özellikler de çok önemlidir. Sitokrom P450 2C19 (CYP2C19) PPI'ları metabolize eden enzimdir. Bu gendeki polimorfizm, PPI metabolizmasını değiştirerek tedaviye yanıtı değiştirebilir (62). Hızlı metabolize eden, orta hızlı metabolize eden ve yavaş metabolize eden olmak üzere üç farklı CYP2C19 genotipi tanımlanmıştır. PPI'ları hızlı metabolize eden grupta standart üçlü tedavi ile eradikasyon oranları düşüktür. Batı toplumlarında hızlı metabolize eden genotip daha sık görülürken, Asya'da yavaş metabolize eden genotip daha yaygındır. Tedaviye yanıtı belirlemede bir diğer önemli faktör de sigara içimidir. Sigara, özellikle amoksisilin içeren tedavi protokollerinde eradikasyon oranlarını düşürmektedir (63). Çok kesin veriler olmamakla birlikte bu etkisinin asit sekresyonunu arttırdığı için olduğu düşünülmektedir. Pek çok Avrupa ülkesinde metronidazol ve klaritromisin dirençleri sırası ile %20–40 ve %2–15 oranlarında bulunmuştur (64). Türkiye'de ise klaritromisin direnci %27'nin üzerindedir (65). Dünya çapında amoksisilin (<%1) ve tetrasikline (<%0,5 - % 9) dirençli *H. pylori* suşları ile pek karşılaşmamaktadır (64). Pek çok araştırmacı metronidazol direncinin kadınlarda erkeklere göre daha sık olduğunu göstermişlerdir. Bunun nedeni büyük ihtimalle jinekolojik enfeksiyonlarda tinidazol grubu antibiyotiklerin sıklıkla kullanılmasıdır. *H. pylori*'de çoklu ilaç direnci çok sık karşılaşılan bir durum değildir. Fakat son dönemde bazı çalışmalarda bildirilmeye başlanmıştır (51, 64)

Tablo 5: *H.pylori* enfeksiyonlarında kullanılan antimikrobiyallerin etki ve direnç mekanizmaları ile prevalansları (8).

Antimikrobiyal	Etki mekanizması	Direnç mekanizması	Direnç prevalansı
Metronidazol	DNA hasarı	rdxA ve frxA genlerinde mutasyon	%20-95
Klaritromisin	Protein sentezinin inhibisyonu	23S rRNA'da nokta mutasyonları	%5-30
Amoksisilin	Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu	PBP-D(tolerans) yada PBP1A(direnç) da afinitenin azalması, membran geçirgenliğinin azalması (direnç)	%1-2
Tetrasiklin	Protein sentezinin inhibisyonu	rrnA ve rrnB, 16S rRNA geninde nokta mutasyonları	<= %1
Florokinolonlar	DNA replikasyonunun inhibisyonu	gyrA geninde nokta mutasyonları	< %1
Rifamisinler	Transkripsiyonun inhibisyonu	rpoB geninde nokta mutasyonları	< %1
Nitrofuraneler	DNA hasarı	Bilinmiyor	< %0,1
Bizmut	Protein, ATP ve hücre membran sentezinin inhibisyonu	Bilinmiyor	Bilinmiyor

2.8.4. Antibiyotik Direncinin Prevalansı

H.pylori'de antibiyotik direncinin prevalansı değişkendir. Az sayıda suşların çalışıldığı tek merkezli çalışmalarda, hastaların seçimi sınırlı kalmakta ve kullanılan yöntemlerin farklı olmasından kaynaklanan farklı oranlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla *H.pylori*'nin antibiyotik direnç oranları standart metodların kullanıldığı çok merkezli tarama programlarından sağlanmalıdır. Sürveyans programları pahalıdır ve yalnızca uygulanan bölgelerde değil, daha sıklıkla araştırmacıların olduğu birkaç ülkede yapılmıştır (8).

2.9. Korunma

Bilinen bütün *H.pylori* suşları üreaz pozitifdir. Bakterinin yaşamı ve midenin asidik ortamına kolonizasyonu için çok önemli bir birimi olan Ure B'nin yüksek antijen özelliği vardır. Üre kanal proteini olan bakteriyel Ure I, asidik memeli midesinde kolonizasyon için anahtar bir faktördür. Yapılan araştırmalara göre Ure B, Ure I ve kolera toksin B (CTB) subunitinden geliştirilen multiepitop bir aşı BALB/ c farelerde *H.pylori*'ye karşı koruma etkisi olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde diğer *H.pylori*

proteinleri kullanılarak ta aşılar geliştirilebilir. Fakat bütün bu çalışmalar henüz devam etmektedir (61).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Gastroenteroloji Anabilim Dalına başvurmuş rastgele seçilmiş 140 hastadan endoskopi sırasında alınan mide biyopsi örnekleri Nucliswab® (Salubris, USA) içerisine konularak Yeditepe Üniversitesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır. Bu biyopsi örneklerinden önce DNA ekstraksiyonu işlemi uygulanarak elde edilen DNA'lar sırasıyla planlanan işlemler için -20°C'de saklanmıştır.

Pozitif kontrol olarak *H.pylori* ATCC 43504 suşu İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜKENS)'nden temin edilmiştir.

3.1.DNA Ekstraksiyonu

Laboratuvarımıza gelmiş olan mide biyopsi örnekleri havanda ezilerek QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) ekstraksiyon kitinin dokular için önerilmiş protokolü uygulanarak DNA izolasyonları yapılmıştır. Buna göre, havanda ezilmiş olan dokunun üzerine 100 µl Buffer ATL ve 20µl proteinaz K eklenerek bir gece 37°C etüvde bekletilmiş, ertesi gün 56°C su banyosunda 2 saat bekletilerek dokunun parçalanması sağlanmıştır. Bu işlemde sonra doku süspansiyonunun üzerine 200 µl Buffer AL eklenmiş, 15 saniye kadar vortekslenerek homojenize olması sağlanmış ve 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Örneğin üzerine 200 µl etanol eklenmiş ve 15 saniye kadar vortekslenerek örneğin homojenizasyonu sağlanmıştır. Süspansiyon hızlıca santrifüj edilerek üzerindeki sıvı kısmı 2ml toplama tüpü içerisinde bulunan QIAamp Mini spin kolonuna aktarılmıştır. 6000 x g (8000rpm)'de 1 dakika santrifüj edilmiş, kolonun altındaki, içinde örneğin sıvı kısmının bulunduğu, toplama tüpleri atılarak temiz toplama tüpleri yerleştirilmiştir. Kolonun üzerine 500 µl Buffer AW1 eklenerek 6000 x g (8000rpm)'de 1 dakika santrifüj edilmiş, yine altındaki toplama tüpleri atılarak temiz olanları yerleştirilmiştir. Bu defa kolonun üzerine 500 µl Buffer AW2 eklenerek 20000 x g (14000rpm)'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonun altındaki 2ml'lik toplama tüpleri atılarak yerine 1,5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüpleri yerleştirilmiş ve kolonun üzerine 200 µl Buffer AE veya distile su eklenerek oda ısısında 1 dakika inkübe edilmiş ve 6000 x g (8000rpm)'de 1 dakika santrifüj edilmiştir, böylece mikrosantrifüj tüpünde örnekteki DNA elde edilmiş oldu.

3.2. Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile hibridizasyon

İzole edilen DNA'larda Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti kullanılarak *H.pylori* varlığı ve florokinolon ve klaritromisine direncin varlığı araştırılmıştır. Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti DNA-STRİP® teknolojisi kullanılarak, kültürü yapılmış örnekten veya biyopsi örneğinden *H.pylori*'nin genetik olarak tanımlanmasına ve florokinolon ve/veya klaritromisin direncinin saptanması için geliştirilmiş bir kittir. Florokinolona direnci *gyrA* geninde en sık rastlanılan mutasyon bölgeleri olan 87 ve 91. kodondaki mutasyonları göstererek belirler. Klaritromisin direnci için ise 23S genindeki 2146 ve 2147. Pozisyondaki mutasyonları (eskiden 2142 ve 2143. Pozisyonlar olarak tanımlanmaktadır) belirler. Prosedür iki aşamalıdır. İlk olarak biotinle işaretlenmiş primerler kullanılarak multipleks amplifikasyon aşaması gerçekleştirilir. Daha sonra hibridizasyon işlemi yapılır. Hibridizasyonun içerdiği basamaklar ise; amplifikasyon ürününün kimyasal denatürasyonu, tek zincirin hibridizasyonu, biotin işaretli ampikonun membrana bağlanması, yıkanması, streptavidin/alkalin fosfataz konjugatın eklenmesi ve alkalin fosfataz işaretli bir boyanma işlemidir.

Önce elde edilen DNA'nın amplifikasyonu için Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kitinin önerdiği protokol uygulanmıştır. Buna göre reaktiflerden hasta başına PNM'den 35 µl, 10x PCR Buffer'dan 5 µl, MgCl₂'den 2 µl, Hotstart TaqDNA Polymeraz'dan 0,2 µl ve 3 µl su eklenerek hazırlanmış PCR karışımına DNA'dan 5 µl ilave edilerek toplam reaksiyon hacmi 50 µl'ye tamamlanmıştır. Thermal cyclers'da aşağıdaki program uygulanarak amplifikasyon sağlanmıştır.

Amplifikasyon programı:

95 °C'de 15 dakika (1 döngü),

95 °C'de 30 saniye, 58 °C'de 2 dakika (10 döngü),

95 °C'de 25 saniye, 53 °C'de 40 saniye, 70 °C'de 40 saniye (25 döngü),

70 °C'de 8 dakika (1 döngü)

Negatif kontrol olarak da hedef DNA yerine aynı miktarda distile su kullanılmıştır.

Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen ürün için hibridizasyon prosedürü uygulanmıştır. Bunun için 20 µl DEN solusyonundan her kuyucuğun köşesine pipetlendi, ve 20 µl PCR ile çoğaltılmış örneklerden DEN solusyonuna pipetlenerek karışması sağlandı ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Önceden ısıtılmış (37-45°C) HYB solusyonu konularak homojen renk elde edilinceye kadar yavaşça karıştırıldı. Bu karışımın üzerine stripler yavaşça yerleştirildi ve Twincubator'da 45±1°C'de 20 dakika çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hibridizasyon solusyonu pastör pipeti yardımıyla kuyucuklardan tamamen boşaltıldı ve her bir kuyucuğa STR solusyonu eklendi 45±1°C'de 10 dakika çalkalanarak inkübe edildi. STR solusyonu da ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra striplerin üzerine 1ml RIN solusyonu eklenerek 1 dakika çalkalanarak striplerin yıkanması sağlandı, bu solusyon da ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra önceden sulandırılmış konjugat solusyonundan her bir stripin üzerine 1ml ilave edildi ve 37°C'de 20 dakika çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasına konjugat dökülerek boşaltıldı ve stripler 2 kez 1'er dakika RIN solusyonu ile 1 kez de 1ml distile su ile yıkandı, ve striplerin üzerine önceden sulandırılmış substrattan 1'er ml eklenerek 3-20 dakika karanlıkta inkübe edildi ve solusyon 2 defa distile su ile yıkanarak işlem sonlandırıldı. Striplerin kuruması sağlandıktan sonra üzerinde oluşan bantlar kitin içinde bulunan değerlendirme kartı kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.3.Realtime PCR ile Klaritromisin Direncinin Saptanması

DNA'da klaritromisin direncini göstermek için nokta mutasyonlarını saptamak amaçlı realtime PCR temelli PCR hibridizasyon testi çalışılmıştır. *H.pylori*'nin 23S rRNA geninin 267 bp'lik bir fragmenti HPYS (5'-TATGGTACCCGCATGATATCCCATTAGCAGT-3') ve HPYA (5'-TAAGAGCTCAGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3') primerleri kullanılarak çoğaltılmış, amplifiye ürün iki proba araştırılmıştır; sensor prob, LC-Red 640 ile işaretli 5' ve 3' fosforillenmiş (5'-GGCAAGACGGAAAGACC-3'; 2504-2520 arasındaki nukleotidler) ve anchor prob; floresanla işaretlenmiş 3' (5'-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC-3'; 2473-2501 arasındaki nukleotidler) kullanılmıştır. Primer ve proplar Sentromer DNA Teknolojileri Ltd.Şti'nden sağlanmıştır.

LightCycler thermocycler (Roche Diagnostics, Neuilly sur Seine, Fransa) kullanılarak PCR ve hibridizasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Cam kapiller tüplerin içinde, 1,6 µl MgCl₂ (25mM), 0,4 µl forward ve reverse primerler (her biri 20 µM), 0,2 µl anchor ve sensor proplar (her biri 20 µM) ve 2 µl FastStart DNA Master Hybridization probes (Roche diagnostics) ve 3 µl DNA içeren toplamda 20 µl hacime sahip olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. Aşağıdaki program kullanılarak amplifikasyon sağlandı.

95 °C'de 10 dakika (1 döngü), (Denaturasyon)

95 °C'de 0 saniye, 60 °C'de 10 saniye, 72 °C'de 17 saniye (50 döngü),

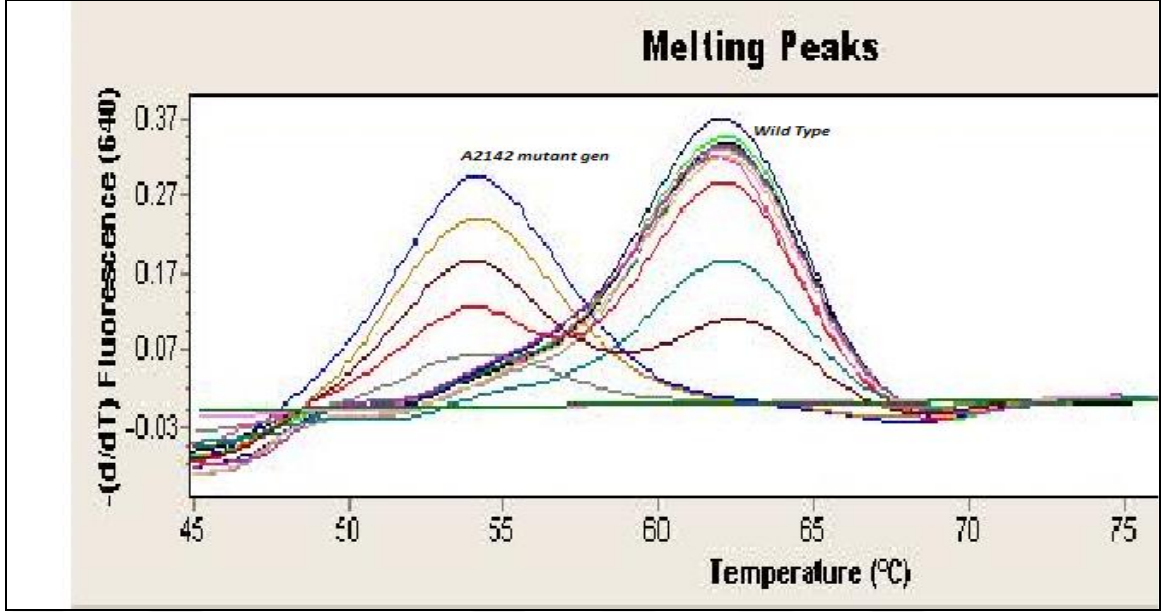
95 °C'de 0 saniye (1 döngü), (Melting)

45 °C'de 30 saniye (1 döngü) (Cooling) (ısı geçiş oranı 20°C/s)

85 °C'de 0,1 °C oranında floresan düşüşü ile yavaş ilerleme

İşlem bittikten sonra Lightcycler cihazından T_m noktaları karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

Çalışmada dört farklı T_m noktası görülmektedir. Wild type suş, A2142C, A2142G ve A2143G mutant suşları için yaklaşık olarak 61.5, 58.0, 53.0 ve 53.6 T_m noktaları gözlenmesi beklenmektedir. Şekil 7'de lightcyclerda yapılmış çalışmaya bir örnek görülmektedir (66).



Şekil 7. Realtime PCR ile klaritromisin direncinin değerlendirilmesi.

3.4. Multipleks PCR ile Virulans Faktörlerin Saptanması

PCR karışımı; 0,9U Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, USA). 1,5nmol/L MgCl₂ içeren 1x PCR buffer, 10 pmol 16S rRNA, 10 pmol VAG, 25 pmol VA1, 10 pmol cagA primerlerinden, 125 µM her bir dNTP'den ve 50ng DNA'dan toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Amplifikasyon için thermal cycler'da kullanılan program;

94 °C'de 3 dakika (1 döngü),

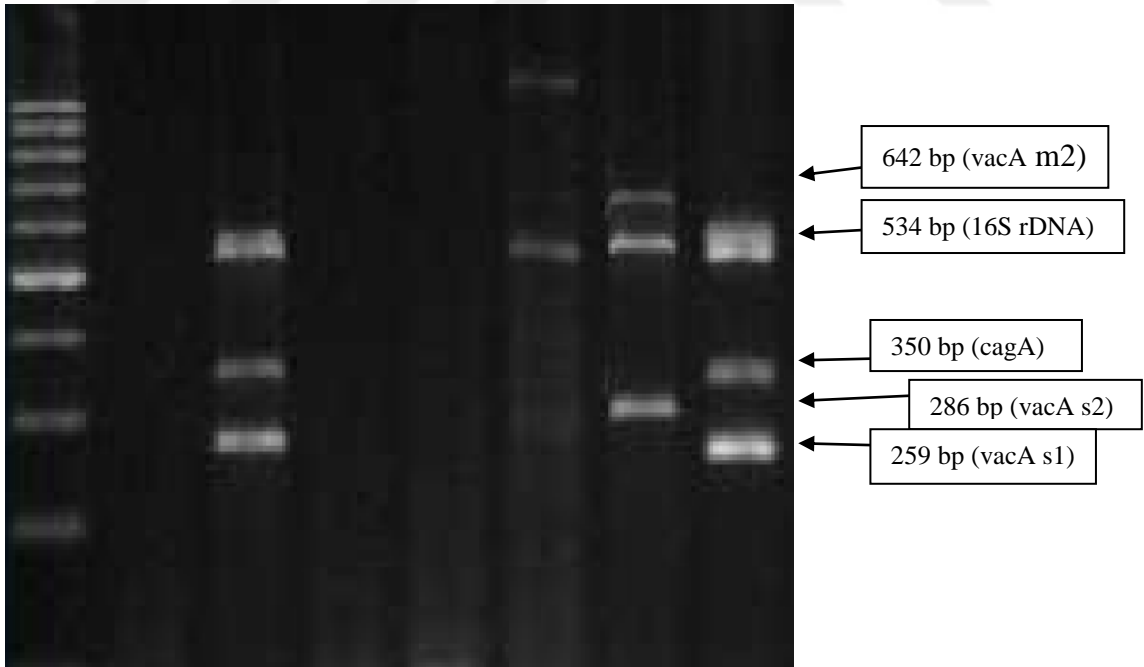
94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika (35 döngü),

72 °C'de 10 dakika (1 döngü),

3µl amplifikasyon ürünü %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş oluşan bantlar değerlendirilmiştir (67).

Tablo 6: Multipleks PCR için kullanılan primerler

Gen	Primer	Primer sekansı	Ürün büyüklüğü (bp)
16S rRNA	16S rRNA-F	5'-TAAGAGATCAGCCTATGTCC-3'	534
	16S rRNA-R	5'-TCCCACGCTTTAAGCGCAAT-3'	
VacA s1/s2	VAI-F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	259/286
	VAI-R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'	
VacA m1/m2	VAG-F	5'-CAATCTGTCCAATCAAGCGAG-3'	567/642
	VAG-R	5'-GCGTCAAATAATTCCAAGG-3'	
cagA	CagA-F	5'-GTTGATAACGCTGTCGCTTC-3'	350
	CagA-R	5'-GGGTTGTATGATATTTCCATAA-3'	



Şekil 8. Multipleks PCR ile virulans faktörlerin değerlendirilmesi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile ve multipleks PCR yöntemi ile elde edilen *H.pylori* pozitifliği sonuçları kıkare testleri ile değerlendirilmiş, $p>0,05$ bulunduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile ve realtime PCR yöntemi ile çalışılan klaritromisin direnci sonuçları kıkare testleri ile değerlendirilmiş, $p>0,05$ bulunduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



4. BULGULAR

Çalışmaya Yeditepe Üniversitesi Gastroenteroloji bölümüne başvurmuş 140 hastadan alınmış biyopsi örnekleri dahil edilmiştir. Hastaların yaşları 19 ile 73 arasında değişmekte olup hastalar rastgele seçilmiştir.

140 hastadan multipleks PCR yöntemiyle yapılan çalışmada 69 (%49,3)'u *H.pylori* pozitif olarak saptanmıştır. Aynı hastaların DNA örnekleri ile Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile yapılan hibridizasyon çalışmasında 78(%55,7) hasta örneğinde *H.pylori* pozitifliği saptanmıştır. Bu iki testin karşılaştırmasında p değeri >0,05 bulunduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Multipleks PCR inhouse bir yöntem olup kullanılan reaktiflerin miktarları denenerek çalışma yapılmıştır fakat ticari kit daha önce yapılan çalışmalarla desteklendiğinden daha doğru sonuç verdiği kabul edilmektedir. Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kitini Cambau ve ark.'nın 2004-2008 yılları arasında Fransa'da yaptıkları geniş bir çalışma ile geliştirmişlerdir (10). Deyi ve ark.'nın 2009 yılında Belçika'da yaptıkları çalışma'da bu kitin duyarlılığının yüksekliğini destekler niteliktedir (68).

Multipleks PCR yöntemiyle 140 hastadan 69'u *H.pylori* pozitif olarak saptanmış ve aynı zamanda virulans faktörleri incelenmiştir. İncelenen virulans faktörleri cagA, vacA'nın s1, s2, m1 ve m2 allelleridir. En önemli virulans faktörlerinden olan cagA, 25(%36,2) hastada saptanmıştır. Diğer bir önemli virulans faktörü olan vacA allellerinin oranları ise %23,2 s1, %33,3 s2, %23,2 m1 ve %14,5 m2 şeklindedir. Tablo 7'de virulans faktörlerin dağılım oranları verilmiştir. VacA allellerinin birliktelikleri de enfeksiyonların oluşumunda önemli bir etkidir. 69 hastamızın %7,2'sinde s1m1, %10,1'inde s1m2, %11,6'sında s2m1 ve %4,3'ünde s2m2 allel birliktelikleri saptanmıştır.

Tablo 7a. Virulans faktörlerin multipleks PCR yöntemi ile elde edilen miktarları

Virulans faktör	CagA	VacA s1	VacA s2	VacA m1	VacA m2
Hasta sayısı (%)	25 (%36,2)	16 (%23,2)	23 (%33,3)	16 (%23,2)	10 (%14,5)

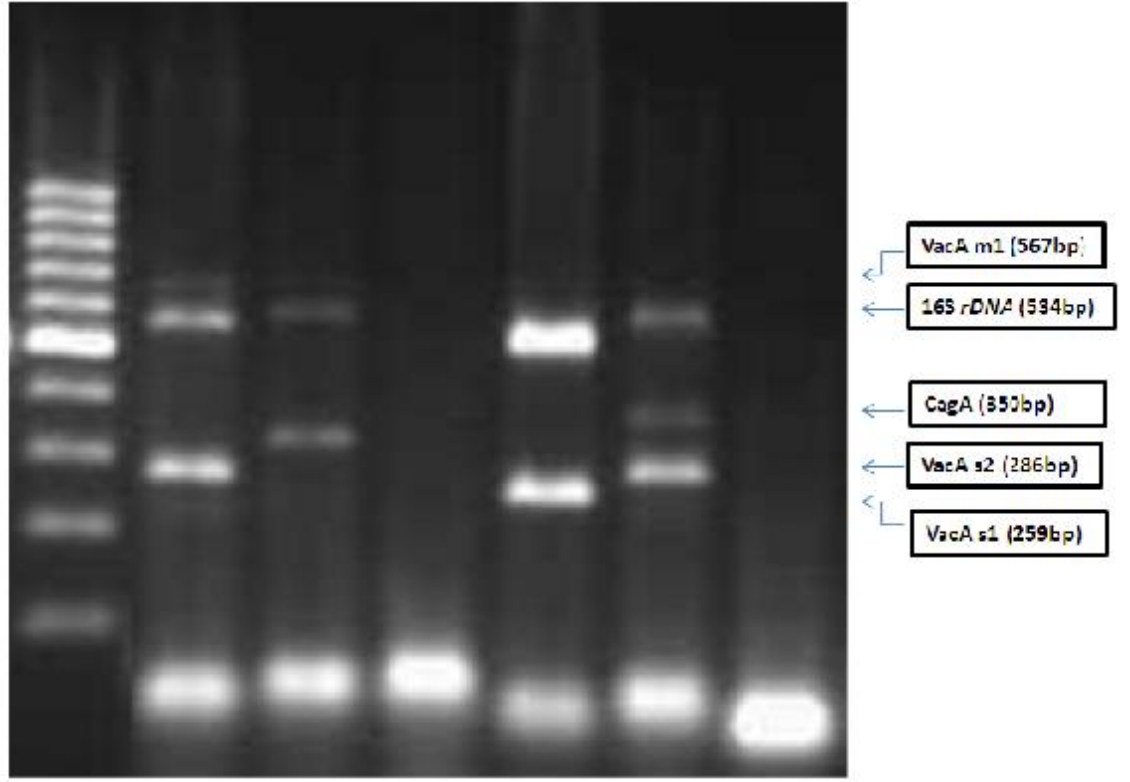
Tablo 7b. VacA allellerinin birlikte bulunma oranları

Virulans faktör	VacA s1m1	VacA s1m2	VacA s2m1	VacA s2m2
Hasta sayısı (%)	5 (%7,2)	7 (%10,1)	8 (%11,6)	3 (%4,3)

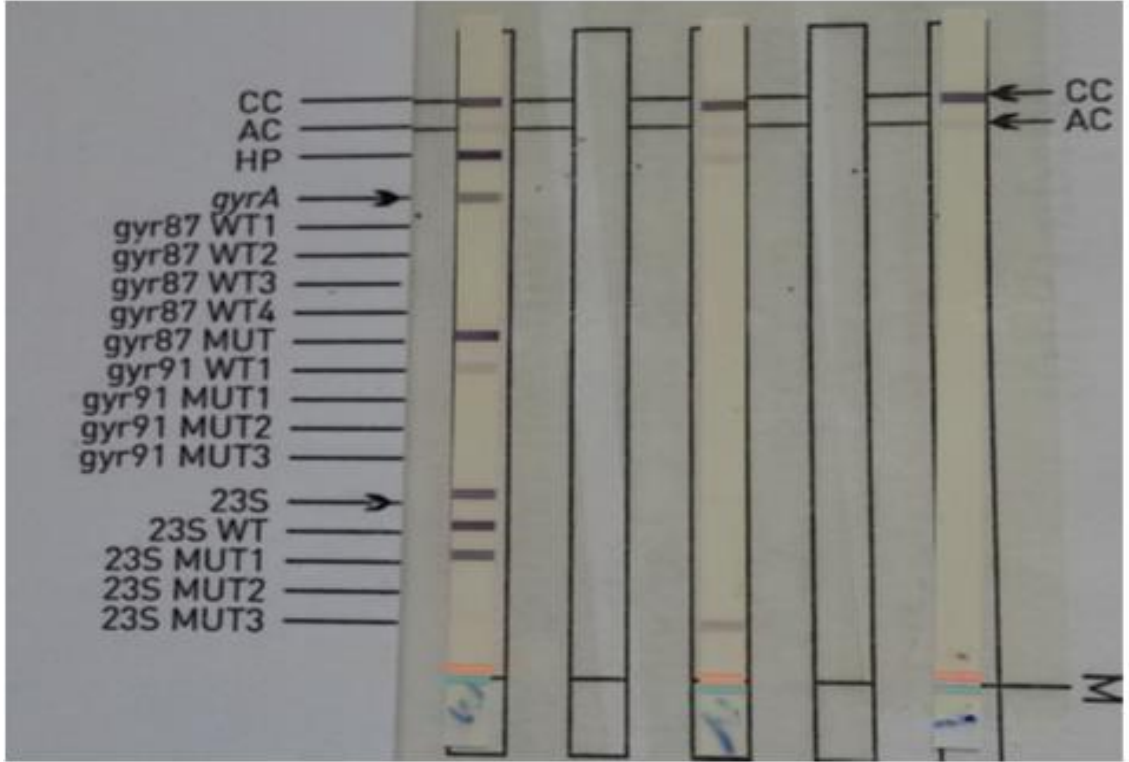
H.pylori'nin enfeksiyon etkeni olmasında cagA virulans faktörü ile birlikte vacA'nın bulunması da diğer önemli bir faktördür. CagA pozitif hastaların 18'inde (%72) vacA genomuna da rastlanmıştır. CagA virulans faktörü saptanan 18 hastada aynı anda belirlenen VacA allellerinin dağılımı incelendiğinde, 3(%12) s1m1, 4(%16) s1m2, 4 (%16) s2m1, 2(%8) s2m2 varyantlarına rastlanmıştır. Bu hastalardan 4(%16)'ünde sadece s2 genomuna, 3(%12)'ünde ise sadece m1 genomuna rastlanmıştır.



Şekil 9. CagA virulans faktörü ile birlikte saptadığımız VacA allellerinin oranları



Şekil 10. *H.pylori* virulans faktörlerinin multipleks PCR çalışıldıktan sonra %2'lik agaroz jelde 100bp ladder kullanılarak görüntülenmesi.



Şekil 11. Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile çalışılmış *H.pylori* pozitif ve negatif olan hastalar.

(1. Hasta HP bandı görülmekte, gyr87 MUT bölgesinde bant görülmesi gyrA bölgesinde mutasyon olduğunu yani florokinolona dirençli olduğunu göstermekte, aynı zamanda 23S bölgesinde WT ile birlikte MUT1 bölgesinde de bant görülmekte yani bu hastadan izole edilen *H.pylori* suşunun klaritromisine de dirençli olduğunu söyleyebiliriz. 2. Hastada HP bandı görülmekte fakat gyrA ve 23 S bandı görülmemektedir. Bu hastanın *H.pylori* pozitif olduğunu söyleyebiliriz. 3. Hastada ise kontrol ve amplifikasyon bandı dışında herhangi bir bant görülmemekte yani hasta *H.pylori* negatif olarak değerlendirilmiştir.)

HP bandının görülmesi hastanın *H.pylori* pozitif olduğunu gösterir. gyrA bandı florokinolon bölgesini göstermekte gyr MUT bölgelerinden herhangi birinde bant görülmesi bu bölgede mutasyon olduğunu dolayısıyla hastada florokinolon direnci olduğunu göstermektedir. 23S gen bölgesi klaritromisin bölgesini göstermekle birlikte 23S MUT bölgelerinden birinde bant oluşması bakterinin klaritromisine dirençli olduğunu göstermektedir.

Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile florokinolon grubu antibiyotiklere direncin saptanması için gyr 87 ve gyr 91 gen bölgelerindeki nokta mutasyonları incelenmiştir. Yapılan çalışmada pozitif olarak saptanan 78 hastanın 14'ünün gyr 87 bölgesinde, 6 hastanın gyr 91 bölgesinde, bunlardan da 2'sinin her iki gen bölgesinde de mutasyon olduğu saptanmıştır. Toplamda 20(%25,6) hastada gyrA gen bölgesinde mutasyona, yani florokinolon direncine rastlanmıştır.

Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile klaritromisin direncinin saptanması için A2146G, A2146C ve A2147G gen bölgelerindeki nokta mutasyonları incelenmiştir. 78 hastanın 31 (%39,7)'ünde klaritromisin direnci saptanmıştır. 11 (%14,1) hastada florokinolon ve klaritromisin antibiyotiklerinin her ikisine de direnç saptanmıştır.

Hibridizasyon yöntemi ile *H.pylori* pozitif olarak saptanan 78 hastaya realtime PCR yöntemi ile A2142G, A2142C ve A2143G gen bölgelerindeki nokta mutasyonları incelenerek klaritromisin direnci bakılmıştır. 26 (%33,3) hastada klaritromisin direnci saptanmıştır. Hibridizasyon ve realtime PCR yöntemleri ile yapılan klaritromisine direnç testleri karşılaştırıldığında, 24 (%30,8) hastada her iki yöntemle de mutasyon saptanmıştır. Bu iki testin karşılaştırmasında p değeri >0,05 bulunduğundan istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hazır kit daha önce yapılan çalışmalarla desteklendiğinden daha doğru sonuç verdiği kabul edilmektedir.

Tablo 8. 78 *H.pylori* pozitif hastanın antibiyotik direnç oranları

	Genotype® HelicoDR
Florokinolon direnci	20 (%25,6)
Klaritromisin direnci*	31(%39,7)
Florokinolon + Klaritromisin direnci	11(%14,1)

* : Klaritromisin direnci realtime PCR yöntemi ile 26 (%33,3) hastada saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada özellikle de gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak bulunan *H.pylori*, insanlarda en sık görülen kronik bakteriyel enfeksiyon etkenlerinden biridir. Eusebi ve ark.'nın bildirilerine göre, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da *H.pylori* pozitiflik oranı yaklaşık üçte bir oranında iken Güney ve Doğu Avrupa, Güney Amerika ve Asya ülkelerinde %50'nin üzerindedir. *H.pylori*'nin prevalansı yüksek olan bölgelerden diğer ülkelere göç yoluyla taşındığı düşünölmektedir (69). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise *H.pylori* prevalansının %63-89 arasında değiştiği gösterilmiştir (7).

H.pylori'nin tanısında kültür yöntemi birçok araştırmacı tarafından altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, tanının doğruluğunun arttırılması için, kültür ile birlikte üre testi ve/veya histoloji ve /veya dışkı antijen testleri ve/veya moleküler yöntemler gibi birden fazla yöntemin kullanılması önerilmektedir. Ayrıca kültür yönteminde bakterinin oksijene olan duyarlılığı, örneğin alındığı yer, taşınma koşulları ve çalışanın tecrübesi gibi nedenlerden dolayı duyarlılığı oldukça düşüktür. *H.pylori*'nin tanısında PCR yönteminin oldukça yüksek duyarlılıkta olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (70). Bunlardan biri de Jaoss Weiss ve ark.'nın yaptığı çalışmadır. Araştırmacılar, PCR, Clotest ve histokimyasal çalışmaları karşılaştırdığında *H.pylori* pozitiflik oranını PCR yöntemi ile %52 oranında bulurken, clotest ve immunhistokimyasal inceleme ile pozitiflik oranını %20 olarak bulmuşlardır (71). Bizim yaptığımız çalışmada bu şekilde bir karşılaştırma yapılmadı fakat aynı hasta grubu iki farklı PCR yöntemi olan multipleks PCR ve hibridizasyon yöntemleri ile çalışıldı. Multipleks PCR ile yapılan çalışmada *H.pylori* pozitiflik oranı %49,3 olarak saptanırken, ticari bir hibridizasyon kiti olan Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile pozitiflik oranı %55,7 olarak saptanmıştır. Bu iki testin karşılaştırılması ile ilgili yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Son yıllarda *H.pylori* ile enfekte bireylerin bazılarında kronik atrofik gastrit ile birlikte gastrik adenokarsinom ve MALT lenfoma gelişirken bazılarında gelişmemesi, bu bakteriye özgü virulans faktörlerini gündeme getirmiştir. Bu faktörlerden biri olan *vacA* geninin s (s1a, s1b, s1c, s2) ve m (m1, m2a, m2b) bölgeleri için farklı allelik varyantları tanımlanmıştır. *H.pylori*'nin *vacA* genotipinin saptanmasının, suşun

ülserojenik özelliğinin belirlenmesinde, in vitro sitotoksin üretiminin gösterilmesinden daha önemli olduğu vurgulanmaktadır. Ülkemizde, bakterinin virulans faktörleri ile ilgili serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu faktörlerin klinik seyir üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalara gereksinim olduğu vurgulanmıştır (72).

H.pylori'nin vacA genotipinin saptanmasının, suşun ülserojenik özelliğinin belirlenmesinde, invitro sitotoksin üretiminin gösterilmesinden daha önemli olduğu vurgulanmaktadır (72). CagA, *H.pylori* için tek başına bir virulans faktörü olarak değil, daha çok sitotoksine yardımcı bir toksin olarak fonksiyon görmekte ve cag patojenite adası (cag PAI) için bir belirleyici olarak kullanılmaktadır. CagA varlığının, yüksek virulan, peptik ülser hastalığı (PÜH) ve gastrik kanser ile yakından ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Bunun yanında PÜH ile cag A'nın arasında herhangi bir ilişkinin saptanmadığı çalışmalar da vardır (73). Yapılan araştırmalarda, PÜH olan hastaların hemen hemen tamamının vacA pozitif *H.pylori* suşları ile enfekte olduğu, bunların da %90-95'inin cagA pozitif olduğu belirtilmektedir. Yine vacA'nın farklı genotiplerine bakıldığında, vacA s1m1 genotipinin cagA pozitif suşlar ile birlikteliği bildirilmektedir. Son yıllarda cagA'daki allelik varyasyonlar konusu da yoğun olarak araştırılmış ve tıpkı vacA'da olduğu gibi cagA'nın da coğrafi farklılıkları tanımlanmıştır. Ayrıca, cagA genotiplerindeki heterojenitenin *H.pylori* ile ilişkili klinik hastalık tipini etkileyebileceği belirtilmiştir (72). CagA'nın aynı zamanda bakteri yükü arasında önemli bir ilişki olduğuna dair çalışmalar da vardır. Belde ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre cagA pozitif suşlar, cagA negatif suşlara göre daha genç ve daha çok sigara içenlerde daha yüksek oranda saptanmıştır (74). Karaman M ve arkadaşları yaptıkları çalışmada cagA oranını %65,5 ve VacA s1m1 genotipi oranını %55 olarak saptamışlardır (72). CagA ve vacA s1 gen bölgesi arasındaki ilişki ilk olarak Atherton ve ark. tarafından tanımlanmıştır (40).

Bilgilerimize göre, Türkiye'deki *H.pylori* genotip paterni hakkında fazla veri yoktur. Mide kanseri prevalansı Asya ülkelerine göre çok daha düşüktür. Bütün bu çalışmalar cag A'nın klinik belirtiler ve histopatolojik aktivitesinin önemini göstermektedir; VacA subtipinin önemi henüz doğrulanmamıştır (29). Hastalık riskine katkıda bulunmak için *H.pylori* virulans faktörlerinin prevalansının çalışılması önemlidir (5).

Türkiye'nin coğrafik konumu, Asya ve Batı ülkelerinin ortak etkisi altındadır, bu da *H.pylori* enfeksiyonu ve genotiplendirmeyele epidemiyolojik çalışmalar için ideal bir bölge haline getirmektedir. Türkiye'de gastrik kanser prevalansı Asya ülkelerine göre (Japonya gibi) çok daha düşüktür. Bununla birlikte farklılık konağa, çevreye veya bakteriyel faktörlere mi ya da faktörlerin hepsine birden mi bağlı olduğu bilinmemektedir.

Batı ülkelerindeki *H.pylori* suşlarının yaklaşık %60'ı cagPAI pozitif iken Doğu Asya ülkelerinde ise %90'dan fazla olduğu bildirilmiştir. Türkiye'nin bu sınıflandırmada Batı ve Doğu Asya'dan ziyade Orta Doğu genotiplerine daha yakın olduğu saptanmış, cagA prevalansının %59-%78 arasında olduğu saptanmıştır (20, 29, 75, 76). Japonya'da yapılan çalışmada cagA prevalansı %100 olarak bulunmuştur (77). CagA pozitifliğindeki prevalans farklılığının sebebi tam olarak açıklanamamakla birlikte, genetik heterojeniteye veya coğrafik lokalizasyona bağlı olabileceği düşünülmektedir. Değişik coğrafik bölgelerde değişik vacA varyantları görülmektedir. Sonuç olarak Türkiye'de rastlanan suşlardaki cagA ve vacA genotipleri batı ülkelerdeki suşlarla benzerlik göstermektedir (75). Sarıbaşak H. ve ark.'nın 2003 yılında yaptıkları çalışmaya göre *H.pylori* pozitiflik oranını %89, bu *H. pylori* suşlarından % 78'inin cagA pozitif, %83'ünün VacA s1a, %5'inin VacA s2, %12'sinin VacA m1, %43'ünün VacA m2 pozitif olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde Erzin Y ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre VacA s1a oranı %83,5 ve cagA genotipi %73,6 olarak saptanmıştır (29). Saltık ve ark. cagA pozitiflik oranını 45 izolatta %55,6 olarak bulmuşlar fakat cagA pozitifliği ile gastroduodenal semptomlar arasında önemli bir fark saptamamışlardır (78).

Çalışmamızda ise cagA pozitiflik oranı %36,2 olarak diğer çalışmalardan daha düşük oranda saptanmıştır. VacA pozitiflik oranı ise %56,5 olarak belirlenmiştir. VacA pozitif suşlardan ise vacA s1 %23,2, vacA s2 %33,3, vacA m1 %23,2, vacA m2 ise %14,5 oranında saptanmıştır. VacA allellerinin birliktelik oranları ise; vacA s1m1 %7,2, s1m2 %10,1, s2m1 %11,6, s2m2 ise %4,3'tür. Bu çalışmada saptanan virulans faktörü oranlarının diğer çalışmalardan daha düşük oranda saptanmasının nedenini virulans faktörlerinin her toplumdaki *H.pylori* suşlarında farklı oranlarda görülmesine bağlayabiliriz. Ayrıca çalışılan hasta sayıları, kullanılan test protokollerinin farklı olmaları da bu nedenler arasında sayılabilir.

Tablo 9’da Türkiye’deki bazı araştırmacıların ve bizim saptadığımız virulans faktörleri oranları verilmiştir.

Tablo 9: Türkiye’de *H.pylori* izolatları ile yapılan çalışmalarda *vacA* ve *cagA* virulans faktörlerinin görülme oranları

	2004 %(n=65)	2006 %(n=93)	2007 %(n=35)	2007 %(n=44)	2011 %(n=29)	2015 %(n=80)	2016 %(n=69)
CagA	78	73,6		79,5	65,5	60	36,2
VacAs1	83	83,5	85,7		75,8		23,2
VacAs2	5				24		33,3
VacAm1	12		70,1				23,2
VacAm2	43						14,5
VacAs1m1				77,4	55		7,2
VacAs1m2				22	20,6		10,1
VacAs2m1							11,6
VacAs2m2				5,6	24		4,3
Kaynak	Sarıbaşak ve ark. (75)	Erzin ve ark. (29)	Salih ve ark. (79)	Bolek ve ark. (80)	Karaman ve ark. (72)	Öktem- Okullu ve ark. (81)	Kipritçi Z

n: Çalışılan toplam hasta sayısı

H.pylori’nin eradikasyonu için standart tedavi protokolü, üçlü tedavi şeklindedir. Omeprazol gibi bir proton pompa inhibitörü (PPI), ve genelde amoksisilin, klaritromisin veya metranidazolü içeren iki antibiyotikten oluşur. Yapılan çalışmalarla bu tedavinin 1990’ların başında *H.pylori*’yi yaklaşık %80 oranında eradike ettiği gösterilmiştir. Fakat daha sonraları eradikasyon başarısı oranı %60’ın altına düşmüştür. Bu, dünyada klaritromisin ve metranidazole direncin artması ile ilişkilidir. Levofloksasin ve moksifloksasin gibi florokinolonlar ise genelde 2. kuşak tedavi için kurtarıcı olarak kullanılır (10). 2. Kuşak tedavi yöntemi de başarısız olursa 2012’de yayınlanan 4. Maastricht kılavuzuna göre antibiyotik duyarlılık testi yapılmalıdır (82).

Tedavi başarısızlıkları, hastanın yaşı, sigara kullanımı, tedavi öncesi midedeki bakteri yükü, bakterinin genotipi, hastanın ilaç uyumu gibi nedenlere bağlanmaktadır. Ancak tedavi başarısızlıklarının büyük bir kısmı, ilk seçenek antibiyotiklere karşı direnç

nedeniyle ortaya çıkmaktadır (7). Farklı hastalıklarda benzer antibiyotiklerin kullanılması bakterinin antibiyotiklere direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Antibiyotiklere karşı artan direnç oranları nedeni ile kullanılabilir olan antibiyotikler için duyarlılık testi yapılması önerilmektedir. Duyarlılık testi için fenotipik yöntemler zordur çünkü *H.pylori* optimal kültür koşullarında yavaş üreyen bir bakteridir. Ve bu mikroorganizmadaki antibiyotik direncinin nokta mutasyonuna bağlı olması nedeniyle genotipik metodların alternatif olarak kullanılması daha uygundur. Bu metodların direkt biyopsi materyaline ve dışkı örneklerine de uygulanabilmesi ile daha hızlı sonuç alınır ve önemli bir adımdır (6).

Klaritromisin, *H.pylori* eradikasyonunda en çok tercih edilen antibiyotiktir, fakat eradikasyon oranı klaritromisin direncinden dolayı %88'den %20'lerin altına düşmüştür. Bununla birlikte klaritromisin dünyada hala ilk tedavi seçeneğidir (7,10). Klaritromisin direnci farklı ülkelerde, farklı bölgelerde değişik oranlarda görülmektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, Avrupa'da 1998 yılında %9 olan klaritromisin direnci 2008 yılında %17,6'ya yükselmiştir. Japonya'da ise 2000 yılında %7 olan direnç oranı 2006 yılında %27,7 olarak saptanmıştır (84). Fransa'da yapılan çalışmalara göre ise 1997'de %14,3 olan klaritromisin direnci 2014 yılında %22,2'ye çıkmıştır. 4. Maastricht kılavuzuna göre klaritromisin direnci %20'nin üzerine çıktığında klaritromisin tedaviden çıkarılarak 2. Kuşak tedavi yöntemi uygulanmalıdır (83). Türkiye'de ise klaritromisin direnci %16,4 ile %48,2 arasındadır. Sezgin O ve ark. 2008 yılında Mersin'de %40,5 (85), Yula E ve ark. Çukurova bölgesinde 2011 yılında yaptıkları çalışmada klaritromisin direncini %7,7 (4), Maçın S ve ark. Ankara'da 2015 yılında %30,1 olarak bulmuşlardır (86). Bu sonuçlarla genel olarak Türkiye'de klaritromisin direnci %20'nin üzerinde olmakla birlikte farklı bölgelerde farklı klaritromisine direnç oranları ile karşılaşmaktadır.

Bizim yaptığımız çalışmada ise Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile klaritromisin direnci %39,7 oranında saptanmış, realtime PCR yöntemi ile yapılan çalışmada ise direnç oranı %33,3 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, daha önceki çalışmalarla Türkiye için saptanmış ortalama direnç oranları ile yakınlık göstermektedir.

Bu çalışmada hibridizasyon kiti olarak kullanılan Genotype® HelicoDR (Hain Life Science, Germany) kiti ile Cambau E ve ark'nın 2006-2009 yıllarında Fransa'da

yaptıkları çalışma ile klaritromisin ve florokinolon direnç oranlarını MİK (E-test) yöntemleri ile de çalışarak karşılaştırma yapmışlardır. Ve bu çalışmada klaritromisine direnç testinde hassasiyet ve özgüllük oranları %94 ve 98 olarak hesaplanmış, levofloksasine direnç aranmasında ise bu oranlar %87 ve 98,5 olarak saptanmıştır (10).

Levofloksasin bir florokinolondur, *H.pylori*'ye karşı aktivitesi önemlidir. *H.pylori* eradikasyonu başarısızlığında ikincil ilaç olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre klaritromisinle %80,8 olan eradikasyon oranı levofloksasin kullanıldığında %96'nın üzerine çıkmıştır (61). Çalışkan R ve ark.'nın yaptığı çalışmada levofloksasine direnç oranını %29,5 olarak bulmuşlardır (7). Çağdaş U ve ark. ise levofloksasine direnç oranını %18,2 olarak bulmuşlardır (70). Pakistan'da Rajper S.ve ark.'nın yaptıkları araştırmada levofloksasin oranı %62,3 olarak saptanmıştır (56). Aynı yöntemle bizim yaptığımız bu çalışmada florokinolona direnç oranı %25,6 olarak bulunmuştur. Bu oran, genel olarak Türkiye'de saptanan florokinolon direnç oranı ile uyumludur. Tablo 10'da Türkiye'de *H.pylori*'nin ilaçlara dirençlerinin saptanması için yapılmış bazı çalışmalar ve kullanılan yöntemler verilmiştir.

Tablo 10. Türkiye’de *H.pylori*’de ilaç direnç oranları

Yıl/Bölge	Yöntem	KLA (%)	LEV(%)	MTZ(%)	TE (%)	AMO(%)	Kaynak
2003/Ankara (n=87)	PCR-RFLP	27,6					Bağlan ve ark. (65)
2007 (n=110)	RT PCR	48,2					Önder G ve ark. (87)
2006/Mersin (n=37)	PCR-RFLP	40,5					Sezgin ve ark.(85)
2011/Hatay (n=79)	PCR- RFLP/Agar dilüsyon	7,7 / 8,9					Yula ve ark. (4)
2012/Mersin (n=94/11)	PCR- RFLP/E-test	18,1/ 18,2		45,5 (E-test)	9,1 (E-test)	0	Çağdaş ve ark. (70)
2015/İstanbul (n=98)	E-test	36,7	29,5	35,5	0	0	Çalışkan ve ark.(7)
2015/Ankara (n=93)	E-test	0,1		48,4	0	0	Maçin ve ark. (86)
2016/İstanbul (n=78)	RT PCR/Helico DR	33,3 /39,7	25,6				Kipritçi Z.

KLA: Klaritromisin, LEV: Levofloksasin, MTZ: Metronidazol, TE: Tetrasiklin, AMO: Amoksisilin
n: Çalışılan toplam hasta sayısı

Metronidazole direnç oranları, bölgelere ve ülkelere göre değişmek üzere %15,9 ile %77,9 arasında bildirilmektedir. Ülkemizde de metronidazolün yaygın kullanımı, direnç oranının yüksek olmasına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre ülkemizde metronidazol direnci %36,4 ile %62,5 arasında değişmektedir. Maçin S ve ark.’nın Ankara’da yaptıkları çalışmada metronidazol oranını %48,4 olarak bulmuşlardır (86).

Amoksisilin direnci ile ilgili bazı çalışmalarda. %11,7 (88) ve %36,1 (89) gibi yüksek direnç oranları saptanırken bazılarında hiç dirençli *H.pylori* suşuna rastlanmamıştır. Çağdaş U ve ark, Çalışkan R ve ark. Türkiye’de yaptıkları çalışmalarda Amoksisilin direnci saptamamışlardır (7, 70).

H. pylori suşlarında tetrasiklin direnci ile ilgili olarak yurt dışı yayınlarda değişik oranlarda direnç bildirilmiştir. Ülkemizde ise Çağdaş U ve ark, yaptıkları

çalışmada tetrasiklin direncini %9,4 olarak saptarken (70), Çalışkan R ve ark, hiç tetrasiklin dirençli *H.pylori* suşuna rastlamamışlardır (7).

H.pylori'nin virulans faktörleri ve antibiyotik direnci arasında bir ilişki olup olmadığı da önemli bir konudur. Yapılan çalışmalarda bakteriyel virulans faktörleri ve konak genetik polimorfizminin *H.pylori* enfeksiyonu üzerindeki klinik rolü henüz tanımlanmamıştır (82). Elvis ve ark, klaritromisin ve metronidazole duyarlılığın vacA s1/m2 genotipi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (90). Boyanova ve ark.'nın yaptığı çalışmada iceA1 alleli %74 oranında klaritromisin duyarlılığı ile birlikte pozitifdir, fakat %55,3'ü dirençle birlikte pozitif bulunmuştur (91). Türkiye'de bu konuda yapılmış çalışmalardan biri olan Bağlan ve ark.'nın çalışmasında ise ice A genotipi ve klaritromisin direnci arasında bir ilişki saptanmıştır (65). Yula ve ark. ise klaritromisin direnci ve cagA pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır (4).

Bizim çalışmamızda ise Klaritromisin ve kinolon direnci görülen suşlarda saptanan virulans faktörlerinin dağılımı çok farklı olduğundan antibiyotik direnci ile virulans faktörleri arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Çalışmayı yaparken alınan biyopsi örneklerinin transferi, ekim yapıldıktan sonra üremesinin uzun bir zaman alması ve ürememe olasılığının yüksek olması nedeniyle bakteriyel enfeksiyonların tanısında kültür yöntemi altın standart olmasına rağmen bu yöntem çalışmaya alınamamıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerin de de MİK testi yapılması önerilmesine rağmen aynı sebeplerden yapılamamıştır. Moleküler yöntemler dışkı örneğinde de uygulanabilir olmasına rağmen yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ki, barsak florası bakterilerini de içerdiğinden PCR inhibitörleri içerebilmektedir, bu da testin duyarlılığını düşürebilmektedir (92). Ayrıca kullanılan PPI ve benzeri ilaçlar nedeniyle bakteri sayısı düştüğünden noninvazif tanı yöntemleri ile *H.pylori*'nin saptanma oranı düşmektedir. Bu nedenle çoğu araştırmacı tarafından mide biyopsi örneklerinden moleküler yöntemlerle tanı ve antibiyotik duyarlılık testi yapılması önerilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı biz de çalışmamızı yapmak için mide biyopsi örneklerini tercih ettik ve PCR yöntemleri ile çalıştık.

Sonuç olarak;

Bu çalışmada *H.pylori* için çalışılan virulans faktörleri oranları Türkiye’de yapılan diğer çalışmalardan daha düşük oranda saptanmıştır. Bu konuda standart bir çalışma protokolü bulunmadığından her araştırmacı farklı primerler ve farklı PCR yöntemleri kullanabilmekte ve ayrıca bu bakterinin prevalansı konusundaki çalışmalar yetersiz olduğundan farklı çalışma gruplarında farklı oranlara rastlanabilmektedir. Klaritromisin ve florokinolonlara direnç konusunda elde ettiğimiz sonuçlar ise Türkiye’deki diğer araştırmacılardan çok farklı görünmemektedir. *H.pylori* için sadece Türkiye’de değil dünyada birçok çalışma olmasına rağmen halen veriler yetersizdir. Bakterinin epidemiyolojisini saptamak için daha geniş hasta grupları ile çalışmakta fayda vardır.

Diğer hastalıklarda da aynı antibiyotiklerin kullanımı sık olduğundan dünya genelinde direnç oranlarının arttığı saptanmıştır. Bu nedenle tedavi öncesinde duyarlılık testi yapılmalı, fakat *H.pylori* üremesi zor bir bakteri olduğundan daha doğru ve hızlı sonuç elde etmek amacı ile moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Moleküler yöntemlerin de maliyeti yüksek olduğundan rutinde kullanımı zor görünmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı Avrupa Helicobacter ve Mikrobiyota çalışma grubu (EHMSG) ve Türkiye’de de Türk Gastroenteroloji derneğinin Türk *Helicobacter pylori* çalışma grubu bu bakteri ile ilgili daha çok ve daha geniş çalışmalar yapılmasını desteklemektedir. EHMSG. 1997, 2000, 2005 ve 2012’de Helicobacter ile ilgili Maastricht 4 kılavuzunu yayınlamışlardır. Bu kılavuzda bakteri ile ilgili son gelişmeler yer almaktadır.

KAYNAKLAR

1. Baldwin D.N, Shepherd B, Kraemer P, Hall M.K, Sycuro L.K, Pinto-Santini D.M, Salama N.R. Identification of *Helicobacter pylori* Genes That Contribute to Stomach Colonization. *Infection and Immunity*.2007. 75:2.1005–1016.
2. Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* -Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice. Volume 2012, 9 pages
3. Alzahrani S, Lina T.T, Gonzalez J, Pinchuk I.V, Beswick E.J, Reyes V.E. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2014; 20(36): 12767-12780
4. Yula E, Nagiyev T, Kaya O.A, Inci M, Celik M.M, Köksal F. Detection of Primary Clarithromycin Resistance of *Helicobacter pylori* and Association Between CagA (+) status and Clinical Outcome. *Folia Microbiol (Praha)*. 2013 Mar;58(2):141-6.
5. Hussein N.R. A Study of *Helicobacter pylori* Outer-membrane Proteins (hom) A and B in Iraq and Turkey. *Journal of Infection and Public Health* (2011) 4, 135—139
6. Vale F.F, Rosa M.R, Oleastro M. *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics. Science Against Microbial Pathogens: communicating current research and technological advances. www.formatex.info/microbiology3/book/745-756.pdf
7. Çalışkan R, Tokman H.B, Erzin Y, Sarıbaş S, Yüksel P, Bolek B.K, Sevik E.Ö, Demirci M, Yılmazlı Ö, Akgül Ö, Kalaycı F, Çakan H, Salih B, Bal K, Kocazeybek B. Antimicrobial Resistance of *Helicobacter pylori* Strains to Five Antibiotics, Including Levofloxacin, in Northwestern Turkey. *Rev Soc Bras Med Trop* 48(3):278-284, May-Jun, 2015
8. Demiray E, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori*'de Antibiyotik Direnci ve Direncin Saptanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Mikrobiyol Bült* 2005; 39: 399-408
9. Bağlan P.H, Bozdayı G, Özkan M, Özden A. Klaritromisin Dirençli *Helicobacter pylori*'nin Saptanmasında, E-Test ve Agar Dilüsyon Metodlarının Karşılaştırılması. *Akademik Gastroenteroloji Dergisi*, 2005; 4 (2): 83-87

10. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy C.J, Delchier J.C, Megraud F. Evaluation of a New Test, GenoType® HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 2009; 47(11): 3600-3607
11. Sönmez C. *Helicobacter pylori* İnfeksiyonu Tanısında yeni Yaklaşımlar. Güncel Gastroenteroloji.2002; 6/3: 137-146
12. Buckley M.J.M, O'Moraint CA. Helicobacter biology – discovery. British Medical Bulletin 1998;54 (No. 1): 7-16
13. Yong X, Tang B, Li B.S, Xie R, Hu C.J, Luo G, Qin Y, Dong Y, Yang S.M. *Helicobacter pylori* Virulence Factor CagA Promotes Tumorigenesis of Gastric Cancer via Multiple Signaling Pathways. Cell Communication and Signaling (2015) 13:30
14. Bridge D.R, Merrell D.S. Polymorphism in the *Helicobacter pylori* CagA and VacA Toxins and Disease. Gut Microbes 2013; 4:2, 101–117
15. Robinson K, Argent R.H, Atherton J.C. The Inflammatory and Immune Response to *Helicobacter pylori* Infection. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2007;Vol. 21, No. 2, pp. 237–259.
16. Perry S, de la Luz Sanchez M, Yang S, Haggerty T.D, Hurst P, Perez-Perez G, Parsonnet J. Gastroenteritis and Transmission of *Helicobacter pylori* infection in Households. Emerg Infect Dis. 2006 Nov;12(11):1701-8.
17. Dunn B.E, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clinical microbiology reviews-ASM. 1997; 10(4): 720–741
18. Van Duynhoven Y.T, de Jonge R. Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? Bull World Health Organ. 2001; 79(5): 455–460.
19. Altındış M, Özdemir M. *Helicobacter pylori* and Diagnosis. Kocatepe Tıp Dergisi 2003; 2, 1-12
20. Akgüç M, Özden A, Bozdayı A.M. Helikobakter pilori Enfeksiyonunda CagA ve Gastrik Kanser İlişkisi. Güncel Gastroenteroloji. 2011; 15-2: 87-94
21. Owen R.J. *Helicobacter* - Species Classification and Identification. British Medical Bulletin 1998;54 (No. 1): 17-30
22. www.mayomedicallaboratories.com

23. Duś I, Dobosz T, Manzin A, Loi G, Serra C, Radwan-Oczko M. Role of PCR in *Helicobacter pylori* Diagnostics and Research-new Approaches for Study of Coccoid and Spiral Forms of the Bacteria. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013 Apr 9; 67: 261-8.
24. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı.2. cilt. 2008: sf: 2223-2235
25. Marshall B.R, Warren J.R. Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic Ulceration. *Lancet* 1984, 1: 1311-1315
26. Achtman M, Azuma T, Berg D.E, Ito Y, Morelli G, Pan Z.J, Suerbaum S, Thompson SA, van der Ende A, van Doorn LJ. Recombination and Clonal Groupings Within *Helicobacter pylori* from Different Geographical Regions. *Mol Microbiol*. 1999 May;32(3):459-70.
27. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard J.K, Stephens M, Kidd M, Blaser M.J, Graham DY, Vacher S, Perez-Perez GI, Yamaoka Y, Me'graud F, Otto K, Reichard U, Katzowitsch E, Wang X, Achtman M, Suerbaum S. Traces of Human Migrations in *Helicobacter pylori* Populations. *Science*. 2003: 299(1582-1585)
28. Wiepjes M. *Helicobacter pylori*. Tree of life Project. http://tolweb.org/treehouses/?treehouse_id=4722.
29. Erzin Y, Köksal V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkish Patients with Dyspepsia. 2006. *Helicobacter* 11: 574–580
30. Montecucco C, Bernard M. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of the Vacuolating Cytotoxin (VacA) and Neutrophil-activating Protein (HP-NAP) Virulence Factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes and Infection* 5 (2003) 715–721
31. Pachathundikandi S.K, Tegtmeyer N, Backert S. Signal Transduction of *Helicobacter pylori* During Interaction with Host Cell Protein Receptors of Epithelial and Immune Cells. *Gut Microbes*. 2013 Nov-Dec;4(6):454-74
32. Badur S, Abacıoğlu H, Öngen B. Enfeksiyon Patogenezi ve Bağışıklık.2015. Cilt II. sf.1027-1036
33. Mobley H.L.T, Mendz G.L, Hazell S.L, editors. *H.pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press; 2001.

34. Oleastro M and Ménard A. The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology* 2013, 2, 1110-1134
35. Israel D.A and Peek R.M. Surreptitious Manipulation of the Human Host by *Helicobacter pylori*. *Gut Microbes*.2010; 1:2, 119-127
36. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: A New Paradigm for Bacterial Carcinogenesis *Cancer sci.* 2005; 96(12):835-843
37. Güvenir M, Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori* Sinyal Yolaklarının Dünyası. *Türk Mikrobiol Cem Derg.* 2009. 39(3-4):115-121
38. Hatakeyama M, Brzozowski T. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2006;11 (Suppl. 1): 14-20.
39. Palframan S.L, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a Key Toxin for *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Jul 12;2:92
40. Atherton J.C, Cao P, Peek R.M, Tummuru M.K.R, Blaser M.J, Cover T.L. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.*1995. July 28. 270(30):17771-17777
41. Figueiredo C, Machado J.C, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 2005;10 (Suppl. 1): 14-20.
42. Sundrind M.S, Torres V.J, Unutmaz D, Cover T.L. Inhibition of Primary Human T-Cell Proliferation by *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin (VacA) is Independent of vacA Effects on IL-2 Secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7727-7737.
43. Rieder G, Fischer W, Haas R. Interaction of *Helicobacter pylori* with Host Cells: Function of Secreted and Translocated Molecules. *Current Opinion in Microbiology* 2005, 8: 67–73
44. Demiray E, Bekmen N. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Fagositoz. *Mikrobiyol. Bül.* 2008; 42: 177-184
45. Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The Significance of Virulence Factors in *Helicobacter pylori*. *J Dig Dis.* 2013 July; 14(7): 341–349
46. Guarner J, Kalach N, Elitsur Y, Koletzko S. *Helicobacter pylori* Diagnostic Tests in Children: Review of the literature from 1999 to 2009. *Eur J Pediatr* (2010) 169: 15–25
47. Ertem D. Clinical Practice: *Helicobacter pylori* Infection in Childhood. *Eur J Pediatr.* 2013 Nov;172(11):1427-34

48. Can F. *Helicobacter pylori*'nin Tanı ve Tedavisinin İzlenmesinde Laboratuvar Testleri, Yenilikler, Değerlendirme, Klinisyene Katkısı. www.duzen.com.tr/artfiles/helicobacter.pdf
49. Uyanık M.H, Aktaş O. *Helicobacter Pylori*'nin Mikrobiyolojik Tanısı. Eurasian J Med. 2007; 39: 205-209
50. Usta Y, Özen H. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2007; 50: 136-145
51. Uzunismail H. *Helicobacter pylori* ve Eradikasyon Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu 11-12 Ocak 2001, İstanbul, s. 19-26
52. Kasapoğlu B, Türkay C. *Helicobacter pylori*'de Tedavi ve Direnç. Güncel Gastroenteroloji 12/3. Aralık 2008: 141-145
53. Frieri G, Pimpo M.T, Palombieri A, Melideo D, Marcheggiano A, Caprilli R, D'Alessandro A, Seri S. Polyunsaturated Fatty Acid Dietary Supplementation: An Adjuvant Approach to Treatment of *Helicobacter pylori* Infection Nutrition Research. 2000; 20(7):907-1058
54. Usluoğulları CA, Önal E.D, Özdemir E, Caner S, Ersoy O, Ersoy R, Çakır B. What is the Effect of Radioiodine Therapy on *Helicobacter pylori* Infection? Turk J Med Sci. 2014; 44: 520-523
55. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Clarithromycin Resistance and 23S rRNA Mutations in *Helicobacter pylori*. Gastrointestinal Endoscopy. Edited by Oliviu Parsu. Published: 2011 Chapter:9. 99-124
56. Rajper S, Khan E, Ahmad Z, Zaheer Alam SM, Akbar A, Hasan R. Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori* isolates: an experience at a tertiary care centre in Pakistan. J Pak Med Assoc. 62(11); November 2012: 1140-1144
57. Wu J.Y, Kim J.J, Reddy R, Wang W.M, Graham D.Y, Kwon D.H. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49: 578-583.
58. Hoffman P.S, Goodwin A, Johnsen J, Magee K, Veldhuyzen van Zanten S.J.O. Metabolic Activities of Metronidazole Sensitive and Resistant Strains of *Helicobacter pylori*: Repression of Pyruvate Oxidoreductase and Expression of Isocitrate Lyase Activity Correlate with Resistance. J. Bacteriol.1996; 178:4822-29.

59. Heep M, Beck D, E. Bayerdörffer E, Lehn N. Rifampin and Rifabutin Resistance Mechanism in *Helicobacter pylori*. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43: 1497–99.
60. Yücel O. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Anibiyoterapi. Ankem Derg. 2000; 14(No.4): 448-453
61. Safavi M, Sabourian R, Foroumadi A. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection: Current and Future Insights. World J Clin Cases. 2016; 4(1):5-19
62. Padol S, Yuan Y, Thabane M, Padol I.T, Hunt R.H. The effect of CYP2C19 Polimorphism on *H.pylori* Eradication Rate in Dual and Triple First Line PPI Therapies: a meta analysis. Am J Gastroenterol 2006; 101: 1467–75
63. Suzuki T, Matsuo K, Sawaki A, Wakai K, Hirose K, Ito H, Saito T, Nakamura T, Yamao K, Hamajima N, Tajima K. Influence of Smoking and CYP2C19 Genotypes on *H.pylori* Eradication Success. Epidemiol Infect 2007; 135: 171–6
64. Megraud F. *H. pylori* Antibiotic Resistance: Prevalence, Importance, and Advances in Testing, Gut 2004; 53: 1374–1384
65. Bağlan P.H, Bozdayı G, Özkan M, Ahmed K, Bozdayı M.A and Özden A. Clarithromycin resistance prevalence and iceA gene status in *Helicobacter pylori* clinical isolates in Turkish patients with duodenal ulcer and functional dyspepsia. J. Microbiol. 2006; 44: 409–416.
66. Oleastro M, Me´nard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthe´le´my P, Me´graud F. Real-Time PCR Assay for Rapid and Accurate Detection of Point Mutations Conferring Resistance to Clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol.2003; 41(1): 397-402
67. Kumar S, Kumar A, Dixit V.D. Direct detection and analysis of vacA genotypes and cagA gene of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 62(2008). 366-373
68. Deyi V.Y.M, Burette A, Bentatou Z, Maaroufi Y, Bontems P, Lepage P, Reynders M. Practical Use of GenoType® HelicoDR, a Molecular Test for *Helicobacter pylori* Detection and Susceptibility Testing. J.diagmicrobio.2011; 70: 557-560
69. Eusebi L.H, Zagari R.M, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter. 2014; 19(1): 1-5
70. Çağdaş U, Otağ F, Tezcan S, Sezgin O, Aslan G, Emekdaş G. Mide Biyopsi Örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin Tanımlanması ve Antimikrobiyal Direncinin Araştırılması. Mikrobiyol Bul 2012; 46(3): 398-409

71. Weiss J, Tsang T.K, Meng X, Zhang H, Kilner E, Wang E, Watkin W. Detection of *Helicobacter pylori* Gastritis by PCR Correlation With Inflammation Scores and Immunohistochemical and CLOtest Findings. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 89-96
72. Karaman M, Abacıoğlu H, Topalak Ö.S, Şimşek İ. Peptik Ülserli ve Ülser Olmayan Dispepsili Hastaların Mide Doku Örneklerinde *Helicobacter pylori* vacA ve cagA Genlerinin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 11-20
73. Özbey G, Aygün C. Prevalence of Genotypes in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients in Eastern Turkey and the Association of These Genotypes with Clinical Outcome. *Braz J Microbiol.* 2012; 43(4): 1132-1339
74. Belda S, Saez J, Santibanez M, Rodriguez J.C, Sola-Vera J, Ruiz-Garcia M, Brotons A, Lopez-Girona E, Perez E, Sillero C, Royo G. Relationship Between Bacterial Load, Morbidity and CagA gene in Patients Infected by *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol Infect.* 2012; 18:E251-E253
75. Sarıbaşak H, Salih B.A, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkey. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42(4):1648-1651
76. Bağlan P.H, Sarımay E, Ahmed K, Özkan M, Bozdayı G, Özden A. Turkish Isolates of *Helicobacter pylori* Belong to the Middle Eastern Genotypes. *Clin. Microbiol Infect.* 2005; 12: 96-98
77. Azuma T, Kato S, Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa A, Ohtani M, Fujiwara S, Minoura T, Iinuma K, Kato T. Diversity of VacA and VagA Genes of *Helicobacter pylori* in Japanese Children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jul;20 Suppl 1: 7-12.
78. Erdoğan C, Sarıbaş Z, Akyön Yılmaz Y. Detection of CagA and VacA Genotypes of *Helicobacter pylori* Isolates From a University Hospital in Ankara Region, Turkey. *Turk J Med Sci* (2014) 44: 126-132
79. Salih B.A, Abasıyanık M.F, Ahmed N. A Preliminary Study on the Genetic Profile of Cag Pathogenicity-island and Other Virulent Gene Loci of *Helicobacter pylori* Strains from Turkey. *Infection. Genetics and Evolution* 7 (2007) 509–512
80. Bolek B.K, 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.* 58 (2007) 67–70

81. Öktem-Okullu S, Tiftikçi A, Saruc M, Çiçek B, Vardareli E, Tozun N, Kocagöz T, Sezerman U, Yavuz AS, Sayi-Yazgan A. Multiplex-PCR-Based Screening and Computational Modeling of Virulence Factors and T-Cell Mediated Immunity in *Helicobacter pylori* Infections for Accurate Clinical Diagnosis. PLoS One. 2015 Aug 19;10(8)
82. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C.A, Atherton J, Axon A.T.R, Bazzoli F, Gensini G.F, Gisbert J.P, Graham D.Y, Rokkas T, El-Omar E.M, Kuipers E.J, The European Helicobacter Study Group (EHSg). Management of *Helicobacter pylori* Infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 2012; 61(5): 664-664
83. Ducornau A, Benejat L, Sifre E, Bessede E, Lehours P, Megraud F. *Helicobacter pylori* Resistance to Antibiotics in 2014 in France Detected by Phenotypic and Genotypic Methods. Clin. Microbiol Infect. 2016; 22: 715-718
84. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance and Molecular Testing. Front Mol Biosci. 2014; 1: 19.
85. Sezgin O, Aslan G, Altıntaş E, Tezcan S, Serin MS, Emekdaş G. Detection of Point Mutations on 23S rRNA of *Helicobacter pylori* and Resistance to Clarithromycin with PCR-RFLP in Gastric Biopsy Specimens in Mersin. Turkey. Turk J Gastroenterol 2008; 19 (3): 163-167
86. Maçın S, Demir H, Özen H, Yüce A, Akyön Y. Determination of *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance Patterns in Pediatric Gastroenterology Patients: the Hacettepe Experience. The Turkish Journal of Pediatrics 2015; 57: 254-257
87. Önder G, Aydın A, Akarca U, Tekin F, Özütemiz O, Ilter T. High *Helicobacter pylori* Resistance Rate to Clarithromycin in Turkey. J Clin Gastroenterol. 2007 Sep;41(8):747-50.
88. Ghotaslou R, Leylabadlo H.E, Asl Y.M. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. World J Methodol. 2015. 26; 5(3): 164-74
89. Hu C.T, Wu C.C, Lin C.Y, Cheng C.C, Su S.C, Tseng Y.H, Lin N.T. Resistance Rate to Antibiotics of *Helicobacter pylori* Isolates in Eastern Taiwan. J Gastroenterol Hepatol. 2007; 22(5): 720-3.
90. Elviss N.C, Owen R.J, Xerry J, Walker A.M, Davies K. *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance Patterns and Genotypes in Adult Dyspeptic Patients From a Regional Population in North Wales. J Antimicrob Chemother. 2004 Aug;54(2):435-40

91. Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R, Mitov I. Association of iceA and BabA Genotypes in *Helicobacter pylori* Strains with Patient and Strain Characteristics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2010 Oct;98(3):343-50.
92. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by Culture, PCR and enzyme immunoassay. *J. Med. Microbiol*. 2001; 50; 1021-1029



HAM VERİLER

Crosstabulation

			durum		Total
			pozitif	negatif	
bakteri	helico dr	Count	78	62	140
		% within bakteri	55.7%	44.3%	100.0%
		% within durum	53.1%	46.6%	50.0%
	H.p 16s DNA	Count	69	71	140
		% within bakteri	49.3%	50.7%	100.0%
		% within durum	46.9%	53.4%	50.0%
Total	Count	147	133	280	
	% within bakteri	52.5%	47.5%	100.0%	
	% within durum	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	1.160 ^a	1	.281		
Continuity Correction ^b	.917	1	.338		
Likelihood Ratio	1.161	1	.281		
Fisher's Exact Test				.338	.169
Linear-by-Linear Association	1.156	1	.282		
N of Valid Cases	280				

a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 66.50.

b. Computed only for a 2x2 table

Ki-kare testi değeri $P=0,281$ dir. $P>0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Crosstabulation

			direnç		Total
			Var	yok	
yöntem	Hibrid	Count	33	45	78
		% within hibrid	42.3%	57.7%	100.0%
		% within realtime	55.0%	46.9%	50.0%
	Real Time	Count	27	51	78
		% within hibrid	34.6%	65.4%	100.0%
		% within realtime	45.0%	53.1%	50.0%
Total	Count	60	96	156	
	% within hibrid	38.5%	61.5%	100.0%	
	% within realtime	100.0%	100.0%	100.0%	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	.975 ^a	1	.323		
Continuity Correction ^b	.677	1	.411		
Likelihood Ratio	.976	1	.323		
Fisher's Exact Test				.411	.205
Linear-by-Linear Association	.969	1	.325		
N of Valid Cases	156				

a. 0 cells (0.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 30.00.

b. Computed only for a 2x2 table

Ki-kare testi değeri $P=0,323$ dür. $P>0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı değildir



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

Sayı : 37068608-6100-15-1095

Konu: Etik kurul Başvurusu hk.

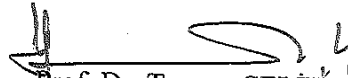
26 / 01 / 2016

İlgili Makama (Sayın Zehra Kipritçi)

Yeditepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Zehra Kipritçi'nin sorumlu olduğu "**Helicobacter Pylori'nin Virulans Faktörleri ve İlaç Dirençlerinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması**" isimli araştırma projesine ait KAEK Başvuru Dosyası(Ex/24 kayıt sayılı KAEK Başvuru Dosyası), Yeditepe Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.12.2014 tarihli toplantıda incelenmiştir.

Kurul tarafından yapılan inceleme sonucu, çalışmanın yapılmasında etik ve bilimsel açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir. (Karar No: 51/445).

Bilginizi ve gereğini saygılarımla arz ederim.


Prof. Dr. Turgay ÇELİK

Yeditepe Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Zehra	Soyadı	Kipritçi
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	13.12.1978
Uyruğu	TC	TC Kim No	20629909546
Email	zehrackic@hotmail.com	Tel	0542 4316516

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Yeditepe Üniversitesi Moleküler Tıp A.D.	2016
Yük.Lis.	İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.D.	2005
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Biyoloji bölümü	2000
Lise	Ö. Tercüman Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	Yeditepe Üniversitesi	11 Yıl (2005- devam)
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi		IELTS (5,5)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	68,3	67,6	62,6
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	İyi
Excel	İyi
PowerPoint	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Yüzme, Taekwondo, Yürümek