

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GASTROENTEROLOJİ KLİNİĞİNE BAŞVURAN HASTALARDAN ALINAN MİDE  
BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE *Helicobacter pylori* SIKLIĞININ VE VİRULANS  
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Taylan CALP

Trabzon 2010

T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GASTROENTEROLOJİ KLİNİĞİNE BAŞVURAN HASTALARDAN ALINAN  
MİDE BİYOPSİ ÖRNEKLERİNDE *Helicobacter pylori* SIKLIĞININ VE VİRULANS  
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Taylan CALP

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Faruk AYDIN

Trabzon 2010

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç.Dr. Faruk AYDIN'a, engin tecrübeleriyle yetişmemde bana önemli katkılar sağlayan başta değerli hocam Sayın Prof.Dr. Murat ERTÜRK olmak üzere, Doç.Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Doç.Dr. İlknur TOSUN'a, Yrd.Doç.Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na ve Yrd.Doç.Dr. Kurtuluş BURUK'a, biyopsi örneklerinin teminindeki yardımları ve değerli katkıları için Sayın Prof.Dr. Orhan ÖZGÜR'e ve tüm Gastroenteroloji kliniği çalışanlarına, tezimin laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Biolog Esmâ AKYILDIZ'a, beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, eğitimim süresince her zaman destek ve yardımlarını gördüğüm bütün Mikrobiyoloji Anabilim dalı çalışanlarına, şefkatini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim biricik eşime ve sabırları için sevgili çocuklarım Aliye Melis ve Ahmet Ökkeş'e sevgi, saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

**Dr. Taylan CALP**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
KISALTMALAR.....	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.2.1. Prevalans.....	4
2.2.2. Enfeksiyonun Bulaşması.....	4
2.3. Sınıflandırma.....	5
2.4. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	6
2.4.1. Görünüm ve Boyanma.....	6
2.4.2. Hücre Duvar Yapısı ve Antijenik Özellikleri.....	7
2.4.3. Hareket.....	8
2.4.4. Genomik Özellikler.....	8
2.5. Üreme ve Kültür Özellikleri.....	10
2.5.1. Üreaz Aktivitesi.....	10
2.6. Patogenez.....	11
2.6.1. Bakteriye Ait Virulans Faktörleri.....	12
2.6.1.1. Kolonizasyon Faktörleri.....	12
2.6.1.1.1. Adezinler.....	12
2.6.1.2. Konak Savunmasından Korunma Faktörleri.....	13
2.6.1.3. Doku Hasarı Oluşturan Virulans Faktörleri.....	13
2.6.1.3.1. <i>cag</i> Patojenite Adası ( <i>cagPAI</i> ) Genleri.....	13

2.6.1.3.1.1. <i>cagA</i> Geni.....	14
2.6.1.3.1.2. <i>cagE</i> Geni.....	15
2.6.1.3.2. <i>vacA</i> Geni.....	15
2.6.1.3.3. <i>iceA</i> Geni.....	17
2.6.1.3.4. <i>babA</i> Geni.....	17
2.6.1.3.5. <i>oipA</i> Geni.....	17
2.6.1.3.6. Diğer Gen Bölgeleri.....	18
2.6.2. Hastaya Ait Faktörler.....	18
2.7. <i>H. pylori</i> Enfeksiyonlarında Tanı.....	18
2.7.1. Klinik Tanı ve Endoskopi.....	19
2.7.2. Mikrobiyolojik Tanı.....	19
2.7.2.1. Non-invaziv Testler.....	19
2.7.2.1.1. Üre Nefes Testi (ÜNT).....	19
2.7.2.1.2. Serolojik Testler.....	20
2.7.2.1.3. Dışkıda Antijen Arayan Testler.....	20
2.7.2.1.4. Dışkıda Moleküler Tanı Testleri.....	21
2.7.2.2. İnvaziv Testler.....	21
2.7.2.2.1. Mide Biyopsi Örneklerin Alınması ve Transportu.....	21
2.7.2.2.2. Histopatolojik Muayene.....	22
2.7.2.2.3. Kültürde İzolasyon.....	22
2.7.2.2.4. Hızlı Üre Testi.....	23
2.7.2.2.5. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	23
2.8. Yaptığı Hastalıklar.....	24
2.8.1. Gastroözefajiyal Reflü Hastalığı.....	24
2.8.2. Gastrit.....	24
2.8.3. Mide Ülseri.....	24
2.8.4. Duodenal Ülser.....	25
2.8.5. Non-Ülser Dispepsi.....	25
2.8.6. Mide Kanseri ve MALT Lenfoma.....	25
2.8.7. Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar.....	25
3. MATERYAL ve METOD.....	26
3.1. Materyal.....	26

3.1.1. Hasta grupları ve örneklerin toplanması.....	26
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler.....	26
3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve kimyasallar.....	27
3.1.4. Primerler.....	27
3.2. Metod.....	28
3.2.1. Klinik örneklerin mikrobiyolojik yönden incelenmesi.....	28
3.2.1.1. Klinik örneklerin mikroskopik incelenmesi.....	28
3.2.1.2. Doku örneklerinde üreaz aktivitesinin araştırılması.....	28
3.2.1.3. <i>H. pylori</i> 'nin kültür ve izolasyonu.....	29
3.2.1.3.1. Mikroskopi.....	29
3.2.1.3.2. Oksidaz testi.....	29
3.2.1.3.3. Katalaz Testi.....	30
3.2.1.3.4. Üreaz Testi.....	30
3.2.1.4. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi.....	30
3.2.2. PCR uygulamaları.....	31
3.2.2.1. <i>H. pylori</i> 'nin kromozomal DNA izolasyonu.....	31
3.2.2.2. <i>H. pylori</i> virulans genlerinin amplifikasyonu.....	32
3.2.2.2.1. PCR reaksiyon master mix'lerinin hazırlanması.....	32
3.2.2.2.2. <i>H. pylori</i> virulans genlerinin amplifikasyon aşamaları.....	33
3.2.2.3. Agaroz jel Elektroforezi ve görüntüleme.....	34
3.2.3. İstatistiksel analiz .....	34
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	62
7. ÖZET.....	66
8. SUMMARY.....	67
9. KAYNAKLAR.....	68

## KISALTMALAR

AbD	Anabilim Dalı
ATCC	American Type Culture Collection
BabA	Blood Group Antigen Binding Adhesin
bp	base pair (baz çifti)
C	Karbon
Cag	Cytotoxin Associated Gene
CagPAI	Cag Patojenite Adası (Cag Pathogenicity Island)
DAF	Decay Accelerating Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular Signal-Related Kinase
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescent in situ hybridization
Ggt	Gamma-glutamyl transpeptidase
GRO- $\alpha$	Growth related oncogene- $\alpha$
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HacGI	<i>H.acinonychis</i> Genomik Adası
HHGI1	<i>H.hepaticus</i> Genomik Adası
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
Hsp	Isı Şok Proteinleri (Heat Shock Proteins)
Ice	Inducible by Contact with Epithelium
IKK	IkappaB kinaz
IL	İnterlökin
JAM	Junctional adhesion molecule

kDa	Kilo dalton
LPS	Lipopolisakkarit
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Majör histokompatibilite
mm	Milimetre
NAMA	N-Asetil muramik asit
NAGA	N-Asetil glikozamin
NCTC	National Collection of Type Cultures
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör kappa B
NixA	Nikel transport protein
Nod	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NSAİİ	Non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar
Oip	Outer Inflammatory Protein
ORF	Açık okuma bölgesi (open reading frame)
PAK-1	p21 protein activated kinase-1
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11
PTPÇ	Reseptör tip protein tirozin fosfataz
Ras	Rasemaz
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
T4SS	Tip 4 sekresyon sistemi
TNF- $\alpha$	Tümör Nekrozis Faktörü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Vac	Vacuolating cytotoxin
ZO-1	Zonula occludens-1



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

*Helicobacter pylori*, dünya nüfusunun yarıdan fazlasının gastrik mukozasında kolonize olarak asemptomatik taşıyıcılık ve non-ülser dispepsi gibi hafif klinik seyirli durumlar ile kronik gastrit, peptik ülser, gastrik MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lenfoma ve gastrik kanser gibi daha ciddi gastrik patolojilere yol açan önemli bir enfeksiyon ajanıdır. Az gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda prevalans %70-90 iken gelişmiş toplumlarda bu oran %40'dan daha düşük seviyelere gerilemiştir (1-3). Bu oranlar *H. pylori* enfeksiyonları ve komplikasyonlarının öncelikle gelişmekte olan ülkelerin sorunu olduğunu göstermektedir (4). Yoğun çalışmalar asemptomatik kolonize kişilerin en az %20'sinde, kolonizasyonu takip eden 10 yıl içerisinde tedaviyi gerektirecek klinik bulguların ortaya çıkabileceğini, bunların da %15-20'sinde peptik ülser, %1-3'ünde gastrik kanser gelişebileceğini ortaya koymaktadır.

*H. pylori* enfeksiyonlarının prognozunu, hasta ve çevresel faktörlerin yanında, bakteriye ait virulans faktörleri de etkiler (5, 6). Bu virulans faktörleri arasında yer alan *cagA* (cytotoxin associated gene A) ve *cagE* (cytotoxin associated gene E), *vacA* (vacuolating cytotoxin A), *iceA* (inducible by contact with epithelium), *babA* (blood group antigen binding adhesin A) ve *babB* (blood group antigen binding adhesin B) gibi toksik ve adeziv proteinleri kodlayan genler patojenitede önemli rol oynar (7-10). Özellikle, vakuolizasyondan sorumlu majör ekzotoksin olan vacA proteinini kodlayan *vacA* geninin signal (işaret) bölgesindeki *sla*, *slb*, *slc* ve *s2* ile toksinin kodlandığı orta bölgedeki *m1a*, *m1b* ve *m2* allellerinin ve ökaryotik hücreler için sitotoksik aktivite gösteren *cagA* proteinini kodlayan *cagA* geni ile enfekte gastrik epitelyal hücrelerinden IL-8 salınımını indükleyen *cagE* proteinini kodlayan *cagE* geni gibi *cag* Patojenite Adası (*cagPAI*) mevcudiyetini gösteren genlerin ve gastrik epitel hücre membranlarında bulunan Lewis<sup>b</sup> kan grubu antijenlerine bağlanmayı sağlayan *babA* proteinini kodlayan *babA2* geni gibi virulans gen varyasyonlarının, gastrik patolojilerin prognozunu direkt olarak etkilediği ve bölgesel farklılıklara neden olduğu gösterilmiştir (10-15).

Çalışmamızda, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı kliniğine, dispeptik yakınmalar nedeniyle başvuran ve tanı amaçlı endoskopi yapılması uygun görülen hastaların, mide biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* 'nin gastrik kolonizasyon sıklığı, cinsiyet faktörünün kolonizasyona olan etkisi ve kolonize suşların virulans genlerinin ve allellik tiplerinin (*cagA*, *cagE*, *vacA* ve allelleri, *iceA* ve allelleri, *babA2*) endoskopik tanularına göre farklı hasta gruplarındaki görülme sıklığı, izole edilecek *H. pylori* suşlarında PCR yöntemi ile belirlenerek, klinik prognoza olan etkilerinin tesbiti amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

*H. pylori*'nin tarihçesi günümüzden yaklaşık 58 bin ila 60 bin yıl öncesine kadar uzanmaktadır. Genetik çalışmalar Doğu Afrika kaynaklı insan göçü ile *H. pylori*'nin yayıldığını göstermektedir (12, 16, 17). Güney Amerika'nın And bölgesi'nde bulunan 3 bin yıllık insan mumyalarının dışkı örneklerinde bu bakteriye ait izler bulunmuştur (18). Tıp tarihinin başlangıcından beri mide barsak hastalıkları ve etyolojisi birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. 1889'da Jaworski W. insandan elde ettiği mide yıkama suyu sedimentinde "*Vibrio rugula*" adını verdiği spiral bakterileri göstererek bunların mide hastalıklarında olası patojeniteden sorumlu olabileceğini öne sürmüştür. Bizzozero G. (1846-1901) köpeklerden alınan mide biyopsi örneklerinde spiral bakterilerin yerleşimini incelemiştir. Krienitz W. (1906) mide kanserli hastanın mide içeriğindeki spiral bakterileri tesbit etmiştir. Steer H.W. ve Colin Jones (1975) mide biyopsi örneklerinde epitele yakın yerleşimli bakterilerin varlığını ve buna cevaben dokuda artmış nötrofil infiltrasyonunu gösterirken, Rollasan ve arkadaşları da (1981) gastrik spiral bakteriyi göstermişler, ancak midenin yüksek asiditesi nedeniyle burada bir mikroorganizmanın kolonize olabileceğini ve hastalık yapabileceğini olası görmemişlerdir. Mide barsak hastalıkları ve etyolojisinin izahına yönelik araştırmalar çoğunlukla otopsi çalışmaları olduğundan kolonize mikroorganizmaların kontaminasyon olduğu düşünülmüştür (19).

1982'de Warren R. ve Marshall B.J. gastrit ve peptik ülserli 34 hastanın mide biyopsi örneklerinde *H. pylori*'yi üreterek bu sarmal gövdeli bakteriyi tıp dünyası ile tanıştırmışlardır. Bu çalışma, araştırmacılara 2005 yılı "Fizyoloji ve Tıp bilimleri" alanında Nobel ödülü kazandırmıştır (20, 21). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC - International Agency for Research on Cancer Working Group) 1994'de *H. pylori*'yi grup 1 karsinogenik olarak bildirmiştir (22). *H. pylori*'nin virulans genlerinin tesbitine yönelik çalışmaların başlaması, bakterinin patojenitesinin aydınlatılmasını sağlamıştır (23, 24).

## 2.2. Epidemiyoloji

### 2.2.1. Prevalans

Batı ülkelerinde *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı son yıllarda azalırken, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ise hala yüksek oranlar görülmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun dünya genelindeki seropozitiflik oranı %14-92 iken, prevalansı batılı ülkelerde %40'dan az, gelişmekte olan ülkelerde ise ortalama %70-90'dır (1, 2). Ülkemizde *H. pylori* prevalansı %40 ile %89 arasında değişmektedir (25, 26).

*H. pylori* ile karşılaşma yaşı ülkelerin gelişmişliği ve sosyo-ekonomik durum ile yakından ilişkilidir. Gelişmekte olan ülkelerde bireyler, batılı ülkelere göre çok daha erken yaşta *H. pylori* ile enfekte olmaktadır. Çocuklarda *H. pylori* prevalansı, batılı toplumlarda %10-35 iken gelişmekte olan ülkelerde bu oran %80'lere ulaşmaktadır (27, 28). Bangladeş'te çocuklardaki *H. pylori* prevalansı %42 iken Gambia'da bu oran %75'den fazladır. Batı ülkelerinde bu grubun prevalansı; Finlandiya'da %6, İskoçya'da %11, Almanya'da %13, İtalya'da %23, Belçika'da %7.3 olarak bildirilmiştir (2, 29).

Ülkemizde, çocuklardaki *H. pylori*'nin seropozitifliği değişik oranlarda bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada 1-15 yaş grubunda %23.6 (30) olarak tesbit edilmiş, diğer bir çalışmada 0-5 yaş grubunda %28, 6-10 yaş grubunda %44, 11-15 yaş grubunda %69 olarak bildirilmiştir (31). Özden ve ark.nın yaptıkları çalışmalarda ise 7-14 yaş grubundaki seropozitiflik oranlarını, 1990 yılında %78.5, 2000 yılında ise %66.3 olarak tesbit etmişler, bu 10 yıl içindeki prevalans düşüklüğünü ülkemizdeki çevresel faktörlerin düzelmesi ve sosyo-ekonomik durumdaki iyileşme ile ilişkilendirmişlerdir (32).

*H. pylori*, duodenal ülser etyolojisinde %90-95, mide ülserinde %50-85 etkindir. *H. pylori* taşıyıcılarının %100'ünde gastrit gelişirken, yaşam boyu peptik ülser olma riski %15-20'dir. Mide kanseri olma riski ise %1-3 dür. Batılı toplumlarda çoğunlukla peptik ülser vakaları rapor edilirken, gelişmekte olan ülkelerde ise *H. pylori* kaynaklı gastrik kanser daha sık bildirilmektedir (4, 29, 33).

### 2.2.2. Enfeksiyonun Bulaşması

*H. pylori* enfeksiyonlarının bulaşmasında etkili olan risk faktörleri arasında, düşük sosyo-ekonomik durum, kalabalık aile, bir yatakta uyuyan birden fazla çocuk, kardeş

sayısının fazla olması, içme sularının kirliliği, aile hikayesi vb. sayılabilir. Bu faktörler genellikle az gelişmiş ülkelerde yaygındır (29).

*H. pylori*'nin insandan insana nasıl bulaştığı hala kesin olarak aydınlatılamamışken, epidemiyolojik çalışmalarla *H. pylori*'nin, kişiden kişiye bulaşında, hem oral-oral hem de fekal-oral yolla olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Fekal hijyenin yeterli olmadığı ve kontamine su kaynaklarının kullanıldığı durumlarda fekal-oral bulaş olabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı fekal-oral bulaş gelişmekte olan ülkelerde söz konusudur (29, 34). Aile içi bulaş, *H. pylori* enfeksiyonunun erken çocukluk döneminde kazanılmasına neden olur. Bu bulaş türünde anneler kilit rol oynamaktadır. Çocukların beslenmesinde yiyeceklerin önce anne tarafından çiğnenip çocuğa verilmesi, Güney Doğu Asya ve Afrika'da sık yapılan bir uygulama olup, bu besleme şekli oral-oral yolla bulaşı da açıklayabilir (29, 35). Oral-oral bulaş olabilmesi için *H. pylori*'nin mide sıvısında bulunması ve regürjitasyon sonrasında ağız boşluğunda geçici olarak kolonize olması gerekir. Dental plaktan ve tükürükten *H. pylori* izolasyonu bildirilmiştir (34).

İatrojenik olarak bulaş hem batılı ülkelerin hem de gelişmekte olan ülkelerin önemli bir sorunudur. Bulaşa genelde dezenfeksiyon kurallarının doğru uygulanmadığı kontamine endoskoplar neden olmaktadır (29).

### 2.3. Sınıflandırma

*H. pylori*, *Campylobacter* cinsine olan benzerliğinden dolayı “*Campylobacter*-like organism” adı verilmiş, daha sonra sırasıyla *Campylobacter pyloridis* ve *Campylobacter pylori* olarak adlandırılmış, yapılan genotipik ve fenotipik araştırmalarla 1989'da *Helicobacteraceae* ailesi *Helicobacter* cinsi içerisinde bir tür olarak yeniden sınıflandırılmış ve *Helicobacter pylori* adını almıştır (36, 37). *Helicobacter* cinsi, uluslararası sınıflandırmaya uygun olarak geçerli sayılan 23 resmi türden ve en az bir düzine aday ve geçerli tür olmayı bekleyen türden oluşmuştur (Tablo 1) (37).

Peptik ülser ve gastrik kanserin başlıca risk faktörü olan *H. pylori*, *Helicobacter* cinsi içinde insanlar için patojen olan en önemli türdür. Esas olarak kedi ve köpeklerde gastrite, domuzlarda peptik ülser, insanlarda ise gastrit, peptik ülser ve gastrik MALT lenfomaya neden olabilen *H. heilmannii* (*Gastrospillum hominis*)'nin %0.05 gibi çok düşük oranda bile olsa insanları enfekte edebileceği gösterilmiştir (36, 38). Enterohepatik helikobakterler olarak gruplandırılan *H. cinaedi* ve *H. fennelliae* insanlarda özellikle

immün yetmezlikli kişilerde gastroenterit ve bakteriyemi yapabilir. *H. canadensis*, *H. canis*, *H. pullorum* ve *H. winghamensis* insanda gastroenterite neden olabilirler. Enterohepatik helikobakterler bu güne kadar insan örneklerinden izole edilememişlerdir (39).

**Tablo 1:** Helicobacter türlerinin kaynak ve primer yerleşimleri

	TÜR	KAYNAK(LAR)	PRİMER YERLEŞİMLER
İNSAN	<i>H. bizzozeronii</i>	insan, kedi, köpek, primat	mide
	<i>H. canis</i>	insan, kedi, köpek	barsak
	<i>H. canadensis</i>	insan, kaz	barsak
	<i>H. cinaedi</i>	insan, hamster, makak, tilki, sıçan, köpek	barsak
	<i>H. fennelliae</i>	insan	barsak
	<i>H. pullorum</i>	insan, tavuk	barsak
	<i>H. pylori</i>	insan	mide
	<i>Helicobacter</i> tür suş flx. takson 8	insan, köpek, koyun, fare	barsak
	<i>H. winghamensis</i>	insan	barsak
İNSAN DIŞI	<i>H. acinonychis</i>	çita	mide
	<i>H. aurati</i>	hamster	mide ve barsak
	<i>H. bilis</i>	fare, köpek, sıçan	barsak ve karaciğer
	<i>H. cetorum</i>	yunus, balina	mide
	<i>H. cholecystus</i>	hamster	karaciğer
	<i>H. felis</i>	kedi, köpek	mide
	<i>H. ganmani</i>	fare	barsak
	<i>H. hepaticus</i>	fare	barsak ve karaciğer
	<i>H. marmotae</i>	dağ sıçanı, kedi	barsak ve karaciğer
	<i>H. mastomyrinus</i>	fare	barsak ve karaciğer
	<i>H. mesocricetorum</i>	hamster	barsak
	<i>H. muridarum</i>	fare, sıçan	barsak
	<i>H. mustelae</i>	dağ gelinciği, vizon	mide
	<i>H. pametensis</i>	kuş, domuz	barsak
	<i>H. rodentium</i>	fare	barsak
	<i>H. salomonis</i>	köpek	mide
	<i>H. typhlonius</i>	fare	barsak
	<i>H. trogontum</i>	sıçan	barsak

## 2.4. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

### 2.4.1. Görünüm ve Boyanma

*H. pylori*, sarmal, kıvrık, martı, “S” veya spiral şeklinde görülebilen, 2-4 µm. uzunluğunda, 0.5-1 µm. eninde, spor ve kapsül oluşturmeyen, hareketli, mikroaerofilik, gram negatif basillerdir. Oksidatif strese maruz kalma, alkali pH, yüksek sıcaklık gibi

uygun olmayan üreme koşullarında, uzun süre beklemiş kültürlerde ve antibiyotik tedavisi sonrasında spiral formdan küresel veya kokoid formlara dönüşebilirler. *H. pylori*'nin kokoid formunun rolü tam anlaşılamamıştır. Bir kısım görüş kokoid formların dejeneratif ya da ölü formlar olduğunu, bir kısmı ise canlı ama dormant (uyuyan) form olduğunu ve antibiyotik tedavisi sonrası nükslerden ve enfeksiyonun iletiminden sorumlu olabileceğini savunmaktadır. Kokoid formlar kültürde üretilemezler (40, 41).

*H. pylori*, tek kutuplu, sayıları 2 ila 6 arasında değişen, yaklaşık 3µm uzunluğunda, kılıflı flagellaları ile son derece hareketlidir. Çoğunlukla flagellaların terminal uçlarında ampul benzeri bir şişlik taşırlar. Bu yapı, bakterinin mide epiteliyal hücrelerini kaplayan mukus tabakası gibi viskoz yapılarda tirbuşonvari hareketine olanak sağlar (5, 39).

*H. pylori*'nin, Gram boyama ile gerek dokudan hazırlanmış kesit veya yaymaları, gerekse besiyerindeki kolonilerden hazırlanan preparatları, etkili bir mikroskopik incelemeye olanak sağlarken, ayrıca Hematoksilen-Eozin, Modifiye Giemsa, Warthin-Starry gümüş boyası, Akridin oranj (floresan boya), Cresil-fast Moru, Gimenez ve Brown-Hopps moru gibi çeşitli histolojik boyalarla da başarılı bir şekilde boyanabilmektedir.

#### 2.4.2. Hücre Duvar Yapısı ve Antijenik Özellikleri

*H. pylori*'nin hücre duvarı yapısı, en dışta lipopolisakkaritten (LPS) zengin olan büyüklüğü 31-80 kDa arasında değişen dış membran, periplazmik alan ve üç katmanlı iç membran ile diğer gram negatif bakterilere benzerken özellikle 3-OH yağ asit yapısı ile enterik bakterilerin LPS'inden yapısal ve antijenik özellik bakımından farklılık gösterir. Yine LPS'de görülen karbon zincirlerindeki değişiklikler antijenik özelliğini zayıflatarak bakterinin immun sistemden kaçışını sağlar. *H. pylori*'nin lipopolisakkarit-O yan zincirlerindeki Lewis karbonhidrat antijenleri (Lewis<sup>x</sup>, Lewis<sup>y</sup>) ile insanlardaki normal hücre yüzey glikolipid/konjugatları olan Lewis antijenleri (Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup>) ve 0 kan grubu insan eritrositlerindeki H-1 antijenleri (Bab) ile yapısal olarak homoloji gösterir. Bu benzerlik bakteriye karşı konağın immun toleransı veya kronik enfeksiyonlara bağlı otoimmun patolojileri başlatır (42, 43).

*H. pylori* yüzeyinde eksprese edilen GroEl ve DNAk ailesine mensup şaperon proteinler veya Isı şok proteinleri (Hsp) büyük moleküler ağırlığa sahip şaperon proteinlerdir. Bu proteinler insanlardaki birçok hücre Hsp'leri ile homolog olmaları nedeni ile konak immün sistemi tarafından algılanmazlar. Ancak, kronik enfeksiyonlarda konak

immün sistemi tarafından algılanırlar ki bu patolojik otoimmün cevaba dönüşür. Sonuç olarak, gastrik karsinomalara kadar giden irreversibl doku hasarı tetiklenir (44, 45).

**Tablo 2:** *H. pylori* Isı şok proteinleri (Hsp) ile insan hücre Isı şok proteinleri (Hsp) benzerliği.

<i>H. pylori</i>	Konak
HpCopA ve HpCopB	H+K+ ATPaz
686 Aminoasit P-tipi ATPaz	H+K+ ATPaz
VacA	H+K+ ATPaz
Üreaz b zinciri	H+K+ ATPaz
HspB, Hsp 60	Hsp 60
Hemaglutinin proteazlar	Karbonik anhidraz

### 2.4.3. Hareket

Helikobakterlerin yoğun viskoz solüsyonlarda oldukça iyi hareket kabiliyeti sağlayan flagellar yapısı; unipolar yerleşimli tek bir flagelladan, bipolar yerleşimli sayıları 20'yi aşan demetler halinde bulunabilir. Bakteri tirbüşon benzeri bu hareketi sayesinde lümen içindeki asidik ortamdan uzaklaşarak tabakalar içerisinde hızla ilerleyebilmekte ve nötrale daha yakın pH'nın olduğu mukusun alt kısımlarına ulaşabilmektedir. Yapılan çalışmalar, kolonizasyonun ilk aşamalarında ve enfeksiyon oluşumunda motilitenin ve üreazın bakteri için elzem olduğunu göstermiştir. *H. pylori* nötral pH'da daha hızlı hareket edebilme özelliğine sahiptir (5, 46, 47).

Flagella, protein polimerlerinden oluşmuş bazal cisimcikten çıkar. Flagellar kılıf, LPS'lerin tipik yağ asitlerinden ve proteinden (29 kDa) oluşan çift katmanlı bir membrandır. Kılıf sayesinde antijenik özellik gösteren flagellar yapı, konağın immün sisteminden saklanabilir ve asit ortama dayanıklılık gösterebilir (36, 48, 49).

### 2.4.4. Genomik Özellikler

*H. pylori* 26695 genomik sekansı yapılan ilk suştur. 1997 yılında kronik gastriti olan bir hastadan izole edilmiştir. Sirküler bir kromozoma sahip olup genom büyüklüğü 1.667.867 bp'dir. Ortalama GC oranı yaklaşık %39'dur. 1590 açık okuma bölgesine (ORF) ilave olarak iki kopya halinde 16S, 23S rRNA ve 36 tRNA genleri mevcuttur (50, 51). J99 suşu, 1999 yılında duodenal ülserli Amerikalı bir hastadan izole edilerek sekans dizilimi



açıklanmıştır. J99 suşunun genomu 1.643.831 bp'dir. J99 suşunun tahmini açık okuma bölgesi *H. pylori* 26695 suşundan daha az olup 1495'tir. Her iki suşta *cag* patojenite adasına (*cagPAI*) sahiptir. Bu iki suşun karşılaştırmalı genom analizlerinde 83 kb.'lık bir bölge suş spesifik gen bölgesi olarak tanımlanmış ve "plastisite zonu" olarak adlandırılmıştır. Spesifik gen bölgelerinin işlevi tam olarak anlaşılamamıştır (50, 51). 2006 yılında sekanslaması yapılan ve bir kronik atrofik gastrit etkeni olan HPAG1 suşunun genomu 1.596.366 bp olup 1536 tahmini açık okuma bölgesine sahiptir (50-52). Yakın zamanlarda sekans dizilimi açıklanan ve İtalyan bir hastadan izole edilen diğer bir suşta *H. pylori* tür G27'dir. Genom uzunluğu 1.652.983 bp, GC oranı %38.9'dur. Tahmini açık okuma bölgesi 1515'dir. Ayrıca G27 suşu, 10.032 bp uzunluğunda AT oranı yüksek (%65.2), plazmid kodlayan 11 genin olduğu bir bölgeye sahiptir. Bu bölgenin benzeri aynı zamanda HPAG1 suşunda da bulunur. Yapılan çalışmalarda, G27 suşundaki *cag* patojenite adasının bir transpozon yoluyla bozulduğu, ancak açık okuma bölgesinin ya da epitelyal hücrelere *cagA* iletiminin bundan etkilenmediği anlaşılmıştır. G27'de, *H. pylori* 26695'nin aksine tek bir plastisite bölgesi vardır ve bu bölge *H. pylori*'deki spesifik genlerin büyük bir kısmını içermektedir. Bu bölge 26695, J99, HPAG1 suşlarında bulunmayan tahmini 58 gen içerir (50). Tam genom dizi analizleri yapılmış diğer suşlar arasında *H.hepaticus* ATCC 51449, *H. acinonychis* str. Sheeba, *H. pylori* Shi470, *H. pylori* 98-10 ve *H. pylori* B128 bulunmaktadır (50-54).

**Tablo 3:** Bazı Helikobakter Türlerinin Genel Genomik Özellikleri

	<i>H. pylori</i>		<i>H. acinonychis</i>	<i>H. hepaticus</i>	
Tür	26695	J99	HPAG1	Sheeba	ATCC 51449
Orijin	İnsan	İnsan	İnsan	Kedigiller	Kemirgen
Genom Büyüklüğü (bp)	1.667.867	1.643.831	1.596.366	1.553.928	1.799.146
G+C İçeriği (%)	39.0	39.0	-	38.2	35.9
Tahmini Kodlanan Sekans	1.590	1.459	1.536	1.611	1.875
Kodlanan Alan (%)	91.0	90.8	-	89.7	93.0
Ortalama Büyüklük (bp)	945	998	-	865	1.082
Değişken Genom Havuzu					
Plazmidleri	Yok	Yok	pHPAG1	pHac1	Yok
İnseriyon Sekansları	IS605, IS606	IS606	Yok	ISHa1675, ISHa1942, ISHa1152	Yok
Genomik Adacıkları	<i>cag PAI</i>	<i>cag PAI</i>	<i>cag PAI</i>	HacGI (İntegron)	HHGI1

## 2.5. Üreme ve Kültür Özellikleri

*H. pylori* adi besiyerlerinde üretilemeyen optimize edilmiş özel besiyerlerinde bile son derece yavaş üreyen bir mikroorganizmadır. *H. pylori* mikroaerofilik bir bakteri olup invitro koşullarda 37°C'de, % 5 O<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub>, % 85 N<sub>2</sub> (nitrojen) içeren nemli atmosferde (% 98), % 5-10 oranında koyun ya da at kanı katılmış, optimum pH'sı 7 olan Brucella agar, Beyin Kalp İnfüzyon agar, Çikolata agar, Wilkins Chalgler agar, Columbia ve Skirrow agar gibi modifiye zenginleştirilmiş besiyerlerinde 3-7 günlük inkübasyon süresinde üretilebilirler. Ortam atmosferinde hidrojen (H<sub>2</sub>) bulunması üremeyi artırır. Besiyerlerine çeşitli antibiyotiklerin katılması örneklerden izolasyon şansını artırır, bu amaçla Vankomisin, Trimetoprim, Nalidiksik asit, Amfoterisin-B, Kolistin, Sefsulodin gibi antibakteriyel ve antimikotiklerin çeşitli kombinasyonları ile aktif karbon ilavesi önerilmektedir. Yine β-siklodekstrin ve %1 izovitaleks katkısı üremenin artırılması için kullanılabilir. At ve koyun kanı dışında fötal dana serumu ve insan kanı da kullanılabilir (39, 55-58).

Uygun besiyerlerine ekilen örnekler, uygun atmosfer ve sıcaklık derecelerinde inkübe edilerek, üremenin tespiti için 3. 5. ve 7. günlerde kontrol edilir. İnkübasyon süresi sonunda 0.5-2 mm. çapında renksiz veya gri renkli, saydam görünümlü koloniler oluşmaktadır. *H. pylori* midenin asit ortamında üremesine rağmen asidofilik bakterilerden değildir. Buna karşılık pH aralığı oldukça geniştir (pH:5.5-8.5). Fakat optimal üreme pH 6.9-8.0 aralığında gerçekleşir. *H. pylori* uzamış inkübasyon süresi, düşük pH derecesi ve oksijen ile temas gibi çevresel faktörlere son derece duyarlıdır. Safırlı ortamlardan olumsuz etkilenir. Metabolizmaları için gerekli enerjiyi aminoasitlerden, üreden ve CO<sub>2</sub>'den sağlarlar (39, 55, 59).

*H. pylori* laboratuvarında; Gram boyanma ile görülen mikroskopik morfolojik özellikleri oksidaz, katalaz ve güçlü üreaz aktivitesi, nitrat redükte edememesi, sülfürlü bileşikler kullanarak H<sub>2</sub>S oluşturabilmesi, hippuratu hidrolize edememesi, nalidiksik aside dirençli, sefalotine duyarlı olması ile ayırtedilebilir (55).

### 2.5.1. Üreaz Aktivitesi

Üreaz, gastrik mukoza hücrelerinden lümene salgılanan üreyi hidrolize edip amonyak ve karbondioksit üreten enzimdir. Bu enzim aktivitesi ile *H. pylori*, mide asidini

nötralle ederek çevresinde koruyucu bir amonyak tabakası oluşturur (36, 46, 60). Üreaz, ya nitrojen metabolizmasında üretilen veya doku aralıklarından sızan ve midedeki konsantrasyonu 1-14mM olan üreyi, amonyak ve karbondioksit'e hidrolizini katalizleyen ve ortamın pH'sını yükselten nikel bağımlı bir enzimdir. Üreaz enzimi operonu, *H. pylori* kromozomunun 34 kb kısmına lokalizedir ve apoenzim olan UreA (30 kDa) ve UreB (62 kDa) yapısal alt üniteleri, UreC ve UreD olan iki regülatör alt üniteyi kodlar. Ayrıca enzim sentezinin düzenlenmesinde ve apoenzime nikel iyonunun eklenmesinde görev alan UreE, UreF, UreG, UreH yardımcı proteinlerini kodlar. *H. pylori*'nin gastrik asiditedeki adaptasyonunda primer mekanizma, UreI tarafından sitoplazmanın içerisine üre girişinin hızlandırılmasıdır. H<sup>+</sup> kaplı üre kanalı UreI tarafından kodlanır ve aside maruz kaldığında *H. pylori* içerisine üre girişini yaklaşık 300 kat artırır (36, 46, 60). Üreazın hücrel lokalizasyonu hakkında hala belirsizlik vardır. *H. pylori*'nin üreyi alıp, amonyağı dışarı verdiği ya da parçalanan *H. pylori* hücrelerinin üreaz enziminin hayatta kalan *H. pylori* hücrelerinin etrafını kapladığı düşünülmektedir (36, 60).

## 2.6. Patogenez

*H. pylori*'nin neden olduğu gastroduedonal patolojide mikroorganizmaya ait çok sayıdaki virulans faktörünün yanı sıra konak ve çevreye ait faktörlerinde birlikte etkili olduğu bilinmektedir. Bugüne kadar hiçbir virülans faktörü veya predispozan faktörün tek başına spesifik bir patoloji ile ilişkisi fizyopatolojik olarak açıklanamamıştır (5, 6). Ancak mikroorganizmanın konağın immün cevabından kaçışı ve kaçışta etkili olan faktörlerle konak mukozası arasındaki ilişki virulansa yönelik çalışmaların temelini oluşturmaktadır.

**Tablo 4:** *H. pylori*'nin patogenezinde rol oynayan başlıca virulans faktörleri

Faktör(ler)	Genomik bölge(ler)	Etki
Üreaz	<i>ure operon</i>	Mide asiti nötralizasyonu, Nitrojen kaynağı, Mukozal toksisite
NixA	<i>nixA</i>	Üreaz için Ni <sup>+2</sup> alınımı
Flagella	<i>flaA, flaB, flgE, flbA</i>	Bakteriyal motilite
Adezinler	<i>hpaA</i> vd.	Hücrelere yapışma
Süperoksit dismutaz	<i>sod</i>	Fagositlerin imhasına direnç
Katalaz	<i>katA</i>	Fagositlerin imhasına direnç
HP-NAP	<i>napA</i>	Nötrofil aktivasyonu
Isı şok proteinleri	<i>hspA, hspB</i>	Moleküler şeparoninler ve Ni <sup>+2</sup> alınımı
<i>vacA</i>	<i>vacA</i>	Gastrik epitelyum hasarı
<i>cagA</i>	<i>cagA</i>	Gastrik epitele sitotoksik etkili

### 2.6.1. Bakteriye Ait Virulans Faktörleri

*H. pylori*'nin mide kolonizasyonunu ve virulansını sağlayan faktörler; midenin mukozal hasarı ile sonuçlanan enflamasyon, mukozal bariyerin bozulması ve normal fizyolojinin değişmesi gibi başlıca üç patolojik etkiye neden olur. Mukozal enflamasyonda IL-8 sekresyonu, endotelial hücrelere nötrofil adherensi, PAF sentezi, lipopolisakkaritler ve üreaz enzimi rol oynar. Mukozal bariyerin bozulmasında koruyucu musin tabakasını incelten musinaz ile fosfolipaz A<sub>2</sub> ve C gibi proteazlar, cagA ve vacA gibi efektör proteinler, nitrik oksit sentaz (NOS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) sentezi ve mide epitelyal hücrelerinde apoptozisin tetiklenmesi etkilidir (36).

#### 2.6.1.1. Kolonizasyon Faktörleri

Düşük pH içeriği ve peristaltik hareketler midede diğer bakterilerin yerleşimine imkan vermezken *H. pylori*, bu olumsuz şartlara rağmen kolonize olmayı başarır. *H. pylori*, primer olarak midenin kardiya, korpus ve antrumunda lümeni kaplayan mukus tabakası içine veya altında, epitel dokusuna bitişik olarak kolonize olur. Fırsat bulduğunda hücre içi yerleşimde gösterebilir. *H. pylori*'nin kolonizasyonunda, üstün hareket kabiliyeti sağlayan spiral yapısı ve flagellaları, asidik ortamdan korunmada etkili olan üreaz enzimi ve hücre reseptörlerine bağlanmayı sağlayan adhezinleri hayati önem taşır (36, 39).

##### 2.6.1.1.1. Adezinler

*H. pylori*'nin mide mukozasında kolonize olabilmesi için konağın hücre reseptörlerine bağlanması gerekir. Bağlanamayan türler kolayca temizlenir. *H. pylori*, konağın epitel hücre yüzeyi ve intraepitelyal alandaki kan grubu antijenlerine, Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup> ve H-1 antijenlerine, siyalize proteinlere, glikolipid ve glikoproteinler gibi glikokonjugatlar ve fosfolipidler ile bağ dokusu içindeki non-sialize laminin, fibronektin ve çeşitli kollajenler, heparin sülfat ve sülfatid'e bağlanırlar ve bütünlüğü bozarlar. Bu bağlanmadan *H. pylori* hücre yüzeyinde yer alan 20'den fazla protein sorumludur. Bunlardan bazıları *BabA*, *SabA/B*, *AlpA/B*, *Hpa*, *HopZ* adezinleridir (46, 47, 61, 62).

*BabA* adezini, fukozillenmiş kan grubu antijenlerine bağlanırlar. *H.pylori* suslarının sadece bir kısmında bulunan *BabA*, konakta bağışık yanıt veya sinyal oluşturmaz. *SabA* ve

HpA sialize kan grubu antijenlerine bağlanırlar, SabA'nın bağlanması nötrofillerde aktivasyona ve oksidatif patlamaya neden olur. AlpA ve HopZ'nin konaktaki reseptörleri bilinmese de yokluğunda *H. pylori*'nin hücrelere adezyonu azalır (46, 47, 61-63).

Üreaz enzimi bilinen fonksiyonlarının yanında aynı zamanda bakterinin adezyonunda da rol oynar. Bakteri yüzeyindeki üreaz, lizis ya da salınım yoluyla konak hücre yüzeyinde bulunan sınıf II MHC yapılarına bağlanarak apoptozisi uyarabilir. Üreazın alt birimi üreB, mide epitel hücre yüzeyindeki CD74'e bağlanarak NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve IL-8 salınımını stümüle eder (46, 47, 61-63).

### 2.6.1.2. Konak Savunmasından Korunma Faktörleri

*H. pylori*, sahip olduğu birçok yapı elemanları, enzim ve toksinlerle midede kolonizasyonu engelleyici faktörlerden korunabilir. Bu elemanlar; flagellalar ile sağlanan etkili hareket yeteneği, üreaz enzimi, konak hücre reseptörlerine bağlanmadan sorumlu adezinler, musinaz gibi suda çözünür extraselüler mediyatör proteinler, süperoksiti hidrojen peroksit dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ve hidrojen peroksiti, oksijen ve suya parçalayarak oksijen radikallerinin yıkıcı etkisinden bakteriyi koruyan katalaz enzimi, proliferasyonu inhibe eden proteinler ile proteinlerin disülfid bağlarını keserek mukus tabakasındaki müsinleri ve daha önemlisi Ig'leri (IgA, IgG ve IgM) denatüre ederek immün defanstan koruyan thioredoxin (CD-59) enzimidir (36, 61, 64, 65).

### 2.6.1.3. Doku Hasarı Oluşturan Virulans Faktörleri

*H. pylori* enfeksiyonlarının prognozunu konağın cevabı ve çevresel etkilerin yanı sıra, bakteriye ait virulans faktörleri de etkilemektedir. *H. pylori*'nin kazanılmış immün yanıtı engellemek için bakteriyel virülans faktörlerini kullandığı düşünülmektedir. Bu virulans faktörleri arasında yer alan cagA, cagE, vacA, iceA, babA ve babB, oipA gibi toksik ve adezif proteinleri kodlayan genlerle ilgili yoğun çalışmalar yapılmıştır.

#### 2.6.1.3.1. cag Patojenite Adası (cagPAI) Genleri

Cag Patojenite Adası (cagPAI), *H. pylori* patogeneğinde önemli rol oynayan, bilinmeyen bir bakteriden horizontal transferle kazanıldığı düşünülen ve *glutamat rasemaz*

(*Ras*) geni içerisinde yerleşmiş, 40 kbp büyüklüğünde, yaklaşık 31 genden oluşan bir DNA fragmentidir. *CagPAI* genleri, ya aralıksız olarak peşpeşe dizilerek bir bütünlük gösterir veya araya giren insersiyon segment IS605 ile ayrılmış sağ, *cagPAI-I* ve sol *cagPAI-II* olarak tanımlanan iki alt üniteye bölünürler (11, 66, 67). Bakteri ürünlerini konak hücrelerine transfer eden Tip 4 sekresyon sisteminde (T4SS) yer aldığı proteinleri kodlar. T4SS bir makromoleküler transfer sistemidir, hücre duvarında yer alan peptidoglikanı ve CagA proteininin de olduğu bakteriyel ürünleri, ökaryotik hücre sitozolüne transfer eden bir “moleküler şırınga” olarak tanımlanır. Yapısı *Agrobacterium tumefaciens*'in *VirB-VirD* sistemine benzer yapıdadır (66). *cagA* geni, *cagPAI* için bir markır olarak kabul edilebilir.

Tip IV sekresyon sistemi ile konak hücrelerine transloke edilen bir diğer bakteriyel ürün; peptidoglikandır. Peptidoglikan, intrasellüler reseptör Nod1 tarafından tanınmakta, böylelikle nükleer faktör kapp B (NF- $\kappa$ B) aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8) sekresyonu gerçekleşmektedir (68, 69).

#### 2.6.1.3.1.1. *cagA* Geni

*H. pylori* suşlarının yaklaşık %60-70'inde mevcut olan bu gen *cagPAI* içinde yerleşiktir. 121-145 kDa molekül ağırlığında, güçlü immunodominant aktiviteye sahip olan sitotoksik bir dış membran proteinini kodlar (7, 70). *cagA* (+) suşların peptik ülser, atrofik gastrit ve gastrik adenokarsinom gelişimiyle yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (8, 12). *cagA*'nın 5' ucu son derece kararlı iken 3' ucunda farklı sayı ve büyüklükte tekrarlayan diziler bulunur. Bu diziler içerisinde Tirozin'in de yer aldığı beş aminoasitten oluşan EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) motifleri kodlanır (11). CagA, EPIYA motiflerindeki tirozin ile sitozolde Src-bağımlı fosforilasyona uğrayarak bir ökaryotik fosfataz olan SHP-2'yi aktive eder. SHP-2 ise FAK (Fokal Adezyon Kinaz) gibi konak hücre proteinlerinin defosforilasyonuna ve sonuçta hücre sinyalizasyon sisteminin etkilenerek hücrelerin uzamasına, hareketlerinin artması ve hücre proliferasyonunun, apoptotik aktivitenin ve sitoskeletal yapının bozulmasına neden olur (7, 10, 12, 13, 69). CagA-SHP-2 etkileşimi benzer şekilde SHP-2'yi kodlayan *PTPN11* geninde mutasyona neden olarak gastrik kanser gelişimine yol açabilir (69). CagA yine tirozin fosforilasyonu aracılığıyla adaptör protein Crk'yi aktive ederek epitelyal bütünlüğün bozulmasıyla sonuçlanan hücrelerarası bağların kopmasına neden olur. Sonuç olarak bu fenotipik anormallikler, hücrenin “hummingbird” olarak anılan morfolojik değişimine neden olur (12). CagA'nın fosforilasyondan bağımsız

olarak E-cadherin ile bağlantı kurabileceğini ve bu bağlantının E-cadherin ile  $\beta$ -catenin arasındaki yapıyı bozarak  $\beta$ -catenin'in sitoplazma ve çekirdekte birikerek hücrelerarası adezyonun bozulmasına neden olacağı bildirilmiştir (10, 12, 13, 71).

Diğer yandan *cagA*, sitozoldeki PAK-1 (p21 proteinle aktive edilmiş kinaz-1) ve MAPK (Mutasyonla Aktive Edilen Protein Kinaz) kinazları aktive ederek NF- $\kappa$ B'yi indükler. NF- $\kappa$ B'nin uyarılması ile TNF- $\alpha$  (Tümör Nekroz Faktörü), IL-8, GRO- $\alpha$  (Büyüme ile ilgili onkogen-alfa), VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ve C-X-C kemokinlerin ekspresyonunda artış görülür. *CagA*'nın Ras/MAPK üzerinden NF- $\kappa$ B'yi aktive etmesi ile sadece IL-8 üretimini sağlanmakta, IL-1 $\beta$  üretilmemektedir (66, 72).

Bu bulgular *cagA*'nın gastrik enflamasyonların ve bir onkoprotein olarak gastrik kanserin gelişiminde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

#### 2.6.1.3.1.2. *cagE* Geni

Tip 4 Sekresyon Sistemi'nin bir komponenti olan *cagE* geni, *cagPAI* içinde *cagA* genine çok yakın bir bölgede lokalizedir ve *cagA*'nın konak hücre sitozolüne translokasyonu ve fosforilasyonu için önemlidir (73). *Bordetella pertussis*'in *ptlC* geni, *Agrobacterium tumefaciens*'in de *virB4* geni ile benzerdir (14). *CagE* proteini enfekte gastrik epitelyal hücrelerinden IL-8 salınımını indükler. Güçlü bir nötrofil kemoatraktan olan IL-8, konağın *H. pylori*'ye karşı ilk enflamatuvar yanıtını oluşturur (9). *cagE* geni özellikle gelişmiş ülkelerdeki *H. pylori* enfeksiyonlarında kötü prognozu gösterir (14, 74).

#### 2.6.1.3.2. *vacA* Geni

*vacA* geni, *cagPAI*'dan farklı olarak *H. pylori* suşlarının tamamında bulunursa da çoğu suşta defektli olduğu için gen ürünü olan toksin suşların yaklaşık %50'sinde üretilmektedir. Gen bir amino-terminal sinyal peptid ve bir karboksi-terminal domain içeren, yaklaşık 140 kDa büyüklüğünde preprotoksin kodlar. Sekresyon sırasında bu toksin 88 kDa'luk aktif toksin monomerlerine dönüşerek extrasellüler alana salınır ve oligomerik kompleksler içinde kümelenerek anyon seçici kanallardaki lipid tabakasına katılırlar. *VacA*'nın sitotoksik etki göstermesi için bakteriden sekrete edilmesi ve konak hücre sitozolüne aktif formda penetrasyonu gerekmektedir. Sekresyon *cagPAI*'da kodlanan T4SS ile gerçekleşir. *VacA* epitelyal hücre kültürlerinde sitoplazmik vakuolizasyon oluşumuna

neden olur (12, 70). VacA toksini iki parçadan oluşur, p55 parçası konak hücresine bağlanmaya aracılık ederken p33 parçası ise p55'in N-terminal ucu ile beraber hücre sitoplazmasında vakuolizasyondan sorumludur (69). VacA'nın konakta PTPÇ (reseptör tip protein tirozin fosfataz) reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir. Bu bağlanma farelerde gastrik enflamasyon, hemoraji ve ülser oluştururken insanlarda hücre ayrılması ve ülser gelişimine katkıda bulunur (10).

*VacA* geni polimorfik bir yapıya sahiptir. Gende vakuolizasyonun aktivitesi ile ilgili olan bir sinyal (s) bölgesi ve konak hücresine bağlanan toksini etkileyerek vakuolizasyonun hücre özgüllüğünü belirleyen bir orta (m) bölgesi bulunur. *vacA* geninin 4 farklı "s" alleli (*s1a*, *s1b*, *s1c* ve *s2*), 3 farklı "m" alleli (*m1a*, *m1b* ve *m2*) bulunur (10, 12). Bu alleller arasındaki polimorfizm sitotoksik aktivitenin farklı düzeylerde olmasını sağlar. *vacA*'nın *s1* tipini bulunduran suşlar aktif sitotoksin salınımı yapar ve hem gastrik ülser hemde gastrik kanser ile yüksek oranda ilişkilidirler, *m1* tip toksinin konak hücresine bağlanma afinitesinin *m2* tip toksine göre çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (10, 13). Sitotoksik aktivitesi en yüksek olanlar *s1/m1* allelini bulunduran suşlar iken *s1/m2* suşları daha az, *s2/m2* suşları ise sitotoksik etki göstermezler.

Rhead ve ark. (75) yakın bir zamanda *vacA* geninde "s" ve "m" bölgeleri arasında bulunan ve intermediate (i) olarak tanımlanan üçüncü bir bölgeyi tespit etmişlerdir. "i" bölgesinin vakuolizasyon yapan "i1" ve vakuolizasyon yapmayan "i2" allelleri gösterilmiştir. Tüm *s1/m1* allellerinin tip "i1", tüm *s2/m2* allellerinin tip "i2" ve *s1/m2* allellelerinin ise "i1" ya da "i2" olabileceği tanımlanmıştır (12, 76).

VacA konak epitelyal hücrelerde çoklu yapısal ve fonksiyonel değişiklik oluşturur. Endozomal olgunlaşmanın bozulmasıyla sonuçlanan vakuolizasyona neden olur, özellikle polarize epitelyal hücre tabakalarında oluşan permeabilite artışı sıkı kavşaklarda bariyer fonksiyonunun bozulması ile sonuçlanır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar *vacA*'nın konağın bağışıklık sistemi üzerine de olumsuz etkilerinin olduğunu göstermiştir. Fagositozisi ve antijen sunumunu bozar. T hücrelerinin aktivasyonunda bir anahtar transkripsiyon faktörü olan NFAT'ı (nuclear factor of activated T cells) inhibe ederek Jurkat T hücrelerinin aktivasyonunda azalmaya neden olur. VacA, NFAT aktivasyonu ve IL-2 ekspresyonundan bağımsız bir mekanizma ile T hücre proliferasyonunu inhibe edebilir. VacA'nın bağışıklık sistemi üzerine olan bu etkileri, sistemin yıkıcı etkilerinden nasıl kaçıp konakta kalıcı enfeksiyon oluşturduğu sorusuna da açıklık getirebilir (12).



### 2.6.1.3.3. *iceA* Geni

*H. pylori*'nin önemli sayılabilecek diğer bir virulans faktöründe *iceA* genidir. Bu gen konağın gastrik epitelyum hücresi ile teması sonrası uyarılır. *iceA* geninin *iceA1* ve *iceA2* olarak tanımlanan iki farklı alleli vardır ve sadece *iceA1* temas sonrası uyarılır (10, 46, 62). *iceA1* geninin ürünü olan *iceA1*'in *Neisseria lactamica*'nın *NlaIII* enzimiyle çok benzer bir restriksiyon endonükleaz enzimi olduğu gösterilmiştir. Ancak *IceA1* diziliminin büyük bir kısmında oluşan insersiyon ve delesyon mutasyonları bu benzerliği engellemektedir. *IceA* geninde oluşan bu mutasyonlar sonucunda *iceA2* gen alleli ortaya çıkmıştır. *IceA2* geninin kodladığı protein tekrarlayan peptid kasetlerinden oluşan bir yapı gösterir. Proteinin en yaygın formu, en dışta 14 ve 10 a.a.'den oluşan korunmuş peptid alanları ve bunların arasında bulunan toplam 35 a.a.'lik (13, 16 ve 6 a.a.) üç peptid bölgesinin oluşturduğu 59 a.a.'lik proteindir. Birçok *H. pylori* suşundan elde edilmiş *iceA2* proteininin yapılan sekans analizleri ile bu 35 a.a.'lik peptid kasetlerinin yokluğu veya tekrar eklenmesi sonucunda 24, 59, 94, 129 a.a.'lik *iceA2*'nin protein varyasyonlarının mevcudiyeti gösterilmiştir (46).

### 2.6.1.3.4. *babA* Geni

*babA* geni dış membran proteinleri ailesi içinde yer alan, amino ve karboksi terminal alanlarının çok benzerlik gösterdiği *babA* proteininin kodlandığı gen bölgeleridir. BabA proteini gastrik epitel hücre membranlarında bulunan Lewis<sup>b</sup> kan grubu antijenlerine bağlanmayı sağlayan adezin molekülleridir. *babA* geni *babA1* ve *babA2* olarak tanımlanan iki gen bölgesine sahiptir. *babA1* 10 bp insersiyon sekansının eksikliği dışında temelde *babA2*'e benzer. *babA1*'deki bu eksiklik Lewis<sup>b</sup>'ye bağlanamayan ucu kesik *babA* ürününün ekspresyonuna yol açar. *babA2* ise Lewis<sup>b</sup>'ye bağlanmayı sağlayan *babA*'yı kodlayan esas aktif gen bölgesidir (15, 16).

### 2.6.1.3.5. *oipA* Geni

*H. pylori* 26695 ve J99 suşlarının yapılan genom sekans analizlerinde ORF bölgelerinin yaklaşık % 1 gibi yüksek bir oranının dış zar proteinlerini kodladığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle *H. pylori* patogeneğinde bu dış zar proteinlerinin olası rolü üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Böyle bir dış zar proteini *oipA* geninin kodladığı 34 kDa

büyükliğinde bir proinflatuvar proteindir (46). Yamaoka ve ark.nın (77) araştırmalarında Doğu Asya'lı hastalardan izole edilen *cagA* (+) suşların çoğunun *oipA*'nın sağlam bir kopyası olduğu ve bu suşların yüksek düzeyde IL-8 salınımını uyardıkları gösterilmiştir.

#### 2.6.1.3.6. Diğer Gen Bölgeleri

Gastrik karsinomalı hastalardan izole edilen suşlarda esnek bölge “*plasticity region*” olarak tanımlanan ve *H. pylori* genomundaki en değişken bölgeyi oluşturan yeni bir ORF bölgesi gösterilmiştir. Büyüklüğü suşlar arasında değişiklik gösteren (J99 suşunda 45 kb ve 26695 suşunda ise 68 kb) bu bölgelerde kanser oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen genler, *JHP940* ve *JHP947* ile gastritle ilişkili olduğu düşünülen ve sadece 26695 suşunda gösterilen bir gen (*HP986*) yer almaktadır (78, 79).

Dış membran proteinleri kodladıkları varsayılan *jhp0870* geni ve onun %90 homoloğu olan *jhp0649* geninin yeni virulans faktörleri olabileceği bildirilmiştir. Bu genlerin allelik varyasyonları orta bölgelerinde gözlenmiştir (80 81).

#### 2.6.2. Hastaya Ait Faktörler

*H. pylori* enfeksiyonlarının insidansı ve prognozunda bakteriye ait ve çevresel faktörlerin yanında hastaya ait; yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, genetik yatkınlık, eğitim düzeyi ve aile yapısı gibi faktörlerin de etkisinin olduğu yapılan epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (1-4, 35, 27-29).

#### 2.7. *H. pylori* Enfeksiyonlarında Tanı

*H. pylori* enfeksiyonlarında tanı, farklı invaziv ve non-invaziv metodların kullanıldığı klinik ve laboratuvar bulgularla konur. Klinik materyalde mikroorganizmanın kendisinin, genomuna ait spesifik dizilerinin, antijenlerinin veya antijenlerine karşı konakta gelişen antikor cevabının gösterildiği mikrobiyolojik yöntemler ve histopatolojik incelemeler tanıda kullanılan yöntemlerdir. Tanıyı optimize etmek için genellikle birkaç testin birlikte kullanılması önerilmektedir. Birçok testin kullanılmasına rağmen histopatolojik incelemeler ve kültür bu enfeksiyonların tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir (82).

### 2.7.1. Klinik Tanı ve Endoskopi

Fleksible endoskopik cihazların geliştirilmesi ile tolerabilitesi ve maliyeti ucuzlamasına rağmen endemik bölgelerde normal hastalarda önerilmeyen endoskopik muayene ve buna bağlı olarak uygulanan invaziv testlerin son derece önemli avantajları bulunmaktadır. Kanama, yutma zorluğu, kusma, bulantı, altta yatan kronik bir hastalık, aşırı kilo kaybı gibi alarm semptomları olan, 5-45 yaş arası hastalarda ise endoskopik girişimi takiben biyopsi bazlı invaziv testlerle tanının konması istenmektedir. Endoskopik muayenede mukozanın görünüşü, gastritin formu, lezyonun lokalizasyonu ve hangi laboratuvar tanı yönteminin kullanılması gerektiği gibi prognozu etkileyecek önemli bulgular elde edilir. Antrumdaki lezyon daha çok duodenal ülserle işaret ederken, korpusdaki lezyon atrofik gastrit, gastrik ülser ve gastrik karsinomalar için önemli bir bulgudur. Fokal, granümatöz veya lenfositik gastrit endoskopik muayene ile tespit edilebilir. Endoskopi esnasında biyopsi alınmasının gerekliliği ve biyopside tanı için yapılması gerekli işlemlerde kararlaştırılır (3, 83-85).

### 2.7.2. Mikrobiyolojik Tanı

*H. pylori* enfeksiyonlarında klasik mikrobiyolojik tanı; Non-invaziv testler olan Üre Nefes Testleri (ÜNT), Dışkı Antijen Testleri (HPSA - *H. pylori* Stool Antigen Tests) ve serolojik testler ile endoskopik incelemeyi zorunlu kılan biyopsi temelli invaziv testler olan; Hızlı Üreaz Testleri (HÜT), kültürde izolasyon ve Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri'ni (NAAT) içerir (83, 84, 86, 87).

#### 2.7.2.1. Non-invaziv Testler

##### 2.7.2.1.1. Üre Nefes Testi

Endoskopi yapılmaksızın *H. pylori* enfeksiyonunun direkt taranmasını mümkün kılan ÜNT hem tedavi edilmemiş hastalarda aktif enfeksiyonun başlangıç tanısında hem de tedavi sonrası takipte kullanılabilen, duyarlılığı %95-100 ve özgüllüğü %96-98,5 gibi oldukça yüksek olan bir testtir (88, 89). *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı için Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan bu testte iki tip karbon izotopu (Radyoaktif karbon C<sup>14</sup> karbon izotopu ve stabil, non-radyoaktif C<sup>13</sup> izotopu)

kullanılabilmektedir. Bu test, organizmanın CO<sub>2</sub>'i sindirilmiş üreden ayrıştıran üreaz aktivitesi esas alınarak hazırlanan işaretlenmiş C-üre kapsülünün hasta tarafından yutulması sonrası midedeki *H. pylori*'nin üreaz aktivitesi tarafından oluşturulan izotop işaretli CO<sub>2</sub>'in kan akımına absorbe edilip dışarı atılan nefeste belirlenmesi esasına dayanır (90). İşaretli ürenin mideye alınmasından 30 dakika sonra solunum yoluyla dışarı verilen hava toplanır. C<sup>13</sup> canlı bakteri ve enfeksiyon varlığını gösterir, tedavi takibinde yararlıdır. C<sup>14</sup> ise kısa dönemde antibiyotik tedavisinin takibinde kullanılmaz, epidemiyolojik çalışmalar için idealdir. Histoloji veya üreaz testi gibi ÜNT'de de yüksek yoğunlukta bakteri bulunması test için gereklidir (82, 86).

#### 2.7.2.1.2. Serolojik Testler

*H. pylori* enfeksiyonu sonrası organizmada güçlü lokal ve sistemik humoral yanıt oluşur. Midede salgısal IgA düzeyleri, serumda ise bakteriye özgül IgG ve IgA seviyeleri yükselir (91). Etkin bir yöntem olarak görünmesine rağmen serolojik testlerin tanısal doğruluğu düşüktür ve sadece *H. pylori* tarama testi olarak kullanılmasını önerilmektedir (82, 86). Ayrıca tam kan veya parmak ucu kan örneklerinin kullanıldığı 4-10 dakika gibi kısa sürede sonuçlanabilen kart testleri de mevcuttur. Bu hızlı immunolojik testlerin laboratuvar ortamında yapılan ELISA yöntemlerine oranla sensitivitesi daha düşüktür. Negatif çıkan yöntemlerin ELISA yöntemi veya ÜNT ile doğrulanması gerekir.

Serolojik olarak hasta başı testleri, bir damla kan ya da serum ile uygulanabilen, tükürük ve idrarda IgG saptayan testler geliştirilmiş ama bunların duyarlılık ve özgüllükleri düşük bulunmuştur (91-93).

#### 2.7.2.1.3. Dışkıda Antijen Arayan Testler

*H. pylori*'nin dışkıda antijenlerinin tanımlanmasında FDA tarafından onaylanmış, mikro kuyucuklara poliklonal antikorların tesbit edildiği bir ELISA testi olan "Premier platinum HpSA (Meridian, Cincinnati, Ohio)" ticari olarak elde edilebilen ilk testtir (94). *H. pylori*'nin katalazına karşı monoklonal olarak geliştirilmiş dışkıda antijen testleri de vardır (Amplified-IDEA-HpStar; DaKo, Glostrup, Danimarka). Testlerin içinde en güvenilir olanı monoklonal antikorların kullanıldığı ELISA testidir (duyarlılık % 96,

özgüllük % 97). Dışkıda antijen arayan hızlı testler oldukça umut vericidir, ancak ileri araştırmalara ve değerlendirmelere gereksinim vardır (39).

#### 2.7.2.1.4. Dışkıda Moleküler Tanı Testleri

Gaitada *H. pylori* spesifik genomunun moleküler yöntemlerle gösterilmesi, non-invazivliğinin ve duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olmasının yanında deneyimli personel ve özel ekipmanı gerektirmesi ve kısmen maliyetinin yüksek olması nedeniyle rutin tanıda kullanılmamaktadır. Dışkı PCR inhibitörleri açısından çok zengindir. Bu nedenle uygulanacak DNA ekstraksiyon yöntemi ve inhibitör uzaklaştırılması dışkıda PCR uygulamasında çok önemlidir. Ayrıca, reamplifikasyon, nested PCR yöntemleri dışkıda *H. pylori* saptanmasında testin duyarlılığını arttıracaktır (86).

#### 2.7.2.2. İnvaziv Testler

##### 2.7.2.2.1. Mide Biyopsi Örneklerin Alınması ve Transportu

Üst gastrointestinal sistem endoskopisiyle, farklı alanlardan birden çok biyopsi örneği alınmalıdır. Toplam mide yüzey alanının 800 cm<sup>2</sup> olduğu düşünüldüğünde, invaziv testler mide mukozasının çok küçük bir alanını inceleyebilmektedir. *H. pylori*'nin gastrik antrumdaki yamasal dağılımı biyopsiye dayalı tanı yöntemlerinde örnekleme hatalarından kaynaklanan yalancı negatifliklere sebep olduğundan, antrum ve korpustan en az ikişer biyopsi örneği alınmasını gerektirir. Biyopsi örneklerinden invaziv testlerin hemen uygulanamadığı durumlarda, taşıyıcı besiyeri olarak; %4 glukozlu izotonik salin, %20 glukoz solusyonu, beyin kalp infüzyon buyyonu (BHI), tioglikolatlı sıvı besiyeri, nutrient sıvı besiyeri, Brucella broth ve Stuart'ın taşıyıcı besiyeri kullanılabilir. Örneklerin taşınmasında serum fizyolojinin de kullanışlı olacağına yönelik raporlar mevcuttur (95). Serum fizyolojik içine alınan biyopsi örneğinde bakteri canlılığını 2 saat sürdürür. İnceleme, 3-24 saat sonra yapılacaksa Stuart transport besiyeri, 24 saatten sonra yapılacaksa %10 gliserollü buyyonda -70 C° veya sıvı nitrojende biyopsi dondurulmalıdır. Gliserol içeren besiyerleri diğer besiyerlerinin aksine hem transport hem de saklama amaçlı kullanılmaktadır. Taşıma ısısı mutlaka +4C° olmalıdır. *H. pylori* oda ısısında canlılığını 2 saat sürdürebilir (59).

### 2.7.2.2.2. Histopatolojik Muayene

Histopatolojik inceleme invaziv yöntemler içerisinde altın standart olarak kabul edilen ve en yaygın kullanılan yöntemdir (82, 96). *H. pylori*'nin histolojik incelemesinde, epitel hücreleri yüzeylerinde, özellikle lümen ve mukus tabakası içinde kümeler halinde kalın spiral basiller şeklinde izlenmektedir (59). Biyopsi örneğinden lam üzerinde ezilerek hazırlanan yaymaların Gram yöntemiyle boyanarak incelenmesi ile kısa zamanda sonuç alınabilmektedir (97). Hematoksilen-Eozin ile *H. pylori* soluk pembe boyanmış spiral bakteriler olarak görülür, kolay bir metot olmakla birlikte 24 saat gerektirir ve yalancı negatif sonuçlar oluşabilir. Warthin-Starry gümüş boyası organizmaları olduğundan büyük göstererek daha belirgin hale getirir. Bakteriler sarı zeminde siyah spiral organizmalar olarak görülür. Gastrik mukozaya yapışık *H. pylori*'nin gösterilmesinde ise Giemsa ve Modifiye Steiner gümüş boyama yöntemleri gibi çeşitli özel boyama yöntemleri kullanılır. Rutin Giemsa boyama ise bazı araştırmacılar tarafından Warthin-Starry boyamaya eşdeğer bulunmuştur. Giemsa ile doku kesitlerinde *H. pylori* koyu mavi boyanmış spiral bakteriler olarak görülür. Floresan boya akridin oranjla da yaklaşık aynı sonuçlar alınmaktadır fakat floresan mikroskop gerektirir. Ayrıca Steiner silver boyası, Alcian blue ve hemotoksilen ile eozin boyasının birleşimini içeren duyarlı boyama teknikleri de geliştirilmiştir (59, 82, 98).

### 2.7.2.2.3. Kültürde İzolasyon

*H. pylori*'nin seçici kültür ortamlarında üretilmesi tanıda altın standarttır. Ancak bu yöntem örneğin sayısı veya büyüklüğü, örnekteki bakteri miktarı, örneğin taşınma şekli ve süresi, kullanılan besiyerleri ve inkübasyon şartları ile çalışanın tecrübesine dayanarak değişken duyarlılık gösterir.

*H. pylori* kültürü yapılırken daha fazla oranda bakteriyi açığa çıkarmak için gastrik biyopsi örneğin ezilmesi ve parçalanması önerilmektedir. Ancak PCR yapılacaksa kontaminasyonu önlemek için tek kullanımlık parçalayıcı önerilmektedir (39). Hazırlanan biyopsi süspansiyonu taze besiyerine hemen ekilmelidir. Materyal seçici olmayan kanlı agara ekilebilir. Bunun için Brucella, beyin kalp infüzyon, columbia, wilkins chalgren ve triptikaz soy agara %5 koyun veya at kanı eklenmiş besiyerleri ve antibiyotik eklenmiş seçici besiyerleri kullanılabilir. En iyi performans vankomisin, amfoterisin B, trimetoprim ve kolistin veya sefsuladin eklenmiş %5-10 at veya koyun kanlı veya odun kömürlü

besiyeri ile alınmıştır (39, 59). İnkübasyon, 37°C'de nemli, özel ettüvler veya kavanozlar tarafından sağlanan, mikroaerobik atmosferde (% 5 O<sub>2</sub>, % 10 CO<sub>2</sub>, % 85 N<sub>2</sub>) yapılmalıdır. Primer kültürde üreme 3-7 günde gerçekleşirken, subkültürde üreme daha hızlı olup 2-4 günde gerçekleşir (39, 59).

Son zamanlarda *H. pylori* kültürü için non-endoskopik gastrik string test önerilmiştir. Hastalara ip yutturulduktan 1 saat sonra ipe yapışan organizmalar kültüre edilir. String test kültürü endoskopik biyopsi kültürü ile karşılaştırıldığında sonuçların tatminkar olduğu gözlenmiştir (59).

#### 2.7.2.2.4. Hızlı Üre Testi

*H. pylori* büyük miktarda hücre dışı üreaz oluşturur; bu üreaz aktivitesi, üre içeren bir besiyerine mide biyopsi örneklerinin konulmasıyla saatler içinde tesbit edilebilir. Üreaz, ürenin amonyak ve karbamata hidrolizinde katalizördür. Amonyak üretiminin direkt etkisi bölgesel pH'yı artırmasıdır. Biyopsi örnekleri, pH indikatörü içeren bir agar jel veya kağıt şerit üzerine konur, örnekte yeterli sayıda bakteri varsa üreazın üreyi parçalaması ve amonyak oluşumundan dolayı renk değişikliği görülür (99, 100). Yapılan kantitatif çalışmalarda örnekte en az 10<sup>4</sup> bakteri olması halinde pozitif sonuç alınmaktadır (101). Örnek gastrik kıvrımdan veya antrumdan ve çok sayıda alındığında duyarlılık artar (39).

#### 2.7.2.2.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

Moleküler tanı yöntemleri *H. pylori*'nin kültür ortamında üretilenlerinin yanı sıra tükrük, diş plakları, mide sıvısı ve biyopsi örnekleri ile dışkı gibi çeşitli klinik örneklerdeki mevcudiyetinin gösterilmesi ve spesifik virulans faktörlerinin tayini ve suşlar arasındaki genetik farklılıkların saptanması, konakta oluşan klinik varyasyonların genetik temeli, antibiyotik direncine neden olabilecek mutasyonların tanınması, tedavi sonrası tekrarlayan enfeksiyonların tesbiti ve kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi farklı amaçlar için de kullanılmaktadır (100). *H. pylori* ile yapılan moleküler düzeyli çalışmalarda, suşların özgül nükleik asit bölgelerinin PCR, RT-PCR, nested seminested-PCR, kalitatif-kantitatif PCR, multipleks PCR, RAPD, FISH, AFLP-PCR, RFLP ve PCR-RFLP gibi amplifikasyon ve restriksiyon bazlı finger-printing yöntemleri ile DNA dizi analizi ve mikroarray yöntemi gibi modifiye moleküler teknikler kullanılmıştır (31, 102).

Amplifikasyon yöntemleri ile *H. pylori*'nin 16S rRNA geni, *cagA*, *vacA* ve allelleri, *cagE* ve alleli, *iceA* ve allelleri, *babA* ve *babB*, *ureA*, *ureB* ve *ureC* (*glmM*) geni, RNA polimeraz alt ünitlerini kodlayan *rpoB* ve *rpoD* genleri ve HP0638 gibi özgül ve virulansla ilgili olduğu düşünülen genlerin varlığı araştırılmıştır (86, 103-105).

## 2.8. Yaptığı Hastalıklar

### 2.8.1. Gastroözefajiyal Reflü Hastalığı

Gastroözefajiyal reflü hastalarında yapılan çalışmalarda *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı genel popülasyona göre daha düşük bulunmuştur. Bu durumun nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, *H. pylori* enfeksiyonunun mide pH'sını yükseltmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (106, 107).

### 2.8.2. Gastrit

*H. pylori*, ya çeşitli sitotoksinler ve üreaz gibi enzimlerle direkt olarak veya otoimmün cevabı başlatarak indirekt yollarla gastrik mukozada hasara yol açmaktadır. *H. pylori*, mide mukozasında hem korpus, hem de antrum bölgesinde yerleşmesine karşın, *H. pylori* (+) gastritler en sık antral kronik gastrit olarak antrumda daha belirgindir. Asit salgılayan bölümün mikroorganizmaya dirençli olduğu düşünülmektedir (33, 108-110).

### 2.8.3. Mide Ülseri

Mukozadan başlayarak muskularis mukozayı da içine alan lokalize bir doku kaybı olan ülser, kronik gidişli ve tekrarlayıcı bir hastalıktır. Agresif faktörlerle doğal savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişir. Ülser etyopatogenezinde önemli bir yer tutan *H. pylori*, mide ülserli hastaların %50-85'inde etkendir. *H. pylori* eradikasyonu yapılan olgularda ülser nüksü oranında belirgin bir azalma olduğu görülmüştür (4, 33).



#### 2.8.4. Duodenal Ülser

Duodenal ülserli hastaların yaklaşık %90-95'inde antrumda enflamasyon ve *H. pylori* varlığı gösterilmiştir (33, 111). Ülser gelişiminde *H. pylori*'nin doku hasarı oluşturan virulans gen ürünlerinin katkısı olduğu gösterilmiştir (8, 12, 15).

#### 2.8.5. Non-Ülser Dispepsi

Non-ülser dispepside, hastanın semptomlarını açıklayacak klinik, biyokimyasal, endoskopik ve ultrasonografik olarak organik bir bozukluk bulunmaz. Yapılan çalışmalarda non-ülser dispepsili hastalarda *H. pylori* prevalansı % 43-87 oranında bulunmuştur (112). Nonülser dispepsili hastalardaki ve asemptomatik bireylerdeki *H. pylori*'nin nonpatojen veya daha az virulan olabileceği de belirtilmektedir (113).

#### 2.8.6. Mide Kanseri ve MALT Lenfoma

Mideye kolonize olan *H. pylori*, burada nitratları nitritlere dönüştürmekte ve oluşan nitritlerin aminlerle birleşmesi sonucunda, kanserojenik etkiye sahip olan N-nitrozo bileşikleri oluşmaktadır (114). *H. pylori* enfeksiyonlarının özellikle kardial mide adenokarsinomunun, primer mide B hücreli lenfomasının ve ayrıca MALT lenfomanın etiyojisinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Günümüzde, *H. pylori* enfeksiyonlarının kanser riskini üç-on kat artırdığı ortaya konmuştur (115, 116).

#### 2.8.7. Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar

Son zamanlarda yapılan çalışmalar; kardiyovasküler, immünolojik ve diğer bazı patolojiler gibi sindirim sistemi dışı hastalıklarla *H. pylori* arasında bir ilişki olduğunu düşündürmüştür. Özellikle iskemik kalp hastalarında daha yüksek *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı bildirilmiştir. *H. pylori* ile Behçet, Sjögren sendromu gibi bazı otoimmün hastalıklar arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Ayrıca, karaciğer ve safra yolu hastalıkları, inflamatuvar bağırsak hastalığı, ürtiker, akne rozasea gibi deri hastalıkları, ITP, demir eksikliği anemisi, megaloblastik anemi gibi hematolojik hastalıklar, astma, alerji ve romatoid hastalıklar arasında da muhtemel bir ilişkinin varlığından söz edilmiştir (3, 117).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hasta Grupları ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya; Haziran 2009-Kasım 2009 tarihleri arasında, çeşitli dispeptik yakınmalarla Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Gastroenteroloji Bilim Dalı kliniğine başvuran ve tanı amaçlı endoskopi yapılması uygun görülen 176 hasta dahil edildi. Antrum ve korpus bölgelerinden ikişer adet olmak üzere her hastadan toplam 4 biyopsi örneği alındı. Hastalar endoskopik tanılarına göre iki gruba ayrıldı. Endoskopik olarak gastrik/duodenal mukozal hasarı (gastrik/duodenal ülser, gastrik/duodenal erozyon, duodenit, gastrit, özefajit) olan hastalar “Grup1”, herhangi bir gastroduodenal mukozal hasarı olmayan sağlam mukozalı hastalar ise “Grup2” olarak tanımlandı. Araştırma, bu tanı grupları üzerinden karşılaştırmalı olarak yapıldı.

Mide biyopsi örnekleri %0.9'luk serum fizyolojik içerisine alınarak soğuk koşullarda, en geç 1 saat içinde laboratuvara ulaştırıldı ve *H. pylori* genotiplemesi için kullanılmak üzere mikrobiyolojik inceleme ve kültür ekimi işlemlerine başlandı.

##### 3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızda kullanılan başlıca araç ve gereçler; Otoklav (Kermanlar), etüv (Mommert), desikatör, sıcak su küveti (GFL-1086), hassas terazi (Sartorius), vortex (Heidolph), pH ölçer(Hanna), -20°C (Philco) ve -80°C (Nuair) derin dondurucular, buz makinesi (Scotsman), buzdolabı, mikrodalga fırın, sıcak kuru bloklar (hot dry block), Otomatik pipetler ve pipet uçları (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl), santrifüj (Sigma), thermal-cycler (Techne), UV Transilluminatör (Vilber Lourmat), Elektroforez tankı (Owl), Güç kaynağı (E-C 105 LVD), Homojenizatör (IKA Ultra – Turrax T 25), Görüntüleme sistemi (VersaDoc, BIO-RAD) ve çeşitli cam malzemeler kullanıldı.

### 3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Brucella agar base, Brucella broth base ve Urea Agar Base Christensen (HİMEDİA), dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA Polimeraz, Taq buffer (Fermentas),

Vancomycin, Trimetoprim, Amphotericin B, EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid), Trisma base, proteinaz K, SDS (sodium dodesyl sulfate), Ethidium bromide, Xylene cyanole, bromphenol blue, phenol, isoamyl alcohol (Sigma).

### 3.1.4. Primerler

*H. pylori* ve virulans genlerinin varlığını PCR yöntemiyle göstermek için *üreC* (*glmM*), *vacA sl/s2*, *vacA sla*, *vacA slb*, *vacA slc*, *vacA ml/m2*, *vacA mla*, *vacA mlb*, *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2*, *babA2* genlerine spesifik primerler (İnvitrogen) kullanıldı (Tablo 5).

**Tablo 5:** *H. pylori* ve virulans genlerinin PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler

Gen	Primer dizisi (5'-3'yönünde)	PCR Ürün boyutu (bp)	Kaynak
<i>glmM</i>	AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC	294	104, 118
<i>vacA</i>			
<i>sl/s2</i>	ATGGAAATACAACAAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	259/286	118, 119
<i>sla</i>	GTCAGCATCACACCGCAAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	190	118, 120
<i>slb</i>	AGCGCCATACCGCAAGAG CTGCTTGAATGCGCCAAAC	187	14, 118, 120
<i>slc</i>	CTCTCGCTTTAGTGGGGYT CTGCTTGAATGCGCCAAAC	213	14, 118, 121
<i>ml/m2</i>	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG GCGTCAAATAATTCCAAGG	567/642	118, 119
<i>mla</i>	GGTCAAATGCGGTCATGG CCATTGGTACCTGTAGAAAC	290	14, 121, 122
<i>mlb</i>	GGCCCCAATGCAGTCATGGAT GCTGTTAGTGCCTAAAGAAGCAT	291	14, 121
<i>cagA</i>	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA TTAGAATAATCAACAAACATCAGCCAT	298	118
<i>cagE</i>	TTGAAAACCTCAAGGATAGGATAGAGC GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC	508	118, 123
<i>iceA1</i>	GTGTTTTTAACCAAAGTATC CTATAGCCATTATCTTTGCA	247	118, 124-126
<i>iceA2</i>	GTTGGGTATATCACAATTTAT TTCCCTATTTTCTAGTAGGT	229/334	118, 125-127
<i>babA2</i>	CCAAACGAAACAAAAAGCGT GCTTGTGTAAGCCGTCGT	271	118, 128, 129

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Klinik Örneklerin Mikrobiyolojik Yönden İncelenmesi

Soğuk koşullar altında ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırılan mide biyopsi örnekleri öncelikle Brucella agara ekimleri yapıldı, sonrasında direkt mikroskopik inceleme için direkt preparatları hazırlandı ve en son üreaz besiyerine batırılan doku örneklerinin üreaz aktivitesi test edildi.

##### 3.2.1.1. Klinik Örneklerin Mikroskopik İncelenmesi

Boyama yöntemi olarak gram boyama tercih edildi. Midenin antrum ve korpus bölgelerinden alınan biyopsi örneklerinin her birisi için ikişer tane olmak üzere bir hasta için toplamda 4 direkt preparat hazırlandı. Örneklerin bir pens yardımıyla temiz bir lam üzerine, 2-3 cm<sup>2</sup>'lik bir alana sürülmesiyle hazırlanan preparatlar alevde tesbit edildi. Preparatlardan birer tanesi boyasız saklandı. Uygulamada preparatlar kristal viyole ile 1 dk boyandı, lugol solüsyonunda 1 dk bekletildi ve su ile yıkandı, aseton-alkol ile 15 sn dekolore edildiikten sonra karşıt boya olarak sulu fuksin ile 30 sn boyandı ve su ile yıkanarak artık boyadan temizlendi. Boyalı preparatlar kurutulduktan sonra mikroskop altında 100x büyütmede, gram negatif, martı kanadı veya S biçimindeki kıvrık bakteriler olan *H. pylori*'nin varlığı açısından incelendi.

##### 3.2.1.2. Doku Örneklerinde Üreaz Aktivitesinin Araştırılması

Doku örneklerinde *H. pylori*'nin üreaz aktivitesinin araştırılması için Urea Agar Base (Christensen) kullanıldı.

##### Urea Agar Base (Christensen)'in hazırlanışı:

24 gram toz besiyeri 950 ml distile suda çözüldü. Final pH'sı 7.0 olarak hazırlanan besiyeri otoklavda steril edildikten sonra 50°C'ye soğutularak içine önceden hazırlanmış ve steril edilmiş %40'lık üreden 50 ml eklendi ve steril petri kutularına dökülerek kullanıma hazır hale getirildi. Besiyerindeki renk indikatörüne (fenol kırmızısı) bağlı olarak ortam renginin sarıdan pembeye dönüşmesi üreaz aktivitesinin pozitif olduğunu gösterir.

Çalışmamızda doku örnekleri bu besiyeri içine gömülerek 37°C'de 1 saat bekletildi ve süre sonunda ortam renginin sarıdan pembeye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.2.1.3. *H. pylori*'nin Kültür ve İzolasyonu

*H. pylori*'nin izolasyonunda Brucella agar base kullanıldı.

#### Brucella agar base'in hazırlanışı :

Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde 43.1 gram toz besiyeri 1000 ml distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de, 15 dakikada steril edildi. 50°C'ye soğutulmuş %5 insan kanı ilave edildi. Donma ısısına gelen besiyeri içerisine steril petri kutularına dökülmeden hemen önce 10 mg/L vancomycin (Sigma), 5 mg/L trimethoprim (Sigma) ve 1 mg/L amphotericin B (Sigma ) ilave edildi. Besiyerleri daha sonra petri kutularına döküldü.

Bir pens yardımıyla doku örneklerinin mukuslu tabakası besiyerinin 1/3'lük kısmına sürüldü ve sonrasında steril bir öze yardımıyla bu sahanın üzerinden geçilerek örneğin 3 yönlü ekimi yapıldı. İnokülasyonu yapılan besiyerleri özel desikatörler içine yerleştirildi. Bir vakum yardımıyla desikatör içerisindeki atmosfer havası boşaltılarak yerine %5 O<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %85 N<sub>2</sub> (nitrojen) içeren mikroaerofilik gaz karışımı verildi. 37°C'lik etüvde inkübe edilen kültürler üremenin tespiti için 3., 5. ve 7. günlerde kontrol edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde üreyen yaklaşık olarak 0.5 mm çapında hemolizsiz, gri, şeffaf kolonilerin *H. pylori* olabilirliği mikroskopi, oksidaz testi, katalaz testi ve üreaz aktivitesi yönünden değerlendirildi.

#### 3.2.1.3.1. Mikroskopi

Kültürdeki *H. pylori* olması muhtemel gri, şeffaf kolonilerden hazırlanan preparatların gram boyaması yapılarak 100x büyütmede, mikroskop altında incelendi ve morfolojik olarak değerlendirildi.

#### 3.2.1.3.2. Oksidaz Testi

Besiyerindeki *H. pylori* şüpheli kolonilerin sitokrom oksidaz varlığı oksidaz testi yapılarak değerlendirildi. Test için koloniler steril bir öze yardımıyla besiyerinden alınarak bir filtre kağıdında ezildi. Üzerine oksidaz ayırıcı olan N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine-dihydrochloride (TMPD) 'in %1'lik çözeltisinden bir damla

damlatılarak 30 saniyeye kadar mor renk oluşumu gözlenen izolatlar oksidaz testi yönünden pozitif olarak kabul edildi.

#### **Oksidaz ayırıcının hazırlanışı:**

N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine-dihydrochloride (TMPD)	1 gr
Distile su	100 ml

Hazırlanan ayıraç ışık ve oksijene karşı dayanıksız olduğundan alüminyum folyo sarılmış eppendorf tüplerinde küçük hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

#### **3.2.1.3.3. Katalaz Testi**

Katalaz testi için besiyerindeki bakteri kolonilerinden steril bir öze yardımıyla bir miktar alınarak temiz bir lam üzerine bırakıldı. Üzerine bir iki damla %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) damlatılıp bir kürdan ile karıştırıldı. Köpürme şeklindeki gaz kabarcığı oluşumları pozitif olarak değerlendirildi.

#### **%3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinin hazırlanışı:**

%30'luk H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> stok çözeltisi	10 ml
Distile su	90 ml

#### **3.2.1.3.4. Üreaz Testi**

Üreaz besiyerine konulan bakterilerin besiyeri rengini sarıdan pembeye dönüştürmesi pozitif olarak değerlendirildi.

#### **3.2.1.4. Saf Kültürlerin Elde Edilmesi**

Yapılan mikrobiyolojik incelemeler sonucunda, *H. pylori* olduğuna kanaat getirilen kolonilerin Brucella agar besiyerine tek koloni pasajları yapıldı. Yeterli sürede inkübasyonu yapılan kültürlerde üretilen koloniler, steril bir öze yardımıyla toplanıp daha önceden hazırlanan, içinde %20 gliserol ilave edilmiş 400 µl Brucella broth bulunan eppendorf tüplerine alındı. İyice vortekslendi ve -80°C'de saklanan %70'lik etil alkol yardımıyla şoklama yapılarak hızlıca donduruldu. Daha sonra bu tüpler, bakteriden DNA izolasyonu yapılmak üzere -80°C'de saklandı.

### **%20 gliserol ilaveli Brucella broth base'in hazırlanışı:**

14.05 gram toz besiyeri 500 ml distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de, 15 dakikada steril edildi. Üzerine otoklavda steril edilmiş gliserinden 125 ml ilave edildi ve steril eppendorf tüplerine 400 µl olacak şekilde dağıtıldı.

### **3.2.2. PCR Uygulamaları**

#### **3.2.2.1. *H. pylori*'nin Kromozomal DNA İzolasyonu**

Bu çalışmada *H. pylori* DNA'sının izolasyonu için hem doku biyopsi örneklerinin kültür ekimleri ile elde edilen izolatlardan hem de kültür ortamında üretilemeyen ama direkt mikroskopisi ve/veya üreaz aktivitesi pozitif olan doku biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı. *H. pylori* DNA'sının izolasyonu için Proteinaz-K, fenol-kloroform-izoamilalkol ekstraksiyon yöntemi kullanıldı.

Kültürde üremesi olmayan doku örnekleri, 0.5 ml %0.9'luk serum fizyolojik bulunan tüpler içinde steril homojenizatör yardımıyla 6.500 devir /dk hızda parçalandı. Parçalanarak süspansiyon edilen doku örneklerinin içine 0.5 ml TE tamponu (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) eklendi, vortekslenildi ve 10.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatantı döküldü. Bu yıkama işlemi pellete 1 ml TE tamponu eklenerek iki kez daha tekrarlandı. Pellet üzerine 0.5 ml TE tamponu ilave edilerek kültür suşları ile beraber DNA izolasyonu yapılmak üzere -20°C'de saklandı.

Brucella broth besiyerinde saklanan stok kültür suşları oda ısısında çözüldükten sonra 200 µl'si pipetlenerek 800 µl TE tamponu bulunan tüp içinde süspansiyon edildi, vortekslenildi ve 10.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatantı döküldü. Yıkama işlemi pellete 1 ml TE tamponu eklenerek iki kez daha tekrarlandı. Pellet üzerine 0.5 ml TE tamponu eklenerek stok süspansiyonlar elde edildi. Bundan sonraki DNA izolasyon işlemleri hem kültür suşları hem de doku örnekleri için aynı şekilde uygulandı.

Temiz ve steril eppendorf tüpleri içine 200 µl stok süspansiyonlardan, 200 µl lizis tamponundan (20 mM Tris HCL, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, %0.5 sodyum dodesil sülfat, 20 µg/ml Proteinase K, pH 8.0) pipetlendi, vortekslenildi ve sıcak su küvetinde 56°C'de, 2 saat sonrasında ise sıcak kuru bloklarda 95°C'de 10 dk inkübe edildi. Inkübasyon sonrası tüpler içerisine +4°C'de bekletilmiş tamponlu fenolden 400 µl eklendi, 3 dk boyunca tüpler alt üst edilerek çalkalandı. Sonrasında 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj

edilerek fenolle beraber DNA dışındaki diğer hücre artıkları çöktürüldü. Çöktürülen pellete dokunulmadan süpernatant temiz steril tüplere aktarıldı, üzerine 400 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) karışımından eklendi ve yine 3 dk boyunca tüpler alt üst edilerek çalkalandı. Karışım 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek geride kalan eser miktardaki fenolünde kloroformla bağlanarak çöktürülmesi sağlandı. Yine süpernatant kısmı pellete dokunulmadan steril tüplere alındı. Bu aşamaya kadar yapılan işlemler sonucunda aquöz içinde çözülmüş bakteri DNA'sı elde edildi. Aquöz üzerine 40 µl 3M sodyum asetat (pH 5.0) ve sonrasında -20°C'de bekletilen %100'lük etanolden 800 µl ilave edilerek 1 saat süresince -20°C'de bekletilip çözülmüş DNA'nın presipite olması sağlandı. 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Yine -20°C'de bekletilen %70'lik etanolden 500 µl ilave edilip 12.500 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek yıkanan DNA, etanolün uzaklaşması için pastör fırınında 65°C'de en az 15 dk kurutuldu ve üzerine ilave edilen 200 µl TE tamponu içinde çözündürülerek araştırılacak olan gen bölgelerinin PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### 3.2.2.2. *H. pylori* Virulans Genlerinin Amplifikasyonu

*H. pylori* ve virulans genlerinin varlığını PCR yöntemiyle göstermek için *ureC* (*glmM*), *vacA s1/s2*, *vacA s1a*, *vacA s1b*, *vacA s1c*, *vacA m1/m2*, *vacA m1a*, *vacA m1b*, *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2*, *babA2* genlerinin amplifikasyonları yapıldı. Her bir gen bölgesi için ayrı ayrı hazırlanan PCR reaksiyon master mix'leri, Thermal cycler cihazına yerleştirilerek amplifikasyonları gerçekleştirildi.

#### 3.2.2.2.1. PCR Reaksiyon Master Mix'lerinin Hazırlanması

Öncelikle her bir genin PCR reaksiyonunda kullanılacak olan master mix karışımının komponentleri hazırlandı. Buz üzerinde çalışmak kaydıyla liyofilize haldeki primerler (Tablo 5) steril distile su ile 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırılarak stok primerler elde edildi. Her bir stok primer çiftinden 10'ar µl alınıp 180 µl distile su bulunan steril eppendorf tüplerine ilave edilerek 10 µM konsantrasyonunda primer mix'ler elde edildi. Primer mix'ler spesifik olacak şekilde her bir gen bölgesi için ayrı ayrı hazırlandı. dNTP mix'in hazırlanmasında, 100'er mM konsantrasyondaki dATP, dTTP, dCTP, dGTP'lerin her birinden 20 µl alınıp 720 µl distile su bulunan steril eppendorf tüplerine



ilave edilerek 2.5 mM konsantrasyonunda dNTP mix elde edildi. Son total reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde *H. pylori* kültüründen ya da mide biyopsi örneklerinden izole edilen genomik DNA template 10 µl, dNTP mix 200 µM, 10X Taq buffer with KCl (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, %0.8 Nonidet P40, pH: 8.8 ) 5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM (*cagA* için 2 mM), her bir primer mix için 0.5 mM (*babA2* için 0.2 mM, *cagA* için 0.3 mM), Taq DNA Polimeraz 1.5 ünite ve steril distile sudan oluşan PCR reaksiyon master mix'i, amplifikasyon aşamalarının gerçekleştirilmesi için Thermal Cycler'a yerleştirildi. Negatif kontrol olarak genomik DNA yerine distile su kullanıldı.

### 3.2.2.2.2. *H. pylori* Virulans Genlerinin Amplifikasyon Aşamaları

İzole edilen DNA örneklerinin *H. pylori*'ye ait olup olmadığının tesbiti ve doğrulanması amacıyla tüm örnekler öncelikle, *üreC* (*glmM*) geninin varlığı açısından PCR ile değerlendirildi. *üreC* (*glmM*) geni için Thermal-cycler'daki amplifikasyon aşamaları 94°C'de 5 dk başlangıç denaturasyonu, 94°C'de 1 dk denaturasyon, 55°C'de 1 dk primerlerin bağlanması (annealing), 72°C'de 1 dk extension (uzama), 72°C'de 7 dk son extension olacak şekilde 35 siklus olarak gerçekleştirildi.

*vacA* geni ve allelleri (*s1/s2*, *s1a*, *s1b*, *s1c*, *m1/m2*, *m1a*, *m1b*) için Thermal-cycler aşamaları aynıydı. 94°C'de 5 dk başlangıç denaturasyonu, 95°C'de 1 dk denaturasyon, 52°C'de 1 dk annealing, 72°C'de 1 dk extension, 72°C'de 7 dk son extension olmak üzere 35 siklus olarak tamamlandı.

*cagA* geni için siklus sayısı tavsiye edildiği üzere (118) artırılıp 45 siklus olacak şekilde 94°C'de 5 dk başlangıç denaturasyonu, 94°C'de 1 dk denaturasyon, 60°C'de 1 dk annealing, 72°C'de 1 dk extension, 72°C'de 7 dk son extension yapılarak amplifikasyon aşamaları gerçekleştirildi.

*cagE* geni için 94°C'de 5 dk başlangıç denaturasyonu, 94°C'de 1 dk denaturasyon, 53°C'de 45 sn annealing, 72°C'de 45 sn extension, 72°C'de 7 dk son extension olmak üzere 35 siklus yapıldı.

*iceA1* ve *iceA2* genleri için amplifikasyon aşamaları benzer olup, 94°C'de 5 dk başlangıç denaturasyonu, 95°C'de 1 dk denaturasyon, 52°C'de 1 dk annealing, 72°C'de 1 dk extension, 72°C'de 7 dk son extension olmak üzere 35 siklus olarak gerçekleştirildi.

Son olarak *babA2* geni için ise amplifikasyon 94°C'de 5 dk başlangıç denaturasyonu, 94°C'de 1 dk denaturasyon, 45°C'de 1dk annealing, 72°C'de 1 dk

extension, 72°C'de 7 dk son extension olmak üzere 30 siklus olarak tamamlandı. Tüm amplifikasyon ürünleri cihaz açılıncaya kadar +4°C'de bekleme konumunda tutuldu.

### 3.2.2.3. Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntüleme

Amplifikasyon ürünlerine etidyum bromidli %2'lik agaroz jelde elektrofrez işlemi uygulandı. UV transillüminatörde amplifiye ürünlerin varlığı araştırılarak jel görüntüleme sistemi ile resimleri çekildi.

Öncelikle elektrofrez için amplifikasyon ürünlerinin yükleneceği %2'lik agaroz jel hazırlandı. 10X TBE (Tris base, borik asit, EDTA, pH: 8.0) stok tamponunun 1/10 distile su ile dilüe edilmesiyle hazırlanan 1X TBE tamponunun 100 ml'sine 2 gr agaroz ilave edildi, mikrodalga fırınında uygun sıcaklıkta eritildi, 60°C'ye soğutuldu ve içerisine 5 µl etidyum bromid (stok 10 mg/ml) eklenerek hava kabarcığı kalmayacak şekilde jel kalıbına döküldü, oda ısısında yaklaşık 20-30 dk soğuyup katılaşması beklendikten sonra tarağı çıkarılarak kuyucuklar oluşturuldu ve elektrofrez tankına yerleştirildi. Tankın içine jel kalıbının üstünü örtecek kadar 1X TBE tamponundan ilave edildi. Amplifiye ürünlerden 10 µl pipetlenerek daha önceden sıvı emmeyen katı bir yüzeyde 2 µl'lik damlalar halinde hazırlanmış olan loading buffer [jel yükleme tamponu: (Bromophenol blue, Xylene cyanol / Glycerol)] ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklendi. Tankın güç kaynağı çalıştırılarak 60 V akım verildi. Bromfenol mavisinin ilerleyişi takip edilerek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında akım kesildi, jel tanktan alınarak UV transillüminatörde ürün bantlarının varlığı incelendi ve jel görüntüleme sisteminde resmi çekildi.

### 3.2.3. İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizinde SPSS 13 paket programı kullanıldı. Grup1 ve Grup2 tanı gruplarının cinsiyet, yaş grupları, *H. pylori* pozitifliği, *H. pylori* virulans genotipleri ve genotip birliktelikleri ile karşılaştırmalarında ki-kare testi kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Testlerin tamamında önem düzeyi olarak  $p < 0.05$  değeri alındı.

#### 4. BULGULAR

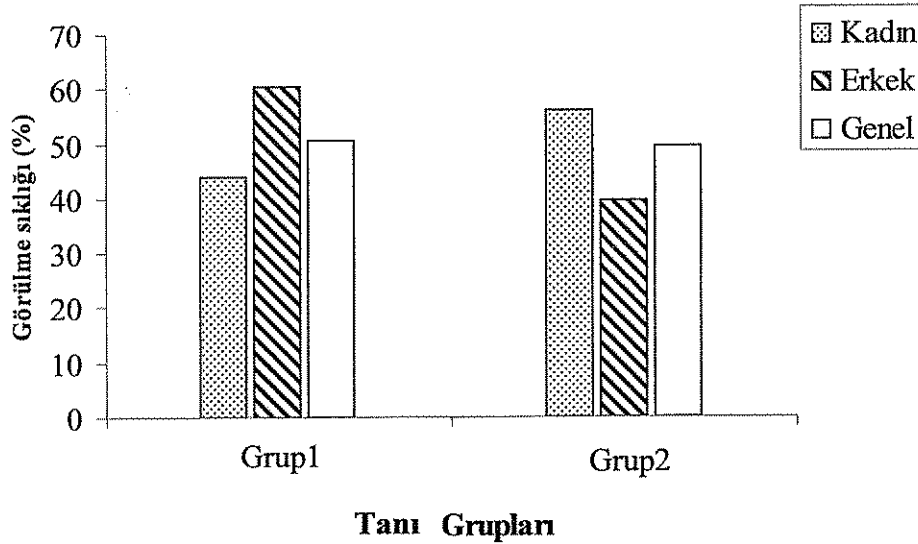
Çalışmaya 105'i (%59,7) kadın, 71'i (%40,3) erkek olmak üzere toplam 176 hastanın antrum ve korpus bölgelerinden alınan mide biyopsi örnekleri dahil edildi. Hastaların 89'u (%50,6) Grup1, 87'si (%49,4) ise Grup2 hastalarından oluşmaktaydı. 105 kadın hastanın 46'sı (%43,8), 71 erkek hastanın 43'ü (%60,6) Grup1 hastalarıydı. Erkek hastalardaki Grup1 endoskopik tanı oranı kadın hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ( $p=0.029$ ) (Tablo 6) (Şekil 1).

**Tablo 6:** Çalışmaya dahil edilen hastaların endoskopik tanı gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.

Tanı grupları	Kadın n (%)	Erkek n (%)	Toplam n (%)	p
Grup1 <sup>a</sup>	46 (43.8)	43 (60.6)	89 (50.6)	0.029
Grup2 <sup>b</sup>	59 (56.2)	28 (39.4)	87 (49.4)	
Toplam	105 (59.7)	71 (40.3)	176 (100.0)	

<sup>a</sup>Gastrik/duodenal mukozal hasarı olan hastalar,

<sup>b</sup>Gastroduodenal herhangi bir mukozal lezyonu olmayan hastalar.



**Şekil 1.** Endoskopik tanılarına göre grupların Kadın-Erkek dağılımları.

Hastaların yaşları 17 ile 81 arasında değişiklik gösteriyordu ve yaş ortalamaları  $37.93 \pm 15.31$  olarak bulundu. Erkek hastaların yaşları 18 ile 80 arasında ve yaş ortalamaları  $37.68 \pm 16.14$  iken kadın hastaların yaşları 17 ile 81 arasında ve yaş ortalamaları  $38.10 \pm 14.80$  olarak saptandı. Kadın hastalarda 31-50, erkek hastalarda ise  $\leq 30$  yaş grubunun diğer yaş gruplarına göre daha yüksek oranlarda olduğu görüldü (Tablo 7).

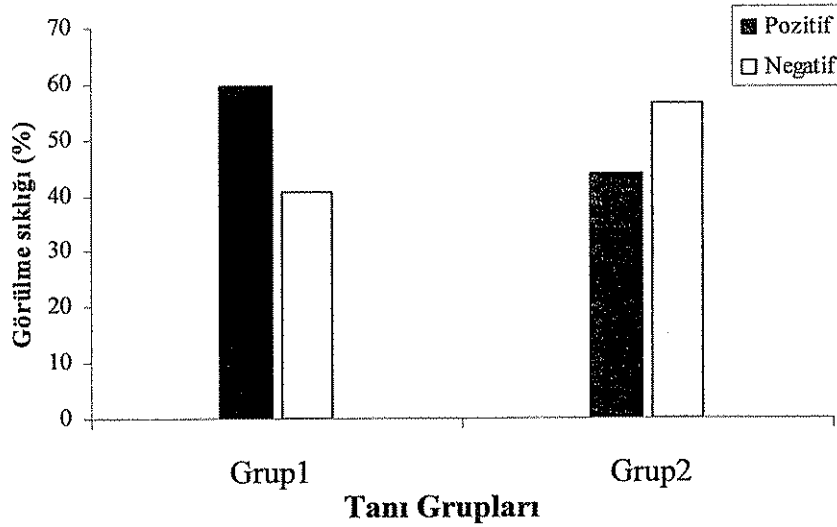
**Tablo 7:** Kadın ve Erkek hastaların yaş ve tanı gruplarına göre dağılımı.

Yaş grubu	Grup1 n: 89 (%)	Grup2 n: 87 (%)	Toplam n: 176 (%)
<b>Kadın</b>			
$\leq 30$	18 (39.1)	21 (35.6)	39 (37.1)
31-50	16 (34.8)	33 (55.9)	49 (46.7)
$\geq 51$	12 (26.1)	5 (8.5)	17 (16.2)
<b>Toplam</b>	46 (43.8)	59 (56.2)	105 (100.0)
<b>Erkek</b>			
$\leq 30$	15 (34.9)	19 (67.9)	34 (47.9)
31-50	19 (44.2)	1 (3.6)	20 (28.2)
$\geq 51$	9 (20.9)	8 (28.6)	17 (23.9)
<b>Toplam</b>	43 (60.6)	28 (39.4)	71 (100.0)

Hastalardan alınan mide biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının gösterilmesinde kullanılan mikrobiyolojik incelemeler mikroskopi, üreaz testi ve kültür yöntemleriyle üç aşamalı olarak gerçekleştirildi. Bu yöntemlerden en az biriyle pozitif olduğu saptanan örneklerin daha sonra *ureC (glmM)*-PCR yöntemiyle doğrulaması yapıldı. Buna göre Grup1'deki 89 hastanın 53'ünde (%59.6), Grup2'deki 87 hastanın 38'inde (%43.7) ve genele bakıldığında 176 hastanın 91'inde (%51.7) *H. pylori* varlığı saptandı. Grup1'deki *H. pylori* pozitifliğinin Grup2'deki hastalara göre daha yüksek bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.035$ ) (Tablo 8) (Şekil 2).

**Tablo 8:** Antrum ve/veya korpus örneklerinde mikrobiyolojik yöntemlerin en az biriyle gösterilen *H. pylori* pozitifliğinin tanı gruplarına göre dağılımı.

	Grup1		Grup2		Toplam		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<i>H. pylori</i>							
Pozitif	53	(59.6)	38	(43.7)	91	(51.7)	0.035
Negatif	36	(40.4)	49	(56.3)	85	(48.3)	
Toplam	89	(50.6)	87	(49.4)	176	(100.0)	



**Şekil 2.** Tanı gruplarının *H. pylori* pozitifliğine göre dağılımları.

Çalışmaya alınan 176 hastanın mide biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* sıklığı %51.7 (n=91) iken kadınlarda bu oran %52.4 (n=55), erkeklerde ise %50.7 (n=36) olarak tesbit edildi. Kadın ve erkek hastalar *H. pylori* pozitifliği açısından homojen bir dağılım gösteriyordu (p=0.827) (Tablo 9).

**Tablo 9:** Antrum ve/veya korpus örneklerinde mikrobiyolojik yöntemlerin en az birisi ile *H. pylori* pozitifliğinin gösterildiği hastaların cinsiyete göre dağılımı.

	Kadın		Erkek		Toplam		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<i>H. pylori</i>							
Pozitif	55	(52.4)	36	(50.7)	91	(51.7)	0.827
Negatif	50	(47.6)	35	(49.3)	85	(48.3)	
Toplam	105	(59.7)	71	(40.3)	176	(100.0)	

*H. pylori* pozitifliği saptanan 91 hastanın mide biyopsi örneklerinin mikrobiyolojik incelemelerinde 91'inin mikroskopik incelemesi, 73'ünün kültürü, 43'ünün üreaz testi ve tamamının PCR yöntemiyle yapılan *ureC* gen tespiti pozitif olarak saptandı. Bu 91 hastada PCR yöntemiyle virulans gen araştırması için yapılan DNA izolasyonunun 73 tanesi kültür izolatlarından, kültürde üretilmeyen 18 tanesi ise direkt mide biyopsi örneklerinden yapıldı.

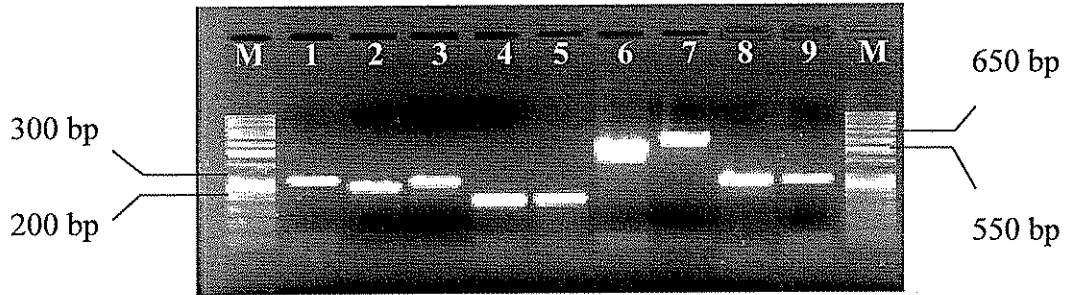
**Tablo 10:** Mide biyopsi örneklerinin en az birinde mikrobiyolojik yöntemlerle *H. pylori* varlığı saptanan 91 hastanın tanı gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı.

Tanı grupları	Kadın		Erkek		Toplam		p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Grup1	29	(52.7)	24	(66.7)	53	(58.2)	0.271
Grup2	26	(47.3)	12	(33.3)	38	(41.8)	
Toplam	55	(60.4)	36	(39.6)	91	(100.0)	

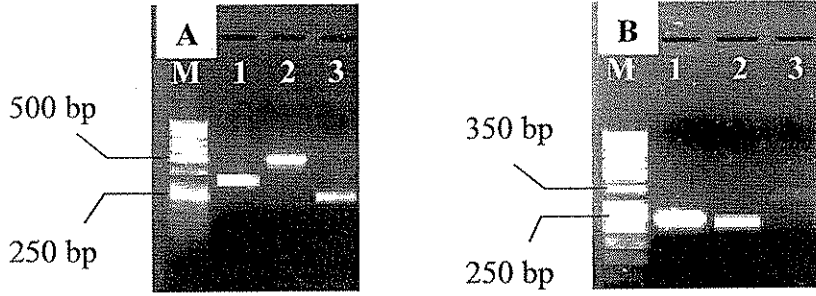
Mide biyopsi örneklerinin en az birinde mikrobiyolojik yöntemlerle *H. pylori* varlığı saptanan 91 hastanın endoskopik tanılarına göre %58.2'si Grup1, % 41.8'i Grup2 hastalarıydı. Hastaların %60.4'ü kadın, %39.6'sı ise erkek hastalardı. Kadın hastalarda Grup1 endoskopik tanı oranı %52.7 iken erkek hastalarda bu oran %66.7 olarak saptandı. Her ne kadar Grup1'deki erkek hastaların oranı kadın hastalara göre daha yüksek bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p=0.271) (Tablo 10).

*H. pylori* izolatlarının virulans gen profillerinin tesbitine yönelik PCR uygulamalarında, 91 hastanın mide biyopsi örneklerinden en az birinde *vacA* geni pozitif

olarak bulundu. Buna karşılık bu 91 hastadan ikisinin hem antrum hem de korpus örneğinden izole edilen suşlardaki virulans gen profillerinin birbirleriyle paralellik göstermediği saptandı. Biri Grup1 endoskopik tanılı diğeri ise Grup2 endoskopik tanılı iki kadın hastaya ait olan bu izolatların birinde *s1a* alleli mevcutken diğesinde ise *s2* alleli varlığı tesbit edildi. Yine bu hastaların birindeki 'm' alleli için de benzer durum söz konusu idi ve izolatların birinde *m1* alleli mevcutken diğesinde ise *m2* alleli varlığı saptandı. Aynı hastaların farklı lokalizasyonlarından izole edilen *H. pylori*'nin iki farklı suşuyla oluşan bu durum bir ko-enfeksiyon mevcudiyetini destekliyordu. Bu iki hasta dışındaki diğeri hastaların antrum ve/veya korpus örneklerinden izole edilen suşlardaki virulans gen profillerinin tamamının aynı olduğu görüldü. Bu nedenle çalışmamızda, bahsedilen bu iki hastadan ikişer suş olmak üzere 91 hastadan izole edilen toplam 93 farklı suşun PCR yöntemiyle virulans gen profilleri değerlendirildi (Şekil 3 ve 4).



**Şekil 3.** *vacA* 's/m' allellerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri; A) M; Marker 1: *üreC* (*glmM*) geni (294 bp), 2. *vacAs1* alleli (259 bp), 3. *vacAs2* alleli (286 bp), 4. *vacAs1a* allel subtipi (190 bp), 5. *vacAs1b* allel subtipi (187 bp), 6. *vacAm1* alleli (567 bp), 7. *vacAm2* alleli (642 bp), 8. *vacAm1a* allel subtipi (290 bp), 9. *vacAm1b* allel subtipi (291 bp), M; Marker.



**Şekil 4.** Diğer virulans genlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri; A) M; Marker, 1. *cagA* geni (298 bp), 2. *cagE* geni (508 bp), 3. *babA2* geni (271 bp). B) 1. *iceA1* geni (247 bp), 2. *iceA2* geni (229 bp), 3. *iceA2* geni (334 bp).

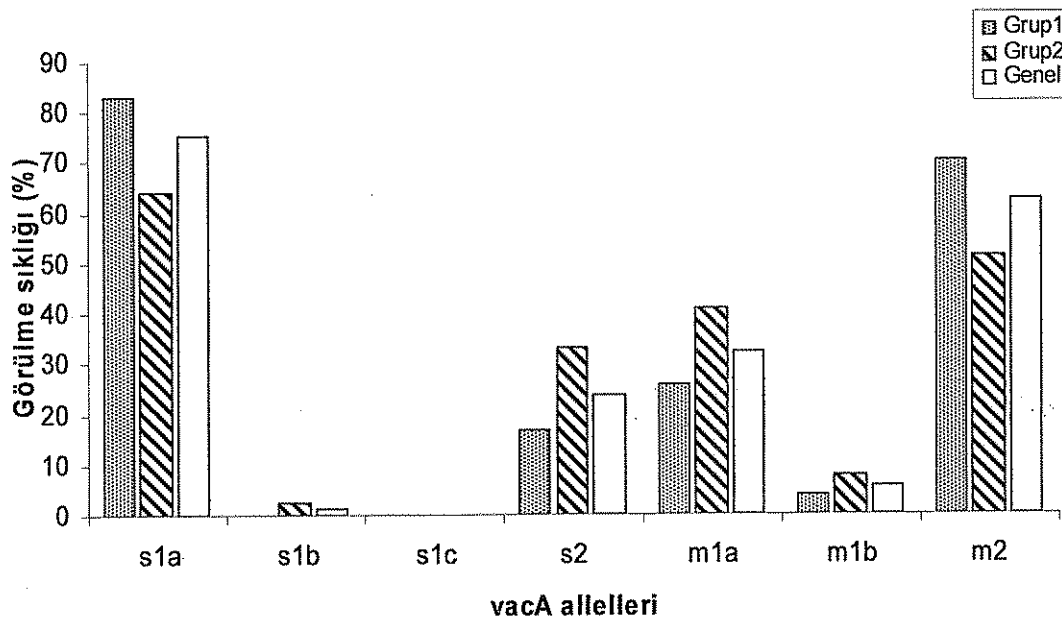
Buna göre Grup1 tanımlı hastalarda *vacA* genindeki 's' bölgesinin allellik varyasyonlarının dağılımı incelendiğinde, en sık tesbit edilen allelin 45 (%83.3) suş ile *vacAs1a* olduğu görüldü. Bunu 9 (%16.7) suş ile *vacAs2* izledi. Benzer şekilde Grup2 tanımlı hastalarda da ilk sırayı 25 (%64.1) suş ile *vacAs1a*, ikinci sıklıkta ise 13 (%33.3) suş ile *vacAs2* allelinin olduğu görüldü. Grup1 tanımlı hastalardaki *vacAs1a* allelinin Grup2 hastalarına göre daha yüksek oranlarda olmasına rağmen bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.060$ ). Genel olarak bizim hasta gruplarımızdaki en sık rastlanan allelin 70 (%75.3) suş ile *vacAs1a* alleli olduğu ve bunu takiben 22 (%23.6) suş ile *vacAs2*'nin izlediği görüldü. Suşların hiçbirinde *vacAs1c* alleli saptanmazken *vacAs1b* allelinin sadece bir suşta bulunduğu ve bunun da Grup2 endoskopik tanımlı bir erkek hastaya ait olduğu görüldü (Tablo 11) (Şekil 5).

'm' bölgesinin allellik varyasyonlarının dağılımı incelendiğinde ise Grup1 hastalarında 38 (%70.4) suş ile *vacAm2*'nin en sık görülen allel olduğu ve bunu 14 (%25.9) suş ile *vacAm1a*'nın takip ettiği saptandı. *vacAm1b* alleli ise sadece 2 (%3.7) suşta mevcuttu. Yine benzer şekilde Grup2 hastalarında da ilk sırayı 20 (%51.3) suş ile *vacAm2*, ikinci sırada ise 16 (%41.0) suş ile *vacAm1a* allelinin olduğu ve *vacAm1b* allelinin de 3 (%7.7) suşta bulunduğu görüldü. Genele bakıldığında 58 (%62.4) suş ile *vacAm2*'nin en sık görülen allel olduğu ve bunu 30 (%32.2) suş ile *vacAm1a*'nın takip ettiği saptandı. Buna karşın *vacAm2*'nin Grup1 hastalarında Grup2 hastalarına göre ve *vacAm1a*'nın da Grup2 hastalarında Grup1 hastalarına göre daha yüksek saptanması istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. ( $p=0.097$  ve  $p=0.189$ ) (Tablo 11) (Şekil 5).



**Tablo 11:** Mide biyopsi örneklerinin en az birinde *vacA* geni pozitif bulunan olgulardaki *vacA* 's/m' allellerinin endoskopik tanı gruplarına göre dağılımı.

<i>vacA</i> 's/m' allelleri	Grup1 n: 54 (%)	Grup2 n: 39 (%)	Toplam n: 93 (%)	p
<b>'s' allelleri</b>				
<i>s1a</i>	45 (83.3)	25 (64.1)	70 (75.3)	0.060
<i>s1b</i>	- (0.0)	1 (2.6)	1 (1.1)	0.419
<i>s1c</i>	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	-
<i>s2</i>	9 (16.7)	13 (33.3)	22 (23.6)	0.105
<b>'m' allelleri</b>				
<i>m1a</i>	14 (25.9)	16 (41.0)	30 (32.2)	0.189
<i>m1b</i>	2 (3.7)	3 (7.7)	5 (5.4)	0.646
<i>m2</i>	38 (70.4)	20 (51.3)	58 (62.4)	0.097



**Şekil 5.** *vacA* allellerinin endoskopik tanı gruplarına göre dağılımı.

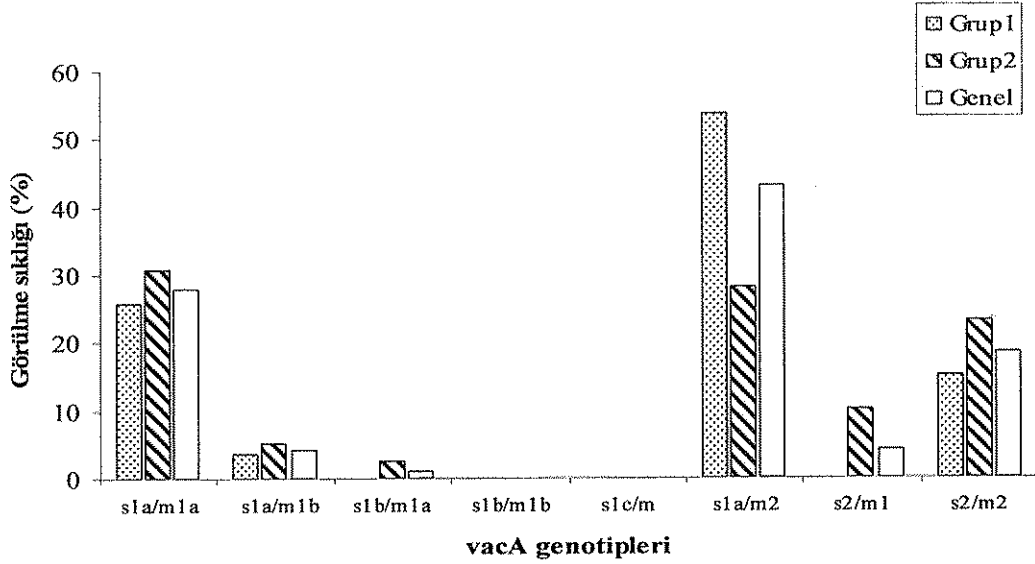
Çalışmaya dahil edilen 93 farklı hasta izolatındaki *vacA* s/m allel genotiplerinin tanı gruplarına göre dağılımları incelendiğinde; Grup1 hastalarından izole edilen *H. pylori*

izolatlarında en sık tespit edilen *s/m* allel genotipinin 29 (%53.7) suş ile *s1a/m2* olduğu görüldü. Bu genotipi 14 (%25.9) suş ile *s1a/m1a* izledi, *s2/m2* genotipi ise 8 (%15.1) suşa saptandı. Grup2 hastalarındaki *vacA* allel genotiplerinin dağılımına bakıldığında ise en sık görülen genotipin 12 (%30.8) suş ile *s1a/m1a* olduğu ve bunu 11 (%28.2) suş ile *s1a/m2* genotipinin izlediği saptandı. Bu hasta grubundaki *s2/m2* genotipi ise 9 (%23.1) suşa gözlemlendi. *s2m1* genotipi Grup1 hastalarının hiçbirinde saptanamazken Grup2 hastalarının 4'ünde (%10.3) tespit edildi. Genel olarak tüm hasta gruplarında kolonize olan suşlardaki en sık görülen genotipin 40 (%43.0) suş ile *s1a/m2* genotipi olduğu ve bunu da 26 (%28.0) suş ile *s1a/m1a*, 17 (%18.5) suş ile *s2/m2* genotipinin izlediği görüldü (Tablo 12) (Şekil 6).

Grup1 hastalarındaki *s1a/m2* genotipinin Grup2 hastalarına göre ve ayrıca Grup2 hastalarındaki *s2m1* genotipinin Grup1 hastalarına göre daha yüksek oranlarda saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.025$  ve  $p=0.029$ ) (Tablo 12).

**Tablo 12:** 93 farklı hasta izolatındaki *vacA s/m* allel genotipleri ile *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* ve *babA2* genotip pozitifliklerinin endoskopik tanı gruplarına göre dağılımları.

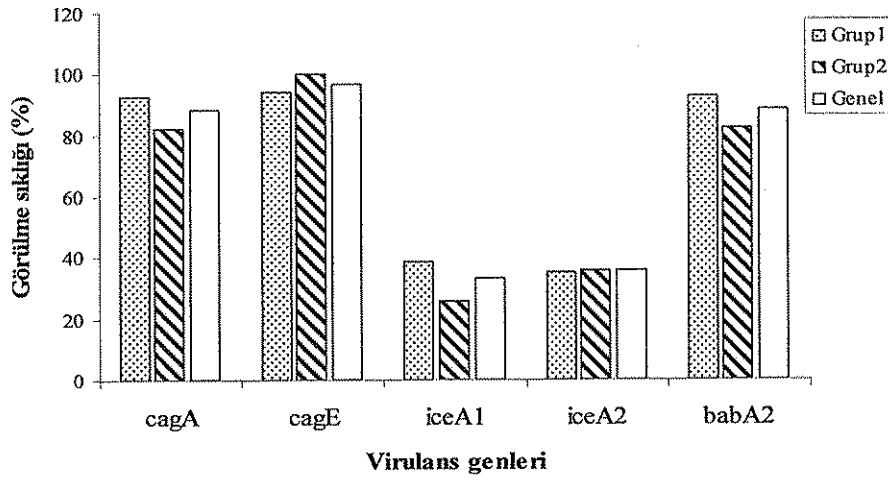
<i>s/m</i> allel genotipleri	Grup1 n: 54 (%)	Grup2 n: 39 (%)	Toplam n: 93 (%)	p
<i>vacA</i>				
<i>s1a/m1a</i>	14 (25.9)	12 (30.8)	26 (28.0)	0.780
<i>s1a/m1b</i>	2 (3.7)	2 (5.1)	4 (4.3)	1.000
<i>s1b/m1a</i>	- (0.0)	1 (2.6)	1 (1.1)	0.419
<i>s1b/m1b</i>	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	-
<i>s1c/m</i>	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	-
<i>s1a/m2</i>	29 (53.7)	11 (28.2)	40 (43.0)	0.025
<i>s2/m1</i>	- (0.0)	4 (10.3)	4 (4.3)	0.029
<i>s2/m2</i>	8 (15.1)	9 (23.1)	17 (18.5)	0.482
<i>cagA</i> <sup>+</sup>	50 (92.6)	32 (82.1)	82 (88.2)	0.192
<i>cagE</i> <sup>+</sup>	51 (94.4)	39 (100.0)	90 (96.8)	0.262
<i>iceA1</i> <sup>+</sup>	21 (38.9)	10 (25.6)	31 (33.3)	0.265
<i>iceA2</i> <sup>+</sup>	19 (35.2)	14 (35.9)	33 (35.5)	1.000
<i>babA2</i> <sup>+</sup>	50 (92.6)	32 (82.1)	82 (88.2)	0.192



**Şekil 6.** *vacA* genotiplerinin endoskopik tanı gruplarına göre dağılımı.

*H. pylori*'nin diğer virulans genleri olan *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* ve *babA2*'nin tanı gruplarına göre dağılımları incelendiğinde; *cagA* genotipi Grup1 hastalarının 50'sinde (%92.6), Grup2 hastalarının 32'sinde (%82.1), genel toplamda ise 82 (%88.2) hastada pozitif olarak belirlendi. Endoskopik tanı grupları ve genotipleri içinde en sık görüleni olan *cagE* geni Grup1 hastalarının 51'inde (%94.4) ve Grup2 hastalarının tamamında olmak üzere toplamda 90 hasta örneğinde (%96.8) pozitif olarak saptandı, *cagE* geni pozitif olan hasta örneklerinin biri dışında hepsi *cagA* pozitif olarak belirlendi, bu tek hasta da peptik ülserli kadın hasta idi. *iceA1*, *iceA2* genlerinin ikisinin birlikte pozitif olduğu suşa rastlanmadı, yani çalışılan suşlarda ya *iceA1* ya da *iceA2* genotipi saptandı veya ikisi de negatifti. *iceA1* genotipi en az tesbit edilen genotip olup 21'i (%38.9) Grup1 ve 10'u (%25.6) Grup2 hastaları olmak üzere 31 hasta örneğinde (%33.3) pozitifdi. *iceA2* genotipi ise Grup1 hastalarında 19 (%35.2), Grup2 hastalarında 14 (%35.9) ve toplamda 33 (%35.5) hasta örneğinde pozitiflik olarak saptandı. *babA2* genotipi 50'si (%92.6) Grup1, 32'si (%82.1) Grup2 hastalarının olmak üzere 82 (%88.2) hasta örneğinde pozitif olarak belirlendi. Grup1 hastalarındaki *cagA*, *iceA1* ve *babA2* gen pozitifliklerinin Grup2 hastalarına göre daha yüksek saptanması istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi. *cagE* genotipi de Grup2 hastalarında daha yüksek saptandı ama bu oran yüksekliği de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. *iceA2* genotipi ise her iki grupta homojen dağılım gösteriyordu ( $p>0.05$ ) (Tablo 12) (Şekil 7).

İki hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori*'nin iki farklı suşuna ait virulans gen profillerine bakıldığında; Grup2 tanıli hastanın antrumundan izole edilen *H. pylori* *s2/m1a*, *cagA*<sup>+</sup>, *cagE*<sup>+</sup>, *iceA*<sup>-</sup>, *babA2*<sup>-</sup> iken korpus örneğindeki *s1a/m2*, *cagA*<sup>+</sup>, *cagE*<sup>+</sup>, *iceA1*<sup>+</sup>, *babA2*<sup>+</sup> genotipine sahip idi. Grup1 tanıli hastanın antrum izolatında *s1a/m2*, *cagA*<sup>+</sup>, *cagE*<sup>+</sup>, *iceA*<sup>-</sup>, *babA2*<sup>+</sup> gen profili bulunurken korpus izolatında ise *s2/m*<sup>-</sup>, *cagA*<sup>+</sup>, *cagE*<sup>+</sup>, *iceA*<sup>-</sup>, *babA2*<sup>+</sup> allel genotipleri saptandı.



Şekil 7. *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* ve *babA2* genlerinin tanı gruplarına göre dağılımı.

Grup1 tanı grubunda *s1a/m1a* genotipine sahip 14 suş ile *s1a/m1b* genotipine sahip 2 suşun tamamında *cagA* geni pozitif iken *s1a/m2* genotipine sahip 29 suştan 26'sında (%48.1) ve *s2/m2* genotipine sahip 8 suştan 7'sinde (%13.2) pozitif olarak belirlendi. Grup2 tanı grubunda ise *s1a/m1b* ve *s2/m1* genotipine sahip suşların tümünde *cagA* geni pozitifliğine karşılık *s1a/m1a* genotipine sahip 12 suşun 11'i (%28.2), *s1a/m2* genotipine sahip 11 suşun 10'u (%25.6) ve *s2/m2* genotipine sahip 9 suşun 5'i (%12.8) pozitif olarak saptandı. *s1a/m2* ve *cagA* birlikteliği Grup1 hastalarında Grup2 hastalarına göre ve yine *s2/m1* ve *cagA* birlikteliği Grup2 hastalarında Grup1 hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.047$  ve  $p=0.029$ ). 93 hasta izolatı içinde tek bir suşta belirlenen *s1b/m1a* genotipinin ise *cagA* geni bulundurmadığı belirlendi. Tüm hasta grubuna bakıldığında *s1a/m1b* ve *s2/m1* genotipine sahip 4 suşun tamamının *cagA* geni bulundurduğu görüldü. Hasta örneklerinin 40'ında bulunan *s1a/m2* genotipine sahip suşların 36'sında (%38.7), 26'sında bulunan *s1a/m1a* genotipine sahip suşların 25'inde (%26.9) ve 17'sinde bulunan *s2/m2* genotipine sahip suşların 12'sinde (%13.0) *cagA* geni

pozitif olarak saptandı. İki hastada bulunan ve hastaların farklı lokalizasyonlarından izole edilen *H. pylori*'nin iki farklı suşuna ait *vacA* allel genotiplerinin de tamamının *cagA* geni bulundurduğu gözlemlendi (Tablo 13).

**Tablo 13:** *vacA* geni pozitif bulunan 93 farklı hasta izolatındaki *s/m* allel genotiplerinin endoskopik tanı gruplarına ve *cagA* geni pozitifliğine göre dağılımları.

<i>s/m</i> allel genotipleri	<i>cagA</i> <sup>+</sup>			p
	Grup1 n: 54 (%)	Grup2 n: 39 (%)	Toplam n: 93 (%)	
<i>s1a/m1a</i>	14 (25.9)	11 (28.2)	25 (26.9)	0.994
<i>s1a/m1b</i>	2 (3.7)	2 (5.1)	4 (4.3)	1.000
<i>s1b/m1a</i>	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)	-
<i>s1a/m2</i>	26 (48.1)	10 (25.6)	36 (38.7)	0.047
<i>s2/m1</i>	- (0.0)	4 (10.3)	4 (4.3)	0.029
<i>s2/m2</i>	7 (13.2)	5 (12.8)	12 (13.0)	1.000
<i>s2/m̄</i>	1 (1.8)	- (0.0)	1 (1.1)	0.419
<b>Toplam</b>	50 (92.5)	32 (81.6)	82 (87.9)	

*vacA* *s/m* allel genotiplerinin hasta gruplarına ve *cagE* birlikteliğine göre dağılımları incelendiğinde, Grup1 hastalarında *s1a/m1b* genotipine sahip 2 (%3.7) suşun tamamında, *s1a/m2* genotipine sahip 29 suşun 28'inde (%51.9), *s1a/m1a* genotipine sahip 14 suşun 13'ünde (%24.1) ve *s2/m2* genotipine sahip 8 suşun 7'sinde (%13.2) *cagE* geni tesbit edilirken Grup2 hastalarında suşların tamamının *cagE* geni bulundurduğu gözlemlendi. Grup1 hastalarındaki %51.9'luk *s1a/m2* ve *cagE* birliktelik oranı ile Grup2 hastalarındaki %10.3'lük *s2/m1* ve *cagE* birliktelik oranı tanı gruplarının diğerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0.039 ve p=0.029). Genel olarak bakıldığında ise hem *s1a/m1b* ve hem de *s2/m1* genotipine sahip 4'er suşun (%4.3) ve *s1b/m1a* genotipine sahip 1 (%1.1) suşun tamamında *cagE* geni mevcut iken *s1a/m2* genotipine sahip 40 suşun 39'unda (%41.9), *s1a/m1a* genotipine sahip 26 suşun 25'inde (%26.9) ve *s2/m2* genotipine sahip 17 suşun 16'sında (%17.4) *cagE* geni varlığı tesbit edildi. Biri Grup1 diğeri ise Grup2'ye dahil olan iki hastadaki kolonize *H. pylori*'nin iki farklı suşuna ait *vacA* allel genotiplerinin de tamamının *cagE* geni bulundurduğu gözlemlendi (Tablo 14).

**Tablo 14:** *vacA* geni pozitif bulunan 93 hasta izolatındaki *s/m* allel genotiplerinin endoskopik tanı gruplarına ve *cagE* geni pozitifliğine göre dağılımları.

<i>s/m</i> allel genotipleri	<i>cagE</i> <sup>+</sup>			p
	Grup1 n: 54 (%)	Grup2 n: 39 (%)	Toplam n: 93 (%)	
<i>s1a/m1a</i>	13 (24.1)	12 (30.8)	25 (26.9)	0.630
<i>s1a/m1b</i>	2 (3.7)	2 (5.1)	4 (4.3)	1.000
<i>s1b/m1a</i>	- (0.0)	1 (2.6)	1 (1.1)	0.419
<i>s1a/m2</i>	28 (51.9)	11 (28.2)	39 (41.9)	0.039
<i>s2/m1</i>	- (0.0)	4 (10.3)	4 (4.3)	0.029
<i>s2/m2</i>	7 (13.2)	9 (23.1)	16 (17.4)	0.339
<i>s2/m<sup>i</sup></i>	1 (1.8)	- (0.0)	1 (1.1)	0.419
<b>Toplam</b>	51 (94.4)	39 (100.0)	90 (96.8)	

93 hasta izolatındaki *iceA* allel genotipleri ile *vacA* geninin 's' allelleri ve *cagA* gen birlikteliklerinin hasta gruplarına göre dağılımları incelendiğinde; Grup1 hasta izolatlarının 18'inde (%33.3) ve tüm hastaların 26'sında (%28.0) olmak üzere en sık görüleni olan *vacAs1*, *cagA*, *iceA1* gen kombinasyonu Grup2 hastalarının 8'inde (%20.5) saptandı. Grup2 hastalarının 10'unda (%25.6) olmak üzere bu grubun en yaygın görülen kombinasyonu olan *vacAs1*, *cagA*, *iceA2* birlikteliği Grup1 hastalarının 14'ünde (%25.9) ve tüm hastaların ise 24'ünde (%25.8) tespit edildi (Tablo 15).

**Tablo 15:** 93 hasta izolatındaki *vacAs1*, *vacAs2*, *cagA* ile *iceA1* ve *iceA2* genotip birlikteliklerinin endoskopik tanı gruplarına göre dağılımları.

Genotip Kombinasyonları	Grup1 n: 54 (%)	Grup2 n: 39 (%)	Toplam n: 93 (%)	p
<i>vacAs1</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA1</i>	18 (33.3)	8 (20.5)	26 (28.0)	0.260
<i>vacAs1</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA2</i>	14 (25.9)	10 (25.6)	24 (25.8)	1.000
<i>vacAs2</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA1</i>	3 (5.6)	2 (5.1)	5 (5.4)	1.000
<i>vacAs2</i> , <i>cagA</i> , <i>iceA2</i>	2 (3.7)	3 (7.7)	5 (5.4)	0.646
<b>Diğer</b>	16 (29.6)	15 (38.5)	31 (33.3)	

Grup1 hastalarındaki *vacAs1*, *cagA*, *iceA1* genotip birlikteliğinin Grup2 hastalarına göre daha yüksek oranda saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Diğer birliktelikler ise homojen bir dağılım gösteriyordu ( $p>0.05$ ) (Tablo 15).

Üçlü pozitif suş olarak bilinen *vacAs1*<sup>+</sup>, *cagA*<sup>+</sup>, *babA2*<sup>+</sup> birlikteliğinin endoskopik tanı gruplarımıza göre dağılımı incelendiğinde; Grup1'deki 54 hasta örneğinin 40'ında (%74.1), Grup2'deki 39 hasta örneğinin 22'sinde (%56.4) ve genele bakıldığında ise 93 hasta örneğinin 62'sinde (%66.0) mevcut olduğu görüldü. Grup1 hastalarındaki üçlü pozitif suş oranı Grup2 hastalarına göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemekteydi ( $p>0.05$ ) (Tablo 16). *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA1* kombinasyonunu aynı anda barındıran izolatlar Grup1 hastalarında en sık tesbit edilenler olup 54 hastanın 18'inde (%33.3), 39 Grup2 hastasının ise 8'inde (%20.5), genele bakıldığında 93 hastanın 26'sında (%28.0) mevcut idi. *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA2* genotipleri, Grup1 hastalarında 14 (%25.9), Grup2 hastalarında 10 (%25.6) ve hastaların genelinde ise 24 (%25.8) izolatta saptandı. *vacAs2*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA1* ve *vacAs2*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA2* genotip kombinasyonlarının her iki tanı grubunda da daha az sıklıkta ve birbirine yakın oranlarda olduğu görüldü, bu kombinasyonların bir arada görüldüğü izolat sayıları Grup1 hastalarında sırasıyla 3 (%5.6) ve 2 (%3.7) iken Grup2 hastalarında 2'ser (%5.1) hasta olmak üzere genel toplamda 5 (%5.4) ve 4 (%4.3) hasta idi. *vacAs1*, *cagA*, *babA2* ve *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA1* genotip kombinasyonları Grup1 hastalarında Grup2 hastalarına göre daha yüksek oranlarda saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Diğer genotip kombinasyonları ise birbirlerine yakın oranlarda homojen bir dağılım gösteriyordu ( $p>0.05$ ) (Tablo 16).

**Tablo 16:** Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinden izole edilen *H. pylori*'deki çeşitli genotip kombinasyonlarının endoskopik tanı gruplarına göre dağılımları.

Genotip	Grup1	Grup2	Toplam	
Kombinasyonları	n: 54 (%)	n: 39 (%)	n: 93 (%)	p
<i>vacAs1</i> , <i>cagA</i> , <i>babA2</i>	40 (74.1)	22 (56.4)	62 (66.0)	0.119
<i>vacAs1</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> , <i>babA2</i> , <i>iceA1</i>	18 (33.3)	8 (20.5)	26 (28.0)	0.260
<i>vacAs1</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> , <i>babA2</i> , <i>iceA2</i>	14 (25.9)	10 (25.6)	24 (25.8)	1.000
<i>vacAs2</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> , <i>babA2</i> , <i>iceA1</i>	3 (5.6)	2 (5.1)	5 (5.4)	1.000
<i>vacAs2</i> , <i>cagA</i> , <i>cagE</i> , <i>babA2</i> , <i>iceA2</i>	2 (3.7)	2 (5.1)	4 (4.3)	1.000

## 5. TARTIŞMA

Dünya nüfusunun yarıdan fazlasını enfekte eden *Helicobacter pylori*, insanların ve çoğu primatın gastrik mukozasında kolonize olabilen spiral, gram negatif, mikroaerofilik bir mikroorganizmadır. Asemptomatik taşıyıcılıktan non-ülser dispepsiye, kronik gastritten peptik ülser, gastrik MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lenfomadan gastrik kansere kadar değişen spektrumda hastalık oluşturabilir (4, 8, 12, 15, 33). Ayrıca mide-barsak sistem dışı bazı hastalıkların etyopatogenezinde de sorumlu olduğu bilinmektedir (3, 117). Yoğun çalışmalar asemptomatik kolonize kişilerin en az %20'sinde, kolonizasyonu takip eden 10 yıl içerisinde tedaviyi gerektirecek klinik bulguların ortaya çıkabileceğini, bunlarında %15-20'sinde peptik ülser, %1-3'ünde gastrik kanser gelişebileceğini ortaya koymaktadır (4). *H. pylori* enfeksiyonlarının prognozunu, konak ve çevresel faktörlerin yanında, bakteriye ait virulans faktörleri de etkilemektedir (5, 6). Bu virulans faktörleri arasında yer alan *cagA* (cytotoxin associated gene A) ve *cagE* (cytotoxin associated gene E), *vacA* (vacuolating cytotoxin A), *iceA* (inducible by contact with epithelium), *babA* (blood group antigen binding adhesin A) ve *babB* (blood group antigen binding adhesin B) gibi toksik ve adeziv proteinleri kodlayan genler patojenitede önemli rol oynamaktadır (7-10).

Çalışmamızda, mide biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori*'nin gastrik kolonizasyon sıklığı, cinsiyet faktörünün kolonizasyona olan etkisi ile *H. pylori*'nin patojenitesini ve enfeksiyonlarının prognozunu etkileyen *vacA* ve allelleri, *cagA*, *cagE*, *iceA* ve allelleri ve *babA2* gibi virulans genlerinin tesbitini ve görülme sıklığını belirlemeyi amaçladık.

Çalışma grubumuz 105'i (%59,7) kadın, 71'i (%40,3) erkek olmak üzere toplam 176 hastadan oluşmaktadır. Kadın hastaların 46'sı (%43.8), erkek hastaların 43'ü (%60.6) Grup1 endoskopik tanı hastalardır. Tanı grupları açısından cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.029$ ) (Tablo 6).



Hastaların yaş ortalamaları  $37.93 \pm 15.31$  olup yaşları 17 ile 81 arasında değişiklik göstermektedir. Yaş gruplarına göre hastaların dağılımı incelendiğinde; kadınlarda 31-50, erkeklerde ise  $\leq 30$  yaş grubunun ağırlıklı olduğu görülmektedir (Tablo 7).

Az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde prevalans %70-90 iken gelişmiş ülkelerde kişisel hijyene verilen önem ve yapılan başarılı eradikasyon çalışmaları ile bu oran %40'dan daha düşük seviyelere gerilemiştir (1-3).

Paniagua GL. ve arkadaşları (130) Meksika'da 238 hastanın mide biyopsi örneklerinden, kültür ve PCR yöntemiyle *H. pylori*'nin virulans genlerinin tayini için yaptıkları bir çalışmada *H. pylori* prevalansını %60.1 olarak tesbit etmişlerdir. Jafari F.ve ark. (131) İran'da peptik ülserli, non-ülser dispepsili ve gastrik kanserli 169 hastadan alınan mide biyopsi örneklerinde kültür ve PCR yöntemiyle *cagA* ve *vacA* gen ilişkisini araştırdıkları bir çalışmada *H. pylori* sıklığını %57.5 olarak saptamışlardır. Yine Malekzadeh R. ve ark.nın (132) İran'da 1011 hastanın mide biyopsi örneklerinde hızlı üreaz testi ve histolojik yöntemlerle *H. pylori* prevalansını %89.2 olarak bulmuşlardır. Muller LB. ve ark. (133) Brezilya'da 10 yıl süren bir araştırmada dispeptik semptomlu 2019 hastanın mide biyopsi örneklerinde histolojik yöntemleri kullanarak prekanseröz lezyonlarla *H. pylori* ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında *H. pylori* prevalansını %76 olarak tesbit etmişlerdir. Kalebi A. ve ark. (134) Kenya'da yaptıkları bir çalışmada 71 hastanın antrum ve korpuslarından alınan mide biyopsi örneklerinde histolojik yöntemlerle *H. pylori* sıklığını sırasıyla %91 ve %86 olarak bulmuşlardır. Lawal OO. ve ark.nın (135) Güney Batı Nijerya'da yaptıkları bir çalışmada dispeptik şikayetleri olan 138 hastada histopatolojik ve kültür yöntemini kullanarak mide biyopsi örneklerinde *H. pylori* prevalansını %77.5 olarak saptamışlardır. Abdullah M ve ark. (136) Endonezya'da yaptıkları bir çalışmada 125'i Endonezyalı ve 42'si Japon olan toplam 167 hastanın mide biyopsi örneklerinde histopatolojik, kültür ve hızlı üreaz testi yöntemlerini kullanarak *H. pylori* sıklığını Endonezyalı hastalarda %68, Japon hastalarda ise %59.5 olarak bulmuşlardır. Ruihua S. ve ark. (137) Çin'de yaptıkları bir çalışmada 1457 sağlıklı bireyde, üre nefes testi ve *H. pylori*'ye karşı serum IgG antikor düzeylerini araştırdıkları yöntemlerle *H. pylori* prevalansını %62 olarak tesbit etmişlerdir. Ceballos FS. ve ark. (138) İspanya'da yaptıkları bir çalışmada üre nefes testini kullanarak *H. pylori* prevalansını %60.3 olarak bulmuşlardır. Robertson MS. ve ark. (139) Avustralya'da yaptıkları bir araştırmada 500 hastanın yaş, cinsiyet ve kan grubu ile *H. pylori* ilişkisini araştırdıkları

çalışmalarında *H. pylori* seroprevalansını %32 olarak tesbit etmişlerdir. Everhart JE. ve ark. (140) ABD'de Amerikan populasyonu ile farklı etnik gruplardaki *H. pylori* enfeksiyonlarının seroprevalansını araştırmışlar ve 7465 serum örneğinde Amerikan populasyonunun *H. pylori* seroprevalansını %32.5 olarak saptamışlardır. Yine Batı Almanya'da Breuer T. ve ark.nın (141) 260 kan vericisinde yaptıkları bir çalışmada *H. pylori* seroprevalansını %39.2 olarak bulmuşlardır. Naja F. ve ark. (142) Kanada-Ontario'da yaptıkları çalışmada 1306 serum örneğindeki *H. pylori* seroprevalansını %23.1 olarak saptamışlardır.

Ülkemizde ise *H. pylori* prevalansı %40-89 arasında değişmektedir (25, 26). Sarıbaşak H. ve ark.nın (26) İstanbul bölgesinde gastrit, PÜ ve gastrik kanser tanılı 73 hastanın mide biyopsi örneklerinde CLO testi, kültür ve PCR yöntemlerini kullanarak *H. pylori* genotipleri ile gastrik patolojiler arasındaki ilişkiyi analiz ettikleri çalışmalarında *H. pylori* prevalansını %89 olarak bildirmişlerdir. Sandıkçı MU. ve ark.nın (143) rutin üst gastrointestinal sistem endoskopisi yapılan 500 hastada mikrobiyolojik ve histolojik yöntemlerle *H. pylori* sıklığını araştırdıkları çalışmalarında *H. pylori* prevalansını %86 olarak bulmuşlardır. Açık Y. ve ark.nın (144) hızlı üreaz testi ve histolojik yöntemlerle *H. pylori* sıklığını araştırdıkları çalışmada 200 hastada *H. pylori* prevalansını %78 olarak bulmuşlardır. Akan Y. ve ark.nın(145) dispeptik yakınmalı 711 hastanın mide biyopsi örneklerinde hızlı üreaz testi ve histopatolojik yöntemlerle yaptıkları bir çalışmada *H. pylori* prevalansını %65.8 olarak tesbit etmişlerdir. Karabiber ve ark. (25) değişik yaş gruplarından oluşan sağlıklı 114 kişide *H. pylori* seroprevalansını %40.3 olarak bildirmişlerdir. Aydın F. ve ark. (146) 1995'de bölgemizde yaptıkları bir çalışmada dispeptik yakınmalarla başvuran ve üst gastrointestinal sistemi endoskopilerinde kronik gastrit saptanan 104 hastanın antrum biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığını, mikrobiyolojik ve histopatolojik yöntemlerle incelemişler ve *H. pylori* prevalansını %53.8 olarak saptamışlardır. Yine bölgemizde 2003 yılında Kaklıkkaya N. ve ark (147), gastrointestinal yakınmalarla başvuran 200 hastanın antral biyopsi örneklerinde, gram boyama, üreaz ve kültür yöntemleriyle *H. pylori* pozitifliğini belirledikleri ve endoskopik bulgulara göre *H. pylori* saptama oranlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında *H. pylori* prevalansını %49.5 olarak tesbit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, *H. pylori*'nin gastrik kolonizasyonunun gösterilmesinde, mide biyopsi örneklerinin mikroskopisi, üreaz testi ve kültür gibi mikrobiyolojik inceleme

yöntemlerini kullanıldı. Bu yöntemlerin en az biriyle pozitif olduğu saptanan örneklerin daha sonra moleküler düzeyde *ureC (glmM)*-PCR yöntemiyle doğrulaması yapıldı. Buna göre dispeptik yakınması olup, Grup1 endoskopik tanılı 89 hastanın 53'ünde (%59.6), Grup2 endoskopik tanılı 87 hastanın 38'inde (%43.7) ve toplamda 176 hastanın 91'inde (%51.7) *H. pylori* pozitifliği saptandı (Tablo 8). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar ülkemizin çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmaların genelinden daha düşük oranlarda iken bölgemizdeki 1995'de Aydın F. ve arkadaşlarının %53.8'lik ve 2003'de Kaklıkkaya N. ve arkadaşlarının %49.5'lik sonuçları ile benzer oranlardadır.

*H. pylori* enfeksiyonlarının görülme sıklığında ve prognozunda bakteriyel ve çevresel faktörlerle beraber hastaya ait; sosyoekonomik durum, sigara kullanımı, genetik yatkınlık, eğitim düzeyi, aile yapısı ve yaş gibi faktörlerin yanı sıra cinsiyetin de etkili olduğu gösterilmiştir (1-4, 35, 27-29). Hem peptik ülser hem de mide kanserinin etyolojisinde rol oynayan *H. pylori* enfeksiyonu, her ne kadar erkeklerde kadınlardan daha sık oranda görüldüğünü bildiren literatür çalışmaları varsa da her iki cinsiyette de benzer oranların olduğu veya kadınlarda *H. pylori* pozitifliğinin daha yüksek oranlarda bildirildiği çalışmalar da mevcuttur. Sasidharan S. ve ark. (148) Malezya'da yapılan bir çalışmada ülkede yaşayan Hintli, Çinli ve Bangladeşlilerden oluşan farklı etnik kökene sahip gruplardaki *H. pylori* sıklığı ile endoskopik bulgu ve cinsiyet ilişkisini Malezyalı hastalarla karşılaştırmışlar, *H. pylori* sıklığını Malezyalı erkeklerde %18.9, kadınlarda ise %9 olarak saptamışlar ve bu oran farkının anlamlı olduğunu, diğer etnik gruplarda ise *H. pylori* sıklığı ile cinsiyetler arasında anlamlı bir farkın olmadığını bildirmişlerdir. Hashemi MR. ve ark. (149) İran'ın güney bölgesindeki 1000 dispeptik hastada *H. pylori* sıklığını belirlemeyi amaçladıkları bir çalışmada hastalardan alınan mide biyopsi örneklerinde hızlı üreaz testi ve histolojik yöntemlerle *H. pylori* sıklığını tüm hastalarda %67.1, erkeklerde %69.9, kadınlarda ise %64.1 oranlarında tesbit etmişlerdir. Zhang DH. ve ark.nın (150) yaptıkları çalışmada; Çin'in iki farklı bölgesinde yaşayan 2065 asemptomatik çocuk ve erişkinin mide biyopsi örneklerinde *H. pylori* sıklığı ve gastrik kanserle ilişkisi dışkı antijen testi (HpSA) ve histolojik yöntemlerle araştırılmış, birinci bölgede *H. pylori* prevalansı %50.95 olarak, erişkin erkek ve kadınların *H. pylori* sıklığı ise sırasıyla %48.19 ve %53.43 olarak belirlenmiştir. *H. pylori* prevalansının %41.35 olduğu diğer bölgede ise bu oranlar yine erkek ve kadınlar için sırasıyla %41.84 ve %40.91 olarak tespit edilmiş ve cinsiyetler arasında anlamlı bir farkın olmadığı bildirilmiştir. Ülkemizde Yücel T. ve ark.nın (151)

HpSA testi ile üniversite öğrencileri arasındaki *H. pylori* prevalansını ve ilişkili faktörleri belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında; %63 olarak saptadıkları *H. pylori* sıklığını erkeklerde %62.5, kadınlarda ise %63.1 olarak tespit etmişler ve yine erkek ve kadınlardaki bu oranların anlamlı bir farklılık yaratmadığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinde, mikrobiyolojik yöntemlerin en az biriyle *H. pylori* sıklığını erkeklerde %50.7 kadınlarda ise %52.4 olarak birbirine yakın oranlarda tespit ettik ve cinsiyetler arasında *H. pylori* sıklığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını belirledik ( $p>0.05$ ) (Tablo 9).

Çalışmamızdaki hedeflerimizden biri de mikrobiyolojik yöntemlerin en az biriyle pozitif bulunan ve *ureC*-PCR yöntemiyle doğrulaması yapılan hastalara ait gastrik kolonize suşlardaki *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* ve *babA2* genleri ile *vacA* geninin *s1a*, *s1b*, *s1c*, *s2* ve *m1a*, *m1b*, *m2* allellik tiplerinin ve sıklığının belirlenmesi idi.

Daha önceden izah edildiği şekliyle *vacA* geni, 4 farklı “s” alleli (*s1a*, *s1b*, *s1c* ve *s2*) ve 3 farklı “m” alleli (*m1a*, *m1b* ve *m2*) içeren polimorfik bir yapıya sahiptir (10, 12). *vacA*’nın *s1* allelini bulunduran suşlar aktif sitotoksin salınımı yapar ve hem gastrik ülser hem de gastrik kanser gibi ciddi klinik sonuçlarla *s2* allele göre daha yüksek oranda ilişkilidirler. Yine *m1* tip toksinin konak hücrelerine bağlanma afinitesinin *m2* tip toksine göre çok daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu durum *s1/m1* ve *s1/m2* genotiplerini bulunduran suşların daha virulan, *s2/m2* genotipine sahip suşların ise daha hafif seyirli klinik sonuçlarla uyumlu olduğunu göstermektedir (10, 13). Farklı *vacA* gen allelerini içeren *H. pylori* suşlarının görülme sıklığı çeşitli faktörlerin etkisiyle bölgeden bölgeye değişen oranlarda izlenmektedir. Van Doorn LJ. ve ark. (152) 24 farklı ülkede, PCR ve LİPA yöntemleri ile toplam 735 hastadan izole edilen *H. pylori* suşlarında *cagA* gen birlikteliği ile *vacA* gen allellerinin dağılımını karşılaştırdıkları çalışmalarında; Kuzey ve Doğu Avrupa ülkelerinde *s1a* subtipi %89 oranında baskın allel olarak bulunmuştur. Fransa ve İtalya’da *s1a* ve *s1b* allelleri Kuzey Amerika’ya benzer şekilde birbirine yakın oranlarda tesbit edilmiştir. İspanya ve Portekiz’de ise suşların %89’u *s1b* olarak saptanmış ve bu sonucun da Orta ve Güney Amerika ile benzerlik gösterdiğine dikkat çekilmiştir. *s1c* subtipi ise Doğu Asya’dan izole edilen suşların %77’sinde gösterilmiş ve sonuç olarak tüm bölgelerde *vacAs1/cagA* pozitif genotiplerin peptik ülserle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir. İran’da Dabiri H. ve ark.’nın (153) yaptıkları çalışmada bu bölgedeki İranlı,

Türk ve diğer etnik gruplara dahil *H. pylori* pozitifliği bulunan, 124 gastrik patolojili hastada *s1*, *s2*, *m1*, *m2* allellik oranlarını İranlı hastalar için sırasıyla %68, %32, %30, %70, Türk kökenli hastalar için %70, %30, %33, %67 olarak saptamışlar, *s1/m1*, *s1/m2*, *s2/m1*, *s2/m2 vacA* genotip varyasyonlarını ise İranlı hastalarda için sırasıyla %20, %47, %9.5, %23, yine Türk kökenli hastalar için ise %18, %51.5, %15, %15 olarak tesbit etmişler. Sonuçta bu iki hasta grubunda *s1* allelinin *s2*'ye göre ve *m2* allelinde *m1*'e göre daha baskın olduğunu, *s1/m2* genotipinin de en yaygın varyasyon olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Almanya'dan Rudi J. ve ark.nın (154) bildirdiği bir çalışmada 65 dispeptik hastadan izole edilen *H. pylori* suşlarında *vacAs1* oranı %83.1, *vacAs2* oranı %15.4 iken *vacAm1* oranı %36.9, *vacAm2* oranı ise %63.1 olarak saptanmış buna göre *vacA* allellik kombinasyonlarını *s1/m2* için %47.7, *s1/m1* için %35.4, *s2/m2* için %15.4 olarak tespit etmişler ve *s2/m1* genotipini ise hiçbir suşta saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Tan HJ. ve ark. (155) Malezya'da yaşayan çeşitli etnik gruplara ait PÜ'li hastalardaki *cagA*, *cagE* ve *vacA* gen allellerinin dağılımını karşılaştırdıkları çalışmalarında, Malezyalı hastalarda %76.6 ve Hintli hastalarda %71.0 oranlarında baskın allelin *s1a* olduğunu ve Çinli hastalarda ise *s1c* allelinin %91.0 ile daha sık görüldüğünü saptamışlardır. *m1* subtipinin tüm etik gruplarda sırasıyla % 66.7, %54.2 ve %76.3 oranlarında *m2*'ye göre daha baskın olduğu görülmüştür. *vacA* allellik kombinasyonları ise *s1a/m1*, *s1a/m2*, *s2/m2* ve *s1c/m1* için Malezya'lı hastalarda sırasıyla %60.0, %16.7, %16.7 ve %6.7 olarak, Hintli hastalarda %63.2, %7.9, %13.2 ve %2.6 olarak saptanmış ve Çinli hastalarda ise diğer gruplardan farklı olarak *s1c/m1* ve *s1c/m2* daha baskın olarak sırasıyla %25.4 ve %39.0 olarak bildirilmiştir. Buna karşılık Zhou W. ve ark. (156) Japonya'nın iki farklı bölgesi ile Çin'deki hastalardan izole ettikleri *H. pylori* suşlarında *cagA* ve *vacA* genlerinin dağılımını karşılaştırmışlar ve Japon hastalarda *s1c/m1b* allellik kombinasyonunu sırasıyla %84.6 ve %63.3 oranlarında, Çinli hastalarda ise *s1c/m2* allellik kombinasyonunu %61.1 oranlarında baskın olarak saptamışlardır. Finlandiya'dan bildirilen bir çalışmada Karhukorpi J. ve ark. (157) çeşitli etnik kökene sahip çocuklardan izole ettikleri suşlarda *vacAs1a* subtipini Finlandiyalı çocuklarda baskın olarak %76, *vacAs1b* subtipini ise Afrika kökenli çocuklarda baskın olarak %67 oranlarında saptamışlardır. Sillakivi T. ve ark (158) Estonya'da yaptıkları bir çalışmada bölgede yaşayan perfore peptik ülserli Rus ve Estonyalı hastalardan izole edilen suşlarda *H. pylori* genotiplerinin dağılımını incelemişler ve tüm hastalarda tamamı *vacAs1a* subtipine ait olan *vacAs1* alleli oranını %88 gibi baskın

bir oranda saptamışlardır. *vacAs1b* ve *vacAs1c* subtiplerini ise suşların hiçbirinde tesbit edememişlerdir. Estonyalı hastalarda *s1a/m1* subtipini %75 oranında baskın allel olarak *s1a/m2* subtipini sadece %13 oranında belirlemişler, *s1a/m1* ve *s1a/m2* subtipini ise Rus hastalarda %44 olarak benzer oranlarda olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki suşlarımızın tamamında baskın olarak bulunan %75.3'lük *vacAs1a* allellik oranımız (Tablo 11) yurt dışında yapılan Van Doorn LJ. ve ark.'nın Kuzey ve Doğu Avrupa ülkelerindeki %89'luk ve Sillakivi T. ve ark.'nın Estonya'daki %88 *vacAs1a* allellik sonuçlarına yakın ama düşük değerlerde iken Tan HJ. ve ark.'nın Malezyalı hastalardaki %76.6'lık ve Hintli hastalardaki %71.0'lik, Karhukorpi J. ve ark.'nın Finlandiyalı çocuklardaki %76'lık oranları ile birebir uyumludur. Yine bu dört çalışmada, *vacAs1b* allellik oranlarının ya çok düşük ya da hiç tespit edilememiş olması bizim tek bir hastada saptadığımız %1.1'lik *vacAs1b* allellik sonucumuz ile de örtüşmektedir (Tablo 11). Biz çalışmamızda *vacAs1c* allelini hiçbir suшта saptayamamış olmamız, Doğu ve Güney Doğu Asya ülke toplumları ile yapılan çalışmalarda (152, 155, 156) bildirilen *vacAs1c* allellik sonuçlarının diğer toplumlara oranla daha yüksek sıklıkta bulunmasını ve bu allellik subtipinin çoğunlukla bu bölgelerdeki suşlarda lokalize olduğu düşüncesini anlamlı kılmaktadır. İran'dan Dabiri H. ve ark.'nın yaptığı çalışmada *vacA* allellerinin subtipleri belirtilmediği için tam bir karşılaştırma yapılamasa da saptadıkları %68 ve %70'lik *s1* oranları ile %70 ve %67'lik *m2* oranları, bizim çalışmamızdaki *vacAs1a* ve *vacAs1b* allelini de içeren %76.4'lük *s1* oranımızla ve %62.4'lük *m2* oranımızla yakın benzerlik göstermektedir (Tablo 11). Yine Almanya'dan Rudi J. ve ark.'nın %83.1'lik *s1* ve %15.4'lük *s2* oranı bizim %76.4'lük *s1* ve %23.6'lık *s2* oranlarımıza yakın, %36.9'luk *m1* ve %63.1'lik *m2* oranları ise bizim %37.6'lık *m1* [*m1a* (%32.2)+ *m1b* (%5.4)] ve %62.4'lük *m2* oranlarımızla çok yakın benzerlik göstermektedir (Tablo 11).

Çalışmamızda Grup1 hastalarında en sık görülen *vacA* allellik varyasyonu %53.7 ile *s1a/m2* olup bu oran Grup2 hastalarında %28.2 olarak tespit edildi. Grup1 hastalarında *s1a/m2*'nin Grup2 hastalarına göre daha yüksek bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.025$ ). Hastalarımızın genelinde de en yaygın görülen *vacA* allellik varyasyonu %43.0 ile *s1a/m2* genotipi iken *s1a/m1a* %28.0 ve *s2/m2* ise %18.5 olarak saptandı (Tablo 12). Malezya'dan bildirilen %60 ve %63'lük *s1a/m1* oranları ile %16.7 ve %7.9'luk *s1a/m2* oranları, Şili'den bildirilen %76'lık *s1b/m1* ve %21'lik *s1a/m1* ve Estonya'dan bildirilen %75 ve %44'lük *s1a/m1* oranları ile %13'lük *s1a/m2* oranları bizim

sonuçlarımızla uyuşmasa da Rus kökenli hastalardaki %44'lük *s1a/m2* oranları benzerlik göstermektedir. *vacA* genotip allellerinin subtiplerinde görülen bu bölgesel oran farklılıklarının olması hastalara ait faktörler, çevresel faktörler ve coğrafik bölgelerin farklılığı dikkate alınacak olursa beklenen bir durumdur. Buna karşılık komşu ülke İran'dan bildirilen %47 ve %51.5'lik *s1/m2* oranları ile %20 ve %18'lik *s1/m1* oranları bizim çalışmamızla çok uyumlu görünmektedir keza Almanya'dan Rudi J. ve ark.nın %47.7'lik *s1/m2*, %35.4'lük *s1/m1* ve %15.4'lük *s2/m2* oranları da bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir. Bildirilen diğer çalışmalardaki *s2/m2* oranları ise genel olarak hastaların kliniği de gözönüne alındığında bizim sonuçlarımızla örtüşen düşük oranlardadır.

Ülkemizde yapılan benzer çalışmalara bakılacak olursa; Sarıbaşak H. ve ark.nın (26) İstanbul bölgesinde yaptıkları çalışmada *vacAs1a* genotipi %83 oranında en sık görülen genotip olarak bulunmuş, *vacAs1b* genotipi sadece bir hastada, *vacAs2* genotipi ise hastaların %5'inde saptanmıştır. Hastaların %9.2'sinde çoklu 's' genotipi tesbit edilmiş, *vacAs1c* genotipinin ise hiçbir hastada gözlenmediği bildirilmiştir. İzole edilen suşlarda saptanan *vacAm1* genotipinin tamamı *vacAm1a* olmak üzere %12 olarak, *vacAm2* genotiplerinin tamamı da *vacAm2a* olmak üzere %43 oranında ve çoklu 'm' genotipi ise %44.6 oranında tesbit edilmiş, sonuç olarak en sık görülen *vacA* allelinin *s1a/m1a* ile *s1a/m2a* olduğu bildirilmiştir. Yine İstanbul bölgesinden Erzin Y. ve ark.nın (159) bildirdiği bir çalışmada NÜD, duodenal ülser (DÜ) ve gastrik kanser tanısı almış 93 hastadan izole edilen *H. pylori* suşlarında *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* genotipleri ile gastrik patolojiler arasındaki ilişki araştırılmış, çalışmada *vacAs1a* genotipi %83.5, *vacAs1b* genotipi %4.4, *vacAs2* genotipi %11, *vacAm1* genotipi %41.8 ve *vacAm2* genotipi ise %58.2 oranlarında saptanmıştır. Bu çalışmada *vacA* allellik varyasyonları *vacAs1/m2* için baskın olarak %48.4, *vacAs1/m1* için %40.7, *vacAs2/m1* için %1.1 ve *vacAs2/m2* için %9.9 oranlarında tespit edilmiş, *vacAs1c* genotipinin ise suşların hiçbirinde saptanamadığı bildirilmiştir. Ümit H. ve ark.nın (160) Edirne'de yaptıkları bir çalışmada 57 hastadan izole edilen suşlarda *vacAs1* genotipi %56.1, *vacAs2* genotipi %31.6, *vacAm1* genotipi %40.3, *vacAm2* genotipi ise % 52.6 olarak tesbit edilmiş, bir izolatta *m1 + m2* genotipi, yedi izolatta ise *s1 + s2* genotipi aynı anda saptanmıştır. Denizli'den bildirilen bir çalışmada Caner V. ve ark. (161) 30'u kronik gastritli ve 16'sı duodenal ülserli toplam 46 hastada *vacAs1* genotipini %89.1, *vacAm2* genotipini ise %82.6 oranında bulmuşlardır. *vacAs1/m2* genotip varyasyonu tüm hasta gruplarında baskın olarak ortalama %66 oranında saptanmış

ve *vacAs1/m2* ise suşların hiç birinde tesbit edilememiştir. Bölgemizde Aydın F. ve ark.nın (162) 2004 yılında yaptıkları çalışmada ise 47'si PÜ'li 51'i NÜD'li olmak üzere 98 hastadan izole edilen *H. pylori* suşlarında tamamı *vacAs1a* subtipi olan *vacAs1* genotipini %88.8, *vacAs2* genotipini ise %11.2 oranında saptamışlar ve yaygın olan *vacA* genotip varyasyonunun %51.0 oranı ile *sla/m1* olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer genotip varyasyonlarını ise *sla/m2* için %37.7, *s2/m2* için %11.2 oranlarında saptamışlar ve suşların hiçbirinde *vacAs1c* subtipine ve *s2/m1* genotipine rastlanmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki %74.7'lik *vacAs1a* tespitimizin ülkemizdeki Sarıbaşak H. ve ark.'nın %83'lük, Erzin Y. ve ark.'nın %83.5'lik ve Aydın F. ve ark.'nın %88.8'lik *vacAs1a* oranlarına yakın ama bir miktar düşük, Ümit H. ve ark.'nın %56.1'lik oranından ise daha yüksek olduğu görüldü. *vacAs1c* genotipinin yapılan çalışmalarda bulunamaması ve *vacAs1b* genotipinin ise ya hiç bulunamaması (162) ya da çok düşük (26, 159) oranlarda saptanması bizim sonuçlarımızla oldukça uyumluydu. Ümit H. ve ark.'nın çalışmasında *vacAs1* subtipleri belirtilmediği için karşılaştırma yapılamadı. Çalışmamızdaki %22.0'lik *vacAs2* oranımız ülkemizdeki diğer çalışmalarda (26, 159, 160, 162) bildirilen *vacAs2* oran sınırları (%5-31.6) içinde olduğu görüldü. Bizim çalışmamızda en sık görülen *vacA* allelik varyasyonu olarak %41.8 ile *sla/m2* genotipi saptandı bunu %28.6 ile *sla/m1a*, %18.7 ile *s2/m2* ve %3.3 ile *s2/m1* genotipi takip ediyordu. Erzin Y. ve ark.'nın çalışmasında da en sık saptanan genotip varyasyonu %48.4 ile *sla/m2* idi ve *s2/m1* oranı ise %1.1 olup sonuçlarımızla uyumluydu. Caner V. ve ark.nın en yaygın genotip varyasyonu olan %66'lık *vacAs1/m2* oranından bizim oranımızın daha düşük olduğu görüldü. Aydın F. ve ark.'nın %51'lik *sla/m1a* genotip oranına göre bizim oranımız düşük bulunmuşken %37.7 *sla/m2* oranı ile daha çok uyumlu olduğu görüldü. Sarıbaşak H. ve ark.'nın çalışmalarında ise bizim bulgularımızdan farklı olarak *sla/m1a* ve *sla/m2* genotipleri birbirine benzer oranlardaydı. Bizim *s2/m2* oranlarımız diğer çalışmalardan (159, 162) (%9.9 ve %11.2) daha yüksekti, ancak Grup1 tanı grubumuzda %15.1 ve Grup2 tanı grubumuzda ise %23.7 olarak hastalarımızın kliniği ile uyumlu olduğu görüldü.

Çalışma grubumuzdaki iki kadın hastanın hem antrum hem de korpus örneğinden izole edilen suşlarda *vacA* allellerinin birbirleriyle paralellik göstermediği ve bu izolatların birinde *s1* alleli mevcutken diğerinde ise *s2* alleli varlığı saptandı, aynı durum 'm' alleli için de söz konusu idi. Aynı hastaların farklı lokalizasyonlarından izole edilen *H. pylori*'nin iki farklı suşuyla oluşan bu durum bir ko-enfeksiyon mevcudiyetini destekliyor



olabilir (Tablo 11). Bizdeki ile benzerlik gösteren farklı suşların bir arada oluşturduğu bu ko-enfeksiyon durumu yurt dışındaki (163, 164) ve ülkemizdeki (26, 160) çalışmalarda da gösterilmiştir.

*H. pylori* patogeneğinde önemli rol oynayan *cagPAI* için bir markır olarak kabul edilen, peptik ülser ve gastrik kanser gelişimi ile yakından ilişkili olduğu düşünülen *cagA* gen pozitifliğimiz Grup1 hastalarında %92.6 ve Grup1 hastalarında %82.1 olmak üzere toplamda %88.2 oranında saptandı (Tablo 12). Coğrafik bölge ve hasta gruplarına göre değişkenlik gösteren bu oranlar; İspanya'da (165) %66.9, Almanya'da (154) %73.8, Brezilya'da (166) %78, Bulgaristan'da (167) %81.5, İran'da (74) %85, Estonya'da (168) %87, Kore'de (169) %94, Tayland'da (118) %96.8 olarak bildirilmişken ülkemizde yapılan çalışmalarda (161, 162) bu oranlar %59.2 ile %93.5 arasında değişmektedir. Bizim % 88.2'lik *cagA* pozitiflik oranımız İspanya, Almanya, ve Brezilya'dan bildirilen oranlardan (%66.9-78) daha yüksek iken Bulgaristan, İran ve Estonya'dan bildirilen oranlarla (%81.5-87) büyük ölçüde örtüşmektedir. Buna karşılık Kore ve Tayland'dan bildirilen çalışmalardaki *cagA* pozitiflik oranlarından (%94-96.8) ise bizim sonuçlarımızın daha düşük olduğu görülmektedir.

Özellikle gelişmiş ülkelerdeki *H. pylori* enfeksiyonlarında kötü prognozu gösteren ve *cagA* ile birlikte *cagPAI* için bir markır olduğu düşünülen (170, 171) *cagE* geni çalışmamızdaki tüm hasta grupları ve genotipleri içinde en yaygın görüleniydi. *cagE* gen pozitifliği, Grup1 hastalarından izole edilen suşların %94.4'ünde ve Grup2'deki hasta suşlarının tamamında (%100) olmak üzere tüm hastalarda %96.8 olarak saptandı, *cagE* geni pozitif olan hasta örneklerinin biri dışında hepsi *cagA* pozitif olarak belirlendi, bu tek hasta da peptik ülserli kadın hasta idi. Yurtdışında yapılan çeşitli çalışmalarda bu oranlar; ABD'de (127) %62, İtalya'da (172) %77.3, Hindistan'da (173) %85.4, Brezilya'da (174) %88.9, İran'da (175) %90.8 ve Japonya'da (176) %98.8 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan mevcut iki çalışmada *cagE* pozitiflik oranlarını Erzin Y. ve ark. (159) %59.3, Ilga U. ve ark. (177) %60.7 olarak bildirmişlerdir. Bizim %96.8'lik *cagE* pozitiflik oranımızın İran ve Japonya'dan bildirilen oranlarla (%90.8-98.8) benzerlik göstermekte olup Hindistan ve Brezilya'dan bildirilen oranlara (%85.4-88.9) ise yakın değerlerdedir. Ancak, ABD ve İtalya'dan bildirilen oranlardan (%62-77.3) ve ülkemizde yapılan iki çalışmadaki *cagE* pozitiflik oranlarından (%59.3-60.7) ise daha yüksektir. Bulgularımızın özellikle ülkemizden bildirilen bulgularla benzeşmemesinin nedeni ülkemizde yapılan *H. pylori*

izolatlarındaki *cagE* geni tesbitine yönelik çalışmaların sınırlı sayıda olmasının ve karşılaştırma yapılacak yeterli verinin bulunmamasının yanında bölgesel farklılıklar, sosyo-ekonomik şartların değişkenliği ve hastalara ait faktörlerin çeşitliliği de olabilir.

*H. pylori*'deki *vacA* genotip allelleri ile *cagPAI* birlikteliğinin virulansa olan etkisi bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Bizim *vacA* allelleri ile *cagPAI*'nin göstergesi olan *cagA* ve *cagE* genotiplerinin birlikteliğini ayrı ayrı incelediğimiz çalışmamızda elde ettiğimiz oranlar aynı zamanda *vacA* + *cagA* ve *vacA* + *cagE* genotip birliktelik oranlarımızı da yansıtmaktadır. Bunun yanı sıra Grup1 hasta örneklerindeki *vacAs1* + *cagA* oranı %77.8 olup *vacAs1a/m2* + *cagA* ise %48.1 oranında baskın birliktelik olarak bulunmuştur. Grup2'de ise *vacAs1* + *cagA* oranı %59.0 olup baskın birliktelik %28.2'lik oran ile *vacAs1a/m1a* + *cagA* olarak saptandı. Sadece Grup2'deki 4 izolata (%10.3) ait *s2/m1* genotipinin tamamının *cagA* bulundurduğu gözlemlendi. Her iki tanı grubunda *vacAs1* + *cagA* oranı %69.1 iken *vacAs1a/m2* + *cagA* ise %38.7 oranında yaygın birliktelik olarak tespit edildi. Bu tanı gruplarına göre olan dağılımın *s/m* allel genotipleri ile *cagE* gen birlikteliğinde de benzer şekilde olduğu görüldü, keza Grup1 hastalarındaki en yaygın birliktelik %51.9 ile *vacAs1a/m2* + *cagE* iken Grup2 hastalarında ise %30.8 ile *vacAs1a/m1a* + *cagE* olarak tespit edildi. Grup1 hastalarındaki %48.1'lik *vacAs1a/m2* + *cagA* ve %51.9'lik *vacAs1a/m2* + *cagE* ile Grup2 hastalarındaki %10.3'lük *vacAs2/m1* + *cagA* ve *cagE* birliktelik oranlarının hasta gruplarının diğerine göre daha yüksek bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Grup1 için  $p=0.047$  ve  $p=0.039$ ) (Grup2 için  $p=0.029$  ve  $p=0.029$ ) (Tablo 13 ve 14). Yurt dışında yapılan çalışmalarda *vacAs1* + *cagA* oranları; Meksika'da (130) %29.4, İran'da (131) %60.4, Avusturya ve Portekiz'de (178) %73.2 ve %59, Finlandiya'da (157) %71.4, Japonya'da (179) %79, Bulgaristan'da (167) %79.5, Estonya'da (158) %80 ve Hong Kong'da (180) %98 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde ise Caner V. ve ark.nın (161) yaptıkları çalışmada bizdeki sonuçlarla örtüşür şekilde *cagA* pozitifliği ile olan baskın genotip birlikteliğini *vacAs1/m2* olarak saptamışlar ve bu birlikteliği kronik gastritli hastalarda %73.3, duodenal ülserli hastalarda ise %68.7 olarak bildirmişlerdir. Erzin Y. ve ark. (159) *cagA* pozitif olan suşlardaki *vacAs1* oranını %94 gibi yüksek bir oranda bulmuşlar ve baskın olan *vacA* allellik kombinasyonlarını da *vacAs1/m1* için %47.8 ve *vacAs1/m2* için %46.3 olarak birbirine yakın oranlarda bildirmişlerdir. Yine bölgemizden Aydın F. ve ark. (162) *cagA* pozitifliğini %59.2 olarak saptadıkları çalışmalarında ise *vacAs1am1* kombinasyonunu baskın olarak bulmuşlardır.

Peptik ülseri oluşumu ile *iceA1* geni arasında önemli birliktelik vardır. Biz çalışmamızda *iceA1* gen pozitifliğini Grup1'deki hasta örneklerinde %38.9, Grup2'deki hasta örneklerinde %25.6 olmak üzere toplamda %33.3 oranında tespit ettik (Tablo 12). Batı toplumlarından izole edilen suşlarda *iceA1* varlığı peptik ülser için bir risk faktörü olarak gösterilirken, görülme sıklığı giderek artan *iceA2* ise, daha çok non-ülser dispepsili hastalardan izole edilen suşlarda görülmektedir (181). Bizim *iceA2* gen pozitifliğimiz ise Grup1'deki hasta örneklerinde %35.2, Grup2'deki hasta örneklerinde %35.9 olmak üzere toplamda %35.5 oranındaydı (Tablo 12). Yapılan çalışmalarda saptanan *iceA1* ve *iceA2* oranları sırasıyla; Tayland'da (118) %45.5 ve %33.1, ABD'de (127) %16 ve %84, Brezilya'da (182) %16 ve %73.7, Hollanda'da (183) %42 ve %54.3 iken ülkemizde (159, 161) ise %45.7-74.7 ve %25.3-54.3 olarak bildirilmiştir. Akut enflamasyonun şiddeti ve IL-8 salınımı ile *iceA1* ekspresyonu doğrudan ilişkilidir. *IceA1*'in *cagA* ve *vacAs1* alleli ile olan beraberliği bu ilişkiyi daha da anlamlı kılar (10, 46). ABD'de de izole edilen *H. pylori* suşlarındaki bu anlamlı birliktelik suşların ancak % 25'inde gösterilebilmiştir, zaten bu oranda peptik ülser ve/veya gastrik kanserli hastaların yaklaşık oranıdır (184). Bizim çalışmamızda benzer şekilde bu oran %28.0'dır (Tablo 15). Nijerya'da yapılan bir çalışmada (185) ise bu birliktelik oranı %82.5 gibi çok yüksek oranlarda bildirilmiştir. Yine de bu allellerin virulansa katkıları ve klinik önemleri tartışmalıdır. ABD, Kolombiya, Kore ve Japonya gibi 4 farklı ülkeyi kapsayan bir araştırmada (186) *iceA1* ile mide barsak hastalıkları arasındaki ilişki doğrulanmamış, ancak yine Japonya'da yeni yapılan bir çalışmada *iceA1* alleli ile gastrik enflamasyonun artışı yönünde bir bağlantının olduğu gösterilmiştir (187).

*H. pylori*'nin *babA2* taşıyan suşları hem peptik ülser hemde gastrik adenokarsinom gibi daha ciddi patolojiler için yüksek risk taşıırken, *babA2* taşımayan suşlar ise daha hafif seyirli klinikle beraberdir (46). Bizim çalışmamızdaki *babA2* gen pozitifliğimiz Grup1'deki hasta izolatlarında %92.6, Grup2'deki hasta izolatlarında %82.1 olmak üzere hastaların genelinde %88.2 oranında tespit edildi. *babA2* gen pozitifliği yönünden tanı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p=0.192$ ) (Tablo 12). Farklı bölgelerden bildirilen bu oranlar; Brezilya'da (188) %69.3, Hong Kong'da (180) %79.8, Küba'da (189) %82.3, Tayland'da (118) %92, Kore'den (190) bildirilen ve dört farklı ülkede yapılan bir çalışmada ortalama *babA2* gen pozitiflik oranları Kolombiya için %77, ABD için %78, Japonya için %92.5 ve Kore için %93 olarak bildirilirken ülkemizde ise bu

oranlar; Erzin Y.ve ark.nın (159) İstanbul'dan bildirilen çalışmalarında %53.8 olarak tespit edilmiştir. *babA2* gen pozitiflik oranları bölgesel farklılıklar göstermekte olup bizim %88.2'lik oranımız daha çok Küba (%82.3) ve Tayland, Japonya, Kore gibi Doğu Asya ülkelerine yakın oranlarda (%92-93) bulundu.

*babA2*'nin diğer hastalık ilişkili genler olan *cagA* ve *vacAsI* ile beraberliği (*babA2*<sup>+</sup>, *cagA*<sup>+</sup>, *vacAsI*) peptik ülser ve gastrik kanser riskini daha da çok artırmaktadır (191). Çin'de yapılan bir araştırmada, *babA2*'nin tek başına ya da *cagA* ve *vacAsI* ile beraberliğinin, midenin preneoplastik lezyonları olan gastrik enflamasyon, intestinal metaplazi, gastrik epitelin hücre turnover ve glandüler atrofi oluşumu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (15). Yine Hong Kong'da (180) yapılan bir çalışmada *babA2*<sup>+</sup>, *cagA*<sup>+</sup>, *vacAsI* birlikteliği %78.8 oranında saptanmış ve bu üçlü pozitif suşların diğer bahsedilen bulgulara ilave olarak gastrik hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Diğer ülkelerde saptanan üçlü pozitif suş oranları; Meksika'da (130) %9.8, ABD'de (127) %31, Küba'da (189) %56.2 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde ise Erzin Y. ve ark.(159) tarafından bu oran %45.1 olarak tespit edilmiş ve tüm hasta grupları arasında anlamlı birliktelik olduğu saptanmıştır. Buna karşılık Brezilya'da (188) yapılan bir araştırmada ise bu oran %32.6 olarak tespit edilmiş ancak peptik ülser ve gastritle anlamlı birliktelik bulunamadığı bildirilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise *babA2*<sup>+</sup>, *cagA*<sup>+</sup>, *vacAsI* birlikteliği suşların Grup1'deki hastalarda %74.1, Grup2'deki hastalarda %56.4 ve hastaların tamamında ise %66.0 oranında tespit edildi (Tablo 16).

Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinden izole edilen *H. pylori*'deki çeşitli genotip kombinasyonlarının hasta gruplarına göre dağılımları incelendiğinde; en virulan birliktelik olan *vacAsI*, *cagA*, *cagE*, *babA2* ve *iceA1* genotiplerinin tamamını içeren suşların oranı Grup1'deki hastalarda (%33.3) Grup2'deki (%20.5) hastalara göre daha yüksek oranda bulundu. *vacAsI*, *cagA*, *cagE*, *babA2* ve *iceA2* genotiplerinin tamamını içeren suşlar ise Grup2'deki hastalarda en sık olmak üzere %25.6 oranında, Grup1'deki hastalar ve hastaların tamamında ise sırasıyla %25.9 ve %25.8 olarak birbirine yakın oranlarda tespit edildi. Diğer birlikteliklere göre daha az virulan olan *vacAs2*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA1* ve *vacAs2*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA2* genotip oranları ise sırasıyla Grup1'deki hastalarda %5.6 ve %3.7, Grup2'deki hastalarda %5.1 ve %5.1, hastaların tamamında ise %5.4 ve %4.3 gibi düşük oranlarda bulundu (Tablo 16).

Sonuç olarak, gelişmiş toplumlardan çok gelişmekte olan toplumların önemli bir halk sağlığı sorunu olan *H. pylori* ve enfeksiyonlarının prognozunu; sosyo-ekonomik durum, kişisel hijyen, aile hikayesi, yaş, beslenme alışkanlıkları, eğitim düzeyi, farklı coğrafik bölge gibi hasta ve çevresel faktörlerin yanı sıra *cagA*, *cagE*, *vacA* ve allelleri, *iceA* ve allelleri ve *babA2* gibi önemli gastrik patolojilerle ilişkilendirilen bakteriye ait virulans genlerinin varlığı da büyük oranda etkilemektedir. *H. pylori* prevalansının ve genotiplerinin mide-barsak hastalıklarıyla olan ilişkisinin belirlenmesine yönelik yapılan yoğun çalışmalarda beklenildiği üzere farklı bölgelerden farklı sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin, ülkemizin de içinde bulunduğu Kuzey ve Doğu Avrupa toplumlarında *sIa* allelinin, Orta ve Güney Amerika toplumlarında *sIb* allelinin, Doğu Asya toplumlarında ise *sIc* allelinin yapılan çalışmalarda daha baskın olduğu görülmektedir. Bu nedenle, bizim ülkemiz için de bir sağlık sorunu olan *H. pylori* ve enfeksiyonlarının gastrik kolonizasyon sıklığını ve kolonize suşlardaki virulans genlerinin ve allellik tiplerinin belirlenmesini amaçladığımız çalışmamızın, özellikle peptik ülser ve gastrit gelişimine neden olabilecek virulans gen profiline sahip suşlarla enfekte olan ve ileriki dönemde gastrik kanser gelişimi açısından yüksek risk grubuna dahil olan bu hastaların uzun süreli takibinde klinisyeni uyarıcı nitelikte olacağı, ayrıca ülkemiz ve bölgemizde yapılacak benzer çalışmalara bir veri oluşturacağı öngörülmüştür.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### SONUÇLAR

Endoskopik olarak gastrik/duodenal mukozal hasarı (gastrik/duodenal ülser, gastrik/duodenal erozyon, duodenit, bulbit, özefajit, gastrit) olan hastalar (Grup1) ile herhangi bir gastroduodenal mukozal hasarı olmayan sağlam mukozalı hastaların (Grup2) mide biyopsi örneklerinden izole edilen *H.pylori*'nin, gastrik kolonizasyon sıklığını, cinsiyet faktörünün kolonizasyona olan etkisini ve kolonize suşların virulans genlerini ve allellik tiplerini (*cagA*, *vacA* ve allelleri, *cagE*, *iceA* ve allelleri, *babA2*) PCR yöntemi ile tespitini amaçladığımız çalışmamızda sonuç olarak;

1. Çalışmaya 105'i (%59,7) kadın, 71'i (%40,3) erkek olmak üzere toplam 176 hasta dahil edildi. Endoskopik tanılarına göre hastaların 89'u (%50.6) Grup1, 87'si (%49.4) ise Grup2 hastalarından oluşmaktaydı.
2. Kadın hastalarda Grup2 endoskopik tanı oranı (%43.8), erkek hastalarda ise Grup1 endoskopik tanı oranı (%60.6) anlamlı derecede yüksek bulundu.
3. Hastaların yaşları 17 ile 81 arasında değişiklik gösteriyordu ve yaş ortalamaları  $37.93 \pm 15.31$  (17-81) idi. Kadın hastalarda 31-50, erkek hastalarda ise  $\leq 30$  yaş grubu diğer yaş gruplarına göre daha yüksek oranlarda saptandı.
4. *H.pylori* pozitifliği Grup1 hastalarında (%59.6) Grup2 hastalarına (%43.7) göre anlamlı şekilde yüksek bulundu.

5. Hastaların genelinde *H.pylori*'nin görülme sıklığı %51.7 iken kadınlarda %52.4, erkeklerde ise %50.7 olarak tesbit edildi. Kadın ve erkek hastaların *H.pylori* pozitiflik oranları homojen bir dağılım gösteriyordu.

6. Hasta izolatlarının tamamında %75.3 ile *vacAs1a*, %62.4 ile *vacAm2* en sık rastlanan *vacA* allelleri olarak saptandı. *vacAs1b* alleli sadece bir suşta bulunurken *vacAs1c* alleli suşların hiçbirinde tespit edilemedi.

7. Grup1 hasta izolatlarında %53.7 oranla *s1a/m2*'nin, Grup2 hasta izolatlarında %30.8 oranla *s1a/m1a*'nın ve genele bakıldığında ise %43.0 *s1a/m2*'nin en sık tespit edilen allellik kombinasyonları olduğu görüldü. Grup1 hastalarındaki *s1a/m2* oranı Grup2 hastalarına göre anlamlı şekilde yüksek bulundu.

8. *s2m1* allellik kombinasyonu Grup1 hastalarının hiçbirinde saptanamazken Grup2 hastalarının %10.3'ünde tespit edilmesi anlamlı bulundu.

9. Diğer virulans genlerinden *cagA* (%92.6), *iceA1* (%35.2) ve *babA2* (%92.6) Grup1 hasta izolatlarında, *cagE* (%100.0) Grup2 hasta izolatlarında daha yüksek oranda saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. *iceA2* (%35.9) ise her iki tanı grubunda homojen bir dağılım gösteriyordu.

10. Grup1 hasta izolatlarında *vacAs1* + *cagA* oranı %77.8 olup *vacAs1a/m2* + *cagA* oranı %48.1 ile en sık saptanan *vacA* + *cagA* birlikteliği idi. Grup2'de ise *vacAs1* + *cagA* oranı %59.0 olup baskın birliktelik %28.2'lik oran ile *vacAs1a/m1a* + *cagA* olarak saptandı.

11. Grup1 hasta izolatlarındaki en yaygın *vacA* + *cagE* birlikteliği %51.9 ile *vacAs1a/m2* + *cagE* iken Grup2'de ise %30.8 ile *vacAs1a/m1a* + *cagE* olduğu görüldü.

12. *vacAs1a/m2* + *cagA* ve *vacAs1a/m2* + *cagE* birliktelik oranları Grup1 hastalarında Grup2 hastalarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunurken *vacAs2/m1* + *cagA* ve *vacAs2/m1* + *cagE* birliktelik oranları Grup2 hastalarında Grup1 hastalarına göre anlamlı şekilde yüksek bulundu.

13. Grup1 hasta izolatlarında *vacAs1*, *cagA*, *iceA1* birlikteliği %33.3'lük oran ile baskın iken Grup2 hasta izolatlarında *vacAs1*, *cagA*, *iceA2* birlikteliği %25.6'lık oran ile baskın bulundu.

14. Üçlü pozitif suşlar (*vacAs1*, *cagA*, *babA2*) Grup1 hasta izolatlarında (%74.1) Grup2 hasta izolatlarına (%56.4) göre daha yüksek oranda bulundu ancak üçlü pozitif suşların görülme oranları ile tanı grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.

15. *H.pylori* suşlarındaki en virulan gen kombinasyonu olan *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA1* birlikteliği Grup1 hastalarında (%33.3) daha yüksek oranda saptandı. *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2*, *iceA2* birlikteliği ise Grup2 hastalarında (%33.3) daha yüksek oranda tespit edildi. Ancak oranlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı.



## ÖNERİLER

1. Çalışmaya dahil edilen hastalarımızın endoskopik tanılarına göre dağılımları istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşmamızı engellediğinden az sayıdaki gastrik/duodenal ülserli ve diğer gastroduodenal mukozal hasarı olan hastalar Grup1 tanı grubunda birleştirilmişlerdir. Hasta sayılarının artırılmasıyla yapılacak olan çalışmalar *H.pylori*'nin virulans gen profilleriyle endoskopik tanıları arasındaki ilişkiyi daha da anlaşılır kılacaktır.
2. Yakın bir zamanda *vacA* geninin “s” ve “m” bölgeleri arasında üçüncü bir bölge olarak tanımlanan intermediate (*i*) gen bölgesi, *vacA* allellerinin gösterilmesinde eşdeğer olarak görülmektedir. Bu gen bölgesi ile yapılacak olan çalışmalar *vacA* allellik farklılıkları ile klinik tanı arasındaki ilişkinin gösterilmesinde yardımcı olabilir.

## 7. ÖZET

Gastroenteroloji Kliniğine Başvuran Hastalardan Alınan Mide Biyopsi Örneklerinde *Helicobacter pylori* Sıklığının ve Virulans Genlerinin Araştırılması

Dünya nüfusunun yarıdan fazlası *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) ile enfektedir ve non-ülser dispepsi, peptik ülser, gastrik kanser ve MALT lenfoma gibi çeşitli mide-duodenum hastalıklarının gelişimi ile doğrudan ilişkilidir. *H.pylori* enfeksiyonları özellikle gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere önemli bir sağlık sorunudur. Bakteri ve konak faktörleri ile çevresel faktörler arasındaki etkileşimlerin, kişilerdeki farklı klinik sonuçların belirlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. *H.pylori* enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rol oynayabilen *vacA* ve allelleri, *cagA*, *cagE*, *iceA* ve allelleri ve *babA2* gibi çeşitli virulans genleri tanımlanmıştır. Bu çalışmada, 176 hastanın [ endoskopik olarak gastrik/duodenal mukozal hasarı olan (gastrik/duodenal ülser, gastrik/duodenal erozyon, duodenit, gastrit, özefajit; Grup1, n=89) ve olmayan (Grup2, n=87)] mide biyopsi örneklerinde *H.pylori* sıklığının ve başlıca virulans genlerinin Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi amaçlandı. Hastaların yaş ortalamaları  $37.93 \pm 15.31$  idi ve %59.7'si kadındı. *H.pylori* sıklığının kadınlarda %52.4 ve erkeklerde %50.7 olmak üzere hastaların tamamında %51.7 olduğu görüldü. 93 izolatın 70'inde (%75.3) *vacA s1a* alleli, 58'inde (%62.4) *m2* alleli bulundu. Suşların hiçbirinde *s1c* genotipi bulunamadı. Çalışılan izolatlar arasında *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* ve *babA2* genotiplerinin sıklığı sırasıyla %88.2, %96.8, %33.3, %35.5 ve %88.2 idi. Grup1 hasta izolatlarında en yaygın görülen *vacA* allellik kombinasyonunun 29 (%53.7) suş ile *s1a/m2*, Grup2 hasta izolatlarında ise 12 suş ile (%30.8) *s1a/m1a* olduğu görüldü. Sonuç olarak *vacAs1a/m2* allellik kombinasyonu Grup1 hastalarında Grup2'ye göre istatistiki olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. En baskın genotip kombinasyonu *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2* ve *iceA1* birlikteliği olarak bulundu.

## 8. SUMMARY

### Investigation of the Frequency and Virulence Genes of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Biopsy from Patients Admitted Gastroenterology Clinics

Over half of the world's population is infected with *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) and it is directly related to development of several gastroduodenal diseases, such as non-ulcer dyspepsia, peptic ulcer disease, gastric cancer and MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma. *H.pylori* infection is an important health problem, especially in developing countries. It has been proposed that the interactions between the host and environmental factors with bacterial virulence factors, play a significant role in determining prognosis of *H.pylori* infections. Several putative virulence genes, such as *vacA* and alleles, *cagA*, *cagE*, *iceA* and alleles and *babA2* have been identified and may play important roles in the pathogenesis of *H.pylori* infections. The aim of this study was to determine the frequency and main virulence genes of *H.pylori* in the gastric biopsy specimens from 176 patients [gastric/duodenal mucosal damage (i.e. gastric/duodenal ulcer, gastric/duodenal erosion, duodenitis, gastritis, esophagitis; Group1, n=89) and no evidence gastric/duodenal mucosal damage (Group2, n=87) by endoscopic diagnosis] by using polymerase chain reaction (PCR). Patients main age was  $37.93 \pm 15.31$  and 59.7% were female. It have seen that, the frequency of *H.pylori* was 51.7% in all patients; 52.4% female and 50.7% male. The *vacA* allele and *m2* allele were found in 70 (75.3%) and 58 (62.4%) of the 93 isolates. None of the strains was found to harbor the *slc* genotype. The frequencies of the *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2*, *babA2* genotypes among studied isolates were 88.2%, 96.8%, 33.3%, 35.5% and 88.2% respectively. The common *vacA* allelic combination seen in isolates from patients in Group1 were *sla/m2* with 29 (53.7%) strains and *sla/mla* with 12 (30.8%) strains in isolates of Group2 patients. Consequently, *vacAsla/m2* allelic combination was found statistically higher in Group1 patients than Group2. The most predominant genotypes combination were found to be associated *vacAs1*, *cagA*, *cagE*, *babA2* and *iceA1*.

## 9. KAYNAKLAR

1. Brown LM: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiol Rev.*, 22(2):283-297, 2000.
2. Fallone CA: Determinants of ethnic or geographical differences in infectivity and transmissibility of *Helicobacter pylori*. *Can J Gastroenterol.*, 13(3):251-255, 1999.
3. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P: *Helicobacter pylori* infection: A clinical overview. *Digestive and Liver Disease*, 40:619–626, 2008.
4. Yılmaz Ö, Okcu N: *Helicobacter pylori* ve Gastrointestinal Sistemle İlişkili Hastalıklar. *AÜTD*, 38:13-17, 2006.
5. Kusters JG, Vliet AHM, Kuipers EJ: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3):449–490, 2006.
6. Suerbaum S and Michetti P: *Helicobacter pylori* infections. *New Engl. J. M.*, 347:1175–1186, 2002.
7. Höcker M and Hohenberger P: *Helicobacter pylori* virulence factors: One part of a big Picture. *Lancet*, 362:1231–33, 2003.
8. Robinson K, Argent RH and Atherton JC: The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 21(2):237–259, 2007.
9. Day AS, Jones NL, Lynett JT, et al.: *cagE* is a Virulence Factor Associated with *Helicobacter pylori* Induced Duodenal Ulceration in Children. *The Journal of Infectious Diseases*, 181:1370–1375, 2000.
10. Peek Jr RM: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Springer Semin Immun.*, 27:197–215, 2005.
11. Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, et al.: Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cag* pathogenicity island isolated from Iranian patients. *Digestive and Liver Disease*, 41:634–638, 2009.
12. Wen S and Moss SF: *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*, 282:1–8, 2009.

13. Amieva MR and El Omar EM: Host-Bacterial Interactions In *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, 134:306–323, 2008.
14. Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, et al.: Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. *Journal Of Clinical Microbiology*, 3906–3916, 2005.
15. Yu J, Leung WK, Go MYY, et al.: Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*, 51:480–484, 2002.
16. Backert S and Selbach M: Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis *Cellular Microbiology*, 10(8):1573–1581, 2008.
17. Linz B, Balloux F, Moodley Y, et al.: An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 445(7130): 915–918, 2007.
18. Egan BJ, O’Morain CA: A historical perspective of *Helicobacter* gastroduodenitis and its complications. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 21(2):335–346, 2007.
19. Kidd M, Modlin IM: A Century of *Helicobacter pylori*. *Digestion*, 59:1-15, 1998.
20. Marshall BJ and Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 21:1311–1315, 1984.
21. Fukuda Y, Tomita T, Hori K, et al.: The history of *Helicobacter pylori*. *Rinsho Byori*, 49(2):109-115, 2001.
22. Eslick GD: *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. *World J Gastroenterol.*, 12:2991-2999, 2006.
23. Mobley HL: *Helicobacter pylori* factors associated with disease development. *Gastroenterology*, 113:21-28, 1997.
24. McGee DJ, Mobley HL: Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: Bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 241:155-80, 1999.
25. Karabiber N, Türet S, Ülker A, Onaran İ: Normal populasyonda *Helicobacter pylori* antikor prevalansı. *Doğa (Tr J Med Sci)*, 16:479-482, 1992.
26. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y and Sander E: Analysis of *Helicobacter pylori* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4):1648-1651, 2004.

27. Malaty HM: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 21(2):205-214, 2007.
28. Das JC, Paul N: Epidemiology and Pathophysiology of *Helicobacter pylori* Infection in Children. Indian J Pediatr., 74(3):287-290, 2007.
29. Mandeville KL, Krabshuis J, Ladep NG, et al.: Gastroenterology in developing countries: Issues and advances. World J Gastroenterol, 15(23):2839-2854, 2009.
30. Ceylan A, Kırımı E, Tuncer O, et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori* in Children and Their Family Members in a District in Turkey. J Health Popul Nutr., 25(4):422-427, 2007.
31. Sönmez C: *Helicobacter pylori* infeksiyonu tanısında yeni yaklaşımlar. Güncel Gastroenteroloji, 6(3):137-146, 2002.
32. Özden A, Bozdayi G, Özkan M, Köse KS: Changes in The Seroepidemiological Pattern of *Helicobacter Pylori* Infection Over The Last 10 Years in Turkey. Turk J Gastroenterol., 15(3):156-158, 2004.
33. Kadanalı A ve Özkurt Z: *Helicobacter pylori* infeksiyonu: Epidemiyoloji, Patogenez ve ilişkili Hastalıkları. Klimik Dergisi, 17(3):146-150, 2004.
34. Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T: Fecal and Oral Shedding of *Helicobacter pylori* From Healthy Infected Adults. JAMA, 282:2240-2245, 1999.
35. Yücel O, Sayan A, Yıldız M: The Factors Associated with Asymptomatic Carriage of *Helicobacter pylori* in Children and Their Mothers Living in Three Socio-Economic Settings. Jpn J Infect Dis., 62:120-129, 2009.
36. Dunn BE, Cohen B, Blaser MJ: *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev., 10(4):720-741, 1997.
37. Andersen LP, Boye K, Blom J, et al.: Characterization of a Culturable "*Gastrospirillum hominis*" (*Helicobacter heilmannii*) Strain Isolated from Human Gastric Mucosa. Journal Of Clinical Microbiology, 37(4):1069-1076, 1999.
38. Tünger Ö: *Helicobacter pylori* İnfeksiyonları. İnfeksiyon Dergisi, 22(2):107-115, 2008;
39. Murray PR: Klinik Mikrobiyoloji (çev. Ed. A. Başustaoğlu) Atlas Kitapçılık, 9. Baskı, 2009, s. 947-962.
40. Chen TS: Is the Coccoid Form of *Helicobacter pylori* Viable and Transmissible? J Chin Med Assoc., 67:547-548, 2004.

41. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JAG and Vandenbroucke-Grauls CMJE: Coccoid Forms of *Helicobacter pylori* Are the Morphologic Manifestation of Cell Death. *Infection and Immunity*, 65(9):3672–3679, 1997.
42. Wirth HP, Yang M, Valentin ES, et al.: Host Lewis Phenotype-Dependent *Helicobacter pylori* Lewis Antigen Expression in Rhesus Monkeys. *The FASEB Journal*, 20:812-820, 2006.
43. Thoreson ACE, Hamlet A, Celik J, Bystrom M et al.: Differences in Surface-Exposed Antigen Expression between *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Duodenal Ulcer Patients and from Asymptomatic Subjects. *Journal Of Clinical Microbiology*, 38(9):3436–3441, 2000.
44. Isami T, Takashi J, Katsushi W, et al.: Suppressive Effects of DNA Vaccines Encoding Heat Shock Protein on *Helicobacter pylori*-induced Gastritis in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277:159-163, 2000.
45. Spohn G, Delany I, Rappuoli R and Scarlato V: Characterization of the HspR-Mediated Stress Response in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 184(11):2925–2930, 2002.
46. Israel DA, Peek RM: Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther.*, 15:1271-1290, 2001.
47. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE: H pylori and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol.*, 12(35):5599-5605, 2006.
48. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (Ed): *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM Pres., 6:53-68, 2001
49. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S: Comparative Ultrastructural and Functional Studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* Flagellin Mutants: Both Flagellin Subunits, FlaA and FlaB, Are Necessary for Full Motility in *Helicobacter* Species. *Journal Of Bacteriology*, 177(11):3010–3020, 1995.
50. Dong QJ, Wang Q, Xin YN, Li N, Xuan SY: Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol.*, 15(32):3984-3991, 2009.
51. Taylor DE: *Helicobacter pylori* It's Genome: Lessons from Treasure Map. *Can J Gastroenterol.*, 13(3):218-223, 1999.
52. Eppinger M, Baar C, Linz B, et al.: Who Ate Whom? Adaptive *Helicobacter* Genomic Changes That Accompanied a Host Jump from Early Humans to Large Felines. *PLoS Genetics*, 2(7):1097-1110, 2006.
53. Baltrus DA, Amieva MR, Covacci A, et al.: The Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain G27. *Journal of Bacteriology*, 191(1):447–448, 2009.

54. McClain MS, Shaffer CL, İsrail DA, et al.: Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. BMC Genomics, 10(3):1-14, 2009.
55. Ustaçelebi Ş (Ed.), Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Tümbay E: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1999, s. 531-540.
56. Ding HJ, Liu YC, Peng CF, et al.: An efficient method for the culture of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies with two-section petri dishes. J Gastroenterol, 36:237-241, 2001.
57. Tominaga K, Hamasaki N, Watanabe T, et al.: Effect of culture conditions on morphological changes of *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol, 34(11):28-31, 1999.
58. Guillermo İ and Perez-Perez Gİ: Accurate Diagnosis of *Helicobacter pylori* Culture, Including Transport. Gastroenterol Clin N Am., 29(4):879-84, 2000.
59. Sönmez C: *Helicobacter pylori* infeksiyonu tanısında yeni yaklaşımlar. Güncel Gastroenteroloji, 6(3):137-146, 2002.
60. Demiray E, Yılmaz Ö: *Helicobacter pylori* İnfeksiyonunda Üreaz Enziminin Rolü ve Önemi. Türk Mikrobiyol Cem Derg., 37 (2):112-117, 2007.
61. Kadanalı A, Özkurt Z: *Helicobacter pylori* infeksiyonu: Epidemiyoloji, Patogenez ve İlişkili Hastalıkları. Klimik Dergisi, 17(3):146-150, 2004.
62. Sgouros SN and Bergele C. Clinical Outcome Of Patients With *Helicobacter pylori* Infection: The Bug, The Host, Or The Environment? Postgrad Med J., 82:338-342, 2006.
63. Clyne M and Drumm B. Adherence of *Helicobacter pylori* to the Gastric Mucosa. Can J Gastroenterol., 11(3):243-248, 1997.
64. Mori M, Suzuki H, Suzuki M, Kai A, Miura S, İshii H: Catalase and Superoxide Dismutase Secreted from *Helicobacter pylori*. Blackwell Science İnc, 2(2):100-105, 1997.
65. Ramarao N, Owen SDG and Meyer TF: *Helicobacter pylori* induces but survives the extracellular release of oxygen radicals from professional phagocytes using its catalase activity. Molecular Microbiology, 38(1):103-113, 2000.
66. Naumann M: Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. International Journal of Medical Microbiology, 295:335-341, 2005.
67. Fukuta K, Azuma T, İto Y, et al.: Clinical Relevance of *cagE* Gene from *Helicobacter pylori* Strains in Japan. Digestive Diseases and Sciences, 47(3):667-674, 2002.
68. İsrail DA ve Peek Jr RM: *Helicobacter pylori* patogenezinde sürekliliğin rolü. Current Opinion in Gastroenterology (Türkçe Baskı), 1(2):61-67, 2006.



69. Clyne M, Dolan B and Reeves EP: Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori* FEMS Microbiol Lett, 268:135–143, 2007.
70. Enroth H, Engstrand L: An Update on *Helicobacter pylori* Microbiology and Infection for the New Millennium. Scand J Infect Dis., 33:163–174, 2001.
71. Nguyen LT, Uchida T, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M: *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. Journal of Medical Microbiology, 57:1445–1453, 2008.
72. Suerbaum S and Josenhans C: Virulence factors of *Helicobacter pylori*: implications for vaccine development. Molecular Medicine Today, 32-39, 1999.
73. Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, et al.: Translocation of *Helicobacter pylori cagA* into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. Science, 287(5457):1497-1500, 2000.
74. Ghasemi A, Shirazi M.H, Ranjbar R, et al.: The prevalence of *cagA* and *cagE* genes in *Helicobacter pylori* strains isolated from different patient groups by polymerase chain reaction. Pak J Biol Sci., 11:2579-2583, 2008.
75. Basso D, Zambon CF, Letley DP, et al.: Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. Gastroenterology, 135:91–99, 2008.
76. Ogiwara H, Graham DY and Yamaoka Y: *vacA i*-region subtyping. Gastroenterology, 134 :1267, 2008.
77. Yamaoka Y, Kwon DH and Graham DY: A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci., 97:7533-7538, 2000.
78. Occhialini A, Marais A, Alm R, et al.: Distribution of Open Reading Frames of Plasticity Region of Strain J99 in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Carcinoma and Gastritis Patients in Costa Rica. Infection and Immunity, 68(11):6240–6249, 2000.
79. Santos A, Queiroz DMM, Menard A, et al.: New Pathogenicity Marker Found in the Plasticity Region of the *Helicobacter pylori* Genome. Journal of Clinical Microbiology, 41(4):1651–1655, 2003.
80. Oleastro M, Monteiro L, Lehours P, et al.: Identification of Markers for *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children with Peptic Ulcer Disease by Suppressive Subtractive Hybridization. Infection and Immunity, 74(7):4064–4074, 2006.
81. Oleastro M, Cordeiro R, Menard A, et al.: Distribution and Allelic Diversity of a Novel Peptic Ulcer Marker Candidate in Different Geographical Regions. *Helicobacter*, 11(4):336, 2006.

82. Uyanık MH ve Aktaş O: *Helicobacter pylori*'nin Mikrobiyolojik Tanısı. EAJM, 39:205-209, 2007.
83. Maaroos Hİ, Andreson H, Loivukene K, et al.: The diagnostic value of endoscopy and *Helicobacter pylori* tests for peptic ulcer patients in late post-treatment setting. BMC Gastroenterology, 4(27):1-6, 2004.
84. Versalovic J: *Helicobacter pylori* Pathology and Diagnostic Strategies. Am J Clin Pathol., 119:403-412, 2003.
85. Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther., 16(1):16-23, 2002.
86. Yılmaz YA: *Helicobacter pylori*: Mikrobiyolojik Tanı Yöntemleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 35:182-186, 2004.
87. Vaira D, Holton J, Menegatti M, et al.: İnvazive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther., 14(3):13-22, 2000.
88. Mauro M, Radovic V, Zhou PZ, et al.: C<sup>13</sup> urea breath test for *Helicobacter pylori*: Determination of the optimal cut-off point in a Canadian community population. Can J Gastroenterol., 20(12):770-774, 2006.
89. Vaira D and Vakil N: Blood, Urine, Stool, Breath, Money and *Helicobacter pylori*. Gut, 48:287-289, 2001.
90. Cho YS, Chae HS, Jang SN, et al.: Comparison of the C<sup>13</sup>-urea breath test and the endoscopic phenol red mucosal Ph test in the quantification of *Helicobacter pylori* infection loading. The Korean Journal of Internal Medicine, 23:134-139, 2008.
91. Megraud F and Lehours P: *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews, 20(2):280-322, 2007.
92. Leodolter A, Vaira D, Bazzoli F, et al.: European multicentre validation trial of two new non-invasive tests for the detection of *Helicobacter pylori* antibodies: urine-based ELISA and rapid urine test. Aliment Pharmacol Ther., 18:927-931, 2003.
93. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D: Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect., 9:489-496, 2003.
94. Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, et al.: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. The Lancet, 354(9172):30-33, 1999.
95. Kolayli F, Karadenizli A, Çelebi A, Şentürk Ö, Bingöl R: *Helicobacter pylori*'nin İzolasyonunda Dört Farklı Taşıma Ortamının Karşılaştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 17(3):333-335, 2003.

96. De Korwin JD: Advantages and limitations of diagnostic methods for *H.pylori* infection. *Gastroenterol Clin Biol.*, 27:380–90, 2003.
97. Oyedeji KS, Smith SI, Arigbabu AO, et al.: Use of direct Gram stain of stomach biopsy as a rapid screening method for detection of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer and gastritis patients. *J Basic Microbiol*, 42(2):121-125, 2002.
98. Hirschl AM and Makristathis A: Methods to Detect *Helicobacter pylori*: From Culture to Molecular Biology. *Helicobacter*, 12 (2):6–11, 2007.
99. Murata H, Kawano S, Tsuji S, et al.: Evaluation of the PyloriTek Test for Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Cases With and Without Eradication Therapy. *The American Journal Of Gastroenterology*, 93(11):2102-2105, 1998.
100. Goh KL, Cheah PL, Navaratnam P, Chin SC, Xiao SD: HUITAI rapid urease test: A new ultra-rapid biopsy urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Digestive Diseases*, 8:139–142, 2007.
101. Gomollona F, Duconsb JA, Santolariab S, et al.: Breath test is very reliable for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in real clinical practice. *Digestive and Liver Disease*, 35:612–618, 2003.
102. Ge Z and Taylor DE: *Helicobacter pylori* molecular genetics and diagnostic typing. *British Medical Bulletin*, 54 (1):31-38, 1998.
103. Lim CY, Lee KH, Cho MJ, et al.: Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucosa of Patients with Gastroduodenal Diseases by PCR-Restriction Analysis Using the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(7):3387–3391, 2003.
104. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, et al.: Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *Journal Of Clinical Microbiology*, 37(3):772–774, 1999.
105. Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M: *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *sl vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*, 56:287–291, 2003.
106. Usta Y ve Özen H: *Helicobacter pylori* enfeksiyonu Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 50:136-145, 2007.
107. Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D, Katsinelos P: *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal reflux disease. *The Lancet*, 368(9540):986, 2006.
108. Amsterdam KV, Vliet AHM, Kusters JG, Ende AVD: Of microbe and man: Determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol Rev*, 30:131–156, 2006;

109. Zhang C, Yamada N, Wu YL, et al.: Comparison of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients. *World J Gastroenterol.*, 11(7):976-981, 2005.
110. Robert ME and Weinstein WM: *Helicobacter pylori*-associated gastric pathology. *Gastroenterol Clin North Am.*, 22(1):59-72, 1993.
111. De Carvalho AST: Peptic ulcer. *J Pediatr.*, 76 (2):127-134, 2000.
112. Başak M, Demirtürk L, Yazgan Y, et al.: Nonülser Dispepsili Hastalarda Helikobakter pilorinin Mide Motilitesine Etkisi. *T Klin J Gastroenterohepatol.*, 9:7-11, 1998.
113. Nazligül Y ve Uzunköy A: Fonksiyonel (Nonülser) Dispepsi . *T Klin J Gastroenterohepatol.*, 10:137-141, 1999.
114. Blanchard TG and Czinn SJ: İmmunological Determinants that may Affect The *Helicobacter pylori* Cancer Risk. *Aliment Pharmacol Ther.*, 12 (1):83-90, 1998.
115. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al.: *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med.*, 324:1127-1131, 1991.
116. Forman D, Webb P, Parsonnet J: *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet*, 343:243-244, 1994.
117. Atmaca H ve Şahan C: *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Sindirim Sistemi Dışı Hastalıklar. *T Klin J Gastroenterohepatol*, 12:194-203, 2001.
118. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 12:30-36, 2008.
119. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, Graham DY, Yamaoka Y. Comparison of Genotyping *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens and Genotyping from Bacterial Cultures. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(7); 3336-3338, 2003.
120. Yakoob J, Abid S, Abbas Z, et al.: Distribution of *Helicobacter pylori* virulence markers in patients with gastroduodenal diseases in Pakistan. *BMC Gastroenterology*, 9:87, 2009.
121. Nahaei MR, Sharifi Y, Akhi MT, et al.: *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* Genotypes and Relationships to Peptic Ulcer Disease and Non-Ulcer Dyspepsia. *Research Journal of Microbiology*, 3(5):386-394, 2008.
122. Atherton JC, Cao P, Peek RM, et al.: Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(30):17771-17777, 1995.

123. Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, et al.: Heterogeneity of *cag* Genotypes in *Helicobacter pylori* Isolates from Human Biopsy Specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(3):976–980, 2003.
124. Gatti LL, Modena JLP, Payao SLM, et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori cagA*, *iceA* and *babA2* alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Tropica*, 100:232–240, 2006.
125. Ito Y, Azuma T, Ito S, et al.: Sequence Analysis and Clinical Significance of the *iceA* Gene from *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *Journal Of Clinical Microbiology*, 38(2): 483–488, 2000.
126. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al.: Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* Status and Clinical Outcome: Studies in Four Different Countries. *Journal Of Clinical Microbiology*, 37(7):2274–2279, 1999.
127. Podzorski RP, Podzorski DS, Wuerth A, Tolia V: Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46: 83–88, 2003.
128. Torres LE, Melian K, Moreno A, et al.: Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol*, 15(2):204-210, 2009
129. B-S Sheu, S-M Sheu, H-B Yang, A-H Huang, J-J Wu: Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut*, 52:927–932, 2003.
130. Paniagua GL, Monroy E, Rodriguez R, et al.: Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8:14, 2009.
131. Jafari F, Shokrzadeh L, Dabiri H, et al.: *vacA* Genotypes of *Helicobacter pylori* in Relation to *cagA* Status and Clinical Outcomes in Iranian Populations. *Jpn J Infect Dis*, 61:290-293, 2008.
132. Malekzadeh R, Sotoudeh M, Derakhshan MH, et al.: Prevalence of gastric precancerous lesions in Ardabil, a high incidence province for gastric adenocarcinoma in the northwest of Iran. *J Clin Pathol*, 57:37–42, 2004.
133. Muller LB, Fagundes RB, Moraes CC, Rampazzo A: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer precursor lesions in patients with dyspepsia. *Arq Gastroenterol*, 44(2):93-8, 2007.
134. Kalebi A, Rana F, Mwanda W, et al.: Histopathological profile of gastritis in adult patients seen at a referral hospital in Kenya. *World J Gastroenterol*, 13(30):4117-4121, 2007.

135. Lawal OO, Rotimi O, Okeke İ: *Helicobacter Pylon* in Gastroduodenal Diseases. *Journal Of The National Medical Association*, 99(1):31-34, 2007.
136. Abdullah M, Ohtsuka H, Rani AA, et al.: *Helicobacter pylori* infection and gastropathy:A comparison between Indonesian and Japanese patients. *World J Gastroenterol*, 15(39):4928-4931, 2009.
137. Shi R, Xu S, Zhang H, et al.:Prevalence and Risk Factors for *Helicobacter pylori* Infection in Chinese Populations. *Helicobacter*, 13:157–165, 2008.
138. Ceballos FS, Samsó CT, Alonso MG, et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the healthy population of the Community of Madrid. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)*, 99(9):497-501, 2007.
139. Robertson MS, Cade JF, Savoia HF, Clancy RL: *Helicobacter pylori* infection in the Australian community: Current prevalence and lack of association with ABO blood groups. *İnternal Medicine Journal*,; 33:163–167. 2003.
140. Everhart JE, Moran DK, Perez-Perez Gİ, et al.: Seroprevalence and Ethnic Differences in *Helicobacter pylori* İnfection among Adults in the United States. *The Journal of İnfectious Diseases*, 181:1359–1363, 2000.
141. Breuer T, Sudhop T, Hoch J, et al.: Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in the western part of Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 8(1):47-52, 1996.
142. Naja F, Kreiger N, Sullivan T: *Helicobacter pylori* infection in Ontario: Prevalence and risk factors. *Can J Gastroenterol.*; 21(8):501-506, 2007.
144. Açık Y, Gülbayrak C, Dönder E, Yalniz M: Fırat Tıp Merkezine Dispeptik Yakımmalarla Başvuran Hastalarda *Helicobacter pylori* Sıklığı ve Etkileyen Faktörler. *OMÜ Tıp Dergisi*, 20(2):82-88, 2003.
143. Sandıkcı MU, Doran F, Koksall F, et al.:*Helicobacter pylori* prevalence in a routine upper gastrointestinal endoscopy population. *Br J Clin Pract.*, 47(4):187-189, 1993.
145. Akçan Y, Özasan B, Soylu AR, Arslan S: The Prevalence of *Helicobacter pylori* in 711 Dyspeptics: The Correlation of H.pylori and Endoscopic Findings. *T Klin J Gastroenterohepatol.*, 10:67-70, 1999.
146. Aydın F, Katırcıoğlu Ü, Köseahmet F, et al.: Antral kronik gastritte *Helicobacter pylori* (HP) izolasyonun gastrit şiddetine göre sıklığı. *İnfek Derg.*, 9:47-48. 1995.
147. Kaklıkkaya N, Çubukçu K, Yazıcı Y, et al.: Gastro-İntestinal Yakınması Olan Hastalarda Gram Boyama, Üreaz ve Kültür Testleri ile *Helicobacter pylori* Varlığının Belirlenmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of İnfection)*, 17(3):329-332, 2003.

148. Sasidharan S, Uyub AM, Azian AA: Further evidence of ethnic and gender differences for *Helicobacter pylori* infection among endoscoped patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 102(12):1226-1232, 2008.
149. Hashemi MR, Rahnavardi M, Bikdeli B, Zahedani MD: H pylori infection among 1000 southern Iranian dyspeptic patients. *World J Gastroenterol.*, 12(34):5479-5482, 2006.
150. Zhang DH, Zhou LY, Lin SR et al.: Recent changes in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection among children and adults in high or low incidence regions of gastric cancer in China. *Chinese Medical Journal*, 122(15):1759-1763, 2009.
151. Yücel T, Aygin D, Şen S, Yücel O: The Prevalence of *Helicobacter pylori* and Related Factors among University Students in Turkey. *Jpn J Infect Dis.*, 61:179-183, 2008.
152. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, et al.: Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 116(4):823-830, 1999.
153. Dabiri H, Maleknejad P, Yamaoka Y, et al.: Distribution of *Helicobacter pylori cagA*, *cagE*, *oipA* and *vacA* in different major ethnic groups in Tehran, Iran. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24:1380–1386, 2009.
154. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, et al.: Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genes and Relationship to *vacA* and *cagA* Protein Expression, Cytotoxin Production and Associated Diseases *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4):944–948, 1998.
155. Tan HJ, Rizal AM, Rosmadi MY, Goh KL: Distribution of *Helicobacter pylori cagA*, *cagE* and *vacA* in different ethnic groups in Kuala Lumpur, Malaysia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20:589–594, 2005.
156. Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa A, et al.: The diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40:81-87, 2004.
157. Karhukorpi J, Yan Y, Kolho KL, et al.: *cagA*, *vacA* and *iceA* Virulence Genes of *Helicobacter pylori* Isolates of Children in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 19:790–793, 2000.
158. Sillakivi T, Aro H, Ustav M, et al.: Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes among Estonian and Russian patients with perforated peptic ulcer, living in Southern Estonia. *FEMS Microbiology Letters*, 195:29-33, 2001.
159. Erzin Y, Koksall V, Altun S, et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, *babA2* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkish Patients with Dyspepsia. *Helicobacter*, 11:574–580, 2006.
160. Umit H, Tezel A, Bukavaz Ş, Unsal G: The Relationship Between Virulence Factors of *Helicobacter pylori* and Severity of Gastritis in Infected Patients. *Dig Dis Sci.*, 54:103–110, 2009.

161. Caner V, Yilmaz M, Yonetci N, et al.: H pylori *iceA* alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol.*, 13(18):2581-2585, 2007.
162. Aydin F, Kaklikkaya N, Ozgur O, Cubukcu K, Kilic AO, Tosun İ and Erturk M: Distribution of *vacA* alleles and *cagA* status of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(12):1102-1104, 2004.
163. Gattia LL, e Souzaa EKF, Leite KR, et al.: *cagA*, *vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51:231–235, 2005.
164. Soltermann A, Koetzer S, Eigenmann F and Komminoth P: Correlation of *Helicobacter pylori* virulence genotypes *vacA* and *cagA* with histological parameters of gastritis and patient's age. *Modern Pathology*, 20:878–883, 2007.
165. Alarcon T, Domingo D, Martinez MJ, Brea ML: *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 24:215-219,1999.
166. Martins LC, Corvelo TCO, Demachki S, et al.: Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 100(8):875-881, 2005.
167. Boyanova L, Markovska R, Yordanov D, et al.: High prevalence of virulent *Helicobacter pylori* strains in symptomatic Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 64(4):374-80, 2009.
168. Andreson H, Loivukene K, Sillakivi T, et al.: Association of *cagA* and *vacA* Genotypes of *Helicobacter pylori* with Gastric Diseases in Estonia. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(1):298–300, 2002.
169. Ko JS , Kim KM, Oh YL and Seo JK: *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Korean children. *Pediatrics International*, 50:628–631, 2008.
170. Douraghi M, Mohammadi M, Shirazi MH, et al.: Simultaneous Detection of *cagA* and *cagE* of *Helicobacter pylori* Strains Recovered from Iranian Patients with Different Gastroduodenal Diseases. *Iranian J Publ Health*, 38(2):98-105, 2009.
171. İkenoue T, Maeda S, Ogura K, et al.: Determination of *Helicobacter pylori* Virulence by Simple Gene Analysis of the *cag* Pathogenicity Island. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(1):181–186, 2001.
172. Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, et al.: Heterogeneity of *cag* Genotypes in *Helicobacter pylori* Isolates from Human Biopsy Specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41(3): 976–980, 2003.



173. S.K. Tiwari, A.A. Khan, G. Manoj, et al.: A simple multiplex PCR assay for diagnosing virulent *Helicobacter pylori* infection in human gastric biopsy specimens from subjects with gastric carcinoma and other gastro-duodenal diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2353–2360, 2007.
174. Módenaa JLP, Salesa AIL, Acrani GO, et al.: Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogenicity island. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59: 7–16, 2007.
175. Douraghi M, Mohammadi M, Shirazi MH, et al.: Simultaneous Detection of *cagA* and *cagE* of *Helicobacter pylori* Strains Recovered from Iranian Patients with Different Gastroduodenal Diseases. *Iranian J Publ Health*, 38(2): 98-105, 2009.
176. Fukuta K, Azuma T, Yoshuyuki Ito Y, et al.: Clinical Relevance of *cagE* Gene from *Helicobacter pylori* Strains in Japan. *Digestive Diseases and Sciences*, 47(3): 667-674, 2002.
177. Ilga U , Ozyurt M, Yildirim S, et al.: *Helicobacter pylori* isolation, serology and *cagA*, *cagE* and *virB11* detection in patients with non-ulcer dyspepsia from Turkey: Correlation with histopathologic findings. *Cent. Eur. J. Med.*, 3(1): 41-46, 2008.
178. Bach S, Makristathis A, Pinto A, et al.: *Helicobacter pylori* Type I Strains Among Austrian and Portuguese Patients with Gastritis, Peptic Ulcer or Gastric Cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 18 : 807–810, 1999.
179. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, et al.: Major virulence factors, *vacA* and *cagA* are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*, 42:338–343, 1998.
180. Yu J, Leung WK, Go MYY, et al.: Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*, 51:480-484, 2002.
181. Figueiredo C, Quint WGV, Sanna R, et al.: Genetic organization and heterogeneity of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*. *Gene*, 246:59–68, 2000.
182. Ribeiro ML, Godoy APO, Benvengo YHB, et al.: Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 36:181-185, 2003.
183. Arents NLA and van Zwet AA: The Importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* Genotypes of *Helicobacter pylori* Infection in Peptic Ulcer Disease and Gastroesophageal Reflux Disease. *The American Journal Of Gastroenterology*, 96(9):2605-2608, 2001.
184. Peek RM, Jr, Thompson SA, Donahue JP, et al.: Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Phys.*, 110:531-544, 1998.

185. Smith SI, Kirsch C, Oyedeji KS, et al.: Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J. Med. Microbiol.*, 51:851–854, 2002.
186. Yoshio Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, et al.: Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* Status and Clinical Outcome: Studies in Four Different Countries. *Journal Of Clinical Microbiology*, 37(7):2274–2279, 1999.
187. Nishiya D, Shimoyama T, Fukuda S, et al.: Evaluation of the clinical relevance of the *iceA1* gene in patients with *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Scand J Gastroenterol*, 35:36-39. 2000.
188. Mattar R, Dos Santos AF, Eisig JN, et al.: No Correlation of *babA2* with *vacA* and *cagA* Genotypes of *Helicobacter pylori* and Grading of Gastritis from Peptic Ulcer Disease Patients in Brazil. *Helicobacter*, 10:601–608, 2005.
189. Torres LE, Melián K, Moreno A, et al.: Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol.*, 15(2):204-210, 2009.
190. Yamaoka Y, Soucek J, Odenbreit S, et al.: Discrimination between Cases of Duodenal Ulcer and Gastritis on the Basis of Putative Virulence Factors of *Helicobacter pylori*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(6):2244–2246, 2002.
191. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al.: Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen binding adhesin. *PNAS*, 96(22):12778–12783, 1999.

T.C.

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU ARAŞTIRMA  
BAŞVURU FORMU

“Gastroenteroloji Kliniğine Başvuran Hastalardan Alınan Mide Biyopsi Örneklerinde *Helicobacter pylori* Sıklığının ve Virulans Genlerinin Araştırılması” adlı çalışma için

**HASTA/DENEĞİN AYDINLATILMIŞ ONAMI**

Sayın Bay/Bayan

Mevcut yakınmalarınız bir mide hastalığının belirtisi olabilir. Günümüzde mide-barsak hastalıklarının önemli bir kısmına *Helicobacter pylori* adlı bakteri neden olmaktadır.

Hastalığınızın tanısı için öncelikle endoskopik inceleme yapılması ve gerekirse histopatolojik inceleme ve *H.pylori* tesbitine yönelik mikrobiyolojik inceleme (direkt inceleme, kültür ve hızlı üreaz testi) için midenizden biyopsi örneği alınacaktır, bu testler sonucunda *H.pylori* tesbit edilirse bakterinin virulans genlerinin araştırılarak hastalığın klinik prognozunun belirlenmesinde kullanılacaktır.

Uygulanacak bu işlemlerin sağlığınıza için herhangi bir yan etkisi yoktur. Araştırmanın herhangi bir döneminde araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilme hakkına sahipsiniz. Araştırma esnasında mahremiyetinize saygı gösterilecektir. Araştırmanın ekonomik sorumluluğu size ait değildir. Araştırmanın yürütülmesi ve yan etkiler veya endişelendiğiniz herhangi bir konu hakkında bir sorunuz olduğunda Arş.gör. Dr. Taylan CALP'a başvurabilirsiniz.

Telefon numarası 0536 596 36 05'dir.

Yukarıdaki açıklamaları okudum; alınan biyopsi örneğinden üretilen bakterilerde virulans genlerinin araştırılmasını kabul ediyorum.

Hastanın Adı-Soyadı

Tarih ve İmza

Tanık Adı-Soyadı

Tarih ve İmza