

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

*Helicobacter pylori*'nin VİRULANS GENLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE KLARİTROMİSİN DİRENCİ  
İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

Dr. Arzu İRVEM

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

2007

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## Sayfa no

<b>1. AMAÇ ve KAPSAM</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
<b>2.1. TARİHÇE</b>	<b>3</b>
<b>2.2. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER</b>	<b>3</b>
<b>2.3. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER</b>	<b>4</b>
<b>2.4. MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ</b>	<b>5</b>
<b>2.5. VİRULANS VE PATOJENİTE ÖZELLİKLERİ</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1. Bakteriyel Faktörler</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1.1. Isı Şok Proteini(Hsp)</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1.2. Flagellin</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1.3. Üreaz</b>	<b>6</b>
<b>2.5.1.4. Süperoksit dismutaz ve katalaz</b>	<b>7</b>
<b>2.5.1.5. Adhezinler ve dış membran proteinleri</b>	<b>7</b>
<b>2.5.1.5.1. BabA (HopS)</b>	<b>7</b>
<b>2.5.1.5.2. OipA (HopH)</b>	<b>7</b>
<b>2.5.1.5.3. SabA (HopP)</b>	<b>8</b>
<b>2.5.1.5.4. Lipopolisakkarit (LPS)</b>	<b>8</b>
<b>2.5.1.6. Sitotoksin ilişkili toksin A (CagA )</b>	<b>9</b>
<b>2.5.1.7. Vakuolizan toksin A ( VacA)</b>	<b>10</b>
<b>2.5.1.8. IceA</b>	<b>13</b>
<b>2.6. H. pylori'ye KARŞI OLUŞAN İMMUN YANIT</b>	<b>13</b>
<b>2.7 EPİDEMİYOLOJİ</b>	<b>14</b>
<b>2.8. H.Pylori'ye BAĞLI GELİŞEN HASTALIKLAR</b>	<b>16</b>
<b>2.8.1. Gastrit</b>	<b>16</b>

<b>2.8.1.1. Antral predominant akut kronik gastrit</b>	<b>16</b>
<b>2.8.1.2. Korpus predominant aktif kronik gastrit</b>	<b>16</b>
<b>2.8.2. Gastrik atrofi ve mide kanseri</b>	<b>16</b>
<b>2.8.3. MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) Lenfoma</b>	<b>17</b>
<b>2.8.4. Duodenal Ülser</b>	<b>17</b>
<b>2.8.4. Gastrik Ülserasyon</b>	<b>19</b>
<b>2.8.5. Nonülser Dispepsi ilişkisi</b>	<b>19</b>
<b>2.9. TANI</b>	<b>19</b>
<b>2.9.1. İnvaziv Yöntemler</b>	<b>19</b>
<b>2.9.1.1. Kültür</b>	<b>19</b>
<b>2.9.1.2. Histopatolojik inceleme</b>	<b>20</b>
<b>2.9.1.3. Hızlı üreaz testi</b>	<b>20</b>
<b>2.9.1.4. Moleküler tanı yöntemleri</b>	<b>21</b>
<b>2.9.2. İnvaziv olmayan yöntemler</b>	<b>21</b>
<b>2.9.2.1. Üre nefes testi</b>	<b>21</b>
<b>2.9.2.2. Serolojik yöntemler</b>	<b>21</b>
<b>2.9.3. Dışkı örnekleri için kullanılan tanı yöntemleri</b>	<b>22</b>
<b>2.9.3.1. Dışkı kültürü</b>	<b>22</b>
<b>2.9.3.2. Dışkı antijen testleri</b>	<b>22</b>
<b>2.9.3.3. Dışkı polimeraz zincir reaksiyonu</b>	<b>22</b>
<b>2.10. TEDAVİ</b>	<b>23</b>
<b>2.10.1. Tedavinin şiddetle önerildiği endikasyonlar</b>	<b>23</b>
<b>2.10.2. Tedavinin tavsiye edildiği endikasyonlar</b>	<b>24</b>
<b>2.11. ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI</b>	<b>25</b>
<b>2.11.1. Bismut tuzları</b>	<b>25</b>

<b>2.11.2. Amoksisilin</b>	<b>25</b>
<b>2.11.3. Metranidazol direnci</b>	<b>25</b>
<b>2.11.4. Klaritromisin direnci</b>	<b>26</b>
<b>2.11.5. Tetrasiklin</b>	<b>26</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>27</b>
<b>3.1. Çalışmaya Alınan Hasta Grubu ve Örnek Alınması</b>	<b>27</b>
<b>3.2. Biyopsi Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Boyalar</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2. Örneklerin İşlenmesi</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1. DNA İzolasyonu</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Moleküler Yöntemler</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1.2. Kullanılan Tamponlar Kimyasal Çözeltiler</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu</b>	<b>31</b>
<b>3.3.2.1. Primerler</b>	<b>31</b>
<b>3.3.2.2. PCR protokolü</b>	<b>32</b>
<b>3.3.2.3. PCR reaksiyon siklusları</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3. Nested Real Time PCR yöntemi ile Klaritromisin Direncinin Belirlenmesi</b>	<b>33</b>
<b>3.3.3.1. <i>H.pylori</i> DNA'sının Amplifikasyonu</b>	<b>33</b>
<b>3.3.3.2. Light Cycler (LC) Reaksiyon Protokolü</b>	<b>33</b>
<b>3.4. Kullanılan Cihazlar</b>	<b>34</b>
<b>3.5. İstatistiksel Analiz</b>	<b>34</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Hasta bulguları</b>	<b>34</b>

<b>4.2.Hasta grupları ve <i>H.pylori</i> pozitifliği</b>	<b>37</b>
<b>4.3. <i>CagA</i> geni pozitifliği</b>	<b>38</b>
<b>4.4. <i>VacA</i> geni pozitifliği</b>	<b>39</b>
<b>4.5. <i>VacA</i> gen allelerinin birlikte pozitifliği</b>	<b>42</b>
<b>4.6. <i>CagA</i> gen pozitifliği ile <i>VacA</i> geni birlikteliği</b>	<b>42</b>
<b>4.7. Adezyon genleri pozitifliği</b>	<b>43</b>
<b>4.8. <i>CagA</i> gen pozitifliği ile adezyon genleri birlikteliği</b>	<b>44</b>
<b>4.9. PCR pozitif örneklerde klaritromisin direnci</b>	<b>45</b>
<b>4.10. Klaritromisin direncinin <i>CagA</i> virulans geni ile ilişkisi</b>	<b>49</b>
<b>4.11. Klaritromisin direncinin <i>VacA</i> alleleri ile ilişkisi</b>	<b>49</b>
<b>4.11. Klaritromisin direncinin adezyon genleri ile ilişkisi</b>	<b>50</b>
<b>5.TARTIşMA</b>	<b>51</b>
<b>6.SONUÇ</b>	<b>59</b>
<b>7.ÖZET</b>	<b>61</b>
<b>8.ABSTRACT</b>	<b>62</b>
<b>9.KAYNAKLAR</b>	<b>63</b>

## TABLolar DİZİNİ

**Sayfa No:**

<b>Tablo 1.</b> Tanıda kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllükleri	<b>23</b>
<b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan primerler	<b>31</b>
<b>Tablo 3.</b> Bir reaksiyon için Real Time PCR karışımının hazırlanması	<b>33</b>
<b>Tablo 4.</b> Endoskopi sonucuna göre hasta grupları ve <i>H. pylori</i> pozitifliği	<b>38</b>
<b>Tablo 5.</b> Virulans genleri	<b>38</b>
<b>Tablo 6.</b> <i>CagA</i> virulans geninin klinikle ilişkisi	<b>39</b>
<b>Tablo 7.</b> <i>VacA</i> gen bölgeleri klinikle ilişkisi	<b>40</b>
<b>Tablo 8.</b> <i>VacA</i> alellik beraberliğinin klinikle ilişkisi	<b>42</b>
<b>Tablo 9.</b> <i>CagA</i> ile <i>VacA</i> alellik genlerinin birlikteliği	<b>43</b>
<b>Tablo 10.</b> Adezyon genlerinin klinikle ilişkisi	<b>44</b>
<b>Tablo 11.</b> <i>CagA</i> ve adezyon genlerinin birlikteliği	<b>45</b>
<b>Tablo 12.</b> Klaritromisin direncinin <i>CagA</i> virulans geni ile ilişkisi	<b>49</b>
<b>Tablo 13.</b> Klaritromisin direncinin <i>VacA</i> allelleri ile ilişkisi	<b>49</b>
<b>Tablo 14.</b> Klaritromisin direncinin adezyon genleri ile ilişkisi	<b>50</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa No:

Şekil 1. <i>VacA</i> proteini(60).	11
Şekil 2. <i>H.pylori</i> ' ye karşı oluşan immün yanıt (81).	14
Şekil 3. Gastrik biyopsiden hazırlanan direk yaymada Gram boyası (10x100) immersiyon objektifte <i>H.pylori</i> pozitifliği	36
Şekil 4. Besiyerinde <i>H.pylori</i> kolonileri	36
Şekil 5. Agaroz jel de A marker, B, C, D, E, F'de <i>CagA</i> + (289 bp). G, H'de 534 bp <i>H.pylori</i> pozitifliği	37
Şekil 6. A. Marker, (B,C,E,F) <i>VacA</i> midregion pozitif, (D,G) <i>VacA</i> midregion Negatif	40
Şekil 7. A.VI pozitifliği,(B,C,D) <i>slA</i> pozitifliği, E <i>slB</i> negatif, F <i>s2</i> pozitif	41
Şekil 8. M marker, B <i>slb</i> , C <i>s2</i> , D <i>m1</i> , E <i>m2</i> , F <i>IceA1</i> , G <i>IceA2</i> (229bp), H <i>IceA2</i> (334)	41
Şekil 9. <i>BabA2</i> pozitifliği (850bp) B.C.D <i>BabA2</i> pozitif , E <i>BabA2</i> negatif	44
Şekil 10. <i>H.pylori</i> 'de klaritromisin duyarlılığını gösteren melting curve analizi $65\pm 2$ °C, 65 °C'deki pik duyarlılığı ve $83\pm 2$ °C pik <i>H.pylori</i> pozitifliği göstermekte	46
Şekil 11. Klaritromisin dirençli <i>H.pylori</i> $57\pm 2$ °C 'de pik ve $83\pm 2$ °C'de pik	47
Şekil 12. Klaritromisin duyarlı ve dirençli izolat bir arada co-enfeksiyon varlığı $57\pm 2$ °C ve $65\pm 2$ °C 2pik mevcut. $83 \pm 2$ °C pik	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>CagA</i>	Sitotoksin ilişkili gen A
<i>CagPAI</i>	Sitotoksin ilişkili gen adacığı
<i>VacA</i>	Vakuol oluşturucu sitotoksin A
<i>BabA</i>	Kan grubu antijeni bağlayan adezin A
<i>SapA</i>	Sialil-Lewis X bağlayan gen A
<i>IceA</i>	İnduced by contact with the epitelyum.
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
PPI	Proton pompa inhibitörü
PCR	Polymerase Chain Reaction
FİSH	Floresan in situ hibridizasyon
PÜH	Peptik ülser hastalığı
PÜ	Peptik ülser
GÜ	Gastrik ülser
DÜ	Düodenal ülser
NIH	National Institute of Health
WHO	World Health Organisation
HspB	ıSı şok protein
LPS	Lipopolisakkariti
IL	İnterlökin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
İNF	İnterferon
GİS	Gastro intestinal sistem
NSAID	Nonsteroid ainti-inflamatuvar



BHI	Brain Heart Infusion
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
TBE	Tris Borik asit -EDTA
TE	Tris-EDTA



## 1.AMAÇ VE KAPSAM

*Helicobacter pylori*'nin (*H. pylori*) gastroduodenal hastalıklardaki rolünün keşfedilmesi, son yıllarda bakteriyoloji ve gastroenteroloji bilim dallarında yapılan önemli buluşlardan birisidir (1). *H. pylori*, gastrit, peptik ülser hastalığı (PÜH), mide kanseri ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoma (MALT) da major patojen olarak kabul edilmektedir (2, 3). *H.pylori*' nin neden olduğu aktif kronik gastrit dünyada en yaygın görülen bakteriyel enfeksiyondur (4).

*H. pylori* enfeksiyonunda ciddi mide hasarı oluşmaktadır. Enfeksiyonun gelişmesinde *H. pylori*'ye ait sitotoksin ilişkili patojenite adacığında (*CagPAI*) yer alan sitotoksin ilişkili gen (*CagA*), vakuol oluşturucu sitotoksin geni (*VacA*), kan grubu antijeni bağlayan adezin (*BabA*), Sialil-Lewis X bağlayan (*SapA*) ve *IceA* virulans faktörleri yanında konağa ait faktörler de önemli rol oynamaktadır. Üreaz enzimi ve yüksek hareket özelliği de enfeksiyon patogenezinde önemlidir (5, 6, 7, 8, 9). *H. pylori*'nin gastrik epitel yüzey mukozası ile etkileşimi proinflamatuvar sitokin IL-8 (İnterlökin) salınması ile sonuçlanır ve bu sitokin inflamatuvar yanıtı başlatır (10). *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda klaritromisin, amoksisilin ya da metranidazol antibiyotik kombinasyonuna proton pompa inhibitörü (PPI) eklenerek yedi veya ondört günlük üçlü tedavi protokolü uygulanmaktadır (11). Klaritromisin, *H. pylori* eradikasyonunda önerilen birçok tedavi protokolünde yer almaktadır. Ancak günümüzde klaritromisin direncinin giderek artması eradikasyon tedavisinin başarı oranını azaltmaktadır (12). Makrolit direncinin saptanmasında E-test, disk difüzyon yöntemi, real-time PCR ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (13). Klaritromisin direnci Amerika'da %5-14, Avrupa'da %10, ülkemizde ise %16.8-56 olarak bildirilmektedir (14).

Bu çalışmada, Kocaeli ve bölgesinde gastrointestinal sistem yakınması olan ve *H. pylori* enfeksiyonu düşünülen hastaların mide biyopsi örneklerinde moleküler yöntemler kullanılarak *H. pylori* varlığının araştırılması, pozitif olanlarda bakteriye ait virülans genlerinin belirlenmesi, bu genlerin klinik bulgu ile ilişkisinin saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca *H. pylori* tedavi protokollerinde yer alan klaritromisin direncin real time PCR yöntemiyle belirlenerek virülans genlerinin klaritromisin direnci üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.TARİHÇE

1890'lı yıllarda Bizzozero ve Saloman, kedi ve köpek mide dokusunda spiral bakterilerin varlığını bildirmişlerdir (15). 1906 yılında Krienitz, mide kanserli bir hastanın midesinde spiral bakteriyi izole etmiştir. 1938 yılında Doenges, postmortem incelediği 242 insan midesinin % 43'ünde benzer bakteri bulunduğunu saptamıştır (16). Freedburg ve Barron, 1940 yılında mide ülseri ve mide kanseri nedeniyle rezeke edilen 35 olgunun 13'ünde benzer bakteri bulunduğunu tespit etmişlerdir (17). Benedict ve Bliss, 1926 yılında üremik hastaların kusmuklarında fazla miktarda amonyum olduğunu ortaya koymuş ve bunun aşırı ürenin mukozal üreaz enzimi etkisi sonucu amonyuma dönüşmesiyle oluştuğunu belirtmişlerdir (18). Fitzgerald ve Murphy, 1950 yılında gastrektomiden alınan parçalarda, PÜH ile mukoza yüzeyindeki üreaz aktivitesi arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir. Ancak üreaz kaynağı, o tarihlerde belirsiz kalmıştır (19). Liebre ve Le Fevre, 1959 yılında tetrasiklin tedavisinden sonra midede üreaz aktivitesinin kaybolduğunu göstermişler ve bu enzimin, bakteri kaynaklı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (3, 18). Delluva, 1968 yılında midede üreaz enziminin bulunmadığını enzimin bakteri kaynaklı olduğunu ortaya koymuştur (20). Ster ve Colin-Jones, 1975 yılında midedeki bu bakterilerin inflamasyonla ilişkisinin bulunduğunu, 1983 yılında bir patolog olan J. Robin Warren bu mikroorganizmaların *Campylobacter*'e çok benzediğini bildirmiştir (21). Gastroenteroloji asistanı olan Barry Marshall aynı yıl bu mikroorganizmayı üretmeyi başarmış, 1985 yılında bir milyanın üzerinde mikroorganizma içeren kültür suyunu içerek kendini infekte etmiş; bakterinin bir patojen mi, yoksa inflamasyonlu mide mukozasını kolonize eden bir kommensel mi olduğunu göstermeye çalışmıştır. Sekiz gün içinde araştırmacıda akut gastrit gelişmiş ve böylece bu mikroorganizmanın gastritle ilişkili bir patojen olduğu doğrulanmıştır (18). 1989'da Goodwin ve ark. mikroorganizmayı *Campylobacter* cinsinden tamamen ayırmışlar; helikal yapısından ve sıklıkla midenin pilor bölgesinden izole edilmesinden dolayı *H. pylori* adını vermişlerdir (17, 18, 22). J.Robin Warren ve Barry Marshall yaptıkları çalışmalardan dolayı 2005 yılında Nobel ödülü almışlardır (18).

1994'de NIH (National Institute of Health) tarafından *H.pylori*'nin peptik ülser hastalığının en önemli nedeni olduğu ve ülserli hastaların bu mikroorganizma için eradikasyon tedavisi almaları gerektiği kabul edilmiştir (23, 24). Aynı yıl WHO'nun (World Health Organisation) bir kolu olan International Agency for Cancer Research, mevcut verileri yeniden gözden geçirerek, *H. pylori*'yi insanlarda sınıf 1 karsinojen olarak sınıflandırmışlardır (25).

## 2.2. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER

Mide biyopsilerinden hazırlanan doku kesitleri, Gram, karbol fuksin, akridin oranj, Giemsa, hematoksilen-eosin ve Whartin-Starry gümüş gibi boyalarla boyandığında *H. pylori* mukus tabakanın altında, epitel hücre yüzeyinde ve lümende görülür. Gram negatif, uzunluğu 2-4 µm, genişliği 0.5-1 µm boyutlarında spiral şekilli basildir. Uzamış kültürlerde ve antibiyotik tedavi altında kokoid formda bulunur. Bu form yaşayan ancak invitro kültürü yapılamayan formdur (5,9). Elektron mikroskopunda U şeklinde basil olarak görülürler. Yaklaşık 3µm uzunlukta 2-6 unipolar kılıflı falajellaya sahiptir (26). Her flagella yapısının uçlarında *Campylobacter* cinsi bakterilerde bulunmayan karakteristik şişkinlikler (terminal bulb) vardır. Bu yapı özellikleri bakterinin yoğun (visköz) sıvılarda tribuşon tarzında kolay hareket etmesini sağlar. Flagellar kılıf, membranın tipik yapısı olan proteinler ve lipopolisakkaritlerden oluşur. *H. pylori*, Gram negatif bakterilerin hücre duvarı yapısına benzer. Dış membran yapısında karakteristik üreaz ve ısı şok protein (HspB) agregatları yer almaktadır. *H. pylori* lipopolisakkariti (LPS) diğer Gram negatif bakterilerden farklılıklar gösterir. Yağ asitlerinin 6 olan zincir sayısı 4'e düşmüş, buna karşılık zincirdeki karbon sayısı artmış ve zincir uzamıştır. *H. pylori* dış yüzey lipopolisakkaritleri, düşük biyolojik aktivite göstermelerine rağmen, infeksiyonun kalıcı olmasına katkıda bulunurlar (27). Bu lipopolisakkaritlerin O-spesifik yan zincirde yer alan tekrarlayan Lewis tipi (Le<sup>x</sup> ve Le<sup>y</sup>) karbonhidrat antijenleri, insan eritrosit ve mide mukoza hücrelerinin yüzeyinde yer alan Le<sup>a</sup>-Le<sup>b</sup> antijenleri (Lewis a ve Lewis b) ve O grubu insan eritrositlerindeki H-1 antijenleri ile yapısal olarak homologdur. Bu özellikler kronik kolonizasyon, immun tolerans ve kronik infeksiyonlara bağlı otoimmün patolojiye yol açar (27, 28).

Üreyebilmeleri için mikroaerofilik ortama (%5 O<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %85 N) ve yüksek neme ihtiyaç duyarlar. Optimum 37°C'de üremekle beraber, 32-40 °C'de de üreyebilirler. Midede kısa bir süre pH<4'e maruz kalsa da üremesi için optimal pH aralığı 5.5-8 arasındadır (29). Glukoz metabolizması ile ilgili enzimleri bulunmasına rağmen β-galaktozidaz enzimi yoktur, bu nedenle glukozu katabolize edebilir, fakat diğer şekerleri katabolize edemez (30, 31, 32, 33). Buna karşılık metabolizma için gerekli olan enerjiyi aminoasitlerden, üreden ve CO<sub>2</sub>'den sağlar (27).

Nazlı üreyen mikroorganizmadır. Üreyebilmeleri için serum veya at kanı ile zenginleştirilmiş, antibiyotik ilavesi ile seçici hale getirilmiş kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Ayrıca uzun zincirli yağ asitlerinin toksik etkisinden korumak için, β-cyclodextrin, IsoVitaleX, % 0,2 aktif kömür eklenmesi gerekir. Genellikle besiyeri olarak rutin kullanımda %7 At kanı, koyun kanı ya da fetal dana serumu ilave edilmiş, Müler Hinton, Columbia ve Brucella agar kullanılır. Selektif üretim için vancomycin, trimethoprim, cefsoludin ve amphotericin B antimikrobiale kombinasyonu önerilmektedir (34).

*H. pylori*'nin mide biyopsi örneklerinden izolasyonu oldukça güçtür ve bazen başarılı olunamamaktadır. Besiyerine ekilen biyopsi örneği 3-5 gün inkübasyon sonrası 1mm çapında şeffaf, pigmentsiz koloniler olarak görülmekte, daha uzun süren inkübasyonlarda kokoid forma dönüşmektedir (26, 35).

Saklanması için besiyeri içersine %15-20 gliserol veya 10% dimethyl sulfoxide ilave edilmiş beyin kalp infusion broth ve Brucella broth besi yerleri kullanılır. Kırksekiz saat inkübasyon sonrası üreyen bakteriler toplanarak -80°C'de saklanır (9).

### 2.3. BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER

*H. pylori*'nin katalaz ve oksidaz reaksiyonu pozitifdir. En belirgin biyokimyasal karakteri yüksek üreaz üretmesidir. Çok güçlü bir üreaz enzimi vardır. Üreaz enzimi operonu *H. pylori* kromozomunun 34 kb kısmına lokalizedir. Üre operonu, ÜreA ve ÜreB olan iki yapısal alt üniteyi, Üre C ve Üre D olan iki regülatör alt üniteyi, ayrıca ÜreI, ÜreE, ÜreF, ÜreG, ÜreH olan beş yardımcı proteini kodlar. Üreazın enzimatik aktivitesi, asidik pH yanıtında bakteri hücrelerine ürenin girişini

düzenleyen iç membran pH bağımlı ÜreI kanalıyla kontrol edilir (6). Bu enzimden bakterinin hızlı tanısında yararlanır. Üreaz enzimi pH: 4–10 arasında aktiftir.

İnsan mide mukusunu bozan proteaz ve fosfolipaz enzimleri de vardır. Hippurat hidrolizi ve nitrat reaksiyonu negatiftir. *H. pylori* karbonhidratları metabolize etmez, ama Krebs siklusu üzerinden organik asitleri ve aminoasitleri kullanmaktadır (33, 36). Mikroaerofilik mikroorganizma olması nedeniyle yüksek oksijen konsantrasyonuna duyarlıdır; bununla beraber son elektron alıcısı olarak oksijeni kullanması nedeniyle %2'lik oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç duyar. *H. pylori* konak hücrede immün yanıtı bağı olarak oksidatif strese maruz kalmaktadır. Bakteri bu strese sahip olduğu süperoksit dismutaz enzimi sayesinde direnç göstermektedir. Oluşan peroksit ise katalaz enzimi sayesinde parçalanır (37).

#### **2.4. MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİ**

*H. pylori* homojen bir suş olup, tek bir dairesel genomik DNA'ya sahiptir. Bu DNA 1.40-1.73 Mbp arasında, ortalama 1.71 Mbp büyüklüğündedir. DNA içindeki Guanin+Sitozin (G+C) kompozisyonu %35-40 arasında değişmektedir. DNA-DNA hibridizasyonu ile, suşların %65 oranında yüksek seviyede dizi homolojisi gösterdiği bulunmuştur (9, 27). Ekstrakromozomal DNA olan plazmid, suşların %45'inde vardır. Plazmidlerin büyüklük ve sayısı suşlara göre değişik olabilir fakat üzerlerinde antibiyotik direnç geni ve virülans geni taşımamaktadır. Birçok suş 1.8-6.3 kbp büyüklüğünde tek bir plazmide sahiptir (38).

#### **2.5.VİRULANS VE PATOJENİTE ÖZELLİKLERİ**

*H. pylori* mide epiteli olan bölgelere tutunabilir. Erişkinlerde proksimal duodenumda %30 oranında, bölgeye gelecek asit salgısından korunmak için mide epiteli bulunur. Özofagusta da yer yer mide epiteli bulunabilir. Böylece *H. pylori* mide dışında, duodenum ve özofagusta da epitele tutunabilir. Tüm bu yerleşim bölgelerinde bakteriler kümeler halinde bulunmaktadırlar. *H.pylori* infeksiyonlarının patogeneğinde bakteriyel faktörler kadar konağın immün cevabı ve çevresel koşullar da etkilidir (9, 39).

### 2.5.1 Bakteriyel Faktörler:

**2.5.1.1. Isı Şok Proteini(Hsp):** Yapısal benzerliğinden dolayı HspB, üreazın moleküler koruyucusu olarak görev yapabilir. HspA ve HspB proteinlerinin, üreaz ile beraber salınımı deneysel olarak üreaz aktivitesini arttırmaktadır (40).

**2.5.1.2. Flagellin:** *H. pylori* spiral morfoloji ve flagellumları yardımıyla viskoz ortamda kolayca hareket edebilmektedirler. En önemli virulans faktörlerinden biri olan hareket yeteneği bakterinin kolonizasyonunda oldukça önemlidir. Flagellar hareket, pH bağımlıdır, pH: 4,1'in altında hareket durur. Üre ve sodyum bikarbonat hareketi uyararak pozitif kemotaksis özelliği gösterir. Flagellalar flaA, flaB ve flaE proteinleri tarafından oluşturulur. Hareketten flaA proteini sorumlu iken flaE proteini uçlardaki karakteristik terminal soğanı oluşturur. Hayvan modellerindeki çalışmalarda flagellası olmayan *H. pylori* mutantları non-virulan bulunmuştur (41).

**2.5.1.3. Üreaz:** Yaklaşık 540 kDa mol ağırlığında heksamerik bir moleküldür. Sitoplazmik metalloenzim olan üreazın nikel iyonlarına gereksinimi vardır. Gastrik kolonizasyonunun başlangıç döneminde üreaz aktivitesinin koruyucu rolü önemlidir. Mide mukozasındaki asit ortamda bu bakterinin canlı kalabilmesi yüksek düzeyde üreaz enzimi yapılmasıyla ilgilidir. *H. pylori* üreaz enziminin etkisiyle üre, amonyak ve karbondioksite parçalanır. Amonyak hidrojen iyonları tutucusu olduğundan midede lokal pH artar. Yapılan pek çok çalışmada amonyağın mide epitel hücrelerinde morfolojik ve fonksiyonel değişmelere neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca amonyak bakteriyel adezyonu arttırmakta ve komplemanı inaktif hale getirmektedir. *H. pylori* üreaz aktivitesi, mononükleer hücre aktivasyonu ve inflamatuvar sitokin üretiminde güçlü bir uyarıcıdır. *H. pylori* üreaz enzimi toplam hücre proteininin %10'dan daha fazlasını oluşturmaktadır (6).

**2.5.1.4. Süperoksit dismutaz ve katalaz:** Bu enzimler, polimorf nüveli lökositlerin fagositoz etkilerine karşı *H. pylori*'yi korurlar. Ayrıca katalaz, bakteriyi invivo toksik O<sub>2</sub> radikallerinin etkisinden korumaktadır. *H. pylori*, proteaz enzimi ile mide mukozasındaki mukusu parçalar. Böylece, bakterinin kolonizasyonunu kolaylaştırır.

Bakteri, salgıladığı proteaz, lipaz ve fosfolipaz enzimleri aracılığıyla mukus ve epitelde hasar oluşturabilir.

**2.5.1.5.Adezinler ve dış membran proteinleri:** Bakterideki birçok faktör gastrik epitele yapışmasına yardımcı olmaktadır. Patogenezinde rolü olanlar;

**2.5.1.5.1.BabA (HopS);** Yetmişsekiz kDa ağırlığındadır ve adezin proteinleri arasında en iyi karakterize edilenidir. *BabA* geni tarafından kodlanmaktadır. İnsan hücrelerinde fukozillenmiş Le<sup>b</sup> kan grubu antijenlerine bağlanmasına yardımcı olur. İki tip *BabA* formu vardır; *BabA1* ve *BabA2*. Ancak *BabA1* geninin 3' ucuna 10 baz çiftlik nükleotid dizisinin girmesi nedeniyle sadece *BabA2* tam uzunlukta adezin proteini kodlar. *H. pylori* çoğunlukla epitel üzerini kaplayan gastrik mukus içinde bulunur. *H. pylori* gastrik musin MUC5AC ile birlikte bulunduğu yapışmanın MUC5AC spesifik ligandlara doğru baskın olduğu yönündedir. Le<sup>b</sup> antijeninin *BabA* tarafından tanınması bu bölge spesifik kolonizasyonda anahtar rol oynadığı yönündedir. Ancak *BabA*'nın Le<sup>b</sup> negatif MUC5AC mutantlarına bağlanması ilave epitoplara veya adezinlerin varlığına işaret etmektedir (42).

*BabA* adezyon proteininin ülser hastalığı ve gastrik adenokarsinoma ile güçlü ilişkisi nedeniyle *H. pylori*'nin virulansında önemli bir rol oynadığı düşünülmekle beraber bu konu hala tartışmalıdır (43).

*BabA* allelleri şiddetli hastalık formları ile ilişkili olmasına rağmen, *BabA2* allelinin *VacA s1* ve *CagA* allelleri ile bağlantısı nedeniyle bağımsız bir hastalık belirteci olarak kullanılamaz (43, 44, 45).

**2.5.1.5.2. OipA (HopH):** Hop protein ailesinin bir başka üyesi olan 34 kDa'luk *OipA* adezin proteini ilk olarak proinflamatuvar cevabı uyandıran faktör olarak tanımlanmıştır (46). *OipA*'yı kodlayan gen tüm *H. pylori* suşlarında bulunmasına rağmen 5' ucunda bulunan CT dinükleotid tekrarlarının sayısının farklılaşmasıyla faz varyasyonu ile ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. *OipA*'nın hem *in-vitro* ortamda hem de *in-vivo* ortamda ekspresyonu artmış IL-8 ekspresyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiş olmasına karşın, bu genin gastrik inflamasyonla ilişkilendirilmesi için daha çok çalışmaya gereksinim duyulduğu bildirilmektedir (43, 47).



**2.5.1.5.3. SabA (HopP):** *SabA* sialik asit içeren glikokonjugatlara bağlanmasına aracılık eder. *H. pylori* tarafından tetiklenen gastrik inflamasyon ve gastrik kanser, nonsialize Lewis antijenlerinin yerine sialillenmiş Le<sup>x</sup> ve Le<sup>a</sup> antijenlerinin yerine geçmesi ile ilişkilidir. Bu nedenle *SabA* muhtemelen kronik inflamatuvar ve atrofik hastalık evrelerinde rol alır. İnsan granülositleri de üzerlerinde sialilatlanmış karbonhidrat molekülleri taşıdıklarından *SabA* tarafından tanınırlar. *H. pylori*'nin *in-vitro* ortamda granülositlere bağlanması bu hücrelerin aktivasyonuna sebep olmakta ve bakterinin bu hücreleri kontrol etmesini sağlamaktadır. *SabA* ayrıca bir hücre dışı matriks proteini olan laminini de bağlayabilir. Bu bağlanma bakterinin basitçe konak immun sistem hücrelerinden kaçmasına yardım etmez, fakat bakterinin *CagA*, *VacA* ve diğer virulans faktörlerinin direk transferi sonucu konağın immun yanıtının kontrol edilmesine izin verir (48).

**2.5.1.5.4. Lipopolisakkarit (LPS):** *H. pylori* suşlarının çoğu hem yapısal hem de immunolojik olarak insan kan grubu antijenlerine benzeyen fukozillenmiş oligosakkaritler içeren LPS'leri içerirler. Lewis antijenleri adı verilen bu bakteriyal antijenler antijenik çeşitlilikte önemli rol oynamakta ve immun yanıtı kurtulmada yardımcı olduğu düşünülmektedir. Lewis antijenlerinin başlangıçta adezinden ve kolonizasyondan sorumlu olduğu düşünülse de aslında bu olaylarda çok az rol aldığı gösterilmiştir (49).

*H. pylori*'nin LPS'i *CagA*'dan bağımsız bir şekilde NF-kB ve IL-8 üretimini hem epitel hem de immün sistem hücrelerinde tetikler, ancak *H. pylori* stimülasyonu ile gerçekleşen ve epitel hücrelerde üretilen NF-kB'nin aktivasyonu LPS yardımı ile olmaz. Diğer Gram negatif bakterilere kıyasla *H. pylori*'nin LPS'i zayıf bir immun cevap uyarıcısıdır. Bunun sonucu olarak LPS immun aktivasyonunda major bir faktör olarak rol oynamamaktadır. Organizma LPS üzerinde taşınan Lewis antijenlerini faz varyasyonları yolu ile değiştirerek taşıyıcı hücre antijenlerini taklit edebilme yeteneğinin gastrik otoimmüniteyi tetikleyip tetiklemediği veya LPS'in immun uyarıcı etkisini, azaltıp azaltmadığı hala netlik kazanmamıştır (50).

**2.5.1.6. Sitotoksin ilişkili toksin A (CagA):** *VacA* üreten suşların hemen tamamında görülen ancak vakuol oluşumuna yol açmayan 128 kDa ağırlığında oldukça immunojen hidrofilik toksindir. Bu genin varolan *H. pylori* suşlarının %50 ile 70'inde bulunduğu ve 27 ile 31 arasında protein kodlayabilen 40 kbp'lik PAI genomik bölgesi için belirteç olduğu düşünülmektedir (51, 52).

*CagPAI* taşıyan suşlar *CagA+* suşlar olarak isimlendirilmiş olup bu suşları taşıyan hastaların *CagA* markır proteinine karşı ciddi antikor titreleri ürettiği bilinmektedir (7). Her ne kadar Asyalılar için geçerli olmasa da batı dünyasında *CagA+* suşlar ile enfekte olan hastaların yüksek inflamatuvar cevabı olup PÜH ve gastrik kansere yakalanma riskleri yüksektir (53, 54, 55). *CagA* PAI içermeyen suşlarında da düşük sıklıkta da olsa GÜ (gastrik ülser) ve kanser hastalığı varlığı bilinmektedir (9). Çoğu *CagA+* olarak düşünülen suşların aslında tam olmayan *CagA* PAI bölgeleri içerdiği (%10) ve dolayısı ile de fonksiyonel olmayan *CagA* PAI ye sahip oldukları bilinmektedir. Bu yüzden *CagA+*'liğin hastalık oluşumu üzerindeki etkisi hala keskin çizgilerle belirlenmiş değildir (52).

*VacA*'ya yardımcı olduğu düşünülen bu toksin 20'den fazla ekstrasellüler proteinin üretildiği *CagA* patojenite gen adası için bir göstergedir. Bu ada *picA* (*CagA* ve *CagD*) ve *picB* gen bölgeleri bulunmaktadır. *picB*'nin kodladığı proteinler epitel hücrede tirozin fosforilasyonunu indükleyerek inflamatuvar cevabı başlatan tirozin kinazı aktive ederler. Bu geni taşıyan *H. pylori* suşları, bu geni taşımayanlara kıyasla PÜH ve mide karsinomu vakalarıyla daha sık ilişkili bulunmaktadır (56).

*CagA* geni, *CagPAI* genleriyle birlikte yüksek oranda inflamatuvar reaksiyonlarla ilişkilidir. Gastrik mukozada IL-8, IL-6, IL-10, IL-12 ve TNF (Tümör nekroz faktör) sekresyonunu uyarır. Farklı patojenik özelliklere sahip *H. pylori* suşları ile yapılan ilk çalışmalar artan patojenisitenin aslında virulan özellik ile ilgili olduğunu ve bu virulan suşların *in-vitro* kültürlerde morfolojik değişikliklere, vakuolizasyona, arda arda yapılan transferler sonucunda dejenerasyona sebep olduğu yönündedir (27, 57, 58).

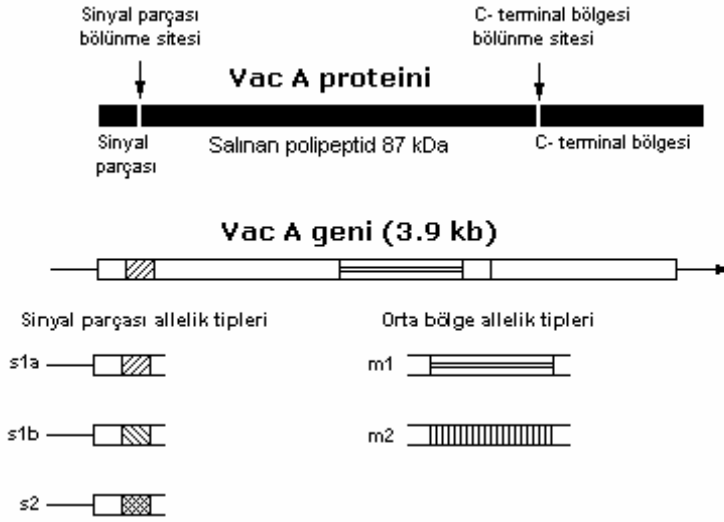
*CagPAI* tarafından kodlanan proteinlerin 18 tanesi tip IV sekresyon sisteminin yapısını oluşturur. Bu proteinler şırınga benzeri bir yapı oluşturarak gastrik epitel hücrelere girer ve *CagA*'nın, peptidoglikanın, ve muhtemelen diğer virulans faktörlerinin taşıyıcı hücreye girişini sağlarlar. *CagA*'nın hücreye girmesini

takiben Src adı verilen bir protein kinaz *CagA*'yı tirozin amino asidinden fosforile eder. Fosforile olan *CagA* taşıyıcı hücre içerisinde aktif hale geçerek taşıyıcı hücreye ait sinyal molekülleri ile (tirozin fosfataz SHP-2) etkileşerek epitel hücrelerde morfolojik değişiklikler yapar (59). *CagPAI* ayrıca immün sistemi de T hücrelerinin apoptozisine sebebiyet vererek etkiler. Tip IV yapısı ile taşıyıcı hücre arasındaki etkileşimler epitel hücrelerde pro-inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu ile sonuçlanır (60, 61).

Daha önce *CagA* proteininin bu pro-inflamatuvar sitokinleri indükte ettiği düşünülmekte idi ancak son zamanlarda inanılan *CagA*'nın bu işlemde rolünün minör olabileceği doğrultusundadır (62).

Tirozinin fosforilasyonu *CagA* üzerinde bulunan EPIYA motifi içerisinde yapılı ve *CagA*'nın SHP-2 bağlanması için bu fosforilasyon şarttır. Farklı *H. pylori* suşları incelendiğinde bunların EPIYA motifleri arasında varyasyonlar olduğu bilinmektedir. *CagA*'nın fosforilasyon düzeyi, üzerinde taşıdığı tekrar dizileri ile ilişkilidir. Tekrar dizisi fazla olan *CagA* proteini kültüre edilmiş epitel hücreler üzerinde daha güçlü morfolojik değişiklikler oluşturmakta ve bu nedenle de gastrik kanser ile ilişkilendirilmektedir (63, 64).

**2.5.1.7. Vakuolizan toksin A ( *VacA* ) :** İnsan ve diğer memeli hayvanların başta mide olmak üzere tüm epitel hücrelerinde asidik vakuolizasyona neden olan bir toksindir. *VacA* toksini 95 kDa büyüklüğünde oligomerik yapıda bir protoksindir. Asit pH'da proteolize uğrayarak 34 kDa'lık N terminal ve 58 kDa'luk C terminal parçalarına ayrılıp aktif hale geçer. 58 kDa'luk parça hücreye bağlanmayı sağlarken, 34 kDa'luk bölüm hücrede vakuolizan ATPaz proton pompasını aktive ederek nukleus etrafında zayıf bazların birikimine ve vakuollerin oluşumuna yol açar. *H. pylori* suşlarının tamamında toksini kodlayan *VacA* geni bulunmasına rağmen genomdaki farklılıklar nedeniyle %50'si toksin üretebilmektedir (65). *VacA* geni suşları arasında, özellikle azot içeren uçtaki (N ucu) kısa olan sinyal dizisinde ve orta bölgede farklılıklar göstermektedir. *VacA* geninin sinyal dizilerine göre *S1a*, *S1b* ve *S2* olmak üzere üç, orta dizi farklılıklarına göre de *m1* ve *m2* olmak üzere iki alleli bulunmaktadır (Şekil 1).



**Şekil 1.** *Vac* proteini (66).

Orta bölge toksin etkinliğinin başlıca belirleyicisidir. p58'in hücreyi bağlayan kısmını içerir. Her suş *VacA* proteinine sahipse de, suşlar arasında vakuolizasyon aktiviteleri arasında büyük farklar görülmektedir. Bunun temel nedeni *VacA* gen dizilerindeki heterojenliktir. *s1/m1* genotiplerinde vakuolizasyon aktivitesi yüksek, *s1/m2* genotiplerinde orta derecede ve *s2/m2* genotiplerinde yoktur. Bu bilgiye paralel olarak, *VacA s1/m1* genotipleri PÜH ve gastrik kanseri ile daha sık ilişkilidir (67). *VacA*'nın *s1/m1* alleli batı toplumlarında görülen en virülan formdur. Bu sonucun aksine Asya toplumlarında yapılan çalışmalarda bu ilişki belirlenememiştir (68). *s1/m1* tipi *VacA*, *CagA*<sup>+</sup> genotip ile bağlantılı olup her iki virülans faktörü de bağımsız tek başlarına hastalık oluşumunda bir virülans belirteci olarak düşünülemez. Bu bulgu son dönemde yapılan çalışmalarda *VacA*'nın hastalık oluşumunda zayıf bir belirteç olduğunu göstermektedir (69).

*VacA* mide epitel hasarının düzeyiyle ilişkilidir. Sinyal dizi tipi ise midedeki inflamasyon düzeyiyle ve duodenum ülser prevalansı ile ilişkilidir. *VacA* pozitif suşlarının çoğu *CagA* toksini yönünden de pozitifdir. Böylece teorik olarak mide epitelinde oluşan hasarın *VacA* sitotoksinin aktivitesi sonucunda ortaya çıktığı ve gastroduodenal ve gastroöfageal patolojiden, gastrik karsinomalardan ve MALT lenfomadan bu toksinin sorumlu olduğu söylenebilir. Bu toksini salgılayan *H. pylori* suşlarının, toksin salgılamayan suşlara oranla PÜ'li (peptik ülser) vakalardan daha sıklıkla izole edilmesi, bu proteinin virulansla ilgisini göstermektedir (67, 70, 71).

*VacA*'nın aktiviteleri arasında membran kanal oluşumu, endozomal ve lizozomal aktivitelerde bozulma, integrin-reseptörlerince indüklenen hücre sinyali yolağına etkisi, apoptosisi indüklemesi ve immün modülasyonları sayılabilir (72).

Vakuolizasyon oluşumu *in-vitro* ortamda gerçekleşse de *in-vivo* ortamda görülmemektedir (73).

Genetik yapısını aktif olarak değiştiren ve hızlı bir şekilde evrimleşen bakteride *VacA* ekspresyon seviyesi zamanla değişebilir. Bu mikroevrim sonucu oluşan farklı toksisite seviyeleri büyüyüp küçülebilen ülserlerin nedeni olarak açıklanabilmektedir (74).

*VacA* epitel hücre membranlarında açtığı porlar aracılığı ile taşıyıcı hücrelerden üre ve negatif yüklü iyon salınımını tetikler. Ayrıca hücreler arası geçirgenliği de artırarak besinlerin ve katyonların salınımını da artırır. Salgılanan toksinin büyük bir parçası çevreye salgılanmaz ve *H. pylori*'nin dış membranı ile bağlantılı kalır. Bakterinin taşıyıcı hücre ile kontak haline geçmesi sonucunda bir araya gelen bu toksinler hücre yüzeyine aktarılır ve toksik etkilerini gösterirler (75).

*VacA* proteinleri vasıtası ile direk veya indirek olarak oluşan etkilerin çoğu membrana bağlanarak por oluşumuna neden olsa da, *VacA* proteinleri aynı zamanda sitozole de girerek mitokondri iç membranında birikip endojen mitokondri kanallarını aktive ederek apoptozisi tetikler. *VacA*'nın bu proapoptotik etkisi hücre tipine bağlı olup belki sadece pariyetal hücreler gibi gastrik epitel hücreleri ile sınırlıdır. Bu azaltılmış bir asit salınımına ve böylece gastrik kanser oluşumuna neden olmaktadır. *VacA*'ya ait etkilerin birçoğu sadece gastrik epitel hücreler için tarif edilmişse de, salgılanan *VacA* proteinleri daha derinlerdeki dokulara penetre olup granülositler, monositler, B ve T hücreleri gibi immün sistem hücreleri ile de etkileşebilir. Bu bilginin bir kısmı lenfosit aktivasyonunun inhibisyonuna dayandırılmaktadır. *CagA*'nın aksine, *VagA* T-hücrelerinin apoptozisine yol açmamaktadır (76). Ancak T-hücrelerinin proliferasyonu *VacA* etkisiyle ciddi şekilde azalma gösterir bu da patojeniteye ayrı bir boyut kazandırmaktadır (76).

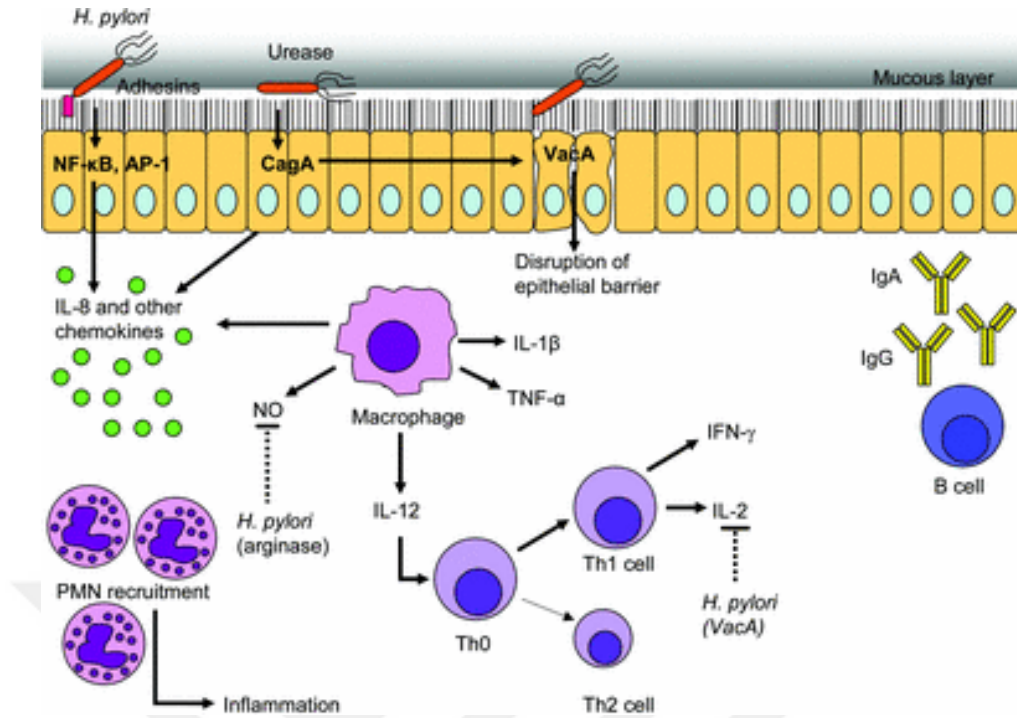
**2.5.1.8. *IceA*** (Induced by contact with epithelium): Bu gen genetik yapı bakımından restriksiyon endonükleazlara benzer. Allel varyantları *IceA1* ve *IceA2*'dir. *IceA1* sıklıkla peptik ülserli hastalarda gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar *CagA*, *VacA*

*sl/m1*, *IceA1* geni taşıyan *H. pylori* suşlarının daha virulan olduğu ve peptik ülserli hastaların sıklıkla bu suşlar ile enfekte olduğunu ortaya çıkarmıştır (77).

## 2.6. *H. pylori*'ye KARŞI OLUŞAN İMMUN YANIT

*H. pylori*'nin epitel hücelere yapışması sonucu içlerinde IL-8'in de yer aldığı değişik sitokinleri üretmesine yol açar (78). Ayrıca *H. pylori* nötrofilleri stimüle etmek suretiyle interferon (INF), TNF ve IL-1, IL-6, IL-8 salınımına neden olur (79). Bu sitokinler ve *H. pylori* tarafından üretilen kemotaktik faktörler, nötrofillerin ve diğer inflamatuvar hücrelerin bu bölgeye toplanmasına ve aktivasyonuna yol açar. Diğer yandan, epitel hücresi membranındaki mikrobiyal antijenler, sitotoksik T hücreleri ve helper T hücreleri tarafından tanımlanır. Bu olay ortama daha fazla sitotoksin salınımına, sitokinlerin artışı da B lenfositlerin spesifik antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmesine yol açar. Organizmada *H. pylori*'ye karşı ilk olarak IgM yapısında antikorlar üretilir. Daha sonra IgA ve IgG antikorlar yapılır (80). Akut enfeksiyon veya reenfeksiyonun göstergesi olan IgM antikorlar birkaç ay içinde azalır. IgA antikorları mikroorganizmanın gastrik epitele adheransını engeller. IgG antikorları ise kronik enfeksiyonda belirgindir. IgG antikorları tanı amaçlı kullanılmaktadır. Eradikasyondan sonra IgG düzeyleri azalmakla birlikte tamamen kaybolmamaktadır. Ortaya çıkan bu antikorlar hücre yüzeyindeki mikroorganizmanın antijenleri ile reaksiyona girer ve otodestruktif bir olay başlar.

Diğer yandan aktive olan nötrofillerden salgılanan reaktif oksijen metabolitleri ve proteazlar gibi zarar verici maddeler de epitel hasarına katkıda bulunur. Ortamda bol miktarda bulunan sitotoksik T hücreleri de doğrudan epitelde hasar oluşturabilir. Bu olaylar sonuç olarak epitelde erezyonlar ve ülserasyona neden olur. İmmun yanıtta varyasyonlar bakteri sayısını etkileyebilmekteyse de, hiçbir zaman tam olarak eradikasyon sağlanamamaktadır. Konakçının immunitesi ile yangısal yanıt arasındaki denge ya da dengesizlik sonucu asemptomatik kronik nonspesifik gastritten, daha ciddi gastroduodenal hastalıklara kadar değişen klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir (9).



Şekil 2. *H. pylori*' ye karşı oluşan immün yanıt (81).

## 2.7 EPİDEMİYOLOJİ

*H. pylori* günümüzde sosyoekonomik koşulları yetersiz olan ülkelerde toplumun tamamını enfekte eden ve kronik infeksiyonları, PÜH, mide adenokarsinomu, MALT lenfoma gibi GİS hastalıklarına neden olan bir patojendir. Sosyoekonomik durumun kötülüğü ve yaş artışıyla doğru orantılıdır (82). Hastalığın prevalansı ülkeler, hatta bir ülkenin farklı yerleşim bölgelerinde farklı olabilmektedir. Bir çok ülkede orta yaşlı yetişkinler arasındaki prevalans %80'in üzerinde iken, gelişmiş ülkelerdeki prevalans %20-50 arasındadır (83, 84). Gelişmekte olan ülkelerde ise %68'dir (85). Gelişmiş ülkelerdeki yetişkin popülasyonlarda enfeksiyonun yıllık insidansı yaklaşık %1 dir.

Ülkemizde 0-2 yaşta %14.7, 3-6 yaşta %20.3, 7-11 yaşta %72.7, 12-17 yaşta %84.4, 18-24 yaşta %76.8, 25-55 yaşta %84.2 olarak bulunmuştur (86).

*H. pylori*' nin esas kaynağı ve geçiş yolu kesin olarak ortaya konulmamış olmakla birlikte, dışkı ve diş plaklarından izole edilmiş olması, PCR ile tükürükte

DNA ürünlerinin varlığının gösterilmesi bakterinin oral yolla alındığını düşündürmektedir (82, 84, 87, 88, 89, 90, 91).

İnfeksiyonun esas olarak erken çocukluk döneminde aile içinde bulaştırıldığına inanılmaktadır (82, 84, 87). Gelişmiş ülkelerde insandan insana doğrudan bulaşma daha çok kusmuk, tükürük ya da feçesle olmakta iken gelişmekte olan ülkelerde kontamine su gibi diğer bulaşma yolları da önemli olabilmektedir. Veriler *H. pylori*'nin cinsel ilişki ve öpüşmekle bulaşmadığını ortaya koymaktadır. Hayvan rezervuarları gösterilememiştir. Primatlardan insanlara *H. pylori*'nin bulaştırılabilme olasılığı, insanlarda infeksiyonunun bu denli yaygın prevalansını açıklayacak yeterlilikte değildir. Hayvanlardan insanlara bulaştığına dair herhangi bir kanıt yoktur. Doğal rezervuarının insan olduğu sanılmaktadır. Henüz çevresel rezervuarı da saptanamamıştır. Ortak yaşam yerlerinde *H. pylori* prevalansının kontrol gruplarından daha yüksek bulunması, aile içi yayılım gösteren bir infeksiyon gibi görünmesi, etkenin insandan insana geçtiğini düşündürmektedir (82, 84, 87, 88, 89, 90, 91). Gelişmiş ülkelerde *H. pylori*'nin kazanılma hızı, son on yıl içinde iyileştirilmiş halk sağlığı koşulları sayesinde oldukça azalmıştır. Dolayısıyla, *H. pylori* prevalansındaki yaşla beraber görülen artış, çoğunlukla eski kohort etkisine bağlıdır. Alkol, sigara, antiinflamatuvar ilaç tüketimi ile *H. pylori* prevalansı arasında ilişki yoktur. Evinde evcil hayvan besleyenlerde prevalans düşük olmasının nedeni bu kimselerin sosyoekonomik durumlarının iyi olmasından ileri gelmektedir (18).

Ülser dışında NÜD (non ülser dispepsilerde), kronik böbrek yetmezliğinde, KAH da, pernisiyöz anemide, ülseratif özefajitte, Zollinger Ellison sendromunda, kolon poliplerinde de yüksek prevalansda görüldüğü iddia edilmekte, bu hastalıkların etyolojilerinde bu bakterinin bulunup bulunmadığı hala araştırılmaktadır (86).

## **2.8. *H. pylori*'ye BAĞLI GELİŞEN HASTALIKLAR:**

**2.8.1. Gastrit:** *H. pylori* ilk yerleşimi sırasında, antrum ve korpusu tutan ve lamina propriada yoğun nötrofil infiltrasyonu ile karakterli olan bir nötrofilik gastrit yapar (92). Akut gastrit dönemi birkaç hafta ile birkaç ay sürer. Bu gastritin en belirgin özelliği midede belirgin bir hipoklorhidriye neden olmasıdır. İnfekte kişilerin çok az bir kısmında infeksiyon kendiliğinden ortadan kalkar ve mukozaya normale döner.



Olguların büyük bir kısmında konakçının immun cevabı, infeksiyonu ortadan kaldırmakta yetersiz kalır ve inflamasyon, aralarında polimorf nötrofillerin de yer aldığı yoğun lenfoplazmositer hücre infiltrasyonu ile karakterli bir aktif kronik gastrite dönüşür (93). Bu gastrit iki türlü olabilir.

**2.8.1.1.Antral predominant akut kronik gastrit:** İnfeksiyon sırasında mide asit salgısı yüksek olanlarda gelişir ve duodenal ülser oluşumu ile birliktedir (93).

**2.8.1.2.Korpus predominant aktif kronik gastrit:** İnfeksiyon sırasında asit salgısı düşük olan midelerde, asitin bakteri üzerindeki olumsuz etkisinin ortadan kalkması, *H. pylori* 'nin korpusta da yerleşmesine ve diffüz ya da korpus predominant gastrit gelişmesine yol açar (93).

**2.8.2. Gastrik atrofi ve mide kanseri:** Mide kanseri ile kronik atrofik gastrit arasındaki ilişki uzun süredir bilinmektedir. *H. pylori*'nin mide kanseri etiolojisinde rol oynayabileceği aşağıdaki gözlemlerle bağlantılıdır:

- a) Tüm dünyada kronik gastrite yol açan nedenler içinde *H. pylori* birinci sıradadır ve bu aktif kronik gastritlerin bir kısmında kronik atrofik gastrite dönüşmektedir.
- b) Mide kanseri ile *H.pylori* arasında güçlü bir epidemiyolojik ilişki vardır.
- c) *H. pylori* infeksiyonunun hücrel ve biyokimyasal sonuçları teorik olarak bazı duyarlı kişilerde kanserojeneze yol açabilir. *H. pylori* prevalansının yüksek olduğu toplumlarda gastrik kanser oranlarında önemli ölçüde artmış durumdadır (93, 94).

Çeşitli çalışmalar *H. pylori* ile infekte kişilerde distal mide kanseri riskinin 8-9 kat arttığını ve gelişmiş ülkelerdeki mide kanserlerinin % 60-80'inin *H. pylori* ile ilişkili olduğunu göstermektedir (95). *H. pylori* gastriti antrum ağırlıklı ise kişide duodenal ülser, eğer korpus ağırlıklı ise gastrik ülser veya kanser eğilimi ortaya çıkmaktadır (96). *H. pylori*'nin indüklediği adenokarsinom mekanizmaları kronik doku yanıtında da rol oynamaktadır ve doku atrofisinin ilerlemesinde ve metaplazi oluşumunda önemli patolojik basamak olarak yer almaktadır. Ortalama olarak bu olayların gerçekleşmesi için on yıllar gerekmektedir. Correa 20 yıl önce intestinal tip gastrik kansere yol açan bir hipotez ortaya atmıştır. Buna göre aktif olarak süren gastritte asit salgılayan bezler giderek kaybolmakta (atrofi), bunun yerini fibrozis ve

intestinal metaplazi almakta, metaplazik ortamda önce displazi, ardından da kanser gelişmektedir (97). Mc Coll ve El-Omar'ın, *H. pylori* ile infekte olan aktif kronik gastritli kişilerin bazılarında midede belirgin asit hiposekresyonu olduğunu göstermeleri, Correa'nın varsayımını desteklemektedir (98). *H. pylori*'nin aynı zamanda mide salgısındaki askorbik asit düzeyini de azalttığı gösterilmiştir. Bir yandan mide salgısında hem hidroklorik asit hem de askorbik asit düzeylerinin azalması ve burada diğer bakterilerin yerleşerek nitrozamin oluşumuna yol açması, diğer yandan mikropla infekte olan mukozada oluşan kronik inflamasyonun yol açtığı hızlı hücre değişimi sırasında DNA da meydana gelen hasar sonuçta kanserogeneze neden olmaktadır (99).

**2.8.3. MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) Lenfoma:** *H. pylori* gastritinde mukozada lenfoid moleküller ortaya çıkar (MALT). Birçok gastrik lenfomalar B lenfositler yardımıyla oluşurlar ve MALToma oluşmasıyla son bulurlar. Birçok çalışmada, *H. pylori* ile infekte olan kişilerde, olmayanlara göre mide kökenli düşük dereceli B hücreli MALT lenfomo riskinin 6 kat arttığı gösterilmiştir. *H. pylori* eradike edildikten sonra MALT lenfoma belirgin olarak gerilediği bildirilmektedir (93, 94).

**2.8.4. Duodenal Ülser:** Duodenal ülser patogenezinin mukoza hasarına yol açabilecek faktörler ile mukoza bütünlüğünü sağlayan faktörler arasındaki dengenin bozulması sorumlu tutulmaktadır. Duodenal hastaların %95'de antrumda inflamasyon ve *H. pylori*'nin bulunması bu mikroorganizmanın duodenal ülser etyopatogenezindeki önemini göstermektedir (100, 101). Önemli bir çalışma sonrasında Carrick ve arkadaşları duodenumda *H. pylori* varlığının duodenal ülserasyon riskini 52 kat arttırdığını göstermiştir (101). Bunun yanısıra *H. pylori* kolonizasyonu gastrik ve duodenal ülserasyon riskini 3-4 kat arttırmaktadır. *H. pylori* ile ilgili duodenal ülser hastalığının patogenezinin belirleyen beş ana özellik bildirilmiştir (99).

1-Helicobacter suşları arasında belirgin bir virulans farklılığı vardır. Virulan suşların çoğu, patojenite adacıkları denilen, *CagA*, *VagA*, *PicA* veya *IceA* gibi genlerin bir araya geldiği bölgeler içerir. Bu bölgelerin içerdiği özelliklere göre *H. pylori* suşları

iki gruba ayrılır. Tip 1: *VacA*(+), *CagA*(+) olan ve ülser yol açan suşlar. Tip 2: *VagA* (-) ve *CagA* (-) olan ve ülser yapmayan suşlar. Yine virulan suşların mukusun üzerindeki fosfolipid tabakaya zarar veren fosfolipazları daha fazla ölçüde ürettikleri ve nötrofilleri daha hızlı aktive ettikleri gösterilmiştir.

2-*H. pylori* ile infekte kişilerin midelerinde hem bazal, hem de postprandial gastrin salgılanması artmıştır. Bunun nedeni *H. pylori*'nin midedeki bazı normal fizyolojik cevapları değiştirmesidir. Normal koşullarda antrumun pH'nın asitleşmesine veya antrumun gerilmesine verilen cevap, D hücreleri tarafından salgılanan somatostatin salınımının uyarılması, dolayısıyla gastrinin inhibe olmasıdır. Çünkü somatostatin; gastrini inhibe eden temel maddedir ve somatostatin salgılanması arttıkça, gastrin salgılanması azalır. Buna karşılık duodenal ülseri olan *H.pylori* pozitif hastalarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki; antrumun asitleşmesi ya da gerilmesine cevap olarak somatostatin salgılanmasında yeterince artış olmamakta, dolayısıyla gastrin etkili biçimde baskılanamadığı için yüksek düzeyde kalmakta, bu da midede fazla asit salgısına yol açmaktadır.

3-Kişilerde hemen daima, özellikle antrumun tutulduğu, buna karşılık korpusun nispeten sağlam kaldığı bir aktif kronik gastrit vardır.

4-*H. pylori* pozitif ve negatif olan duodenal ülserli hastalar karşılaştırıldığında, bakteriyi barındıran midelerde bazal ve postprandiyal asit salgılanmasının belirgin olarak arttığı saptanmıştır.

5-Bu kişilerde duodenumda, asit salgılayan hücre adacıkları halinde gastrik metaplazi adacıkları vardır.

*H. pylori* ve ülser hastalığı arasındaki ilişkiyi kanıtlayan en önemli ipuçlarından biri de mikrobun eradike edilmesinden sonra ülser iyileşme oranının çok yüksek ve yeniden ülser oluşumu oranının çok düşük olmasıdır (93).

**2.8.5 Gastrik Ülserasyon (GÜ):** Duodenal ülserle (DÜ) karşılaştırılınca GÜ'de daha küçük bir grup *H. pylori* ile kolonizasyona maruz kalmıştır (%50–80). GÜ'in görülmesinin önemli bir yüzdesi NSAID veya aspirin kullanımından dolayı olmaktadır. Prepilorik bölgede görülen GÜ'ler veya DÜ ya da bir duodenal skara eşlik eden korpus ülserleri DÜ'e benzer patogeneze gösterir.

PÜH'nın bugün için kabul edilen dört ana sebebi vardır:

- 1) *H. pylori*
- 2) NSAİ
- 3) Asit hipersekresyonu
- 4) Diğer Sebepler (Crohn, malignite gibi).

GÜ'lerin antibiyotik tedavisi ile iyileştirildiği durumlarda elde edilen bulgular DÜ'lerde görülenlerle paraleldir (99).

**2.8.6. Nonülser Dispepsi ilişkisi:** NÜD'de organik sebepler yoktur. Bu hastalarda *H. pylori* prevalansı benzer yakınması olmayanlardan daha sıktır. *H. pylori*(+)'liği ile dispepsi sendromlarının oluşması arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. *H. pylori* kolonizasyonunun olduğu NÜD'li hastalarda yapılan çalışmalarda, plasebolarla karşılaştırılınca antimikrobiyal ilaçlara daha iyi yanıtlar verildiği görülmüştür. Bazı çalışmalarda ise *H. pylori* tedavisi ile plasebo tedavi arasında fark görülmemiştir. Totalde *H. pylori*, NÜD hastalığında %10'dan daha az bir oranda etkili olmaktadır (102).

## 2.9. TANI

**2.9.1. İnvaziv Yöntemler:** *H. pylori*, özellikle daha az asit içeren bir ortam olmasından dolayı, midede antrum bölgesine, düzensiz yerleşme eğilimindedir. Bu nedenle endoskopi ile alınacak biyopsi örnekleri mümkünse birden fazla ve antrumdan alınmalıdır.

**2.9.1.1 Kültür:** *H. pylori* kültürde üretilmekte ve tanı için altın standart sayılmaktadır. Bu yöntem iyi stadardize edilmiş, en özgül ve oldukça duyarlı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (103). Oksijene duyarlı olan bu bakterinin laboratuvara ulaştırılması ve ekimi uygun koşullarda ve hızlı olmalıdır. Taşıyıcı besiyeri olarak serum fizyolojik ve ticari olarak hazırlanmış besiyerleri kullanılmaktadır. *H. pylori* kültürünün başarısı biyopsi örneğinin alımıyla ekimi arasındaki süreye ve oksijenle temasına bağlıdır. Bu nedenle alınan örnekler en fazla dört saat içinde ekilmeli, bu süre boyunca +4°C'de bekletilmelidir. Örnek hemen ekilemeyecekse -70°C'de saklanabilir, bu işlem kültürde üretmeyi %40 azaltacaktır.

*H. pylori* seçici (antibiyotik içeren) ve seçici olmayan besiyerlerinde, mikroaerofilik ortamda 3-7 günde üretilmektedir. %5-10 yalancı negatif sonuç alınmaktadır (40). Kullanılacak besiyeri beyin-kalp-infüzyon agar (Brain Heart Infusion BHI), Columbia agar, Brucella agar gibi zengin besiyerleri olmalı ve kan ya da serumla zenginleştirilmelidir. Mikroaerofil ortam, çeşitli ticari kitler kullanılarak, anaerop kavanozda sağlanabilmektedir. Üreyen suşlar, Gram boyama, üreaz, katalaz, oksidaz reaksiyonlarına göre konvansiyonel yöntemlerle değerlendirilerek tanı koyulmaktadır. Kültürde üretilen *H. pylori*'ye antibiyotik duyarlılık testi uygulanabilir, tiplendirme yapılabilir (104).

**2.9.1.2. Histopatolojik inceleme:** Birçok araştırmacı histopatolojik incelemenin *H. pylori* infeksiyonunun tanısında altın standart olduğunu kabul etmektedir (105).

Bakteri mukus içinde, yüzey epiteline tutunmuş olarak, kriptin içine doğru derinlerde bulunur. Antral biyopsi örneklerinin, rutinde kullanılan hematoksilen-eozinle veya özgülüğün arttığı Warthin-Starry gümüşleme, akridin-oranj ve modifiye Giemsa ile boyandıktan sonra histopatolojik değerlendirilmesi oldukça iyi sonuçlar vermektedir. Histopatolojik inceleme ile gastroduodenal patolojinin düzeyi ve premalign değişiklikler saptanabilmektedir. Monoklonal veya poliklonal floresan anti-*H. pylori* antikörlerinin kullanıldığı immünohistokimyasal boyama tanıda özgül ve duyarlı bir yöntemdir, ancak maliyeti yüksektir (106).

**2.9.1.3. Hızlı üreaz testi:** Endoskopi sırasında alınan antral biyopsi örneklerinden uygulanan hızlı üreaz testi hem ucuz hem de kolay bir tekniktir. *H. pylori* üreaz aktivitesi ile ortamdaki üreyi amonyak ve bikarbonata parçalar ve ortamın pH'sını yükselterek pH indikatörü ile ortamın rengini değiştirir. Pozitif sonuçların %90'ı ilk yarım saatte görülür ve geri kalanlarda ertesi gün okumayı gerektirir (40).

**2.9.1.4. Moleküler tanı yöntemleri:** Moleküler yöntemler, özellikle son yıllarda *H. pylori* ve diğer *Helicobacter* türlerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (107). Bu yöntemler tiplendirmede, antibiyotik duyarlılık saptamada ve virülans faktörlerinin belirlenmesinde önem kazanmışlardır. Moleküler yöntemler mide biyopsi örnekleri dışındaki örneklerden de *H. pylori* ve/veya diğer *Helicobacter*

türlerini saptamak için kullanılabilir. Moleküler bir yöntemle gösterilen *Helicobacter*'in canlı olup olmadığı saptanamaz. Seçilecek DNA ekstraksiyon yöntemi bu testlerin duyarlılığında büyük önem taşımaktadır (107).

## 2.9.2. İnvaziv olmayan yöntemler:

**2.9.2.1. Üre nefes testi:** Bu testte oral yoldan C<sup>13</sup> veya C<sup>14</sup> (radyoaktif karbon) işaretli üre alımını takiben, 20-30 dakika sonra solunan hava örnekleri toplanmakta ve bunlar daha sonra spektrometrik olarak veya sintillasyon cihazlarında sayılmaktadır. İşaretli üre *H. pylori* ile infekte kişilerde bakterinin üreaz enzimi ile parçalanır. Oluşan CO<sub>2</sub> solunum havasında saptanmaktadır. Duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksektir. Test, yalancı negatif sonuçlardan kaçınmak üzere antibiyotik veya omeprazol tedavisi sırasında uygulanmamalı, tedavi bitiminden en az bir ay sonra uygulanmalıdır (107).

**2.9.2.2. Serolojik yöntemler:** *H. pylori* tanısında kullanılan yaygın yöntemlerden biridir. Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda yararlıdır. Enzim işaretli katı faz immünassay (ELISA) yöntemi en sık kullanılan serolojik yöntemdir (108).

*H. pylori* enfeksiyonu sistemik ve lokal antikor yanıtına neden olur. Özgül IgM antikorlar kısa süreli olarak yükselir, IgG ve IgA enfeksiyon süresince artar ve tedavi edilmedikçe yüksek kalır. Tedaviyi izleyen aylarda eradikasyon sağlandıysa IgG ve IgA düzeyleri düşer. IgG düzeyi hiçbir zaman tamamen negatifleşmez. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde, tedavi öncesi ve tedavi bitiminden itibaren üç-altı ay sonra olacak şekilde iki titrasyonun karşılaştırılması gereklidir (109).

“Western Blot”, immünoblotlama, bakterinin çeşitli bölümlerine karşı oluşan sıvısal bağışık yanıtı saptamada kullanılan oldukça duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Serolojik olarak hasta başı testleri, bir damla kan ya da serum ile uygulanabilen veya idrarda IgG saptayan testler geliştirilmiştir ama bunların duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür (110, 111).

### 2.9.3. Dışkı örnekleri için kullanılan tanı yöntemleri:

**2.9.3.1. Dışkı kültürü:** *H. pylori* safraya duyarlı bir bakteridir. Dışkı safra asitlerinin yüksek oranda bulunduğu bir ortamdır. Dışkı aynı zamanda anaerop ve fakültatif anaerop bakterilerden oluşan zengin normal floraya sahip bir ortamdır. Bütün bu nedenlerden dolayı dışkı kültüründe *H. pylori* üretmek oldukça zordur. Pasajın çok hızlı olduğu diyareli olgularda dışkıda *H. pylori* üretilmişdir (112).

**2.9.3.2. Dışkı antijen testleri:** Ticari olarak hazırlanmış poliklonal ve monoklonal antikor testleri bulunmaktadır. Poliklonal testlerin özgüllüğü oldukça yüksekken, duyarlılığı değişken olarak saptanmıştır . Monoklonal testler yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermiştir. Hasta başı test olarak geliştirilen monoklonal antikor test sonuçları oldukça duyarlı ve özgül olarak saptanmıştır (113).

**2.9.3.3. Dışkı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):** Dışkı PCR inhibitörleri açısından çok zengindir. Bu nedenle uygulanacak DNA ekstraksiyon yöntemi ve inhibitör uzaklaştırılması dışkıda PCR uygulamasında çok önemlidir. Dışkı filtrasyon yöntemi inhibitörlerin uzaklaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Polipropilen membran ile süzülen dışkı örneklerinde PCR inhibitörlerine rastlanmamıştır (114). İmmünmanyetik ayırma bir diğer inhibitör uzaklaştırma yöntemidir. *H. pylori* yüzey antijenlerine karşı antikorlarla kaplı manyetik boncuklar kullanılır. Dışkıdaki *H. pylori* basil ve kok formları bu boncuklara yapışır, örnekteki inhibitörler yıkamayla uzaklaştırılır (114). Biyokimyasal saflaştırma dışkıdan DNA ekstraksiyonu için kullanılan bir başka yöntemdir. Dışkıda *H. pylori* saptanması için PCR yöntemi kullanılacağı zaman en az iki set primer kullanılması önerilmektedir (114, 115). Ayrıca, reamplifikasyon, nested PCR yöntemleri dışkıda *H. pylori* saptanmasında testin duyarlılığını arttıracaktır.

**Tablo.1** Tanıda Kullanılan Testlerin Duyarlılık ve Özgüllükleri ( 9).

Test	Duyarlılık ve Özgüllük(%)
<b>İnvaziv metodlar</b>	
Histoloji	>95%
Kültür	>95%
Hızlı üreaz testi	>90%
<b>İnvaziv olmayan metodlar</b>	
Üre soluk testi	>95%
Dışkı antijen testleri	>90%
Seroloji	80-90%

## 2.10. TEDAVİ

Avrupa Maastricht 2-2000 konferansı konsensus raporunda, *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisi için önerilen endikasyonlar şunlardır:

### 2.10.1. Tedavinin şiddetle önerildiği endikasyonlar:

- Duodenum ve mide ülseri (aktif ya da değil, komplike PÜH dahil),
- MALT lenfoma,
- Atrofik gastrit,
- Yeni rezeke edilmiş mide kanseri,
- Mide kanserli hastanın birinci derece akrabası olmak,
- Hastanın istemesi (doktora danıştıktan sonra)



## 2.10.2.Tedavinin tavsiye edildiği endikasyonlar:

-Fonksiyonel dispepsili hastalar,

-Uzun süreli yoğun asit baskılama tedavisi yapılacak gastroözefagial reflü olan hastalar,

-Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç kullanan hastalar(18).

*H. pylori* infeksiyonu ve non-steroid antiinflamatuvar ilaç ya da aspirin kullanımı, PÜH için bağımsız risk etmenlerdir. Non-steroid antiinflamatuvar ilaç kullanımından önce *H. pylori* eradikasyonu, ülser insidansını azaltır. Fakat yüksek riskli hastalarda tekrarlayıcı ülser kanamalarını önlemede yetersiz kalır (119). Eradikasyon, nonsteroid antiinflamatuvar ilaç almaya devam eden hastalarda mide ve duodenum ülserlerinin iyileşmesini artırmaz. PÜH'nin tedavisinde en geçerli olan uygulama, aktif veya remisyonda oluşuna bakılmadan tüm infekte PÜ'lerde *H. pylori*'nin ortadan kaldırılmasıdır. PÜH'ında *H. pylori*'nin eradike edilmesiyle ortaya çıkan en önemli sonuç, tedavi görenlerde ülser nüksünün son derece düşük olmasıdır (117, 118, 119).

*H. pylori* eradikasyonu için en sık kullanılan kombinasyonlar; proton pompası inhibitörü ve/veya bizmut tuzlarına iki antibiyotik eklemekle elde edilen üçlü tedavi rejimleridir. Üçlü tedavilerde *H. pylori* eradikasyon oranı değişik serilerde %80 ile %100 arasında değişmekle birlikte, ortalama % 85 civarındadır. Optimal tedavi süresi bir haftadır. Bu süreden daha az verilen tedavilerin başarısı düşük bulunmuştur. Sürenin arttırılması ile tedavi maliyeti yükseldiği halde eradikasyon oranında belirgin bir değişiklik olmamıştır (120).

Uygulanmakta olan üçlü tedavi seçenekleri

1. Proton Pompası İnhibitörü (Omeprazol 20mg x 2 veya lansoprazol 30 mg x 2 ) + iki antibiyotik ( Klaritromisin 250-500mg x 2 + amoksisilin 1gm x 2 veya klaritromisin 250-500mg x 2 + metronidazol 250-500mg x 2 ).

2. Bizmut tuzları (Kollaidal bizmut substrat veya ranitidin bizmut sitrat ) + iki antibiyotik: Bu grupta kullanılan kombinasyon ranitidin bizmut sitrat (400mg x 2 ) + klaritromisin (250-500mg x 2) + amoksisilin (1gm x 2)'dir.

Daha önceden kullanılmakta olan ve klasik tedavi olarak bilinen bizmut substrat + metronidazol + amoksisilin veya tetrasiklin bileşimi yan etkilerinin çokluğu ve iki hafta süreli oluşu nedeniyle artık kullanılmamaktadır.

Dörtlü Tedavi: Proton pompa inhibitörü + klasik üçlü tedavi ( Kolloidal bizmut substrat 300mg + metronidazol 500mg x 2 + 35 amoksisilin 1gm x 2 veya tetrasiklin 500mg x 2 )'dir. Üçlü tedavilerin başarısız olduğu durumlarda kullanılmaktadır (121).

## 2.11.ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ MEKANİZMALARI

Bölgeler arasında farklı olmakla birlikte, klaritromisin ve metronidazole olan primer direnç, tedavi başarısını sırasıyla %50 ve %37 oranında azaltmaktadır.

**2.11.1.Bismut tuzları:** Bizmut tuzlarının bilinen ilk etkileri, mukozal proteinlere olan afiniteleri nedeniyle oluşan polimer glikoprotein komplekslerin ülserli dokuyu kaplayarak asit-pepsin aktivitesine karşı korumalarıdır. Son yıllarda prostoglandin sentezi ve bikarbonat sekresyonunu artırmalarının yanısıra antibakteriyel etkili oldukları da anlaşılmıştır. Elektron mikroskopik çalışmalarda, bizmutun mukusta bulunan *H. pylori*'nin hücre zarının iç ve dış yüzünde toplanarak mukustan ayrılmasına ve lizisine neden olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* eradikasyonunda, tek başına %10-30 oranında enfeksiyonu tedavi eden en etkili monoterapötik ajanlardır (118).

**2.11.2.Amoksisilin:** *H. pylori* hücre duvarı sentezini inhibe eder. Gastrik asiditede stabilken nötr pH'da aktivitesi daha fazladır. Tek başına eradikasyon oranı %20'yi geçmemektedir. Direnç gelişimi %0-1 ile %29 arasında değişmektedir.

1.mekanizma; beta laktamaz enzimi salgılama; filogenetik olarak bağırsakta bulunan diğer bakterilerden farklı olmakla beraber intestinal sistemde bu bakterilerle kontak sonucu  $\beta$ -laktamaz enziminden sorumlu gen *H. pylori*'ye aktarılabilir (118, 122).

2. mekanizma penisilin bağlayan proteinde değişiklik olmasıdır (118, 122).

**2.11.3. Metranidazol direnci:** Diğerlerine göre daha yüksek olup, gelişmekte olan ülkelerde daha fazla oranda rastlanmakta rneğin Afrika'da %80-90 direnç rapor edilmiştir. Gelişmiş ülkelerde ise %10-50 arasında görülmektedir (122). *H. pylori*'de nitroimidazoller bazı nitroredüktaz enzimleri tarafından metabolize edilir. Bunlardan en önemlisi olan oksijene duyarsız NADPH nitroredktazda rdxA geni tarafından kodlanır. Bu gende olan mutasyonlarla direnç gelişir (122).

**2.11.4. Klaritromisin direnci;** %5 ile %25 arasında değişmektedir. Son yıllarda özellikle solunum yolları enfeksiyonlarında makrolid kullanımının artması klaritromisin direncinde belirgin bir artışa neden olmuştur. Daha nceki çalışmalarda direncin yaş ve cins ile ilişkisinin olmadığı görülmüş. Bakterinin 23S rRNA'sında nokta mutasyonlar olması (A2115-G, G2141-A, A2141-G, A2142-G, A2143-G, A2143-C, A2142-T, T2717-C, T2182-C) sonucu ortaya çıkmaktadır (126, 127, 128, 129, 130). Dirençten sorumlu en sık görülen mutasyonlar A2142-G, A2143-G olup, ender olarak A2142-C, T2717-C ve T2182-C mutasyonlarına da rastlanmaktadır. Ancak bu mutasyonların klaritromisin direnci ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir (123, 124, 125, 126, 127).

**2.11.5. Tetrasiklin:** *H. pylori* tedavisinde tek olarak kullanılması ile %6-30 oranında eradikasyon sağlar. Alternatif ikincil tedavide önerilmekte ve direnç oranı henüz bilinmemektedir. Bakterinin 16S rRNA'sında 926-928 nkleotidlerde tekli, çiftli ve üçlü baz çiftinde oluşan mutasyon sonucu direnç gelişmektedir (128).

### **3.GEREÇ VE YÖNTEMLER:**

#### **3.1. Çalışmaya Alınan Hasta Grubu ve Örnek Alınması**

11.2006-05.2007 tarihleri arasında gastroenteroloji polikliniğine mide şikayeti ile gelen ve endoskopi yapılması kararlaştırılan 66 bayan, 55 erkek olmak üzere toplam 121 hasta araştırmaya alındı.

Fujinon (Eve precessor Epx-201 H) videoendoskopi ile uygulanan (EG 201 FP) endoskopi sonucunda çalışmaya dahil edilmesine karar verilen hastaların antrumlarından üç adet biyopsi örneği alındı.

Çalışmaya alınan hastalara;

- 1-Yaş
- 2-Cinsiyet
- 3-Dispeptik şikayetler
- 4-İlk tanı
- 5-Özgeçmiş
- 5-Mide kanaması öyküsü
- 6-Daha önce gastroskopi olup olmadığı
- 7-Kullandığı ilaçlar
- 8-Geçirdiği ameliyatlara (özellikle gastrointestinal sistem)
- 9-Aile hikayesi soruldu.

#### **3.2 Biyopsi Örneklerinin Mikrobiyolojik Değerlendirilmesi:**

##### **3.2.1 Kullanılan Besiyerleri ve Boyalar**

**3.2.1.1.Müeller Hinton Agar**, %10 koyun kanı, *H. pylori*'ye selektif antibiyotik (Dent supplement , Oxoid, UK) ilave edilerek hazırlandı.

**3.2.1.2.Üreaz besi yeri:** Christensen üre agar besiyerine (Oxoid, UK)'ne %10 üre ilavesi ile hazırlandı.

**3.2.1.3.Gram boyama yöntemi** biyopsiden yapılan direk yayma preparat örneği metanolle 2 dakika fiske edildi. Kristal viole ile preparat 2 dakika bekletildikten sonra yıkandı, lugol ile 2 dakika mordanlandı, ardından 3:7 oranında karıştırılmış

olan aseton/alkol ile renksizleştirme işlemi yapıldı. En son sulufuksin ile 1 dakika boyandı (132).

### 3.2.2 Örneklerin İşlenmesi:

Alınan biyopsi örneklerinden bir tanesi hızlı üreaz testi için kullanıldı. *H. pylori*'nin yaptığı üreazın ortamdaki üreyi parçalaması ve oluşan NH<sub>3</sub> ve bikarbonatın pH'yı yükseltmesi ve bunun bir indikatör ile gösterilmesine dayanır. Biyopsi örneği üreaz besiyerine gömülerek ilk 30 dakika içindeki renk değişikliği gözlenerek kaydedildi. Besiyeri bir gece bekletilerek ertesi gün renk değişikliği olup olmadığı tekrar değerlendirildi. Diğer 2 adet mide biyopsi örneği, 0,5ml serum fizyolojik içersinde, 2 saat içinde mikrobiyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Biyopsi örneklerinden bir tanesi -80°C'de DNA izolasyonu için saklandı. Diğer biyopsi örneği ise Dent supplement (Oxoid) ve %10 koyun kan ilaveli Müeller Hinton agar besiyerine (Oxoid) ekildi ve Gram boyası için lam üzerine yayma yapıldı. Besi yerleri mikroaerofilik gaspak (Campy Gen, Oxoid) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda (%5 O<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %10 H<sub>2</sub>), 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Üreme olmayan plaklar 7 güne kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda *H. pylori* kolonileri Gram boyama yöntemi ile boyanarak 100X'lük objektifte incelendiğinde kıvrık, martı kanadı, gibi tipik morfolojinin görülmesi, kolonilerin hızlı üreaz, katalaz ve oksidaz pozitif olması ile tanımlandı. Üreyen mikroorganizmalar saklama besiyerine alınarak -80°C'de saklandı.

## 3.3 Moleküler Yöntemler

### 3.3.1 DNA İzolasyonu

#### 3.3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasalın adı	Firma	Kod
Agaroz	Prona	Basilica LE
Etanol	Sigma	E7023

Etidium bromid	Sigma	E8751
EDTA	Sigma	E 5134
Formaldehit	Sigma	F 8775
Gliserol	Sigma	G 5516
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum hidroksit	Merck	B1900662
Sodyum klorid	Merck	K26744400
Sodyum karbonat	Sigma	S 7277
Trizma base	Sigma	T 8524
Asetik asit	Sigma	A6283
Brom fenol mavisi	Sigma	B5525
Amonyum asetat	Merck	A174189
Amonyum persülfat	Sigma	A 9164
Proteinaz K	Roche	1370300
Borik asit	Riedel de Haen	11607
CTAB	Sigma	H-9151

### 3.3.1.2 Kullanılan Tamponlar Kimyasal Çözeltiler :

#### **TE tamponu (pH 8.0):**

10mM Tris HCl

1mM EDTA pH 8.0 (+20°C)

**SDS stok solüsyonu:** 10% (w/v)

0.2-0.45 µm membran ile filtre edilir.

#### **10 X TBE( Tris Borik asit -EDTA) stok solüsyon pH 8.0:**

121.10 gr Trisma Base

61.83 gr Borik asit

5.84 gr EDTA(susuz)

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanır. pH 8.0 e ayarlanarak oda ısısında saklanır.

**0.5 M EDTA:** 29.2 gr EDTA 160ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülür, hacim 200 ml' ye tamamlanır. pH:8.0 olması için NaOH pelet ilave edilir. Otoklavda steril edilerek kullanılır.

**CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) solüsyonu:**

4.1 g NaCl, 80 ml suda çözülür. İçerisine 10g CTAB, 65<sup>0</sup>C'lik su banyosunda yavaş yavaş ilave edilerek solüsyon hazırlanır. CTAB aniden eklenirse erimesi sağlanamaz.

**CTAB ile DNA ekstraksiyon yöntemi :**

- 1) Biyopsi örneği , 500 µl TE tamponu içine eklendi.
- 2) 30 µl % 10 SDS + 3 µl 20 mg/ml Proteinaz K eklenerek pipetlemeyle iyice karıştırıldı, bir gece 37<sup>0</sup> C'de inkübe edildi.
- 3) İnkübasyon sonunda 100 µl 5M NaCl eklenerek, vortekslendi.
- 4) 80 µl CTAB eklenerek, vortekslendi, 65<sup>0</sup> C'de 10 dakika inkübe edildi.
- 5) 750-800 µl Kloroform eklendi, vortekslendi; 8 dakika (1600 rpm) santrifüj edildi.
- 6) Süpernatana, karıştırmamaya dikkat edilerek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı,
- 7) 24ml kloroform / 1ml izopropanol karışımından , süpernatana eşit miktarda eklendi, (yaklaşık 600-700 µl), daha sonra vortekslendi; 8 dakika (1600 rpm) santrifüj edildi.
- 8) Süpernatana, karıştırmamaya dikkat ederek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. İzopropanol'dan süpernatana eşit miktarda( yaklaşık 600-700 µl) eklendi ve 3M pH: 5,2 sodyum asetat 3 µl ilave edilerek, çok nazik sallayarak karıştırıldı. DNA iplikçik şeklinde yada hava kabarcıkları şeklinde görüldü. 13 dakika santrifüj edildi. Santrifüj tüpünün dibinde çökeltiyi görüldü. pipet yardımıyla, çok nazik olarak, süpernatana alındı ve atıldı.
- 9) Kalan çökeltinin üzerine % 70'lik etanol ,200 µl eklendi, 6 dakika santrifüj edildi.
- 10)Çökeltiyeye dokunmadan pipet yardımıyla etanol alındı ve atıldı. Çökeltinin kuruması için oda ısısında 2,5 saat bekletildi. Çökelti üzerine; 50 µl TE eklendi. DNA hemen kullanılacaksa +4<sup>0</sup>C'de, daha sonra kullanılacaksa -20<sup>0</sup>C'de bekletildi.

### 3.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

#### 3.3.2.1 Primerler

Çalışmada kullanılan primer çiftleri çeşitli literatürlerden belirlenerek tablo halinde aşağıda verilmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Çalışmada Kullanılan Primerler (68, 130)

Amplifiye edilen bölge	Primer	Primer dizisi (5'→3')	PCR ürün uzunluğu, (bp)
Cag A	CAG-L	ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGAA	289
	CAG-R	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT	
VacA s1	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	259
	VA1-R	CTGCTTGAATGCGCCAAAC	
VacA s2	VA1-F	ATGGAAATACAACAAACACAC	286
	VA1-R	CTGCTT GAATGCGCCAAAC	
VacA s1a	SS1-F <sup>a</sup>	GTCAGCATCACACCGCAAC	190
VacA s1b	SS3-F <sup>a</sup>	AGCGCCATACCGCAAGAG	187
VacA s2	SS2-F <sup>a</sup>	GCTAACACGCCAAAT GATCC	199
VacA m1	VA3-F	GGTCAAAATGCGGTCATGG	290
	VA3-R	CCATTGGTACCTGTAGAAAC	
VacA m2	VA4-F	GGAGCCCCAGGAAACATTG	352
	VA4-R	CATAACTAGCGCCTTGCA C	
İceA1	İceA1-F	GTGTTTTTAACCAAAGTATC	246
	İceA1-R	CTATAGCCAGTCTCTTTGCA	
İceA2	İceA2-F	GTTGGGTATATCACAATTTAT	229/334
	İceA2-R	TTGCCCTATTTTCTAGTAGGT	
BabA2	BabA2-F	ATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA	850
	BabA2-R	TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA	
16S rRNA	16S-F	TAAGAGATCAGCCTATGTCC	534
	16S-R	TCCCACGCTTTAAGCGCAAT	

<sup>a</sup>: VA1-R primeri ile birlikte kullanılmıştır.



**3.3.2.2 PCR protokolü:** Total 25 µl olarak düzenlenen bir reaksiyonluk PCR karışımı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

<b><u>PCR protokolü</u></b>	<b><u>1rxn</u></b>
dH <sub>2</sub> O	16 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
PCR buffer (10X)	2.5 µl
dNTP mix (Fermentans)	2 mM
Primer F'	1mM
Primer R'	1mM
Taq DNA polimeraz (Fermentans)	1U
<i>H. pylori</i> DNA	200ng

Amplifikasyon için GeneAmp PCR sistemi (Perkin Elmer) kullanıldı. Farklı gen bölgeleri için her bir siklus aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

### **3.3.2.3.PCR reaksiyon siklusları:**

Predenatürasyon	94°C	5'	
Denaturasyon	94°C	1'	
Annealing 1S1S1	*	1'	siklus**
Sentez 1S1S1	72°C	1'	
Son sentez 1S1S1	72°C	7'	

	<b><u>*Annealing 1S1S1:</u></b>	<b><u>** reaksiyon siklusları:</u></b>
CagA	52 °C	35(60 saniye)
Vac s1a	54°C	30(30 saniye)
Vac s1b	54 °C	30(30 saniye)
Vac s2	54 °C	30(30 saniye)
Vac m1	50 °C	35(60 saniye)
Vac m2	54 °C	35(60 saniye)
İceA1	49 °C	35(45 saniye)

İceA2	47 °C	35(45 saniye)
BabA2	52 °C	40(60 saniye)
16S rRNA	53 °C	35(60 saniye)

**3.3.3 Nested Real Time PCR yöntemi ile Klaritromisin Direncinin Belirlenmesi:**  
Klaritromisin direnci ticari olarak üretilmiş *H. pylori* Real Time PCR test kiti (Metis Biotek.) kullanılarak belirlendi.

### 3.3.3.1. *H.pylori* DNA'sının Amplifikasyonu:

Reaksiyonun duyarlılığını artırmak için önce *H. pylori* DNA'sı amplifiye edildi. Bir örnek için hazır olan PCR karışımından 20 µl ependorfa koyulur. Üzerine 0.2 µl Taq DNA polimeraz ve 5 µl çalışılacak DNA eklenir. Belirtilen programda thermal cycler'da (Perkin- Elmer ) amplifiye edilir. Amplifikasyon; 1 siklus 94°C'de 3 dk, 25 siklus 94°C'de 20sn, 60°C'de 45sn, 72°C'de 1dk, 1 siklus 72°C'de 3dk şeklinde gerçekleştirilir.

### 3.3.3.2.Light Cycler (LC) Reaksiyon Protokolü;

**Tablo 3.** Bir reaksiyon için Real Time PCR karışımının hazırlanması

LC PCR Mix	1rxn
dH2O	6.4 µl
MgCl2	0.8 µl
Hpy LC Primer mix	0.5 µl
Hpy LC Probe mix	0.5 µl
LC FastStart SYBR Gren Master mix 10xconc.	1.0 µl
Total volüm	9.2 µl
1.tur PCR ürün örneği	0.8 µl
Total volüm	10 µl

Reaksiyon karışımı primerler ve probe pipetlenerek iyice karıştırılarak alınır. MgCl<sub>2</sub> eklendikten sonra vortekslenir. Karışım hazırlandıktan sonra 9.2 µl mikten kapillere dağıtılır. En son 0.8 µl 1.tur ürünü eklenir. 3000-5000xrpm' de 10 sn santrifüj edilir.

<b>Tm noktası</b>	<b>+/- 2.0</b>
Klaritromisin duyarlı	65 °C
Klaritromisin dirençli	57 °C

84 °C, +/- 2.0' de görülen pikler *H. pylori* pozitifliğini gösteren ürüne ait.

57 °C, +/- 2.0' de görülen pikler A2143G veya A2144G mutasyonunu göstermektedir.

### **3.4.Kullanılan Cihazlar**

PCR cihazı (Eppendorf Mastercycler, Techne )

Real Time PCR (Roche)

Çalkalamalı su banyosu

CCD kamera-bilgisayar donanımı

Yatay elektroforez

UV transilimünatör

Yatay çalkalayıcı

Spektrofotometre

**3.5. İstatistiksel Analiz:** Pearson Che-Square test ve Fisher's Exact test kullanıldı.

## **4. BULGULAR**

### **4.1.Hastalara ait bulgular**

11.2006 - 05.2007 tarihleri arasında Gastroenteroloji polikliniğine başvuran ve endoskopi yapılan 66 bayan, 55 erkek toplam 121 hasta, yaş ortalaması 49±15 olarak belirlendi. Hastaların 66'sı (%54.5) dispeptik şikayetle başvurdu. Yakınmaları

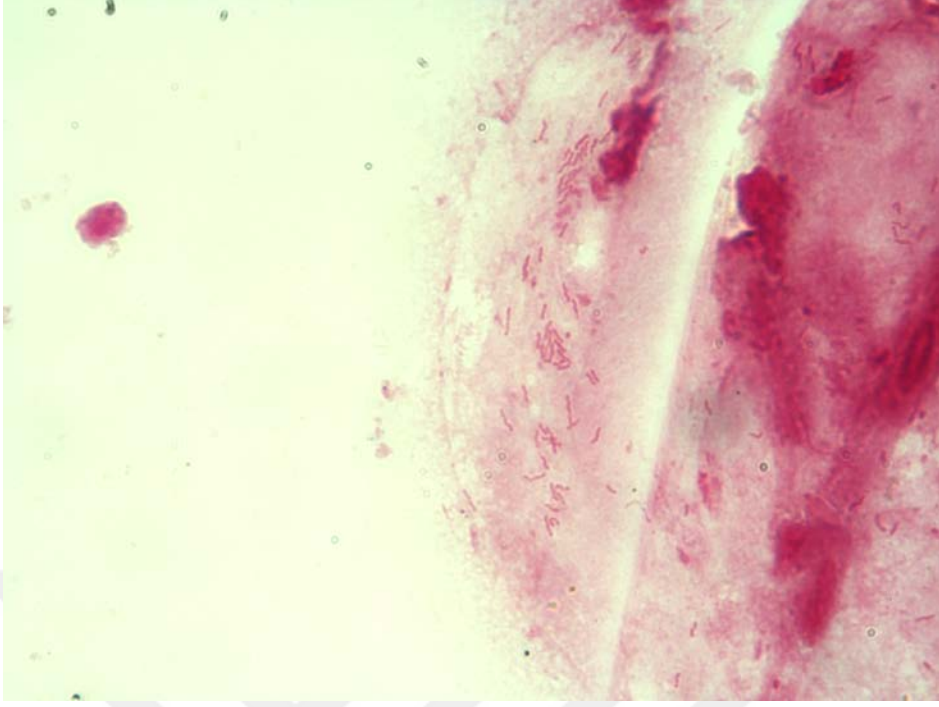
midede ağrı ekşime, şişkinlik, mide boşalmasında geçikme idi. 10 (% 8.3) hasta, daha önce ülser tanısı alıp eradikasyon tedavisi gören kontrol amaçlı endoskopisi yapılan hasta grubu idi. 33 (%27.3) hasta açlık mide ağrısı, yanma, melana, anemi sebebi ile başvuran hasta grubu, 12 (%9.9) kişi farklı bir hastalık Romatoid artrit, Ankilozan spondilit gibi romatizmal hastalıkların tedavisi esnasında steroid ve nonsteroid antiinflamatuvar ilaç alımına sekonder mide şikayeti olan ve endoskopi planlanan hasta grubunu oluşturdu.

Hastaların sigara ve alkol kullanıp kullanmadığı sorgulandığında 88 (%72.7) sigara kullanmadığı, 33'nun (%27.3) sigara kullandığı ve 108'inin (%89.3) alkol kullanmadığı, 13'nün (%10.7) alkol kullandığı tespit edildi.

Endoskopi öncesi tedavi ve ilaç kullanımı sorulduğunda 41 (%33.9) hastanın mide şikayeti için hiç ilaç kullanmadığı, 13'nün(%10.7) antasit kullandığı, 47'sinin (%38.8) PPI, 20'sinin (%16.5) *H. pylori* eradikasyon tedavisi aldığı, 9'unun (%7.4) romatizmal hastalık nedeniyle nonsteroid antiinflamatuvar aldığı öğrenildi.

*H. pylori* PCR sonuçları ile alkol ve sigara alımı karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunamadı. *chi-kare test* ( $p>0.05$ )

Endoskopi esnasında ilk alınan biyopsi örneklerinde hızlı üreaz testi yapıldığında, 60 biyopsi örneğinde üreaz testi pozitif, 61 örnekte üreaz testinin negatif olduğu görüldü. Yüz yirmi bir örneğin direk Gram boyalı preparatlarının mikroskopik bakısında 50'sinde *H. pylori* pozitif görüldü (Şekil 3). Bakteri kültürü için yapılan ekimimlerde 34 örnekte üreme görüldü (Şekil 4).



**Şekil 3.** Gastrik biyopsiden hazırlanan direk yaymada Gram boyasında *H. pylori* pozitifliği (100x).

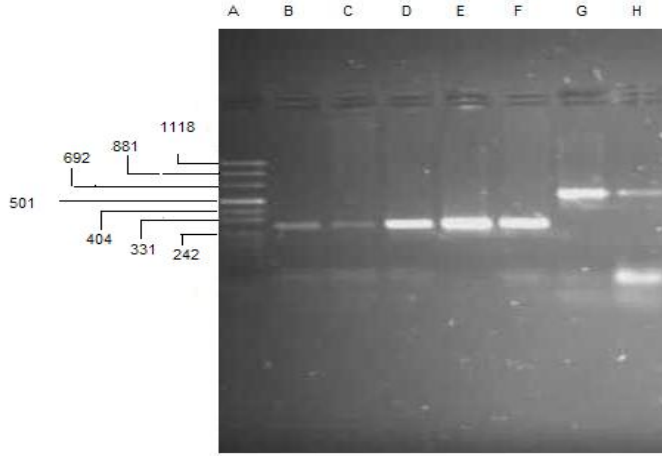


**Şekil 4.** Selektif Müeller Hinton Besiyerinde (%10 koyun kanlı) *H. pylori* Kolonileri

#### 4.2.Hasta grupları ve *H. pylori* pozitifliği

Endoskopi bulgularına göre gruplandırıldığında hastaların 56'sı (%46.3) gastrit, 24'ü (%19.8) ülser, 13'ü (%10.7) duodenit, olarak belirlendi. Yirmisekiz (%23.1) hastada herhangi bir patoloji bulunamadı.

Alınan 121 biyopsi örneğinden izole edilen DNA'lardan *H. pylori* 16S rRNA primerleri (Tablo.2) kullanılarak yapılan PCR'da 78 (%64.4) örnekte *H. pylori* pozitif, 43 (%35.6) örnekte *H. pylori* negatif olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



**Şekil 5.** *CagA* geninin (289 bp) ve *H. pylori* 16S rRNA geninin (534 bp) agaroz jeldeki görüntüsü. A; marker, B, C, D, E, F; *CagA*+. G, H; *H. pylori* +

Gastritli hastaların 40'ı (%71.4), ülserli hastaların 20'si (%83.3), duodenitli hastaların 9'u (%69.2), normal endoskopi bulgusuna sahip hastaların ise 9'u (%32.1) *H. pylori* pozitif olarak belirlendi (Tablo4). Buna göre hasta grupları ile *H. pylori* pozitifliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu. [*Pearson chi-kare* ( $p<0.05$ )].

**Tablo 4.** Endoskopi sonucuna göre hasta grupları ve *H. pylori* pozitifliği

Endoskopi sonucu	Hasta sayısı(%)	H.pylori +(%)
Gastrit	56 (46.3)	40 (51.3)
Ülser	24 (19.8)	20 (25.6)
Duodenit	13 (10.7)	9 (11.5)
Normal	28 (23.1)	9 (11.5)
Toplam	121 (100)	78 (100)

**Tablo 5.** Virülans genlerinin görülme sıklığı

Virülans genleri	Pozitif (%)	Negatif (%)	Toplam
<i>CagA</i>	55 (70.5)	23 (29.3)	78 (100)
<i>Vac s1a</i>	56 (71.8)	22 (28.2)	78 (100)
<i>Vac s1b</i>	0 (0)	78 (100)	78 (100)
<i>Vac s2</i>	13 (16.7)	65 (83.3)	78 (100)
<i>Vac m1</i>	1 (1.3)	77 (98.7)	78 (100)
<i>Vac m2</i>	68 (87.2)	10 (12.8)	78 (100)
<i>Ice A1</i>	19 (24.4)	59 (75.6)	78 (100)
<i>Ice A2</i>	21 (26.9)	57 (73.1)	78 (100)
<i>Bab A2</i>	5 (6.4)	73 (93.6)	78 (100)

### 4.3 *CagA* geni pozitifliği:

Yetmiş sekiz örnekte *CagA* genine bakıldığında 55'inde (%70.5) *CagA* pozitifliği görüldü (Şekil 5). 23'ünde (%29.5) *CagA* negatifliği görüldü (Tablo5). *CagA* geni pozitifliği ile hastaların klinik bulguları karşılaştırıldığında; *H. pylori* pozitif gastritli 40 hastanın 31'inde (%77.5), ülserli 20 hastanın 14'de (%70.0), duodenitli 9 hastanın 4'ünde (%44.4), normal endoskop bulgulu 9 hastanın 6'sında (%66.7) *CagA* geni pozitif olarak belirlendi. *CagA* geni ile klinik bulgu arasında anlamlı ilişki saptanamadı (Tablo 6) [*Pearson che-square test* (p>0.05)].

**Tablo 6.** *CagA* virulans geninin klinikle ilişkisi:

<b>Klinik Bulgu</b>	<b><i>CagA</i>+ (%)</b>	<b><i>CagA</i>- (%)</b>	<b>Toplam</b>
<b>Gastrit</b>	31 (77.5)	9 (22.5)	40 (100)
<b>Ülser</b>	14 (70.0)	6 (30)	20 (100)
<b>Duodenit</b>	4 (44.4)	5 (55.6)	9 (100)
<b>Normal</b>	6 (66.7)	3 (33.3)	9 (100)
<b>Toplam</b>	55 (70.5)	23 (29.5)	78 (100)

#### **4.4. *VacA* gen pozitifliği:**

*H. pylori* pozitif 78 örneğin *Vac* midregion (Tablo. 2) gen bölgesi PCR ile bakıldığında 69 (%88.4) örnekte *VacA* geni pozitifliği görüldü, 9 (%11.6) örnekte *VacA* genine rastlanmadı (şekil 6).

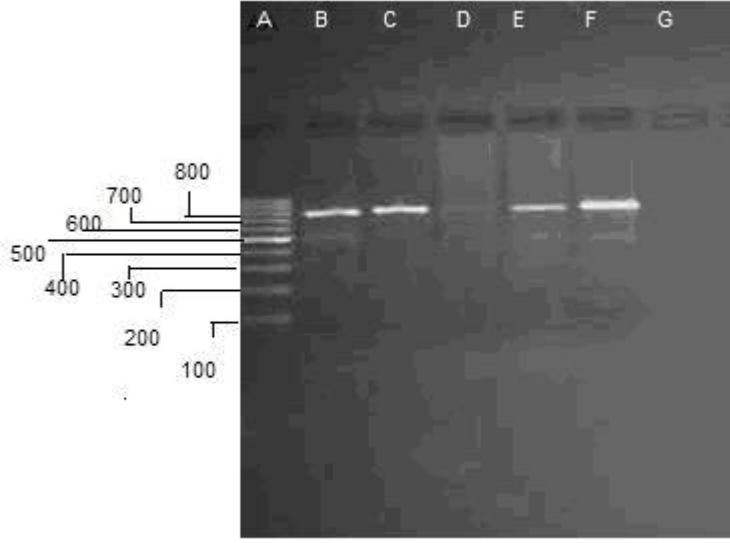
Gastritli 40 hastanın 31'inde (%77.5) *s1a* pozitif, 7'sinde (%17.5) *s2* pozitif bulundu. *m1* pozitifliği görülmeyip, *m2* pozitifliği 38'inde (%95) görüldü (Resim4,5). İki hastada *VacA* geni belirlenemedi.

Ülserli 20 hastanın 14'ünde (%70) *s1a* pozitif, 2'sinde (%10) *s2* pozitif, 16 (%80) örnekte *m2* pozitif görüldü (şekil 6,7), *m1* pozitifliği görülmeyip ve 4 örnekte *VacA* geni negatif bulundu.

Duodenitli 9 hastanın 6'sında (%66.7) *s1a* pozitif olup, 1 (%11.1) örnekte *s2* pozitifliği görüldü, 7'sinde (%77.8) *m2* pozitif olup (şekil 6,7), *m1* pozitifliği görülmeyip ve 2 vakada *Vac* negatif bulundu.

Endoskopi bulgusu normal 9 örneğin 5'inde (%55.6) *s1a* pozitif, 3'ünde (%33.3) *s2* pozitif, 1'inde (%11.1) *m1* pozitif, 7'sinde (%77.8) *m2* pozitif görüldü (şekil 7,8), 1 örnekte *VacA* geni negatif bulundu (Tablo 7). Klinik bulgular ile *s1a*, *s2*, *m1*, *m2* arasında anlamlı ilişki belirlenemedi. [ *Pearson che-square* test ( $p>0.05$ )].

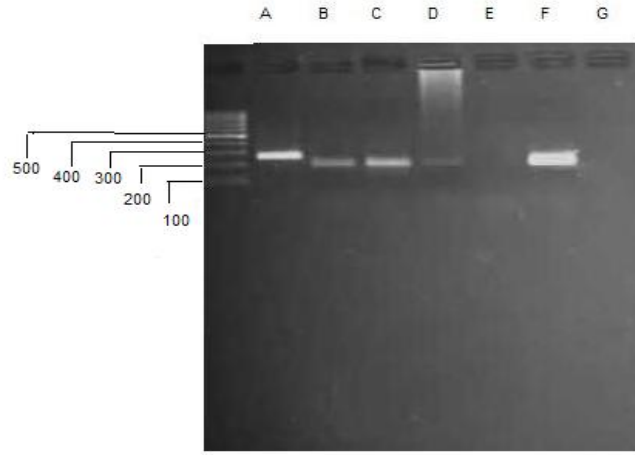




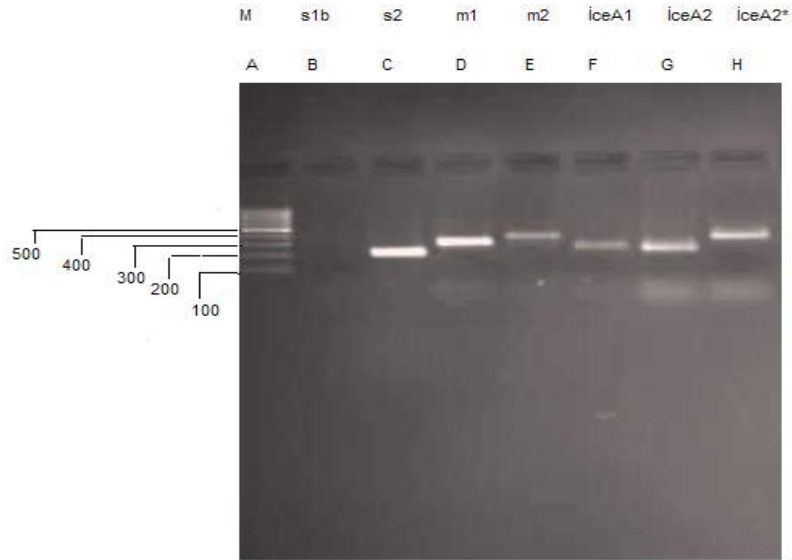
**Şekil 6.** *VacA* geninin agaroz jeldeki görüntüsü. A; markır, B, C, E, F; *VacA* +, D, G; *VacA* -

**Tablo 7.** *VacA* gen bölgeleri klinikle ilişkisi:

<b>Klinik</b>	<b>Bulgu</b>	<i>s1a</i> (%)	<i>s1b</i> (%)	<i>s2</i> (%)	<i>m1</i> (%)	<i>m2</i> (%)
<b>Gastrit</b>		31 (77.5)	0 (0)	7 (17.5)	0 (0)	38 (95)
<b>Ülser</b>		14 (70)	0 (0)	2 (10)	0 (0)	16 (80)
<b>Duodenit</b>		6 (66.7)	0 (0)	1 (11.1)	0 (0)	7 (77.8)
<b>Normal</b>		5 (55.6)	0 (0)	3(33.3)	1 (11.1)	7 (77.8)



Şekil 7. A: *VI* pozitifliği, (B,C,D) *s1a* pozitifliği, E *s1b* negatif, F *s2* pozitif



Şekil 8. M; markır, B; *s1b*, C; *s2*, D; *m1*, E; *m2*, F; *IceA1*, G; *IceA2*(229bp), H; *IceA2*

(334)

#### 4.5. *VacA* gen allelerinin birlikte pozitifliği:

*VacA* geninin allellere bakıldığında gastritli 40 hastanın 31'inde (%77.5) *s1a/m2* , 7'sinde (%17.5) *s2/m2* görüldü ve klinikle anlamlı bir ilişki bulunamadı. Ülserli 20 hasta örneğinin 13'ünde (%65) *s1a/m2* görülürken 2'sinde (%10) *s2/m2* görüldü. Duodenit tespit edilen 9 hastanın 6'sında (%66.7) *s1a/m2* ve 1'inde (%11.1) *s2/m2* görüldü. Endoskopi sonucu normal olan 9 hastada 1'inde (%11.1) *s1a/m1* 5'inde (%55.6) *s1a/m2* , 3'ünde (%33.3) *s2/m2* belirlendi(Tablo 8). Klinikle ilişkisi *Pearson Che-Square* testine göre anlamlı bulunamadı ( $p>0.05$ ).

**Tablo 8.** *VacA* alellik beraberliğinin klinikle ilişkisi.

Klinik Bulgu	<i>s1a/m1</i> (%)	<i>s1a/m2</i> (%)	<i>s2/m2</i> (%)
Gastrit	0 (0)	31 (77.5)	7 (17.5)
Ülser	0 (0)	13 (65)	2 (10)
Duodenit	0 (0)	6 (66.7)	1 (11.1)
Normal	1 (11.1)	5 (55.6)	3 (33.3)

#### 4.6. *CagA* gen pozitifliği ile *Vac* geni birlikteliği:

*CagA* ve *VacA* geni allelleri birlikteliği değerlendirildiğinde; örneklerde *s1a/m1* alleli sadece 1 örnekte pozitif olarak bulundu. Kırk iki örnekte *s1a/m2* pozitif belirkenirken, 5 örnekte *s2/m2* bulundu (Tablo 9). *CagA* geni ve *s1a/m2* allellerinin birlikteliğinin gastrik hastalıklarla ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. [*Pearson Che-Square* test ( $P>0.05$ )].

**Tablo 9.** *Cag* ile *Vac* allelik genlerinin birlikteliği

	<b><i>CagA</i> pozitif (%)</b> (n=48 )	<b><i>CagA</i> negatif (%)</b> (n=22)
<i>s1a/m1</i>	1 (2.1)	0 (0)
<i>s1a/m2</i>	42 (89.4)	14 (63.6)
<i>s2/m2</i>	5(10.6)	8 (36.4)

#### 4.7.Adezyon genleri pozitifliği:

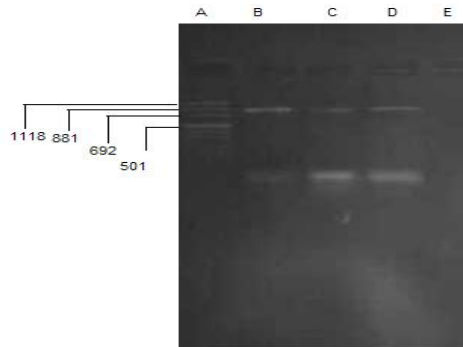
*H. pylori* pozitif belirlenen 78 hastanın 19'unda (%24.4) *IceA1*, 21'inde (%26.9) *IceA2*, 5'inde (%6.4) *BabA2* geni pozitif olarak belirlendi (Şekil 8,9). Adezyon genleri ile klinik bulgular karşılaştırıldığında;

Gastritli 40 hastadan 14'ünde (%35) *IceA1* , 8'inde (%20) *IceA2*, 2'sinde (%5) *BabA2* genleri pozitif bulundu.

Ülserli 20 hastanın 3'ünde (%15) *IceA1*, 4'ünde (%20) *IceA2* ,2'sinde (%10) *BabA2* pozitif bulundu.

Düodenitli 9 hastanın 1'inde (%11.1) *IceA1*, 3'ünde (%33.3) *IceA2*, 1'inde (%11.1) *BabA2* genleri pozitif olarak belirlendi.

Endoskopik bulgusu normal 9 hastanın 1'inde (%11.1) *IceA1*, 6'sında (%66.7) *IceA2* pozitif görüldü, *BabA2* pozitifliği görülmedi (Tablo.10).



**Şekil 9.** *BabA2* (850bp) geninin agaroz jeldeki görüntüsü. B, C, D; *BabA2* +

**Tablo 10.** Adezyon genlerinin klinikle ilişkisi

<b>Klinik Bulgu (n=78)</b>	<b><i>Ice A1</i>(%)</b>	<b><i>Ice A2</i>(%)</b>	<b><i>BabA2</i>(%)</b>
<b>Gastrit (n=40)</b>	14 (35)	8 (20)	2 (5)
<b>Ülser (n=20)</b>	3 (15)	4 (20)	2 (10)
<b>düodenit (n=9)</b>	1 (11.1)	3 (33.3)	1 (11.1)
<b>Normal (n=9)</b>	1 (11.1)	6 (66.7)	0 (0)
<b>Toplam (n=78)</b>	19 (24.4)	21 (26.9)	5 (6.4)

#### **4.8. *CagA* gen pozitifliği ile adezyon genleri birlikteliği:**

*CagA*+ örneklerde adezyon genleri değerlendirildiğinde *IceA1* 16 (%29.1), *IceA2* 10 (%18.2), *BabA2* ise 4 (%7.3) örnekte belirlendi (Tablo11). *CagA* pozitif örneklerde *IceA2* negatifliği anlamlı bulunurken (*Fisher's Exact Test* p=0.011). *CagA* ve adezyon genlerinin birlikteliğinin klinikle ilişkisi belirlenemedi (p>0.05).

**Tablo 11.** *CagA* ve adezyon genlerinin birlikteliği

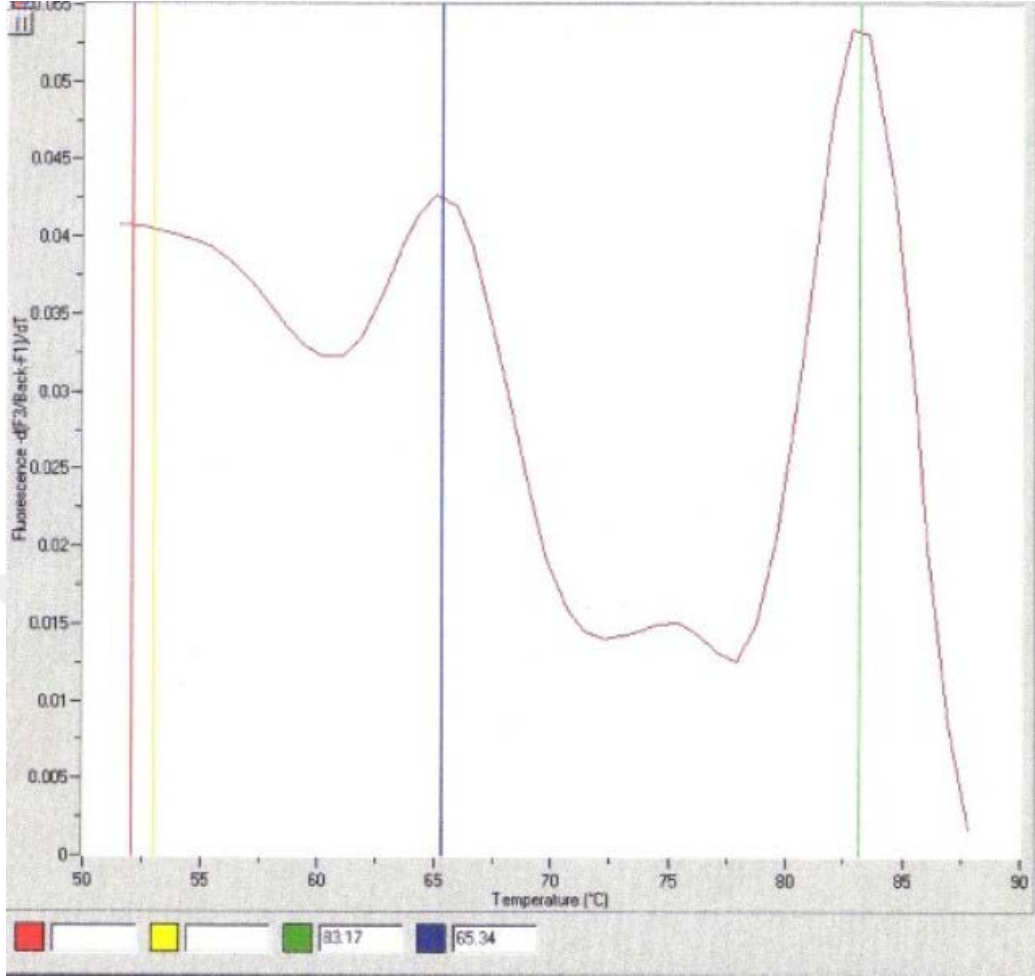
	<b><i>CagA</i> pozitif (%) (30 Hasta)</b>	<b><i>CagA</i> negatif (%) (15 Hasta)</b>
<b><i>IceA1</i></b>	16 (29.1)	3 (%13)
<b><i>IceA2</i></b>	10 (18.2)	11 (47.8)
<b><i>BabA2</i></b>	4 (7.3)	1 (4.3)

#### **4.9.PCR pozitif örneklerde Klaritromisin direnci:**

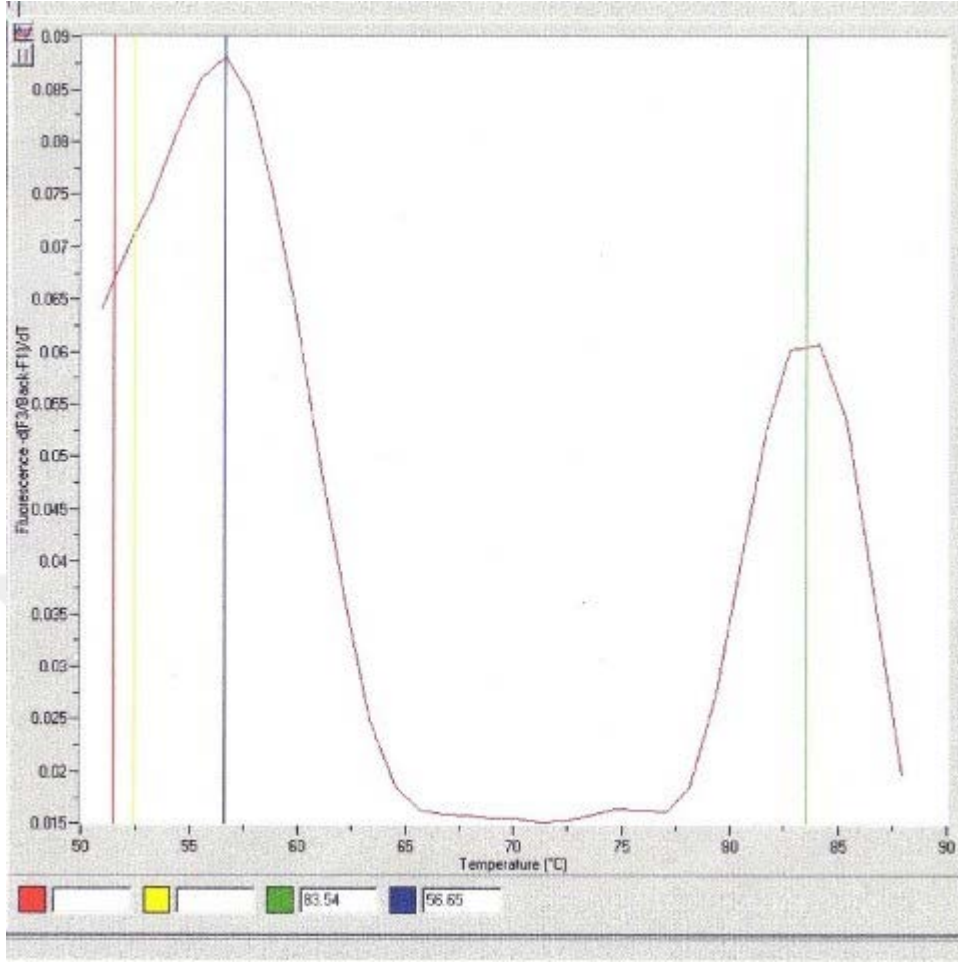
*H. pylori* pozitif 78 örnekte real time PCR yöntemi ile 23S rRNA'daki A2142G ve A2143G nokta mutasyonlarına bağlı klaritromisin direnci araştırıldı. Kırk altı *H.pylori* izolatu klaritromisine duyarlı bulundu (Şekil 10). Yirmi iki örnekte klaritromisine direnç belirlendi (Şekil 11). Beş örnekte 57 ve 65 ±2 °C de 2 pik

görülmesi nedeniyle hastanın 2 farklı *H.pylori* suşu ile enfekte olduğu düşünöldü (Şekil 12). Ayrıca 5 örnekte  $83 \pm 2$  °C pik görölmesine karşın (*H. pylori* pozitif), 57 ve  $65 \pm 2$  °C’de pik belirlenemedi. Bu nedenle 10 örnek istatistiksel değeriendirmelere dahil edilmedi.



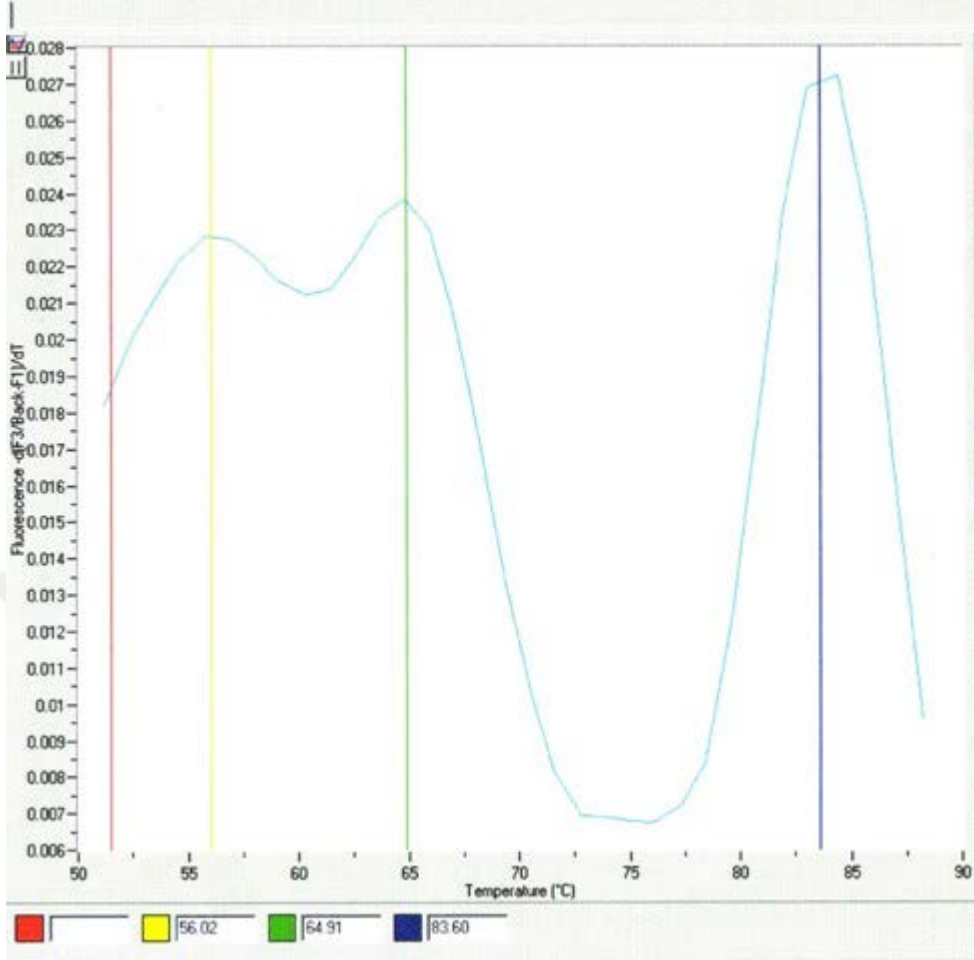


**Şekil 10.** *H. pylori*'de klaritromisin duyarlılığını gösteren melting curve analizi  $65 \pm 2$  °C, 65 °C'deki pik duyarlılığı ve  $83 \pm 2$  °C pik *H.pylori* pozitifliğini göstermekte



Şekil 11. Klaritromisin dirençli *H. pylori* 57±2 °C 'de pik ve 83±2 °C'de pik





Şekil 12. Klaritromisin duyarlı ve dirençli izolat bir arada co-enfeksiyon varlığı  
57±2 °C ve 65±2 °C 2 pik mevcut. 83 ±2 °C pik

#### 4.10. Klaritromisin direncinin *CagA* virulans geni ile ilişkisi:

*Cag+* 49 örneğin 37'si (%75.5) duyarlı, 12'si (%24.5) dirençli , *Cag-* 19 örnekten 10'u (%52.6) dirençli, 9'u (47.4) duyarlı bulundu (Tablo12). *CagA* pozitif örneklerde klaritromisin duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. [*Fisher's Exact Test* (p=0.042)]

**Tablo 12.** Klaritromisin direncinin *CagA* virulans geni ile ilişkisi

Klaritromisin	<i>CagA+</i> (%)	<i>CagA-</i> (%)
Dirençli	12 (24.5)	10 (52.6)
Duyarlı	37 (75.5)	9 (47.4)

#### 4.11. Klaritromisin direncinin *VacA* allelleri ile ilişkisi:

*s1a/m1* allelli olan 1 suş klaritromisine duyarlı bulundu. *s1a/m2* 49 örnekten 15'i (%68.2) klaritromisine dirençli, 34 (%73.9) duyarlı bulundu. *s2/m2* alleli 10 örnekten 3'ünde (%13.6) klaritromisine direnç görülürken, 7'si (%15.2) duyarlı olarak belirlendi (Tablo.13). Klaritromisin direnci ile *Vac* alleli birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki görülmedi. [*Fisher's Exact Test* (P>0.05)].

**Tablo 13.** Klaritromisin direncinin *VacA* allelleri ile ilişkisi:

	Klaritromisin dirençli(%) n= 22	Klaritromisin duyarlı(%) n=46
<i>s1a/m1</i>	0 (0)	1 (2.2)
<i>s1a/m2</i>	15 (68.2)	34 (73.9)
<i>s2/m2</i>	3 (13.6)	7 (15.2)

#### 4.11. Klaritromisin direncinin adezyon genleri ile ilişkisi:

*IceA1* geni olan 6 suşun (%27.3) klaritromisine dirençli, 11 suşun (23.9) duyarlı olduğu, *IceA2* geni olan 8 örneğin (%36.4) klaritromisine dirençli, 12'sinin (%26.1) duyarlı olduğu belirlendi. *BabA2* gen olanlarda klaritromisine direnç görülmezken, 3'ü (%6.5) duyarlı olarak belirlendi (Tablo18). Klaritromisin direnci ile adezyon genleri birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki saptanamadı. [*Fisher's Exact Test* ( $p>0.05$ )]

**Tablo 14.** Klaritromisin direncinin adezyon genleri ile ilişkisi

	Klaritromisindirençli(%) n=22	Klaritromisin duyarlı(%) n=46
<i>IceA1</i>	6 (27.3)	11 (23.9)
<i>IceA2</i>	8 (36.4)	12 (26.1)
<i>BabA2</i>	0 (0)	3 (6.5)

## 5.TARTIŞMA

Bir asırdan beri insan midesinde spiral şekilli bakterilerin varlığı bilinmekle beraber izolasyonu ve identifikasyonu yapılamamıştır (1, 16, 17). Yaklaşık 20 yıl önce Barry Marshall ve Robin Warren insan midesinden bakteriyi izole etmişler ve kültürünü yapmayı başarmışlardır (17, 18, 22). Daha sonra bu bakteri *H. pylori* olarak tanımlanmıştır (22). *H. pylori* kolonizasyonunu takiben oluşan ilk patolojik durum kronik aktif gastrittir. Bakterinin intragastrik yayılımı, kronik inflamasyonun şiddeti kolonize olan suşun yapısı, konağın genetik yapısı, oluşan immün yanıt, diyet ve asit üretim düzeyiyle yakından ilişkilidir (9).

Dünyada insan popülasyonunun %50'sinden fazlası *H. pylori* ile enfektir. Fakat sadece %10'da klinik olarak belirgin bir hastalık oluşmakta, büyük bir kısmında ya asemptomatik ya da sadece kronik gastrit görülmektedir. Patojenik ve non-patojenik *H. pylori* suşları konakta bulunabilmekte ve farklı genotiplere sahip suşlar farklı klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler.

Bu çalışmada Kocaeli ve çevresinde gastrik yakınması olan hastalıklardan izole edilen *H. pylori* suşlarının virülans genlerinin araştırılması ve bu genlerin tedavi protokollerinde kullanılan klaritromisin direnci üzerine etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

*H. pylori*'nin araştırılmasında geleneksel standart metod bakteri kültürünün yapılmasıdır. Bununla beraber teknik zorlukları, biyopsi materyalinde bakteri sayısının azlığı, bu testin duyarlılığını azaltmaktadır. Hızlı üreaz testinin duyarlılığı da sınırlıdır. Her iki metotta da biyopsi örneğine ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat *H. pylori* midede yama tarzında yayılım gösterdiği için alınan bütün biyopsi örneklerinde bakteri, belirlenmeye yetecek miktarda olmayabilir (131, 132). Bizim çalışmamız da, alınan 121 biyopsi materyalinin 60'ı hızlı üreaz test ile, 50'si Gram boyama sonucu direk mikroskopi, 34 örnek ise kültür yöntemi ile *H. pylori* pozitif olarak belirlenmiştir. Biyopsiden *H. pylori* DNA'sı izole edilip 16S rRNA'ya spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR'de 78 biyopsi örneğinde *H. pylori* pozitifliği belirlenmiştir. Zsikla ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada histopatolojik kesitlerde *H. pylori* pozitifliği ve PCR yöntemi ile *H. pylori* pozitifliği belirlenmesi karşılaştırıldığında; histopatolojik olarak negatif belirlenen biyopsilerde

PCR'la %20 oranında daha fazla pozitiflik belirlenmiştir(133). Yapılan çalışmalarda, *H. pylori*'nin belirlenmesinde kullanılan metodların duyarlılıkları ve özgüllükleri farklı olarak verilmektedir (134, 135, 136). Bu nedenle bu çalışmada *H. pylori* belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin duyarlılıkları ve özgüllükleri değerlendirilmemiştir. Çalışmada direk biyopsi örneğinden DNA izole edilip PCR yöntemi ile *H. pylori* pozitifliği belirlenmesi temel alınmıştır.

*H. pylori*'nin patojenite genleri ile ilgili çalışmalarda, coğrafik bölgelere göre genetik çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da *H. pylori* izolatlarının %60'ında *CagA* geni pozitif olarak belirlenirken Kore, Japonya gibi Asya ülkelerinde *H. pylori* suşlarında %90'ın üzerinde *CagA* geni pozitifliği bildirilmiştir (53, 137, 138, 139, 140). Avrupa ülkelerinde PÜ'le *CagA* pozitifliği arasında sıkı bir ilişki bildirilirken, Asya ülkelerinde böyle bir ilişkinin varlığı bildirilmemektedir. Çin'de yapılan bir çalışmada da *CagA* geni pozitifliği ile kronik gastrit ve PÜH arasında ilişkinin varlığı belirlenememiştir (140). Japon hastalarda *CagA* virulans geninin ülser oluşumunda güvenilir belirleyici olmadığı gösterilmiştir (141). Türkiye'de yapılan bir çalışmada % 61.7 *CagA*-pozitifliği belirlenmiş, *CagA* gen pozitifliği DÜ ve GÜ daha sık görülmekle beraber NÜD ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (146). Brezilyada yapılan bir çalışmada *CagA* geni, *H. pylori* suşlarının % 65'inde pozitif bulunmuş, *CagA* ile PÜH arasında ilişki görülmüştür (142, 143). Başka bir çalışmada *Cag* geninin RFLP analizi ile 3 farklı paterni olduğu ve bunların klinik bulgularla ilişkili olmadığı bildirilmiştir (145). Yapılan bu çalışmada *H. pylori* pozitif olarak belirlenen biyopsi örneklerinin %70.5'de *CagA* geni pozitif olarak belirlenmiştir. Hasta grupları dikkate alındığında; gastritte %77.5, ülserde %70.4, duodenitte %44.4 ve herhangi bir patolojik endoskopi bulgusu olmayanlarda %66.7 oranında *CagA* geni pozitif olarak belirlenmiştir. *CagA* pozitifliği gastrit ve ülserli hasta gruplarında yüksek oranda görülmektedir. Fakat *CagA* geni pozitifliği ile gastrik hastalıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenememiştir ( $p>0.05$ ).

*H. pylori* suşlarının tamamında toksini kodlayan *VacA* geni bulunmasına rağmen genomdaki farklılıklar nedeniyle %50'si toksin üretebilmektedir. Fakat *VacA* gen dizisi olmayan bazı suşların varlığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (146). Çalışmamızda da *H. pylori* pozitif 9 biyopsi örneğinde *VacA* geni belirlenememiştir.

Bu hastaların 8 tanesi *CagA* geni taşıyor olup gastrit ve ülser belirlenen hastalardır. Dolayısıyla *VacA* geninin tek başına patogeneze sorumlu olup olmadığı tartışma konusudur. *VacA* geni sinyal dizisi (s bölgesi) *s1a*, *s1b*, *s2* allelleri olarak, orta bölge (m bölgesi) ise *m1* ve *m2* allelik formlarda bulunabilmektedir. Bu alleller değişik coğrafyalarda farklılıklar göstermektedir. *s1am1* sitotoksik etkisinin *s1a/m2* den daha fazla olduğu ve *s2/m2* bulunanlarda sitotoksositeye hemen hemen rastlanmadığını bildirmektedirler. Kuzey ve Doğu Avrupa'da *VacA s1a* allelinin, İspanya ve Portekiz'de *s1b* allelinin baskın olduğu, Fransa, İtalya ve Kuzey Amerika'da ise *s1a* ve *s1b* allellerinin eşit oranda görüldüğü bildirilmiştir. Yine Avrupa ve Amerika'da *VacA* geni *m1* ve *m2* allelleri eşit oranda görülürken İran ve birçok Asya ülkesinde *m2* allelinin daha yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir (140). Almanyada yapılan bir çalışmada *VacA s1a*'nın güçlü bir şekilde PÜH ile bağlantılı olduğu, *Vac s2*'nin NÜD ile bağlantılı olduğu görülmüş, çok nadir olarak ülserli hastalardan izole edildiği gösterilmiş, *m1* ve *m2*'nin klinik ile ilişkisi görülmemiştir (147). Brezilyadaki hastalarda *VacA* s ve m genotipleri araştırılmış, izolatların % 62'sinde *s1*, % 30'da *m1*, % 70 ise *m2* alleli belirlenmiş olup PÜH olanlarda *s1* alleli daha yüksek belirlenirken *m1* ve *m2*'nin klinik ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Aynı ülkeden başka bir çalışmada PÜH ile *s1/m2* mozaikliği ve Gastro özefageal reflü ile *s2/m2* mozaikliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmiştir (142, 146). Türkiye'den yapılan bir çalışmada %76.6 *VacA* pozitifliği görülmüş. *VacA* pozitifliği ülserli hastalarda NÜD'li hastalardan daha yüksek olmasına rağmen, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış. *CagA* ile DÜ ve GÜ arasında önemli derecede pozitif bir ilişki varlığına rağmen *VacA* geni DÜ, GÜ, ve NÜD'de önceden hastalığın belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır (145). Bizim çalışmamızda *s1a* ve *s2* allellerinin pozitiflikleri sırasıyla %71.8 ve %16.7 olarak belirlenmiş olup *s1b* alleli belirlenmemiştir. *s1a* pozitifliği gastritli hastalarda %77.5, ülserli hastalarda %70, duodenitli hastalarda %66.7, normal hastalarda ise %55.6 olarak belirlenmiştir. Gastritli hasta grubunda *s1a* pozitifliği belirgin bir şekilde yüksek görülmektedir. Bu sonuç yapılan diğer çalışmalarla uyum göstermektedir.

*VacA* genotipinin allelik birlikteliğine bakıldığında; Çin'de yapılan bir çalışmada *s1a/m2* genotipinin, Japonya'da yapılan bir çalışmada *s1a/m1* genotipinin,

Meksika’da yapılan bir çalışmada ise *s1b/m1* genotipinin dominant olduğu bildirilmiştir (138, 148). Avrupa’da *s1/m1* ve *s1/m2* mozaikliği eşit oranda görülüp, *s2/m2* daha düşük oranda görülmektedir. Amerika’da *s1/m1* ve *s2/m2* en sık ve eşit oranda görülen mozaiklidir (67). Almanya ve İngiltere’de ise *s1/m1* ve *s1/m2* en sık genotip olduğu tespit edilmiştir (150, 151). Bizim çalışmamızda da en sık rastlanan mozaiklik *s1a/m2* olup Avrupa ülkeleri ile benzerlik göstermektedir. Fakat gastrik hastalıklarla ilişkisi değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenememiştir.

Almanya’da yapılan çalışmalarda patojenite belirteci olarak bilinen *CagA* geni ile *VacA s1a* sinyal sekansın yüksek oranda korele olduğu görülmüş; ancak *CagA* ile *s2* ve *m2* arasında korelasyon görülmemiş, çok nadir olarak ülserli hastalardan izole edildiği gösterilmiştir (147, 151, 152, 153). Başka bir çalışmada da *CagA* negatifliği ile *s2/m2* genotipi arasında belirgin bir ilişkili olduğu gösterilmiştir (154). Çalışmamızda da *CagA* negatifliği ve *s2/m2* genotipi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmüştür ( $p=0.016$ ). *s2/m2* genotipinin görüldüğü hastalarda *CagA* geninin negatif olması bu suşların hastalıktan sorumlu olmaktan çok kolonizan suş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çalışmada en sık olarak görülen *s1a/m2* mozaikliğinin *CagA* geni ile birlikteliğinin gastrit, peptik ülser ve düodenitli hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenememiştir. Xiang Z ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *CagA* pozitifliği ile *VacA* subtiplerinin birlikte değerlendirilerek PÜ ve kronik gastrit ile karşılaştırıldığında bir belirteç olarak kullanılmayacağı sonucuna varılmıştır (138). Bu sonuç bizim çalışmamızı desteklemektedir. Doğu Asya ülkelerinde *CagA* ve *VacA* subtipleri ile gastrik kanser, PÜH ve gastrit arasında bir ilişki bulunmamasına rağmen Avrupa ülkelerinde bunun tam tersine *CagA* ve *VacA* subtiplerinin (özellikle *s1/m1*) gastrik hastalıklarla sıkı bir ilişkisi belirlenmiştir (142).

Türkiye’den yapılan çalışmalarla karşılaştırdığımızda; bir çalışmada *CagA* geninin mevcudiyeti %78 olup, *VacA s1a* ile birlikteliğine PÜH olanlarda daha sık rastlanmıştır. Başka bir çalışmada ise *H. pylori* izolatlarının özellikle *CagA*, *VacA s1a/m1* veya *s1a/m2* genotiplerinin baskın olduğu görülmüştür (145, 146). Bu sonuçlar çalışmamız ile uyum göstermektedir.

*IceA* geni, *H. pylori* epitel hücrelerle karşılaştığında indüklenmekte ve bakterinin epitel hücre yüzeyinde kolonizasyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (78). *IceA* geni *IceA1* ve *IceA2* olmak üzere iki alleli bulunmaktadır. *IceA1* genotipi Japonya, Kore ve Çin’de, *IceA2* genotipi ise Amerika’da dominant olarak görülmekte ve klinikle anlamlı bir ilişkisi bulunmamaktadır. Yue Hua Han ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *IceA1* %74.5 ve *IceA2* %15.6 oranında pozitif belirlenmiş olup *IceA1* ve *IceA2* genotiplerin *VacA* ve *CagA* pozitif kombinasyonu ile hastalıkların çeşitliliği arasında bağlantı görülmemiştir. Bu sonuç diğer Asya ülkeleri ile de uyumlu bulunmuştur (155). Yamaoks ve arkadaşlarının çalışmalarında Japonya ve Kore’de *CagA*<sup>+</sup>, *VacA s1m1*, *IceA1* genotipinin, USA’da ise *CagA*<sup>+</sup>, *Vac s1b/m1*, *IceA2* genotipinin dominant olduğunu belirtmişler ancak her iki bölgede klinik hastalıkla virulans genleri arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir. *IceA2* genotipi olan izolatlar çoğunlukla asemptomatik veya gastrit ve NÜD hastalarda bulunmaktadır. Bir çalışmada, *IceA1* pozitif izolatlarda, negatif olanlara göre daha fazla proinflamatuvar sitokin IL-8 salınımının olduğu ve bunun da peptik ülser gelişimine neden olduğu ileri sürülmüştür (156). Bizim çalışmamızda hastaların %24.4’de *IceA1*, %26.9’de *IceA2* pozitif olup birbirine yakın oranda bulunmuştur (Tablo 10). *IceA1* genotipi ile gastrik hastalıklar arasında herhangi bir ilişki görülmezken *IceA2* ile klinik bulgular arasında istatistiksel olarak negatif bir ilişki gözlenmiştir (p=0.031). PÜ, gastrit ve duodenit’li hastalardaki *H.pylori* suşlarının *IceA2* gen taşımadıkları, doalyısıyla bu genotipin virulansla ilişkili olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Brezilya’da yapılan bir çalışmada *IceA2* % 74 oranda bulunurken *iceA1* genotipi %15 olarak belirlenmiştir (157). Diğer iki çalışmada ise *IceA2* oranı benzer olup klinik bulgularla ilişkisi görülmemiştir (158, 159). Zheng ve ark. yaptığı çalışmada 108 PÜ ve NÜD hastadan elde edilen *H. pylori* izolatının %95.4 Le<sup>x</sup> ve Le<sup>y</sup> antijeni saptanmış, PÜH ile Lewis antijenleri arasında istatistiksel anlamlı ilişkili olduğu halde *CagA*, *IceA*, veya *VacA* genotipler ile ilişkili olmadığı görülmüştür. *CagA*, *IceA*, ve *VacA*’nın universal virülans belirleyicileri olmadığı ve klinik bulguların ortaya çıkmasında konak-patojen etkileşiminin önemli olduğu sonucuna varılmıştır (160).

*BabA* adezyon proteininin ülser hastalığı ve gastrik adenokarsinoma ile güçlü ilişkisi nedeniyle *H. pylori*’nin virulansında önemli bir rol oynadığı düşünülmekle



beraber bu konu hala tartışmalıdır (119). Avrupa toplumunda *BabA2* %38 oranında pozitif olup klinikle anlamlı ilişki bulunmakta iken, Japonya’da yapılan çalışmalarda *BabA2* daha yüksek oranda (%66-72) görülmekle birlikte klinik ile ilişkisi saptanmamıştır (161). Mizushima ve ark. yaptığı çalışmada *BabA2 VacA s1a CagA* üçlü pozitifliğinde DÜ, gastrik adenokarsinom prevalansında artış görülmüş. *BabA2* ve *VacA s1* arasında korelasyon görülmemiş, az sayıda PÜ ve adenokarsinomu olan hastada ise *BabA*, *CagA*, *VacA s1a* negatif genotip görülmüştür (142). Çeşitli çalışmalarda *BabA2*, *CagA*, *Vac s1a* üçlü pozitifliğinin DÜ, gastrik adenokarsinom ve gastrik prekanseröz lezyonla önemli ölçüde bağlantılı olduğu rapor edilmiştir (162, 163, 164). Bizim çalışmamızda sadece %6.4 örnekte *BabA2* pozitifliği görülmüştür ve klinikle ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Oranın bu şekilde düşük olmasının nedeni gastrik kanserli ve prekanseröz lezyonlu hasta grubunun olmaması ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

*H. pylori* enfeksiyonununun tedavi protokollerinde makrolit grubu antibiyotikler önemli bir yer tutmaktadır. PPI + Amoksisilin + Klaritromisin en sık kullanılan tedavi protokolüdür. Bu tedavide amoksisilin’e direnç %1 gibi düşük oranda görülmekle beraber ABD, İtalya ve Brezilya’da değişen oranlarda direnç bildirilmektedir (165, 166, 167).

Tedavide kullanılan diğer bir antibiyotik olan klaritromisin direnci 23S rRNA’da meydana gelen nokta mutasyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Dokuz farklı mutasyon olmakla beraber en sık olarak A2142G ve A2143G pozisyonunda oluşan mutasyon görülmektedir. Klaritromisin direnci Amerika’da %5-14, Avrupa’da %2-10, ülkemizde ise %16.8-56 olarak bildirilmektedir (14). Bununla birlikte makrolitlerin gittikçe artan tüketimi yıllar içerisinde direnç oranında yükselmeye neden olmaktadır. Üniversite Hastanemizde 2000-2001 yılları arasında izole edilen suşlarda klaritromisin direnci %5 olarak belirlenirken (168), bu gün direnç oranı %28.2 olarak belirlenmiştir. Ancak 5 izolatta hem dirençli hem de duyarlı suş co-enfeksiyon olarak değerlendirildiğinde direnç oranı %34.6 olmaktadır. Meksika ve Çin’de yapılan çalışmalarda birden fazla suşla enfeksiyonun yaygın olduğu bildirilmiştir. Co-enfeksiyon *H. pylori* prevalansının yüksek olduğu ülkelerde daha sık olarak görülmesi beklenmektedir (169, 170, 171). Klaritromisine karşı direnç gelişimi ciddi olarak eradikasyonu zorlaştırmaktadır (62). Elviss ve ark. klaritromisin

direncinin *CagA* ve *VacA s1/m2* pozitif genotiplerle güçlü bir ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir (154). (Dirençli suşların hepsinde, duyarlı suşların yarısından azında bu genotip belirlenmiş). Yakoop ve ark. yaptıkları *in-vitro* çalışmada *CagA/ s1* negatif olan suşların *CagA/s1* pozitif hale transforme olduklarında aynı zamanda klaritromisin direnci kazandıklarını göstermişlerdir (171). Bu çalışmaların aksine Cellini ve ark. co-enfeksiyon varlığında klaritromisin direncinin daha yüksek olabileceğini bildirmişlerdir (172). Bunun yanında bazı araştırmacılar virulans genleri ile makrolit direnci arasında herhangi bir ilişki bulunmadığını bildirmişlerdir (142,173).

Bir biri ile çelişen bu çalışmalar dikkate alındığında, bizim çalışmamızda Kocaeli ve çevresinde belirlenen *H. pylori* suşlarına ait virulans genleri ile klaritromisin direnci arasındaki ilişkiyi araştırdık. Yetmiş sekiz *H. pylori* belirlenen biyopsi örneğinin 5 tanesinde iki farklı suş olduğu düşünüldü. Ayrıca 5 örnekte de klaritromisin duyarlılığı veya direncinin belirleyen bir pik görülmedi. Bu nedenle 10 örnek istatistiksel analiz dışı bırakılmıştır. Altmış sekiz biyopsi örneği değerlendirildiğinde, *CagA* pozitif örneklerde klaritromisinin duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.042). Diğer virulans genleri olan *VacA s1a, s2, m1, m2* ve adezyon genleri olan *IceA1, IceA2* ve *BabA2* ile klaritromisin direnci arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir (p>0.05). Ayrıca *CagA +, vacA s1/m2 +* genotip birlikteliğinin klaritromisin direnci ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; Kocaeli ve çevresinde belirlenen *H. pylori* suşlarında *CagA+, VacA s1a/m2* genotipi daha yüksek oranda belirlenmiş olup gastrik hastalıklarla istatistiksel olarak ilişkisi bulunamamıştır. Klaritromisin direnci ile virulans genleri karşılaştırıldığında diğer çalışmalardan farklı olarak *H. pylori CagA* pozitif örneklerde klaritromisin duyarlılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bölgemizde, gastrik hastalıkların oluşumunda *H. pylori* suşlarının virulans genlerinin etkisinden daha ziyade bire-bir konak-bakteri etkileşiminin önemli olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca bakterinin virülansı ile antibiyotik direnci arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir. Tam tersine klaritromisin direnci *H. pylori*'nin patojenite adası varlığının göstergesi olan *CagA* geni olmayan suşlarda daha sık görülmüştür. *H. pylori* ile yapılan çalışmalarda direnç gelişimi ve virulans genleri arasındaki ilişki

ile ilgili çelişkili sonuçlar olmakla beraber çeşitli bakterilerde de yapılan çalışmalarda dirençli olan suşların virülansının daha düşük olduğu bildirilmektedir.



## 6.SONUÇ:

Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve endoskopi yapılan 66 bayan, 55 erkek 121 hasta çalışmaya dahil edildi. Yaş ortalaması (49±15) belirlendi ve hastalara ait demografik veriler kaydedildi.

Hastaların biyopsi örneklerinden DNA izole edilip, 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PCR da 78 örnek *H. pylori* pozitif olarak tespit edildi.

Yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı ile *H. pylori* pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı.

Endoskopi bulgularına göre gruplandırıldığında hastaların 56'sı (%46.3) gastrit, 24'ü (%19.8) ülser, 13'ü (%10.7) duodenit, olarak belirlendi. Yirmisekiz (%23.1) hastada herhangi bir patoloji bulunamadı. Gastritli hastaların %71.4, ülserli hastaların %83.3, duodenitli hastaların %69.2, normal endoskopi bulgusuna sahip hastaların ise %32.1 *H. pylori* pozitif olarak belirlendi.

*H. pylori* belirlenen örneklerin %70.5'inde *CagA* geni pozitif olup gastrik hastalıklarla istatistiksel olarak ilişki saptanamadı.

*VacA* geni bölgesi PCR ile bakıldığında 69 (%88.4) örnekte *VacA* geni pozitifliği görüldü, 9 (%11.6) örnekte *VacA* genine rastlanmadı. *VacA* genindeki mozaikliğe bakıldığında *sla/m2* dominant görülen genotip olup gastrik hastalıklarla ilişkisi bulunamadı. Aynı şekilde *CagA*, *VacA sla/m2* genotipinin de gastrik hastalıklarla ilişkisi belirlenemedi.

Adezyon ile ilgili genlerden *IceA1* geni 19 (%24.4) örnekte, *IceA2* geni 21 (%26.9) örnekte, *BabA2* geni ise 5 (%6.4) örnekte pozitif bulundu ve gastrik hastalıklarla ilişkisi saptanamadı. *CagA* ile birlikte değerlendirildiğinde *IceA1* ve *BabA2* genleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken *CagA* pozitif örneklerde *IceA2* geninin daha az oranda varlığı belirlendi. Fakat *CagA* ve adezyon genleri birlikteliğinin klinik ile ilişkisi ise saptanamadı.

Klaritromisin direnç oranı %28.2 olarak belirlendi. Ancak 5 izolatta hem dirençli hem de duyarlı suş co- enfeksiyon olarak değerlendirildiğinde direnç oranı %34.6 olmaktadır. Virulans genleri ile klaritromisin direnci değerlendirildiğinde *VacA* ve adezyon genleri ile ilişkisi görülmezken, *CagA* pozitif örneklerde duyarlılık oranı daha yüksek bulundu ve klaritromisin direnci ile virulans genleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı sonucuna varıldı.

*H. pylori*'nin gastrik hastalıklarının patogeneğinde *CagA*, *VacA*, *IceA* ve *BabA2* gibi virölans genlerinin varlığının etkisi bizim çalışmamızda belirlenemedi. Birçok çalışmada da belirtildiği gibi hastalıkların ortaya çıkmasında *H.pylori* virölans özelliği yanında bakterinin konakla olan ilişkisi ve konağa ait genetik faktörler de önem taşımaktadır.



## 7. ÖZET

*H.pylori* gastrit, gastrik ve duodenal ülser, gastrik kanser ve MALT lenfoma ile ilişkili önemli bir insan patojenidir. *H.pylori* virülans genleri ile gastrik hastalıklar arasında ilişkinin varlığı bilinmekle birlikte çeşitli coğrafik bölgelerde farklılıklar göstermektedir. Farklı coğrafik bölgelerde, *H.pylori*'nin klaritromisin direnci ile genetik paterninin dağılımı arasında ilişki ile ilgili sonuçlar farklılık göstermektedir.

Bu çalışmada, Kocaeli bölgesindeki dispeptili hastalarda *H. pylori* klaritromisin direnci ve virülans genlerinin prevalansını; bu virülans genleri ile klaritromisin direnci arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

*H.pylori* 16S rRNA genine spesifik primerler kullanılarak yapılan Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) yetmiş sekiz hastanın (40 gastritli, 20 gastrik ülserli, 9 duodenitli, 9 normal endoskopikbulgulu) biyopsi örneğinde *H. pylori* pozitif olarak belirlendi. Virülans genlerinin varlığı klasik PCR yöntemi ile klaritromisin direnci ise TaqMan real time PCR yöntemi ile araştırıldı. İstatistiksel analiz için Pearson Chi-squared ve Fisher's exact test testleri kullanıldı.

Kocaeli bölgesinde belirlenen *H. pylori* suşlarında *CagA* geni %70.5, *VacA s1a/m2* alleli %71.8, *VacA s2/m2* alleli %16.7 oranında bulundu. *CagA*, *VacA s1/m2* genotipi dominant olmasına rağmen klinik bulgularla istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenemedi. *IceA1* ve *IceA2* allelleri hemen hemen eşit oranda (sırasıyla %24.4-%26.9) belirlenirken *babA2* alleli %6.4 oranında belirlendi. *IceA2 alleli* ile klinik bulgular arasında negatif bir ilişki belirlendi( $p=0.011$ ) *IceA1*, *BabA2* allelleri istatistiksel olarak klinikle ilişkili bulunamadı. Klaritromisin direnci %34.6 oranında bulundu. *CagA* pozitif suşlarda klaritromisin duyarlılığı daha sık belirlendi ( $p=0.042$ ). Sonuç olarak klaritromisin direnci ile bakteriyel genotipik patern arasında herhangi bir ilişki belirlenemedi.

# INVESTIGATION OF VIRULANCE GENES OF *Helicobacter pylori* AND DETERMINATION OF ASSOCIATION WITH CLARYTHROMYCIN RESISTANCE

## 8. ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is an important human pathogen associated with gastrointestinal diseases such as gastritis, gastric and duodenal ulcer, gastric cancer and MALT lymphoma. Distinct virulence factors of *Helicobacter pylori* have been associated with clinical outcome of the infection; however, considerable variations have been reported from different geographic areas. On the other hand, the relationship between *H. pylori* clarithromycin resistance and genetic pattern distribution has been differently explained from different geographic areas.

In this study we aimed to determine the prevalence of *cagA*, *vacA*, *iceA* and *babA* genotypes of *H. pylori* in Kocaeli patients with dyspeptic diseases. In addition, we evaluated the prevalence of clarithromycin resistance and determination of association between these four virulence markers and antibiotic resistance in the city of Kocaeli.

Seventy eight *H.pylori*- positive patients (40 with gastritis, 20 with gastric ulcer, 9 with duodenitis, 9 with normally endoscopic finding) were determined with polymerase chain reaction (PCR) using primers specifically designed 16S rRNA gene primers. The presence of CagA, VacA alleles, *IceA*, *BabA2* genotypes were determined using classical PCR and Clarithromycin resistance was assessed specimens by TaqMan real time polymerase chain reaction (PCR). Pearson Chi-squared test and Fisher's exact test were used for statistical comparisons.

*CagA*, *VacA s1a/m2*, *s2/m2* genes were found in 70.5%, 71.8%, 16.7%, of isolates, respectively. The *CagA*, *VacA s1/m2* genotype was dominant. However there was no significant association with clinical outcomes in Kocaeli patients. *IceA1* and *IceA2* genotypes were almost equally present ( 24.4%- 26.9% respectively), while 6.4% were found to possess the *babA2* allele. The *Ice A2* allele was negatively correlated with *CagA* positive strains (p=0.011). There was no clinical entity associated with *IceA*, *BabA2* alleles. Clarithromycin resistance was found 34.6 % in

the City of Kocaeli. The *CagA* positive strains were significantly associated with Clarithromycin sensitivity ( $p= 0.042$ ). Finally, we did not find any relationship between clarithromycin resistance and bacterial genotype.

## INVESTIGATION OF VIRULANCE GENES OF HELICOBACTER PYLORY AND DETERMINATION OF ASSOCIATION WITH CLARYTHROMYCIN RESISTANCE

### 8. ABSTRACT

**Aim:** To determine *H.pylori* Clarithromycin resistance, and to show whether this resistance is associated with virulence genes and significance of these genes in clinics in the city of Kocaeli..

**Materials and Methods:** We studied gastric biopsy materials of 121 patients with gastric complaine admitted to the Gastroenterology clinic of Kocaeli University Hospital. Genomic DNA was isolated from biopsies with CTAP method. Identification of *H.pylori* strains in these genomic DNA was done using primers specifically desinged for *H.pylori* 16S rRNA gene. In *H.pylori* positive DNA, *CagA, VacA, IceA, BabA2* virulence genes were determined using PCR. Point mutations in the 23rRNA gene causing Clarithromycin resistance namely A1242G, A1243G were determined using Real-Time PCR

**Results:** Although the *CagA+/VacAs1am2* genotype prevailed in *H. Pylori* strains found in the City of Kocaeli, there was no statistically association with the gastric patients. When compared with Clarithromycin resistance with virulence genes, Clarithromycin resistance in *CagA* positive samples, in contrast with previous studies, was statistically significant.



## 9.KAYNAKLAR:

- 1.[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005)
2. Asaka, M., T. Kimura, M. Kato, M.Kudo, K.Miki, K. Ogoshi, T.Kato, M. Tatsuga, and D.D.Y.Graham; Possible role of *Helicobacter* infection in early gastric cancer development *Cancer* ,1994;**73**:2691-2694.
- 3.Mc Coll, K.E. *Helicobacter pylori: Clinical aspects.J.infect.* 1997;**34**:7-13.
- 4.Cover, T. L and M. J. Blaser; *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implication for eradication and prevention. *Adv.intern.Med.* 1996;**41**:85-117.
- 5.Hunt R N:the role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis: The spectrum of clinical outcome. *Scand J. Gastroenterol*,1996;**31**:3.
6. Ebru Demiray, Özlem Yılmaz: *Helicobacter pylori* infeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2007;**37 (2)** : 112-117.
7. Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and R. Rappuoli; Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993;**90**:5791–5795.
8. Cover, T. L, U. S. Krishna, D. A. Israel, and R. M. Peek, Jr; Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res.* 2003;**63**:951–957.
9. Johannes G. Kusters, Arnoud H. M. van Vliet, and Ernst J. Kuipers: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection *Clinical Microbiology Reviews*, July 2006, p. 449–490.

10. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J: Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 1998; **42**:609
11. Calvet X, Garcia N, Lopez T, Gispert JP, Gene E, Roque M: A meta-analysis of short versus long therapy with a proton pump inhibitor, clarithromycin and either metronidazole or amoxicillin for treating *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000; **14**:603
12. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; **56**: 772-781
13. Can, Fusun; Yilmaz, Zerrin; Demirbilek, Muge; Bilezikci, Banu; Kunefeci, Ganiye; Atac, Fatma B.; Selcuk, Haldun; Arslan, Hande; Boyacioglu, Sedat; Sahin, Feride I.f.f.e.t: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens *Canadian Journal of Microbiology*, Volume **51**, Number 7, 1 July 2005 , pp. 569-573(5)
14. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; **56**: 772-781.
15. Bingöl R. *Helicobacter pylori* Mikrobiyolojisi. 9. Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 3-8 ekim 1999, Antalya; Kongre Kitabı, S.51-55.
16. Dooley C P. Background and historical considerations of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America* 1993; **22**:1-5.
17. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1984**:1311-1314.

18. Önder Ovalı, Orhan Baylan Klinik ve Mikrobiyolojik açıdan *Helicobacter pylori*, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi* 2004 **34**:135-146
19. Harry L. T. Mobley, George L. Mendez, and Stuart I. Hazell: *Helicobacter pylori* physiology and genetics chapter **3**:20-21
20. Buckley MJM, O'Morain CA. *Helicobacter* biology-discovery. In: Farthing MJG and Patchett SE (eds). *Helicobacter* infection. *Br Med Bull.* 1998: **54**:7-16,
21. Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *The Lancet* 1983; 1273.
22. Goodwin, C. S., J. A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M. D. Colins, L. Sly, W. McConnell, and W. E. S. Harper. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1989: **39**:397-405.
23. Graham KS, Graham DY: Contemporary Diagnosis and Management of *H.pylori*-associated Gastrointestinal Diseases. 1st ed, p 1, handbooks in Health Care Co, Pennsylvania, 2001.
24. Malaty HM, Graham DY: Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 1994: **35**:742
25. Martin Welin, Noël M. A. Holmgren, Patric Nilsson and Helena Enroth: Statistical Model of the Interactions Between *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer Development , *Helicobacter* Volume **8**, Number 1, 2003: 72-764.
26. Washington Winn Jr. Stephen Allen, William Janda, Emler Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, Gail Woods: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 2006.

27. Köksal F. *H.pylori*. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2002; 1643–1647.
28. Dietrich Rothenbacher, Maria Weyermann, Günter Bode, Murrat Kulaksiz, Bernd Stahl and Hermann Brenner: Role of Lewis A and Lewis B Blood Group Antigens in *Helicobacter pylori* Infection, *Helicobacter* 2004; **4**:Volume **9**
29. Scott, D. R., E. A. Marcus, D. L. Weeks, and G. Sachs. 2002. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **123**:187–195
30. Berg, D. E., P. S. Hoffman, B. J. Appelmelk, and J. G. Kusters. The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol*, 1997; **5**:468–474.
31. Doig, P., B. L. de Jonge, R. A. Alm, E. D. Brown, M. Uria-Nickelsen, B. Noonan, S. D. Mills, P. Tummino, G. Carmel, B. C. Guild, D. T. Moir, G. F. Vovis, and T. J. Trust.; *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999;**63**:675–707.
32. Marais, A., G. L. Mendz, S. L. Hazell, and F. Megraud.;Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:642–674.
- 33.Nedenskov, P.;Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994;**60**:3450–3453.
- 34.Taneera, J., A. P. Moran, S. O. Hynes, H. O. Nilsson, W. Al-Soud, and T. Wadstrom.;Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter spp.* *Microbiology* , 2002;**148**:677–684

35. Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. Vandenbroucke Grauls. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* 1997: **65**:3672–3679.
36. Reynolds, D. J., and C. W. Penn.; Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology* 1994:**140**:2649–2656.
37. Mendz, G. L., A. J. Shepley, S. L. Hazell, and M. A. Smith. ; Purine metabolism and the microaerophily of *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 1997:**168**:448–456.
- 38 Owen RJ. *Helicobacter*- species classification and identification. In:Farthing MJG and Patchett SE (eds). *Helicobacter* Infection. *Br Med Bull.* 1998: **54**:17-30.
39. Köksal F. *H.pylori* infeksiyonlarında patogenez ve bağışık yanıt. 9.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongre kitabı, 3–8 Ekim 1999 Antalya. syf.46–50
40. Dunn BE, Cohen H, Blaser Mj: *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* ,1997: **10**: 720
- 41.O'Toole, P. W., M. C. Lane, and S. Porwollik.; *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* 2000: **2**:1207–1214
- 42.Van den Brink, G. R., K. M. Tytgat, R. W. Van der Hulst, C. M. Van der Loos, A. W. Einerhand, H. A. Buller, and J. Dekker. ; *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut*,2000.**46**:601–607
43. Yamaoka, Y., S. Kikuchi, H. M. el-Zimaity, O. Gutierrez, M. S. Osato, and D. Y. Graham.; Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 2002: **123**:414–424.

44. Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard.; Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* 2001: **61**:1903–1909.
45. Rad, R., M. Gerhard, R. Lang, M. Schoniger, T. Rosch, W. Schepp, I. Becker, H. Wagner, and C. Prinz. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.* 2002: **168**:3033–3041.
46. Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham.. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000: **97**:7533–7538
47. Ando, T., R. M. Peek, D. Pride, S. M. Levine, T. Takata, Y. C. Lee, K. Kusugami, A. van der Ende, E. J. Kuipers, J. G. Kusters, and M. J. Blaser.; Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with cagA status. *J. Clin. Microbiol.* 2002: **40**:239–246
48. Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren. ; *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*, 2002: **297**:573–578.
49. Mahdavi, J., T. Boren, C. Vandenbroucke-Grauls, and B. J. Appelmelk.; Limited role of lipopolysaccharide Lewis antigens in adherence of *Helicobacter pylori* to the human gastric epithelium. *Infect. Immun.* 2003: **71**: 2876–2880.

50. Muotiala, A., I. M. Helander, L. Pyhala, T. U. Kosunen, and A. P. Moran.; Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 1992;**60**:1714–1716.
51. Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.; *CagA* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;**93**:14648–14653.
52. Akopyants, N. S., S. W. Clifton, D. Kersulyte, J. E. Crabtree, B. E. Youree, C. A. Reece, N. O. Bukanov, E. S. Drazek, B. A. Roe, and D. E. Berg. Analyses of the *Cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 1998;**28**:37–53
53. Blaser, M. J., and J. E. Crabtree.; *CagA* and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 1996; **106**:565–567.
54. Kuipers, E. J., G. I. Perez-Perez, S. G. Meuwissen, and M. J. Blaser. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995;**87**:1777–1780
55. Van Doorn, L. J., C. Figueiredo, R. Sanna, M. J. Blaser, and W. G. Quint. Distinct variants of *Helicobacter pylori* *CagA* are associated with *VacA* subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37**:2306–2311.
56. Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor *CagA* is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002;**99**:14428–14433.
57. Atherton J. Covacci A. *H.pylori*'nin patojenik özellikleri. *Current Opinion in Gastroenterology.* 1997; **13**: 20–24.

58. Go M F, Crowe SE. Virulence and pathogenicity of *H.pylori*. *Gastroenterology Clinics of N.America*, 2000; **29**: 649–671.
59. Investigation of the biological relevance of *Helicobacter pylori* cagE locus diversity, presence of *CagA* tyrosine phosphorylation motifs and vacuolating cytotoxin genotype on IL-8 induction in gastric epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003;**36**:135–140.
60. Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000;**287**:1497–1500.
61. Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999;**96**:14559–14564
62. Al-Ghoul, L., S. Wessler, T. Hundertmark, S. Kruger, W. Fischer, C. Wunder, R. Haas, A. Roessner, and M. Naumann.; Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori* infected epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004: **322**:860–866.
63. Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after Cag-driven host cell translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000: **97**:1263–1268.
64. Selbach, M., S. Moese, R. Hurwitz, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J.* 2003: **22**:515–528.
65. Cover, T. L., and M. J. Blaser. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 1992;267:10570–10575.



66. Atherton JC. *Helicobacter pylori* virulence factors. In: Farthing MJG and Patchett SE (eds). *Helicobacter Infection. Br Med Bull.* 1998;**54**:105-120.
67. Atherton, J. C., P. Cao, R. M. Peek, Jr., M. K. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* 1995;**270**:17771–17777.
68. Yue Hua Han, Wen Zhong LIU & Shu Dong XIAO: Clinical relevance of *IceA* and *BabA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in a Shanghai population. *Chinese Journal of Digestive Diseases* 2004;**5**:181-185.
69. Yamaoka, Y., T. Kodama, O. Gutierrez, J. G. Kim, K. Kashima, and D. Y. Graham. Relationship between *Helicobacter pylori* *IceA*, *CagA*, and *VacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J. Clin. Microbiol.* 1999;**37**:2274–2279.
70. Marchetti, M., B. Arico, D. Burroni, N. Figura, R. Rappuoli, and P. Ghiara. Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*, 1995;**267**:1655–1658.
71. Ogura, K., S. Maeda, M. Nakao, T. Watanabe, M. Tada, T. Kyutoku, H. Yoshida, Y. Shiratori, and M. Omata. ;Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J. Exp. Med.* 2000;**192**:1601–1610.
72. Hennig, E. E., M. M. Godlewski, E. Butruk, and J. Ostrowski.; *Helicobacter pylori* *VacA* cytotoxin interacts with fibronectin and alters HeLa cell adhesion and cytoskeletal organization in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005;**44**:143–150
73. Cover, T. L., and S. R. Blanke. ;*Helicobacter pylori* *VacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005;**3**:320–332.

74. Aviles-Jimenez, F., D. P. Letley, G. Gonzalez-Valencia, N. Salama, J. Torres, and J. C. Atherton. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *J. Bacteriol.* 2004;**186**:5182–5185.
75. Ilver, D., S. Barone, D. Mercati, P. Lupetti, and J. L. Telford. *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cell. Microbiol.* 2004; **6**:167–174.
76. Gebert, B. W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*, 2003;**301**:1099–110232.
77. Donahue, J. P., R. M. Peek, L. J. Van Doorn, S. A. Thompson, Q. Xu, M. J. Blaser, and G. G. Miller.; Analysis of iceA1 transcription in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2000; **5**:1–12.
78. R.H.Hunt, G.N.J.Tytgat: *Helicobacter pylori Basic Mechanisms to Clinical Cure 2000* , Kluwer Academic Publishers Dordrecht Boston, London .2000:141-14634.
79. Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JI.: Mucosal tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in patients with Helicobacter-associated gastritis. *Gut*.1991;**32**:1473-1477,
80. Atherton JC. *Helicobacter pylori* virulence factors. In: Farthing MJG and Patchett SE (eds). *Helicobacter Infection. Br Med Bull.* 1998; **54**:105-120.
81. Cynthia PORTAL-CELHAY\* and Guillermo I. PEREZ-PEREZ Clinical Science (2006) 110, 305–314 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/CS20050232 305 (Review)
82. <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch023.htm>

83. Malaty HM, Graham DY:İmportance of childhood socioeconomic status on the current prevalance of *Helicobacter pylori* infection.*Gut*, 1994;**35**:742
- 84.Suerbaum S, Michetti P: *Helicobacter pylori* infection. *N engl J Med* , 2002;**347**:1175.
- 85.European *Helicobacter* Study Group XXth İnternetional Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul. Turkey
- 86.Özden A: *Helicobacter pylori* epidemiyolojisi. “A. Özden (ed): işte *Helicobacter pylori*, Gastrit, Ülser”, Türk gastroenteroloji derneği, Ankara,1995: **p18**.
87. Brea ML, Alarcon T, Megraud F. *H.pylori* infeksiyonlarında tanı.;Current Opinion in *Gastroenterology*. 1997; **13**: 13–19.
- 88.Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. *H.pylori*. *Manuel of Clinical Microbiology*. 6.th Edition, ASM Press, Washington D.C. 1995: 1247–1256.
- 89.Vaira D, Holton J, Menegatti M, Ricci C, Landi F. New Immunological assays for the diagnosis of *H.pylori* infection. *Gut*, 1995; **45(1)**: 123–127.
- 90.Kocazeybek B, Memişoğlu R, Arıtürk S. Determination of the HpSA in stool for diagnosis of *H.pylori* infections and the value this method post-treatment follow up *H.pylori* eradication. 12th European Congress of Clinical Microbiology and İnfection Disease. Milan, Italy. Kongre Kitabı 2002.
- 91.Unver S, Kubilay U, Sezen OS, Coskuner T. Investigation of *Helicobacter pylori* colonization in adenotonsillectomy specimens by means of the CLO test. *Laryngoscope*. 2001 Dec;**111(12)**:2183-6.

- 92.Dixon MF. Helicobacter gastritis. İn:Moran Ap,O2Morain CA (eds), Pathogenesis and host response in helicobacter pylori İnfections. Bad Homburg: normed verlag;1997:110
- 93.Sandıkçı M. Gastrit, peptik ülser ve *H.pylori*. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul; 2002: 787–789.
- 94.Blaser J.Martin: *H.pylori* and relatid organisms. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(eds). Mandell, Douglas and Bennet’s Principles and Practice infections disease. Newyork Chrchill, Livingstone; 5.baskı. 2000: 2228–2241
- 95.Sipponen P, Price A.Gastritis and gastric cancer. İn:Malferttheiner P, Michetti P, Price A.(eds), Helicobacter pylori. An Atlas. London: Science Pres;1996:8
- 96.Schistosomiasis, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC monographs on the evaluation of carcinogenecs.Risks to humans. IARC, Lyons, 1994, **61**:177
- 97.Correa P,Haenzel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. Lancet, 1975 ii:58
- 98.McColl KEL ve El-Omar E. Helicobacter and disturbance of gastric function associated with düodenal ulcer disease and gastric cancer. Scan. *J.Gastro* 1996: **215**:31-32
- 99.Blaser J.Martin: *H.pylori* and relatid organisms. In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(eds). Mandell, Douglas and Bennet’s Principles and Practice infections disease. Newyork Chrchill, Livingstone; 5.baskı. 2000: 2228–2241.
- 100.So M, AH: Gastric, duodenal and stres ulcer. Gastrointestinal Disease. Ed, Sleisenger MH, Fortran JJ., WB Saunders company, 1993:**5**: 580–620.

101. Tytgat, GNJ. Noach, LA. Rauws EAJ: *H.pylori* infection and duodenal ulcer disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; **22(1)**:127–139.
- 102.Lambert JR. The role of *H.pylori* in nonulcer dyspepsia. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; **22(1)**: 141–151.
- 106.y103Makristathis A, Hirschl AM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; Suppl 1.
- 104.[http://www.htd.tip.hacettepe.edu.tr/doc/2004\\_4/182-186.doc](http://www.htd.tip.hacettepe.edu.tr/doc/2004_4/182-186.doc) Yılmaz Y.A. *H.pylori* mikrobiyolojik tanı yöntemleri.
- 105.Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform which test? *Ann Med* 2001; **33**:91-7
106. Monteiro L Doermann HP, Megraud F. Non-serological diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infections. Homburg Normed Verlag: *International Medical Publishers*,1997; 215-29
- 107.Makristathis A, Hirschl AM, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004;Suppl 1
- 108.Taylor D, Parsonnet J. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. In: Blaser MJ, Smith PF, Ravdin J, Greenberg H, Guerrant RL (eds). *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1995; 551-64.
109. Hirschl AM, Rotter ML. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *J. Gastroenterol* 1996; **31**:33-6.
- 110.Vaira D, Gatta L, Ricci C, Miglioli M. Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; **16(1)**:16-23.

111. Herbrink P, vanDoorn LJ. Serological methods for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and monitoring of eradication therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**:164-73.

112. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from human feces. *Lancet* 1992; **340**:1194-5.

113. Wu IC, Ke HL, Lo YC, et al. Evaluation of a newly developed office-based stool test for detecting *Helicobacter pylori*: an extensive pilot study. *Hepatogastroenterology* 2003; **50**:1761-5.

114. Cavallini A, Notarnicola M, Berloco P, et al. Use of macroporous polypropylene filter to allow identification of bacteria by PCR in human fecal samples. *J Microbiol Methods* 2000; **39**:265-70.

115. Kabir S. Detection of *Helicobacter pylori* in faeces by culture, PCR and enzyme immunoassay. *J Med Microbiol* 2001; **50**: 1021-9

116. Bazzoli F: Key point from the revised Maastricht consensus report: The impact on general practice. *Eur J Gastroenterol.* 2001; **36**:690.

117. Köseoglu HT. Peptik ülser komplikasyonlari ve tedavisi. Sivri B (ed. ). Modern tip seminerleri- 5, Peptik ülser tedavisinde yenilikler. Ankara, Öncü Basimevi, 1999 :72-89.

118. Dökmeci G. *Helicobacter pylori* tedavisinde kullanılan ilaçlar. Özden A (ed.) *Iste Helicobacter pylori, gastrit, peptik ülser.* Türk Gastroenteroloji Derneği yayini, Ankara, Nurol Matbaasi, 1995:114-126.

119. Harris A. Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. In: Farthing MJG and Patchett SE (eds.). *Helicobacter infection. Br Med Bull.* 1998; **54**: 195-205.
120. Laheij RJ, Rossum LG, Janse JB, Straatman H, Verbeek AL: Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection: A meta analysis. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999; **13**: 857
121. Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D, Zhang J, Bhattacharyya H, King EC, Hopking RJ: Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: The surveillance of *H. pylori* antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. *Ann Intern Med.* 2002; **136**:13
122. Musoğlu A. *Helicobacter pylori* infeksiyonunun tedavisi. Çavuşoğlu H (ed.) *Helicobacter pylori* ve gastrit-ülser ilişkisi, Ayin Kitabı:76. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 1995:71-101.
123. V. de Francesco, M. Margiotta, A. Zulla, C. Hassan, N. D. Valle, O. Burattini, U. Cea, G. Stoppino, A. Amoroso, F. Stella, S. Morini, C. Panellas & E. Ierardi: Blackwell Publishing Ltd, *Aliment Pharmacol Ther* 2006; **23**,429-435.
124. Vincenzo De Francesco<sup>1</sup>, Marcella Margiotta, Angelo Zullo, Cesare Hassan<sup>3</sup>, Floriana Giorgio, Osvaldo Burattini, Giuseppe Stoppino, Ugo Cea, Antonella Pace, Mariangela Zotti, Sergio Morini, Carmine Panella and Enzo Ierardi: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; **59**: 783–785
125. Vasquez A, Valdez Y, Gilman RH, McDonald JJ, Westblom TU, Berg D, Mayta H and Gutierrez V: Metronidazole and clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* determined by measuring MICs of antimicrobial agents in color indicator egg yolk agar in a miniwell format. *J Clin Microbiol* 1996, **34**:1232-1234.

126. Debets-Ossenkopp YJ, Herscheid AJ, Pot RG, Kuipers EJ, Kusters JG and Vandenbroucke-graus CM: Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline and trovafloxacin in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 1999, **43**:511-515.
127. Graham DY, Genta R, Evans DG, Reddy R, Clarridge JE, Olson CA, Edmons AL and Siepman N: *Helicobacter pylori* does not migrate from the antrum to the corpus in response to omeprazole. *Am J Gastroenterol* 1996, **91**:2120-2124.
128. Monique M. Gerrits,<sup>1</sup> Marcel R. de Zoete,<sup>1</sup> Niek L. A. Arents,<sup>2</sup> Ernst J. Kuipers,<sup>1</sup> and Johannes G. Kusters<sup>1</sup>: *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2002; 2996–30057.
129. İsenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC:ASM pres. 2004;**1**:3.2.1.7
130. P Y Zheng, J Hua, K G Yeoh, B Ho: Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population: *Gut* 2000;**47**:18–22
131. Engstrand, L., K. Rosberg, R. Hubinette, T. Berglindh, W. Rolfsen, and S. Gustavsson.. Topographic mapping of *Helicobacter pylori* colonization in long-term-infected pigs. *Infect. Immun.* 1992; **60**:653–656.
132. Kohli, Y., Y. Tanaka, T. Kato, and S. Ito. Endoscopic diagnosis of *Helicobacter pylori* distribution in human gastric mucosa by phenol red dye spraying method. *Nippon Rinsho*. 1993; **51**:3182–3186
133. Zsikla V, Hailemariam S, Baumann M, Mund MT, Schaub N, Meier R, Cathomas G. *Am J Surg Pathol*. 2006; **30(2)**:242-8.



134. Yakoob J, Abid S, Jafri W, Abbas Z, Islam M, Ahmad Z. Comparison of biopsy-based methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection, *Br J Biomed Sci.* 2006; **63(4)**:159-62.
135. Dönmez-Altuntaş H, Güven K., Detection of *Helicobacter pylori* using nested polymerase chain reaction and rapid urease test in gastric biopsy samples. *Turk J. Gastroenterol.* 2002;**13(2)**:94-7.
136. Vinette KM, Gibney KM, Proujansky R, Fawcett PT. Comparison of PCR and clinical laboratory tests for diagnosing *H. pylori* infection in pediatric patients. *BMC Microbiol.* 2004;**4**: 5.
137. Covacci, A., J.L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli.. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999;**284**, 1328-1333.
138. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, et al.; Analysis of expression of *CagA* and *VacA* virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *CagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* ,1995;**63**: 94-98.
139. Olfat FO, Zheng Q, Oleastro M, Volland P, Borén T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Gerhard M. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 May 1;**44(2)**: 151-6.
140. Chen Xue-jun, Yan Jie and Shen Yue-Feng : Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H.pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in zhejiang province and correlations among differ genotypes, coinfection and severity of the diseases:*clin med J* ,2005;**118(6)**:460-467.

141. Tokumaru K, Kimura K, Saifuku K, Kojima T, Satoh K, Kihira K, Ido K CagA and cytotoxicity of *Helicobacter pylori* are not markers of peptic ulcer in Japanese patients. *Helicobacter*. 1999;**4**:1-6.
142. Anita Paula Ortiz Godoy, Marcelo Lima Ribeiro, Yune Helena Borges Benvenuto, Lea Vitiello, Maira de Carvalho Bueno Miranda, Sergio Mendonça and José Pedrazzoli Jr: Analysis of Antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolate: *BMC Gastroenterology* 2003;**3**:20.
143. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W and Quint W: Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998;**115**:58-66.
144. Arents NL, van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, van Slochteren KR, Degener JE, Kleibeuker JH and van Doorn LJ: The importance of *VacA*, *CagA*, and *IceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001, **96**:2603-2608.
145. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey :*J. Clin Microbiol.* 2004 **42**(4):1648-51.
146. Bulent K, Murat A, Esin A, Fatih K, MM Murat H, Hakan H, Melih K, Mehmet A, Bulent Y, Fatih H ;Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population; *World J Gastroenterol.* 2003;**9** (7):1580-3.
147. Sonja Strobel, Stefan Bereswill, Peter Balig, Peter Allgaier, Hans-Gunther Sonntag And Manfred Kist; *Journal of clinical microbiology*, 1998, p.1285-1289.
148. Ito Y, Azuma T, Ito S, et al. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:1710-1714.

149. Han, S.R., H.J. Schreiber, S. Bhakdi, M. Loos, and M.J. Mäurer. *vacA* genotypes and genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; **5**:139-145.
150. Kauser, F., M.A. Hussain, I. Ahmed, S. Srinivas, S.M. Devi, A.A. Majeed, K.R. Rao, A.A. Khan, L.A. Sechi and N. Ahmed. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol.* 2005.
151. Atherton, J. C., M. R. Peek, K. T. Tham, T. L. Cover, and M. J. Blaser. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997; **112**: 92–95.
152. Bereswill, S., A. Pahl, P. Bellemann, W. Zeller, and K. Geider. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992; **58**:3522–3526.
153. Cover, T. L., M. K. R. Tummuru, P. Cao, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. Divergence of genetic sequences for vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 1994. **269**:10566–10573.
154. Elviss, N.C., R.J. Owen, J. Xerry, A.M. Walker, and K. Davies. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004. **54**, 435-440.
155. Yue Hua HAN, Wen Zhong LIU, Hong Yin ZHU, Shu Dong XIAO; Clinical relevance of *iceA* and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* in a Shanghai population: *Chinese Journal of Digestive Diseases.* 2004; **4** :181

156. Xu Q, Blaser Mj. Promoter of the CATG-specific methyltransferase gene hpyIM differ between *IceA1* and *IceA2* *Helicobacter pylori* strains *J. Bacteriol* 2001; **183**: 3875-84.
157. Carvalho AS, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA and Penna FJ: Diagnosis and distribution of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of symptomatic children. *Braz J Med Biol Res*, 1991;**24**: 163-166.
158. Ashour AA, Collares GB, Mendes EN, de Gusmao VR, Queiroz DM, Magalhaes PP, de Carvalho AS, de Oliveira CA, Nogueira AM, Rocha GA and Rocha AM: *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. *J Clin Microbiol* 2001, **39**: 1746-1750.
159. Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB, Youn SJ and Park SM: Genotyping *cagA*, *vacA* subtype, *iceA* 1, and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci* 2001;**16**: 579-584.
160. Zheng PY, Hua J, Yeoh KG, Ho B; Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population *Gut*. 2000 Jul;**47(1)**: 18-22
161. Gerhard M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehle, M. Classen, and C. Prinz. 199. Clinical Relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood group antigen binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12778-12783.
162. Yuj, Leung WK, Go MY et al.; Relationship between *Helicobacter pylori* *BabA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalign gastric lesions. *Gut* 2002;**51**:480-4.

- 163.Oliveira AG,Santos A, Guerra JB et al. *BabA2* and *Cag* positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulser and gastric carcinoma in Brazil. *J. Clin Microbiol* 2003;**41**:3964-6
- 164.Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori BabA2, CagA, and sI VacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J.Clin Pathol* 2003; 287-91
- 165.Mendonca S, Ecclissato C, Sartori MS, Godoy AP, Guerzoni RA, Degger M and Pedrazzoli JJ.; Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter* 2000, **5**:79-83.
- 166.Fedorak R, Archambault A, Flamm R, Osato M and Stamler D: Antimicrobial susceptibility of *H. pylori* in Canada to three key antibiotics: metronidazole, clarithromycin, and amoxicillin. *Gastroenterology*, 1997, **112**:A115.
- 167.Dore MP, Pianna A, Carta M, Atzei A, Are BM, Mura I, Massarelli G, Maida A, Sepulveda AR, Graham DY and Realdi G: Amoxicillin resistance is one reason for failure of amoxycillin-omeprazole treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1998, **12**:635-639.
- 168.Fetiye Kolay, Aynur Karadenizli, Altay Çelebi, Recep Bingöl:İn vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to metronidazole, claritromycin and amoxycillin: *Turkish Journal of Infection* 2004. **18(4)**:478-476.
- 169.Morales-Espinosa, R., G. Castillo-Rojas, G. Gonzalez-Valencia, G. Gonzalez-Valencia, S. P. de Leon, A. Cravioto, J.C. Atherton, and Y. Lopez-Vidal.. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999;**37**:3001-3004.

170. Kim, J.J., J.G. Kim, and D.H. Kwon.; Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter*, 2003; **8**:202-206.
171. Yakoob, J., X.G. Fan, G.L. Hu, and Z. Zhang. Genetic and phenotype changes following in vitro interactions between *Helicobacter pylori* strains. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; **19**: 626-631.
172. Cellini, L., R. Grande, E. Di Campli, S. Di Bartolomeo, S. Capodocasa, and L. Marzio. Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. *Scand. J. Gastroenterol.* 2006; **41**: 280-287.
173. Vincenzo De Francesco, Marcella Margiotta, Angelo Zullo, Cesare Hassan, Nicola Della Valle, Osvaldo Burattini<sup>4</sup>, Roberto D' Angelo, Giuseppe Stoppino, Ugo Cea, Floriana Giorgio, Rosa Monno, Sergio Morini, Carmine Panella<sup>4</sup>, and Enzo Ierardi: Claritromycin Resistance and *Helicobacter pylori* Genotypes in Italy: *J Microbiol.* 2006 Dec; **44(6)**:660-4.

