

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GASTRODUODENAL PATOLOJİSİ
OLAN HASTALARDAN ALINAN MİDE BİYOPSİSİ
ÖRNEKLERİNDE *HELICOBACTER PYLORI*
PREVALANSININ VE GENOTİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Dr. Toğrul NAĞIYEV

DOKTORA TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof.Dr. Fatih KÖKSAL

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TF. 2004D3 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2007

TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her zaman hoşgörölü davranan, her konuda rahatlıkla ulaşırp danıştığım, büyük desteklerini gördüğüm ve engin tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Prof.Dr.Fatih Köksal’a, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tıp Faköltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr.Salih Çolakoğlu’na ve Çukurova Üniversitesi Tıp Faköltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli Öğretim Üyelerine, başta bölüm sekreterimiz Suna Gökmen olmak üzere bütün çalışma arkadaşlarıma ve sevgili eşim Rabiye’ye, ayrıca, eğitimimi sürdürebilmem için bana verdikleri burs desteğinden dolayı TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubuna (BAYG) saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Toğrul NAĞIYEV

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji	5
2.2.1. Prevalans	6
2.2.2. İnfeksiyonun Bulaşması:	7
2.3. Sınıflandırma	8
2.4. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri	9
2.4.1. Görünüm ve Boyanma	10
2.4.2. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikleri	10
2.4.3. Hareket	11
2.4.4. Genomik Özellikler	12
2.5. Üreme ve Kültür Özellikleri	13
2.5.1. Üreme Özellikleri	13
2.5.1.1. Üreaz Aktivitesi	14
2.5.1.2. Adaptif Değişimler	16
2.5.2. İn-vitro Şartlarda Üreme	16
2.6. Biyokimyasal Özellikleri	17
2.7. Patogenezi	18
2.7.1. Bakteriye Ait Virulans Faktörleri	18

2.7.1.1. Kolonizasyon Faktörleri	18
2.7.1.1.1. Hareket	19
2.7.1.1.2. Üreaz	19
2.7.1.2. Adezyon	20
2.7.1.3. Konak Savunmasından Korunma Faktörleri	20
2.7.1.3.1. Katalaz ve Superoksit Dismutaz	20
2.7.1.3.2. Thioredoxin (CD59)	21
2.7.1.3.3. Polifosfat Kinaz (PPK)	21
2.7.1.4. Doku Hasarı Oluşturan Virulans Faktörleri	21
2.7.1.4.1. <i>cag</i> Patojenite Adası (<i>cagPAI</i>) Genleri	22
2.7.1.4.1.1. <i>cagA</i> Geni	24
2.7.1.4.2. <i>vacA</i> (Vacuolating Cytotoxin) Geni	27
2.7.1.4.3. <i>iceA</i> Geni (Inducible by Contact with Epithelium Gene)	28
2.7.1.4.4. <i>oipA</i> (Outer Inflammatory Protein) Geni	29
2.7.1.4.5. Diğer Gen Bölgeleri	29
2.7.2. Hastaya Ait Faktörler	30
2.8. <i>H.pylori</i> Enfeksiyonlarında Tanı	32
2.8.1. Klinik Tanı	32
2.8.2. Mikrobiyolojik Tanı	33
2.8.2.1. Non-invaziv Testler	33
2.8.2.1.1. Serolojik Testler	33
2.8.2.1.2. Üre Soluk Testi	34
2.8.2.1.3. Dışkıda Antijen Arayan Testler (<i>H.pylori</i> Stool Antigen Tests)	34
2.8.2.1.4. Moleküler Bazlı Testler	35
2.8.2.2. İnvaziv Testler	35
2.8.2.2.1. Histolojik Muayene	35
2.8.2.2.2. Kültürde İzolasyon	36
2.8.2.2.3. Hızlı Üre Testi (HÜT)	36
2.8.2.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri	37
2.8.2.2.4.1. Amplifikasyon Bazlı Yöntemler	38
2.8.2.2.4.1.1. Örnek Seçimi ve Nükleik Asit Ekstraksiyonu	38
2.8.2.2.4.1.2. Hedef Bölge ve Primerlerin Seçimi	39

2.8.2.2.4.2. Restriksiyon Bazlı Yöntemler	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Örneklerin Toplanması ve Taşınması	42
3.1.1. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu	43
3.1.1.1. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonunun Hazırlanışı	43
3.2. PCR Uygulamaları	43
3.2.1. Biyopsi Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	44
3.2.1.1. Uygulama	44
3.2.2. Amplifikasyon	45
3.2.2.1. <i>H.pylori ureC (glmM)</i> Geninin Amplifikasyonu	45
3.2.2.2. <i>cagA</i> Geninin Amplifikasyonu	46
3.2.2.3. <i>vacA</i> Geninin Amplifikasyonu	46
3.2.2.4. <i>vacA</i> Gen Allellerinin Amplifikasyonu	47
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.2.3.1. 10xTBE tamponunun hazırlanması	48
3.2.3.2. Uygulama	49
3.3. İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇLAR	80
7. KAYNAKLAR	82
8. ÖZGEÇMİŞ	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>H.pylori</i> üreaz aktivitesi	15
Şekil 3.1. Elektroforez tankı ve güç kaynağı	50
Şekil 3.2. Jel görüntüleme sistemi	50
Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri	51
Şekil 4.2. <i>vacA</i> genotiplerinin cinsiyet gruplarına göre dağılımı	57
Şekil 4.3. <i>vacA</i> genotiplerinin hasta gruplarına göre dağılımı	58

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. <i>H.pylori</i> Hsp ile insan hücre Hsp benzerliği	11
Tablo 2.2. <i>H.pylori</i> tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıkları	41
Tablo 3.1. Antrum ve korpus biyopsi örnekleri değerlendirilen hastaların cinsiyete ve hasta gruplarına göre dağılımı	42
Tablo 3.2. Çalışmamızda kullanılan primerler	48
Tablo 4.1. Kadın ve erkek hastaların mide biyopsisi örneklerinden en az birinde <i>ureC</i> genini hedefleyen PCR testi ile <i>H.pylori</i> dağılımı	52
Tablo 4.2. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde <i>H.pylori ureC</i> -PCR ile pozitif bulunan hastaların endoskopik tanıya ve lokalizasyona göre dağılımı	52
Tablo 4.3. G/MÜ'li hasta grubunda antrum ve korpus biyopsi örneklerinin <i>ureC</i> -PCR testi sonuçlarına ve cinsiyete göre dağılımı	53
Tablo 4.4. DÜ'li hasta grubunda antrum ve korpus biyopsi örneklerinin <i>ureC</i> -PCR testi sonuçlarına ve cinsiyete göre dağılımı	53
Tablo 4.5. G/MÜ'li hastalar ile DÜ'li hastalarda <i>ureC</i> -PCR testine göre <i>H.pylori</i> dağılımı	54
Tablo 4.6. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde <i>cagA</i> ve <i>vacA</i> pozitifliğinin hasta gruplarına dağılımı	54
Tablo 4.7. Hasta gruplarında <i>cagA</i> ve <i>vacA</i> pozitifliğinin Ki kare testine göre değerlendirilmesi	55
Tablo 4.8. <i>ureC</i> -PCR testi ile pozitif bulunan antrum ve korpus biyopsi örneklerinin hasta gruplarına ve <i>cagA</i> , <i>vacA</i> genlerinin pozitifliklerine göre dağılımı	55
Tablo 4.9. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde <i>vacA</i> geni pozitif bulunan olguların <i>vacA</i> allellerine göre dağılımı	56

Tablo 4.10. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde <i>vacA</i> geni pozitif bulunan olguların <i>s/m</i> allel kombinasyonlarının (genotiplerinin) cinsiyete göre dağılımı	56
Tablo 4.11. <i>vacA</i> genotiplerinin lokalizasyona ve hasta gruplarına göre dağılımı	58
Tablo 4.12. Hasta gruplarındaki farklı <i>vacA</i> genotiplerinin <i>cagA</i> ile birlikteliği	59
Tablo 4.13. Hasta gruplarındaki <i>cagA</i> ⁺ <i>vacA</i> ⁺ (Tip-I) suşların <i>vacAsIa</i> ve <i>vacAsIc</i> allelik tiplerine göre dağılımı	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
Acetyl-CoA	Asetil Koenzim-A
Bab	Blood Group Antigen Binding Adhesin
BHIB	Brain Heart Infusion Broth – Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu
C	Sitozin
Cag	Cytotoxin Associated Gene
<i>cagPAI</i>	<i>cag</i> Patojenite Adası
CLO	<i>Campylobacter</i> -Like Microorganism
CO ₂	Karbondioksit
COX	Cyclooxygenase - Siklooksijenaz
DÜ	Duodenal Ülser
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular Signal-Related Kinase
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
Fts	Filamentation-Temperature-Sensitive
G	Guanin
GGT	Gamma-Glutamyl Transpeptidase
G/MÜ	Gastrit ve/veya Mide Ülseri
GlmM	Phosphoglucosamine Mutase
GRO- α	Büyüme (Growth) Faktörü alfa
H ₂	Hidrojen
HK	Histidin Kinaz
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HPSA	<i>H.pylori</i> Dışkı (Stool) Antijeni
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hsp	Heat Shock Proteins - Isı Şok Proteinleri
HÜT	Hızlı Üreaz Testleri

IARC	International Agency for Research on Cancer Working Group
Ice	Inducible by Contact with Epithelium
IFAT	İmmün Floresan Antikor Testi
IFN	İnterferon
Ig	Immunoglobulin
IKK	I κ B kinaz
IL	İnterlökin
IP	İmmün Peroksidaz
JNK	Jun N-terminal Kinase
LacNAc	<i>N</i> -acetylactosamine
LPS	Lipopolisakkarid
M	Molar
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MAPK	Mutasyonla Aktive Edilen Protein Kinaz
MAPs	Metil Kabul Eden Kemoreseptör Proteinleri
MMP	Matriks Metalloproteaz
N ₂	Nitrojen
NAAT	Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri
NF- κ B	Nükleer Faktör kappa-B
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
NIH	National Institute of Health
NK	Natural Killer - Doğal katil
Nod	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NOS	Nitrik Oksid Radikalleri
NPV	Negatif Prediktif Değer (Value)
NÜD	Non-Ülser Dispepsi
O ₂	Oksijen
Oip	Outer Inflammatory Protein
OMP	Outer Membrane Protein – Dış Zar Proteini
OOR	Oxogluterat: Acceptor Oxidoreductase
ORF	Open Reading Frame
PAI	Pathogenicity Islands - Patojenite Adaları

PAK	p21-Aktive Edilmiş Kinaz
PCR	Polymerase Chain Reaction
POR	Piruvate Flavodoxine Oxidoreductase
PPI	Proton Pompa İnhibitörü
PPK	Polifosfat Kinaz
PPV	Pozitif Prediktif Değer (Value)
PUD	Peptik Ülser Hastalığı
Ras	Rasemaz
<i>rdxA</i>	Nitroreductase
<i>rfxA</i>	Flavin Oxidoreductase
R/M	Restriksiyon / Metilasyon
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Reverse Transcriptase - PCR
sIgA	Sekretuar İmmün Globulin-A
SOD	Süperoksit Dismutaz
SP-D	Sürfaktan Protein-D
SSA	Türe (Species) Spesifik Antijen
Succinyl-CoA	Suksinil Koenzim-A
T	Timin
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
Ure	Urease
ÜST	Üre Soluk Testleri
Vac	Vacuolating Cytotoxin
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme (Growth) Faktörü
WB	Western Blot
WHO	World Health Organisation – Dünya Sağlık Örgütü
μ	Mikro
n	Nano
p	Piko

ÖZET

GASTRODUODENAL PATOLOJİSİ OLAN HASTALARDAN ALINAN MİDE BİYOPSİSİ ÖRNEKLERİNDE *HELICOBACTER PYLORI* PREVALANSININ VE GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

H.pylori dünya nüfusunun % 50'den fazlasını infekte eden önemli bir enfeksiyon ajanıdır. Mide enfeksiyonunun prognozunu bakteriye bağlı CagA ve VacA toksinleri üretiminin ve bu toksinleri kodlayan genlerdeki allelik farklılıkların etkilediği gösterilmiştir. Tip-I suşlar olarak kabul edilen *cagA*⁺*vacA*⁺ suşlar kronik aktif gastrit, peptik ülser ve gastrik kanserler gibi daha ciddi tablolardan sorumlu iken, *cagA*⁻*vacA*⁻ suşlar asemptomatik taşıyıcılık veya non-ülser dispepsi (NÜD) ile ilişkilendirilmektedir. Tip-I suşlar kadar *vacA* allelik kombinasyonlarının prognoza etkisi Batı ve Doğu toplumlarında bölgesel farklılıklar göstermektedir. Prognozla ilgili doğru tahminler yapılabilmesi için, farklı coğrafi bölgelerdeki etken suşların moleküler yöntemlerle belirlenen genotipleri ve allelik kombinasyonları ile klinik tablo arasındaki ilişki bilinmelidir. Bu çalışmada, bölgemizdeki gastrit ve/veya mide ülserli (G/MÜ) hastalar ile duodenal ülserli (DÜ) hastalarda antrum ve korpus mukozasında *H.pylori* prevalansının ve genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bu çalışmaya, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı ile Sağlık Bakanlığı Adana Çukurova Devlet Hastanesi Gastroenteroloji polikliniklerine başvuran, gastroduodenal yakınması olan ve endoskopi endikasyonu alan 231 hasta dahil edildi.

Biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu QIAGEN doku ekstraksiyon kiti ile yapıldı. Önce *H.pylori* kolonizasyonunu göstermek üzere PCR (Polymerase Chain Reaction) ile *ureC* genine spesifik diziler çoğaltıldı. Daha sonra *ureC*-PCR pozitif olan DNA örnekleri *cagA* ve *vacA* genlerinin tespiti için, spesifik dizileri hedef alan primerler kullanılarak çoğaltıldı. *vacA* pozitif olan DNA örneklerinin tamamında, *vacA* geninin “s” ve “m” allelleri allel spesifik primerler kullanılarak PCR ile araştırıldı. Böylece, *H.pylori* suşlarının Tip-I ve Tip-II genotiplerine ek olarak, *vacA* geninin allelik kombinasyonları da belirlendi.

Çalışma sonunda 72'si (% 75.0) kadın ve 129'u (% 95.6) erkek hastalara ait olmak üzere 201 (% 87) hastanın biyopsi örneklerinden en az birisinde *H.pylori ureC* geni bulundu. *H.pylori* prevalansının G/MÜ'li hastalarda % 82.9, DÜ'li hastalarda da % 95.9 olduğu görüldü. Kolonize suşların % 84.1'inin *cagA*⁺*vacA*⁺ Tip-I suşlar olduğu, bu suşların G/MÜ'li ve DÜ'li kolonize hastalardaki prevalanslarının ise sırası ile % 78.6 ve % 94.3 olduğu tespit edildi. Tip-I suşlarda en sık karşılaşılan *vacA* allelik kombinasyonun 47 (% 27.8) suş ile *s1a/m1b*, Tip-II

suşlarda ise 11 (% 36.7) suş ile *s1/m2* olduğu görüldü. Özellikle, G/MÜ'li hastalara ait 59 (% 57.3) suшта *s1c* allelinin varlığı dikkat çekici bulundu.

Sonuç olarak, *H.pylori* Tip-I suşları DÜ'li hastalarda G/MÜ'li hastalara göre istatistiki yönden anlamlı şekilde yüksek bulundu. Ayrıca, DÜ'li hastalarda kolonize olan suşlarda *s1a* alleleline, G/MÜ'li hastalarda ise *s1c* alleleline sahip Tip-I suşların prevalansı diğer allelik tiplerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulundu.

Anahtar sözcükler: *H.pylori*, *ureC*, *cagA*, *vacA*, *vacA* allelleri.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE PREVALENCE AND GENOTYPES OF *HELICOBACTER PYLORI* IN THE GASTRIC BIOPSY SPECIMENS FROM PATIENTS WITH GASTRODUODENAL PATHOLOGIES

H.pylori is an important infective agent which infects more than 50% of world population. It is reported that, the prognosis of gastric infection could be affected by the production of CagA and VacA toxins and allelic differences in coding genes of these toxins. While *cagA*⁺*vacA*⁺ strains called Type-I are responsible for more serious diseases such as chronic active gastritis, peptic ulcer and gastric cancer, *cagA*⁻*vacA*⁻ strains are associated with asymptomatic carriage or non-ulcer dyspepsia (NUD). The effects of *vacA* allelic combinations as well as Type-I strains on prognosis shows geographic differences in Western and Eastern populations. The relation between the clinical outcome and genotypes and allelic combination of causative strains isolated from patients with gastroduodenal disorder in different geographic regions in order to make true estimation on prognosis should be known. The aim of this study was to determine the prevalence and genotypes of *H.pylori* in the antral and corpus biopsy specimens from patients with gastritis and/or gastric ulcer (G/GU) and duodenal ulcer (DU) in our region.

Two hundred thirty one patients with gastroduodenal complaints and who having endoscopic indications from University of Cukurova, Medical Faculty, Gastroenterology Department and Ministry of Health, Adana Cukurova Governmental Hospital, Gastroenterology Department were enrolled in this study.

The DNA extractions from biopsy specimens were performed with QIAGEN tissue extraction kit. First, in order to demonstrate *H.pylori* colonisation, the specific sequences of *ureC* gene were amplified with PCR (Polymerase Chain Reaction). Then, *ureC*-PCR-positive DNA templates were amplified by primers which target specific sequences in order to detect *cagA* and *vacA* genes. The “s” and “m” alleles of *vacA* genes were investigated in all of *vacA*-positive DNA templates by PCR with allele specific primers. Thus, in addition Type-I and Type-II genotypes, the allelic combinations of *vacA* gene of *H.pylori* strains were also determined.

As a result, *H.pylori ureC* gene was found at least in one of the biopsy specimens from 201 (87%) patients; 72 (75%) female and 129 (95.6%) male. It have seen that, the prevalence of *H.pylori* was 82.9% in patients with G/GU and 95.9% in patients with DU. Of colonized strains 84.1% were *cagA*⁺*vacA*⁺ Type-I strains and prevalences of these strains in patients with G/GU and DU were 78.6% and 94.3% respectively. The most *vacA* allelic combination seen in Type-I strains was *s1a/m1b* with 47 (27.8%) strains and *s1/m2* with 11 (36.7%) strains in Type-II

strains. Especially, the presence of *s1c* allele in 59 (57.3%) strains from G/GU patients was striking.

In conclusion, Type-I strains of *H.pylori* was found statistically higher in patients with DU than patients with G/GU. Besides, the prevalence of Type-I strains that contain *s1a* allele in patients with DU and *s1c* allele in patients with G/GU was found statistically higher than the other allelic types.

Keywords: *H.pylori*, *ureC*, *cagA*, *vacA*, *vacA* alleles.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Helicobacter pylori (*H.pylori*) konak ve doku tropizmi gösteren, insanlarda gastrik mukozada antrum ve korpusta kolonize olan, asemptomatik taşıyıcılıktan non-ülser dispepsiye, kronik gastritten gastrik MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lenfoma ve gastrik kanserlere kadar değişen spektrumda hastalık oluşturan önemli bir enfeksiyon ajanıdır. Bütün dünyada insanların en az % 50'sinin midesinde kolonize olan *H.pylori*'nin prevalansı az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde % 60-85 arasında değişmektedir. Ancak gelişmiş ülkelerde kişisel hijyene verilen önem ve yapılan başarılı eradikasyon çalışmaları ile prevalans % 10-30'lara kadar geriletilmiştir. Benzer şekilde insidans oranı da gelişmekte olan ülkelerde yılda % 3-10 gibi yüksek oranlarda iken, gelişmiş ülkelerde bu oran % 0.5'lere kadar düşmüştür^{1,2,3}. Epidemiyolojik çalışmalar asemptomatik kolonize kişilerin en az % 20'sinde, kolonizasyonu takip eden 10 yıl içerisinde tedaviyi gerektirecek klinik bulguların ortaya çıkabileceğini, bunların da % 2-8'inde gastrik kanserin gelişebileceğini göstermektedir^{4,5}. Bu oranlar, *H.pylori* enfeksiyonları ve komplikasyonlarının öncelikli olarak gelişmekte olan ülkelerin sorunu olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

H.pylori enfeksiyonlarının prognozunu konak ve çevreye ait faktörlerin yanı sıra, bakteriye ait virulans faktörleri de etkilemektedir⁶⁻¹⁰. Bu virulans faktörleri arasında yer alan CagA (cytotoxin associated gene), VacA (vacuolating cytotoxin), IceA (inducible by contact with epithelium), BabA ve BabB (blood group antigen binding adhesin) gibi toksik ve adeziv proteinleri kodlayan genlerle ilgili yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, duodenal ülser, gastrik atrofi ve mide kanseri gibi ciddi patolojilerle ilişkilendirilen *H.pylori* izolatlarının Doğu Asya ve Batı kökenli suşlarda genotiplerinin farklı olduğu gösterilmiştir. Özellikle, vakuolizasyondan sorumlu VacA proteinini kodlayan *vacA* geninin sinyal (işaret) bölgesindeki *sl*a, *sl*b, *sl*c ve *s*2 ile toksinin kodlandığı orta bölgedeki *ml*a, *ml*b ve *m*2 allellerinin yanı sıra, memeli hücreleri için sitotoksik aktivite gösteren CagA proteinini kodlayan *cagA* geninin 3'

ucundaki mutasyonların bölgesel özellik gösteren ve prognozu direkt olarak etkileyen mutasyonlar olduğu gösterilmiřtir¹¹⁻¹⁶.

Bu çalışmanın amacı; farklı coğrafik özelliklerinin yanı sıra, beslenme alışkanlıklarına sahip bölgemizde mide-duodenum yakınması olan hastalardan aldığımız mide biyopsisi örneklerinde *H.pylori* prevalansının, *H.pylori vacA*, *cagA* prevalansının ve *H.pylori vacA* allellerinin farklı hasta gruplarına göre görülme sıklıklarının saptanmasıdır. Çalışma sonunda bölgesel ve genel anlamda ülkemiz için *H.pylori* genotiplerinin klinik önemi ve gastroduodenal patolojinin prognozunun tespitinde genotiplerin prediktif değerin belirlenmesi gibi iki önemli fayda beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Gastroduodenal hastalıklar ve etyolojisine tıbbın ilgisi yazılı tıbbın ilk günlerine kadar uzanmaktadır. Hipokrat'ın "epigastrik yanma ve şişlik" olarak tanımladığı gastroduodenal hastalıkların etyolojisini, İbni Sina (980–1037) "yemek ile gastrik ağrı" arasındaki ilişkide aramış, Donati M. (1586) ülserli hastalarda mide asidine dikkat çekmiştir. Bir bakteri ile gastrik yakınmaların muhtemel ilişkisi ilk defa Alman bakteriyolog Bottcher G. ve arkadaşı Fransız Letulla M. (1875) tarafından ileri sürülmüştür. Bu araştırmacılar ülser tabanında ve kenarında bakteri kolonilerini göstererek, kültür ortamında üretemedikleri bu bakterilerin ülseri neden olduğunu ileri sürmüşlerdir^{1,17}. Patolog Klebs C. 1881'de basil benzeri organizmaların midede varlığını bildirmesine rağmen, o dönemde konu fazla ilgi çekmemiştir. Bottcher hayvanların gastrointestinal sisteminde spiral bakterinin varlığını bilimsel olarak bildirmiştir¹⁸. Dr Jarowski W. (1889) insandan aldığı mide yıkama suyu sedimentlerini incelemiş, sıvı içerisinde çomak şeklindeki bakterilerin yanı sıra, spiral şekilli basillerin varlığını göstererek, bunlara "*Vibrio regula*" adını vermiştir. Bu araştırmacı tarihe "spiral bakteriler gastrit etkenidir" iddiasını ilk ileri süren araştırmacı olarak geçmiştir. İtalyan araştırmacı Bizzozero G. (1892) köpeklerin ülseratif lezyonlu mide biyopsi örneklerindeki, muhtemelen bu gün *H.heilmannii* veya *Gastrospirillum hominis* olarak tanımladığımız spiral şeklindeki bakterileri ve artmış üreaz aktivitesini göstererek, gastrit ve ülserin hem etyolojisi, hem de patofizyolojisi hakkında son derece faydalı bilgiler sunmuştur^{1,17}. Krienitz (1906) mide kanserinde benzer mikroorganizmaların varlığını gösterdikten sonra, Muhlens, Luger, Neuberger de ülseratif özellikteki mide kanserlerinde bu yapıları göstermişlerdir. Neuberger aynı zamanda sağlıklı kişilerin mide suyu ve mide mukozasında da spiral bakterinin varlığını göstermiştir⁹.

Sir Berkeley Moynihan, aşırı mide asidinin duodenum mukozasını dijesyona uğratarak ülser oluşturduğunu ileri sürmüştür. Schwartz K. (1910) "Asit yoksa, ülser

yok” aforizmasını ortaya atmış, gastroduodenal hastalıkların patofizyolojisinde, tedavi protokollerini de uzun yıllar etkileyecek olan yeni bir tartışmayı başlatmıştır. Bu hipoteze bağlı olarak gastrit tedavisinde 1915 yılından itibaren anti-asitler kullanılmaya başlanmıştır. Penisilinin keşfi ile gastroduodenal patolojide mikroorganizmaların muhtemel rolü varsayımından hareketle Lieber C. ve Lefevre A. (1957) antibiyotiklerin gastrik ürenin amonyağa dönüşümünü engellediğini ve bu sebeple tedavide kullanılabileceklerini göstermişlerdir. Bu bildiriden kısa bir süre sonra Yunanlı gastroenterolog Lykoudis J. (1957) önce kendisindeki peptik ülseri tedavi için antibiyotik kullanmış, hastalığını tedavi edince 22.453 peptik ülserli hastanın tedavisinde antibiyotik kullanarak başarılı olduğunu bildirmiştir. Steer H.W. ve Colin Jones 1975 yılında gastrik biyopsi örneklerinde epitele yakın konumda bakterilerin varlığını gösterirken, Rollasan ve arkadaşları da 1981 yılında gastrik spiral bakteriyi göstermişler, ancak midenin yüksek asiditesi nedeniyle burada bir mikroorganizmanın yaşayabilmesine ve hastalık yapabilmesine ihtimal vermemişlerdir. Yapılan araştırmaların çoğunlukla postmortem çalışmalar olması, hastalık etkeni olabileceği bildirilen mikroorganizmaların genellikle bulaş kaynaklı olabileceği şüphesine yol açmıştır^{1,17-19}.

Nihayet, patolog Robin Warren (1979) *H.pylori* ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki ilişkiyi keşfetmiş ve Barry J. Marshall (1982) mikroorganizmayı kültür ortamında üretebilmiştir. İki araştırmacı yaklaşık 4 yıl süren çalışmalarını 1983 yılında Lancet dergisinde yayınlanan makaleleri ile Tıp Dünyasına duyurmuşlardır. Patolog Warren R.yıllardır gastritli olgularda gözlemlediği bakteriyel yapıları gastroenteroloji asistanı Marshall B.J. ile birlikte değerlendirmeye başlayarak “gastrit-bakteri ilişkisi” konusundaki çalışmaların ilk adımını atmışlardır. *H.pylori*’nin virulans çalışmalarında hayvan modeli başarılı olmadığından Koch postulatlarını gerçekleştirmek için Dr.Marshall bu bakteri ile gönüllü olarak kendisini infekte etmiş ve bir süre sonra kendisinde gastrit tablosunun geliştiğini görmüştür. Bu gözlemlere dayanan Dr.Marshall, bu bakterinin sadece mideyi infekte etmekle kalmayıp, mide dokusunda inflamasyonu arttırdığını da deneysel olarak ispatlamıştır. Buna göre, bu bakterinin özellikle antral gastrit ve ülser ile etyolojik ilişkisi olduğu kesinlik kazanmıştır^{9,17,20}.

Bakteri, yapısal olarak kampilobakterlere benzemesi nedeni ile önce “*Campylobacter-like microorganism (CLO)*” olarak adlandırılmıştır. Fakat yapılan

alışmalar sonucunda 16S rRNA (Ribozomal RNA) yapısı, DNA zincir yapısı, yağ asitleri kompozisyonu ve enzimlerinde birçok farklılıklar olduğu anlaşılmış ve 1989’da Goodwin, bu bakterilerin benzer fenotipik özelliklere sahip *Campylobacter*, *Flexispira* ve *Wolinella* cinslerine ait olmadığını bildirmiştir. İn-vivo şartlardaki helikal görüntüsü ve sıklıkla midenin pilor bölgesinden izole edilmesinden dolayı bu bakteriye “*Helicobacter*” olarak tanımlanan yeni bir cins içerisinde yer verilmiş ve “*Helicobacter pylori*” olarak isimlendirilmiştir^{1,21,22}.

H.pylori infeksiyonlarının öneminin anlaşılması üzerine, ilk olarak “Avrupa *Helicobacter pylori* Çalışma Grubu” oluşturulmuştur (1987). Bakterinin gastrik kanser ile ilişkisinin dört çalışma ile ispatlanmasından (1991) sonra da, Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO - World Health Organisation) bir kolu olan Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC - International Agency for Research on Cancer Working Group) mevcut verileri yeniden gözden geçirerek *H.pylori*’yi insanlarda birinci sınıf karsinojen olarak ilan etmiştir (1994). Yine aynı yılda NIH (National Institute of Health) konsensusunda *H.pylori*’nin peptik ülser hastalığının en önemli nedeni olduğu ve ülserli hastaların bu mikroorganizmanın eradikasyonu için tedavi olmaları gerektiği kabul edilmiştir. *H.pylori* infeksiyonunun gastrik Non-Hodgkin Lenfoma (NHL), diğer lenfoproliferatif hastalıklar ve MALT lenfoma gelişmesiyle de ilişkisi bulunmuştur^{1,23-27}.

Virulansın tespitine yönelik çalışmalarla *VacA* ve *cagA* toksinlerinin keşfedilmesi, türler arasında virulans farklılıklarının anlaşılmasını sağlamıştır^{6,28}.

Marshall B.J. ve Warren R.’ye *H.pylori* ile ilgili çalışmaları sebebi ile 2005 yılında “Fizyoloji ve Tıp bilimleri” alanında Nobel ödülü verilmiştir^{29,30}.

2.2. Epidemiyoloji

H.pylori ve diğer gastrointestinal ve enterohepatik helikobakterlerin ilk mikroorganizmalar kadar eski ve insanoğlunun evrimsel olarak ayrıma uğradığı yıllardan çok daha önce (yaklaşık 100 Milyon yıl) ilk primatlarda ve büyük memelilerde mide mukozasında yerleşen ve florayı oluşturan temel bakterilerden olduğu tahmin edilmektedir. Modern dünya ile temasları olmayan Güney Amerika yerlilerinde yapılan

mide biyopsi çalışmalarında, Asya kökenli genotipe uygun *H.pylori* suşlarının gösterilmesi, bu bakterinin mide mukozasındaki kolonizasyonunun, Bering boğazından ilk göçlerin tahmini geçmişi ile ilişkili olmak üzere, bilimsel anlamda, en azından 11–13.000 yıllık bir geçmişe dayandığını göstermiştir. *H.pylori*, muhtemelen insanların Afrika boynuzundan Asya'ya oradan da dünyaya dağıldığı ilk göçten beri, mide mukozasında yerleşik olarak bulunduğu düşünülmektedir³¹.

2.2.1. Prevalans

Midenin asit sekresyonuna ve diğer sindirimle ilgili yapısal ve fizyolojik özelliklerine uyum sağlamak üzere, farklı coğrafi bölgelerde genetik yapısında değişimler gösteren *H.pylori* halen tüm dünyada, insanların ortalama %50'sinin midesinde kolonizasyon göstermektedir. *H.pylori*'nin mide mukozasındaki prevalansı ve insidansı gelişmişlik oranlarına ve yaşa göre ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde % 60–85 arasında değişen prevalans, gelişmiş ülkelerde kişisel hijyene verilen önem ve yapılan başarılı eradikasyon çalışmaları ile % 10-30'lara kadar geriletilmiştir. Bu oran; Asya'da % 70-80, Afrika'da % 70-90, Kuzey Amerika'da % 30-40, Güney Amerika'da % 80-90, Batı Avrupa'da % 30-50 ve Doğu Avrupa'da % 70 olarak bildirilmiştir³²⁻³⁴.

Ülkemizde asemptomatik ve semptomatik gruplardaki *H.pylori* prevalansının % 45 ile % 100 arasında değiştiği, ortalama olarak da yaklaşık % 85 olduğu bilinmektedir^{9,35-39}.

H.pylori'nin yaş gruplarına göre dağılımı da gelişmekte olan ülkeler ile gelişmiş batı ülkeleri arasında farklılıklar göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde infeksiyon çocukluk çağında hızla kazanılmakta ve adölesan çağa gelmeden toplumun büyük bir kısmı infekte olmaktadır^{40,41}. Batı ülkelerinde ise erişkinlerin % 80-90'ı infekte durumdayken, çocuklarda bu oran % 5-10 civarındadır^{3,41}.

H.pylori, konağın immun cevabı tarafından eradike edilemediği için yaşam boyu devam eden kronik kolonizasyon şekillenmektedir. Ancak, uygun antibiyotik kombinasyonları ile eradikasyon sağlanabilmektedir. Her ne kadar 1990'lı yıllarda tanı almış hastalarda birinci seçenek antibiyotiklerin yer aldığı kombine tedavilerle yüksek

eradikasyon sağlanabilmişse de, 2000'li yılların başından itibaren özellikle endemik ülkelerde bu antibiyotiklere karşı direnç gelişmiş ve tedavide başarısızlık oranları artmıştır. Gelişmiş ülkelerde eradikasyon sonrası tekrar infeksiyon gelişimi oranı yıllık % 1'den daha az olmasına rağmen gelişmekte olan ülkelere bu oran % 15-40'a kadar çıkmaktadır. İlk seçenek tedavi protokolleri ile başarısızlık halinde ikinci seçenek, ikinci seçenekle başarısızlık halinde ise üçüncü seçenek ilaçlarla başarı şansı % 30'u geçmemektedir. Bu veriler *H.pylori* infeksiyonları ve komplikasyonlarının, gelişmiş ülkelere çok, hastalığın epidemiler şeklinde seyrettiği gelişmekte olan ülkelerin problemi olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır^{42,43}.

2.2.2. İnfeksiyonun Bulaşması:

H.pylori infeksiyonlarında, düşük sosyo-ekonomik şartlar, kalabalık aile ortamı, sanitasyon yetersizliği, anne-babanın bu bakteri ile infekte olması gibi ailesel faktörlerin etkili olduğu gösterilmiştir. *H.pylori*'nin insan dışında doğal kaynağı veya taşıyıcısı bulunmamaktadır^{34,44}. Buna karşılık, Dore ve arkadaşları⁴⁵ yaptıkları bir çalışmada; çoban köpekleri ve koyunlarla direkt temas eden çobanlarda *H.pylori* pozitifliğini % 98 oranında bulmuşlar, aynı bölgede yaşayan, fakat direkt hayvan teması olmayan kontrol grubunda ise bu oranı % 43 olarak saptamışlardır. İnsanlar arasında bulaşmada fekal-oral ve oral-oral yol ile kontamine endoskopların kullanımı önemlidir. *H.pylori*'nin cinsel yolla geçtiğini gösteren hiçbir epidemiyolojik veri yoktur^{9,34,44}.

H.pylori infeksiyonu sıklıkla çocukluk döneminde kazanılır ve çocuklar yetişkinler arasında infeksiyon için bir vektör olarak da rol oynarlar. Çocuklar arasındaki infeksiyon sıklığı, özellikle diğer aile bireyleri infekteyse, daha yüksektir. *H.pylori* infeksiyonu infekte annelerin çocuklarında, infekte olmayanlara göre beş kat daha fazla görülmüştür^{46,47}. Çocukluk döneminde birden fazla suş midede kolonize olabilir, ancak suşların çoğu spontan olarak eradike olurken, mide mukozasına ve konağın immün sistemine direnç gösterebilen genotip konakta kalıcı kolonizasyon oluşturabilir⁴⁸. Baskın genotip aileseldir ve bu baskın yerleşim diğer suşlarla bir yarış sonu kazanılan bir kalıcılık olmayıp, ailenin şartlarına uyum sağlamış mide kolonizasyonuna adaptasyonun sonucudur. Rhesus maymunlarında 7 farklı suşun

birlikte verildiği deneysel infeksiyonlarda da uzun süreli kalıcı kolonizasyonu sadece bir suşun başardığı gösterilmiştir. Kişi ve çevre hijyeni bozuk toplumlarda hayatın her döneminde yeniden infeksiyon riski mik s infeksiyon ihtimalini artırmaktadır^{6,48}. Ancak mik s kolonizasyonun gerçekten bir mik s infeksiyona mı, bir kontaminasyona mı, yoksa midenin antrum ve korpusuna adapte olmaya çalışan bir suşun farklı genotipik mutantlarına mı bağlı olduğu kesin açıklanamamıştır. *H.pylori*'nin insanlar arasında oral-oral yolla geçebildiği, öpüşmenin bir bulaş yolu olabileceği gibi oral kavitede kolonize olan suşlarla mideye bakteri geçişinin sürekli olabileceği de ileri sürülmüştür^{34,49}. Diş etlerinde ve diş plaklarında kolonize olan *H.pylori*'nin, özefagus ve üst gastrointestinal sistem kanserleri ile ilişkisi epidemiyolojik araştırmalarla gösterilmiştir^{37,49,50}. Mide kanserleri, yılda 700 bin ölüm ile dünyada kansere bağlı ölümler arasında üçüncü sırada yer almaktadır^{37,49,51}.

H.pylori ile infekte hastalarda kullanılan ve yeterli dezenfeksiyon işlemi uygulanmamış endoskopların kullanılması ile görülen bulaşda oral-oral geçiş örneği olarak gösterilmektedir. Fare modeli çalışmalarda dışkıda görülen *H.pylori* suşlarının spiral ve dormant formları ile fekal-oral bulaşın mümkün olduğunun gösterilmesi, özellikle gelişmekte olan ülkelerde insanlarda da fekal-oral bulaşmanın önemli olabileceğini düşündürmektedir^{44,49}. Bu şekilde bulaşda dışkı ile kontamine suların, kontamine sebze ve meyvelerin rol oynayabileceği ileri sürülmüştür^{9,44,52}. Peru'da yapılan bir çalışmada evin dışından taşınan içme suyunu içen çocuklarda, ev içi su kaynağını kullanan çocuklara göre üç kat daha fazla *H.pylori* infeksiyonu riski görülmüştür^{53,54}.

2.3. Sınıflandırma

H.pylori 1989 yılında *Campylobacter* cinsinden çıkartılarak, *Helicobacteraceae* ailesi *Helicobacter* cinsi içerisinde bir tür olarak yeniden sınıflandırılmıştır. *H.pylori*'nin gastroduodenal hastalıklar ile ilişkilendirilmesinden sonra insan, kedi, köpek, domuz ve kemiricilerde gastrointestinal sistemdeki benzer mikroorganizmaların gösterilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmaların sonunda, 24'den

fazla tür isimlendirilerek *Helicobacter* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır. Bu türler dışında en az 35 türün de isimlendirilme çalışmaları devam etmektedir⁵⁵.

İnsanlarda gastroduodenal hastlıklarla ilişkili en önemli tür *H.pylori* olup, bu tür dışında başka helikobakter türleri de gastrointestinal sistemde kolonize olabilmektedir. Bunların insanlardaki kolonizasyon oranları % 0.01 (İtalya'da)⁵⁶ ile % 6.2 (Tayland'da)⁵⁷ arasında değişmektedir. Bu türler arasında en sık görülen *H.heilmannii* tip-1 (*Gastrosprillum hominis*)'dir (% 78.5) ve insan midesinde % 0.2-4 oranında kolonize olabilmektedir^{58,59}. Bu suşun MALT lenfoma ile ilişkili olabileceği, eradikasyon tedavisinden sonra hastalardaki klinik cevaba dayanarak iddia edilmiştir⁶⁰. *H.felis*'in de insan mide mukozasında kolonize olabildiğine dair tartışmalı yayınlar bulunmaktadır. Bunun dışında ishalleri, inflamatuvar bağırsak hastalığı olanlar ve bakteriyemik hastalarda çok düşük oranlarda bile olsa (% 0.001-6) *H.canis*, *H.pullorum*, *H.cinaedi*, *H.fennelliae*, *H.canadensis*, *H.winghamensis*, *H.westmeadi* ve *H.rappini* gibi enterohepatik *helicobacter* türleri izole edilmiştir^{55,61}. Yine, primer olarak köpeklerin mide mukozasında kolonize olan *H.salomonis*'in, evinde köpek besleyen kişilerin bağırsaklarında kolonize olabildiği bilinmektedir⁶².

2.4. Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

H.pylori; virgül, martı, "S" veya spiral şeklinde görülebilen, 2.5-5.0 µm uzunluğunda, 0.5-1.0 µm genişliğinde, bir uçta bulunan 1-6 adet arasında değişen sayıdaki kılıflı flagellaları ile son derece hareketli, sporsuz ve kapsülsüz, mikroaerofilik, gram negatif çomaktır. *H.pylori* genomu, 1.67 Mb uzunluğunda ve sirküler yapıda olup, *E.coli* genomunun 1/3'ü kadardır. Genomda insersiyon fragmentleri hariç G+C oranı ortalama olarak % 39'dur^{1,63,64}.

Helikobakterleri kampilobakterlerden ayıran en önemli morfolojik özellikleri; kılıflı polar demetler halindeki sayısı 1-6 arasında olan flagellar yapısı, aksiyal flamanının olmaması, visköz bir ortamdaki optimal hareket yeteneği ve düzgün hücre duvarıdır. Ayrıca, *H.pylori* sahip olduğu güçlü üreaz ve katalaz enzimleri ile de *Campylobacter* ailesinden ayrılmaktadır^{22,65}.

2.4.1. Görünüm ve Boyanma

H.pylori dokuda oksintik kanalların içerisinde, epitel hücre yüzeyinde ve lümende görülürler. Gerek dokudan hazırlanmış kesit veya yaymalar, gerekse besiyerindeki kolonilerden hazırlanan preparatlar, Gram boyası ile boyanabilecekleri gibi, karşıt boya olarak karbol fuksinin kullanıldığı Gram boyası, giemza, sadece sulu fuksin veya iyi süzülmüş karbol fuksinle 1–2 dakika muamele edilerek boyanabilir. Histopatolojik incelemeler için biyopsi kesitleri Warthin-Stary gümüşleme yöntemi ile boyanabilir²².

H.pylori'nin karakteristik morfolojik özellikleri dokudan hazırlanmış preparatlarda daha açık gözlenirken, besiyerinden hazırlanmış yayma preparatlarda, kıvrımları nispeten kaybolmuş, ince çomaklar şeklindeki görünüm dominanttır. Ayrıca, mikroorganizmanın antibiyotikler veya dezenfektanlar gibi kimyasal, oksijen veya ısı farkı gibi fiziksel olumsuzluklarla karşılaşması halinde, tedavi başarısızlıklarından sonraki reaktivasyonlardan sorumlu olan, canlı ve metabolik yönden aktif oldukları halde kültür ortamlarında üretilmeyen, hücre duvarları defektli “dormant form” olarak adlandırılan kokoid formda da görülebilirler. Elektron mikroskobu ile yapılan ultrastrüktürel çalışmalarda kokoid formlarda U şeklinde kıvrılmış basilin uç kısımlarının membrana ait bir uzantı ile bağlanmış olduğu gösterilmiştir. Bu formların boyalı preparatlarda görülmesi *H.pylori* için prediktif bir bulgu olarak algılanmalı ve histolojik veya histopatolojik bir yöntemle tanı konuyorsa, negatif sonuç verilmeden önce preparatlar daha dikkatli incelenmelidir³.

2.4.2. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Özellikleri

H.pylori hücre duvarı gram negatif bakteri hücre duvarı özelliklerine sahiptir. Yapı en dışta lipopolisakkaridden (LPS) zengin, büyüklüğü 31–80 kDa (kilodalton) arasında değişen dış membran, periplazmik alan ve 3 katmanlı iç membrandan oluşur. *H.pylori* suşlarındaki LPS, özellikle 3-hidroksi yağ asitlerinin yapısı ile diğer enterik bakterilerin LPS'lerinden yapısal ve antijenik olarak farklılıklar gösterir. *H.pylori*

LPS’inde O-spesifik karbon zincirlerinde dal sayısı 6’dan 5’e düşmüş, buna karşılık, zincirlerdeki karbon sayısı artmıştır. Bu yapısal değişim LPS’nin biyolojik aktivite ve antijenik özelliğini *E.coli* ve *Salmonella*’ların LPS’sinden 1000 kat daha düşürerek bakterinin immun sistemden kaçışını sağlamıştır. Ayrıca, bu yüzey glikolipidlerinin çoğu kısmen fukozillenmiş, glikozillenmiş veya galaktozillenmiş *N*-acetylactosamine (LacNAc) O-polisakkarid yan zincirler halindedir ve insanlardaki normal hücre yüzey glikolipidler/konjugatları olan Lewis^a, Lewis^b ve kan grubu antijenleri ile homoloji gösteren Lewis^x (Le^x), Lewis^y (Le^y) ve Bab antijenlerini oluştururlar. Bu benzerlik de bakteriyi konağın immun cevabına karşı korumakta veya otoimmun cevaba yol açarak patolojik olayları başlatmaktadır^{3,66,67}.

H.pylori yüzeyinde eksprese edilen GroEl ve DNAk ailesine mensup stres cevap proteinleri veya Isı şok proteinleri (Hsp - Heat Shock Proteins) büyük moleküler ağırlığa sahip şeparon proteinlerdir. Bu proteinler insanlardaki birçok hücre Hsp’leri ile homolog olmaları nedeni ile konak immün sistemi tarafından algılanmazlar (Tablo 2.1). Ancak, kronik infeksiyonlarda konak immün sistemi tarafından algılanırlar ve böylece patolojik otoimmun cevap ortaya çıkar. Sonuç olarak, gastrik karsinomalara kadar giden irreversibl doku hasarı tetiklenir^{68,69}.

Tablo 2.1. *H.pylori* Hsp ile insan hücre Hsp benzerliği.

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

2.4.3. Hareket

Spiral şekil, son derece düzgün hücre yüzeyi ve sayıları 1–6 arasında değişen polar flagellaları, mikroorganizmanın mide içerisinde yaşaması ve hastalık oluşturmasını sağlamak üzere mukus içerisinde hızlı harekete uygun şekilde düzenlenmiştir. Birçok flagellalı bakteride hız, ortamın vizikozitesi su vizikozitesine eşit iken, en yüksek düzeyde devam eder. Viskozitenin 2–3 centipois’e artması halinde

hız süratle düşmektedir. *E.coli* gibi peritriş flagellalı ve hızlı hareket eden bakteriler 20 centripois'e kadar hareketlerini sürdürebilirken, *H.pylori* 200 centripois de hareketliliğini korumakta, bu yoğunlukta pH>4 iken 60-70 µm/saniye hız yapabilmektedir. *H.pylori* flagellası, *Salmonella* ve *E.coli*'de olduğu gibi, sitoplazmik membrandaki FliF, FliM ve FliS protein polimerlerinden oluşan bazal cisimcikten çıkar, dış membrana gömülü olan diski geçtikten sonra FlaE protein polimerinden oluşan, hücre duvarına bağlı dirsekten geçerek hücre dışına salınır. Flagella; 56 kDa büyüklüğünde bir major flagellin, FlaA ve 57 kDa büyüklüğündeki bir minor flagellin, FlaB, protein iplikçiklerinden oluşan, uçları topaç görünümlü sarmal yapıda kamçıdır. Kamçının uzunluğu yaklaşık olarak 30µm, kalınlığı ise 2.5 nm kadardır⁷⁰⁻⁷².

2.4.4. Genomik Özellikler

H.pylori 26695 ve J99 suşlarının tam genom dizi analizi yapılmıştır. Bu suşların gen büyüklükleri sırası ile 1.667.867 ve 1.643.831 bp olarak tespit edilmiştir. *H.pylori* 26695 genomunda, genomun % 91'ini oluşturan 1590 açık okuma bölgesi, *H.pylori* j99 genomunda ise genomun % 90.8'ini oluşturan 1495 açık okuma bölgesi bulunmaktadır. Genlerin 300 den fazlası membran yapısı ile ilişkilidir. Ayrıca beta-galaktosidaz hariç, glukoz metabolizması ile ilişkili genler, enerji sentezinde rol alan oksidaz, sitokrom oksidaz ve katalaz gibi oksidasyon redüksiyon genleri, çok sayıda taşıyıcı sistem, iki bileşenli regülatör sistem ve *ureA*, *ureB*, *ureE*, *ureF*, *ureG*, *ureH* ve *ureI* gibi üreaz genleri gibi fonksiyonel gen bölgeleri tanımlanmıştır. Midenin asidik ortamına karşı direncinde ve patogeneizde önemli rol oynayan üreaz enzimi ile ilişkili proteinler, bakterinin bütün proteinlerinin % 2-15'ini oluşturur⁷³.

Genomda ortalama % 39 olan G+C oranı, bakterideki genetik esnekliği, yani çevre şartlarına uyum için gerekli mutasyon ve rekombinasyon yapabilme yeteneğini artırmaktadır. Ayrıca, % 2–8 oranında görülen sinonim ve non-sinonim mutasyonlar da mikroorganizmanın mide şartlarına uyumunu kolaylaştırır. Buna karşılık, bakterinin mide dışındaki çevre şartlarına karşı duyarlılığı *E.coli* genomundakinden 10 kat daha düşük sayıdaki regülatör bölgelerle izah edilmektedir. *H.pylori* 26695 suşunda 5 bölgede, *H.pylori* J99 suşunda ise 9 bölgede “Patojenite adaları”nı (PAI – Pathogenicity

Islands) ima eden, düşük G+C oranına (% 33-35) sahip yabancı gen dizileri gösterilmiştir. *H.pylori* 26695 suşundaki 40 kb uzunluğundaki R2 bölgesi *cagPAI* (*cag* Patojenite Adası) bölgesi olup, *H.pylori* virulansı ile direkt ilişkili Tip-IV sekresyon sistemi ve effektör protein CagA dahil 27 proteini kodlamaktadır. Diğer 4 bölge muhtemelen, RNA polimerazın β ve β' subunitlerini, “translation elongation factor EFG” yi kodlayan *fusA* genini ve restriksiyon modifikasyon sistemleri ile ilişkili genleri içermektedir. Genomda en az iki kopya halinde 16S ve 23S rRNA genleri bulunur. Çok sayıda genin farklı yer ve sayıda tekrarladığı görülür. Bu, *H.pylori* geninde yeniden düzenlenme (rearrangement) olaylarının ve hatalı eşleşmelerin sıklığını gösterir. *H.pylori* suşlarının en az % 40’ında büyüklükleri 1.5 kb ile 23.3 kb arasında değişen plazmidler bulunur. Ancak bunlar virulansla ilişkili herhangi bir gen içermezler⁷³.

2.5. Üreme ve Kültür Özellikleri

2.5.1. Üreme Özellikleri

H.pylori kapnofilik bir mikroorganizma olup mikroaerofilik ve aerobik şartlarda üreyebilecek superoksit dismutaz, peroksidaz, sitokrom oksidaz ve güçlü katalaz aktivitesine sahiptir. Bu sebeple, % 5–10 CO₂ (karbondioksit) varlığında % 5–20 O₂ (oksijen) içeren atmosferde üreyebilirler. Diğer taraftan, fumarat redüktaz, menaquinonlar ve oksijene toleransı düşüren, buna karşılık, krebs siklusunda, anaerobik fermentasyonda pirüvatın asetil koenzim-A (Acetyl-CoA) ve suksinil koenzim-A’ya (succinyl-CoA) dönüştürülmesinde gerekli olan piruvate flavidoxine oksidoreductase (POR) ve oxogluterate: acceptor oksidoreductase (OOR) enzimleri bulundurmaları bu bakterilerin oksijen toleranslarını azaltmakta, CO₂ kullanım yeteneğini ise artırmaktadır. Oksijene duyarlı olmalarına ve oksijen varlığında oluşan reaktif oksijen radikallerine rağmen, düşük düzeyde de olsa, fonksiyonlarını devam ettirebilmektedir. *H.pylori* anaeroblara karşı etkili bir antibiyotik olan metranidazol’e duyarlı oluşu anaerobik fermentasyona bağlı enerji bağımlılığını düşündürmekte ise de, metranidazolün etki mekanizması klasik anaeroblara olan etki mekanizmasından farklıdır ve NADPH nitroreductase (*rdxA*) ve NAD(P)H:flavin oksidoreductase (*rfxA*) ile ilişkilidir. Genel

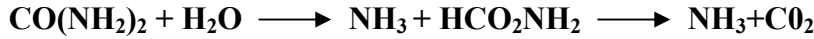
olarak, mikroaerofilik bakterilerin yukarıda bahsedilen redoks potansiyeli ile ilişkili, hücre enerji metabolizması ve yaşamı için gerekli olan enzimleri, %10 un üzerinde pO₂ konsantrasyonuna sahip atmosferde, ortaya çıkan reaktif oksijen radikalleri sebebi ile bozulur. Fakat *H.pylori*, ürettiği ortamdaki metabolitlere, tercih edilen metabolik yola ve ortamdaki bakteri yoğunluğuna bağlı olarak mikroaerofilik şartlarda üreyebilirler^{3,22}.

H.pylori suşları her ne kadar in vitro şartlarda major karbonhidratları katabolize edemeseler de nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile bu bakterilerde monosakkarit (glukoz) kinaz aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Bakteri D-glukoz transporterlara sahiptir. *H.pylori* in-vivo şartlarda vücutta bol miktarda bulunan D-glukozu fermente etmekten çok, sahip olduğu pentoz-fosfat enzimleri yardımı ile, enerji dönüşümünde fosfat alıcısı (substrat) olarak kullanmaktadır. Ayrıca, *H.pylori* suşları kampilobakterlerden farklı olarak *elektron* transport sistemlerinde proton taşıyıcısı olarak görev yapan, protein yapıda olmayan metillenmemiş MK-6 kinonlara sahiptir. *H.pylori* midenin asidik ortamında üreyebilmesine rağmen nötrofilik bir bakteridir. Bu sebeple in-vivo ve in-vitro şartlarda üreme üzerine pH'ın etkisi büyüktür. *H.pylori* suşları optimal üreme pH'ları 6.8–7.6 arasında olmasına karşın, pH 5-8 aralığında üremeye devam ederler. Ancak bakteri, çevre şartları ve ortamdaki metabolitlere bağlı olmak üzere pH 2.5–9 aralığında canlılığını korumaktadır. Çevrenin pH'ı 7.0 iken bakteri sitoplazmasının pH'ı 8.4 olarak belirlenmiştir. Aynı pH değerinde *E.coli* sitoplazma pH'ı 7.8 olarak bulunmuştur. Bu sonuç, *H.pylori* 'nin asit pH'a diğer enterik bakterilerden daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Mide'nin düşük pH'ında özellikle asit sekrete eden parietal hücrelerin yer aldığı oksintik kanalların içerisinde üreyebilmesi güçlü üreaz aktivitesi ve hücre membranında kısa sürede adaptif değişiklikler yapabilmesine bağlıdır^{1,3,22}.

2.5.1.1. Üreaz Aktivitesi

Üreaz aktivitesi, *H.pylori* suşlarının mide asidine rağmen hayatta kalma ve üreyebilmeleri için gerekli olan en önemli özellikleridir. Üreaz, ya nitrojen metabolizmasında kullandığı yaklaşık 37.5 kDa'luk *argininaz* enzimi yardımı ile L-arginine'i, L-ornithine ve üreye çevirmek sureti ile metabolik olarak proteinlerden

üretileen üreyi veya doku aralıklarından sızan ve mide sıvısındaki konsantrasyonu kan düzeyinde, yani 1-3 mM olan, üre ve bikarbonatı, amonyak ve karbamat (carbamic asit)'a hidrolize ederek, ortamı güçlü olarak alkalize eder (Şekil 2.1). İyi tamponlanmamış ortamda üreaz aktivitesine bağılı olarak ortamın pH'ı 9,5'e kadar çıkabilir¹.



Şekil 2.1. *H.pylori* üreaz aktivitesi.

Üreaz enzimi; aktivite için, esansiyel iyon olarak Ni^{+2} 'e ihtiyaç duyan, 564 kDa (510-600) ağırlığında, suda çözünür bir metalloproteazdır. Bakteri genomunda *ureA*, *ureB*, *ureI*, *ureE*, *ureF*, *ureG* ve *ureH* olarak tanımlanan 7 genden oluşan gen topluluğu tarafından kodlanan üreaz enzimi, 66 kDa ve 29.5 kDa ağırlığında UreA ve UreB olarak tanımlanan iki fonksiyonel alt üniteden oluşur. Üreaz enziminin küçük parçası intrasitoplazmik lokalizasyon gösterirken, büyük parçası hücre duvarının en dış katmanında, lipopolisakkarid'e bağılı olarak yerleşir. Yüzeydeki üreaz veya serbest üreaz pH 7-8 aralığında optimum seviyede üretilirken, $\text{pH} \leq 4$ olduğunda üretimi ve aktivitesi tamamen durur. Buna karşılık, pH 6.5 iken eser miktarda ölçülen internal veya sitoplazmik üreaz aktivitesi, $\text{pH} < 2.5$ iken 15 kat artmaktadır. Bu bulgular *H.pylori* suşlarının midenin asit ortamına adaptasyonunda hücre dışı üreazdan çok, asidik ortamda aktive olan sitoplazmik üreazın etkili olduğunu göstermektedir. Üreaz ile ilişkili gen kümesindeki genler tarafından eksprese edilen diğer proteinler (UreE, UreF, UreG ve UreH) yapısal genlerin biyosentezi, apoenzim olan UreA ve UreB'ye aktivite için Ni^{+2} 'in bağlanması ve enzim sentezinin düzenlenmesinde rol alırlar. *H.pylori* için spesifik olan UreI ise ortamın pH'ına bağılı olarak dış membrana üreaz enziminin transportunu düzenler^{1,3}.

H.pylori suşlarında üreaz aktivitesi sadece midede kolonizasyon ve çoğalma için değil, aynı zamanda patogenezi için de son derece önemli bir virulans faktörüdür. Üreaz, sekretuar Ig'leri (immunoglobulin) sülfidril bağlardan kopararak, antikorların opsonizan aktivitesine karşı bakteriyi korur. Diğer taraftan mide mukozası yüzeyinde yarattığı pH değişikliğine bağılı olarak mide bezlerinden sekrete edilen H^+ iyonlarının

mide lümenine geçişini engelleyerek diffüzyon yolu ile mukozaya geri alınımına yol açar. Üreaz aktivitesi sonucu açığa çıkan NH₃ mide mukoza hücreleri arasındaki sıkı bağları ve bağ kompleksini kopararak mukoza bütünlüğünün bozulmasına sebep olur²².

2.5.1.2. Adaptif Değişimler

H.pylori suşlarında aside toleransta, üreaz enzimi dışında hücre duvarı protein profilindeki adaptif değişimler de önemli rol oynar. Üreaz geni delesyona uğratılmış mutant suşlarda, asit ile temasa bağlı olarak, toleransı sağlamak üzere hücre duvarı ile ilişkili en az 11 gende ekspresyonel değişimler olduğu gözlenmiştir. Ortamın pH'ının 7'den 5'e düşürülmesi halinde, bakteride VacA, CagA ve bir serin proteaz olan HtrA'yı kodlayan genlerin ekspresyonunda azalma, buna karşılık, DnaK-Hsp70, HP1052, HP0871, HP1459, HP0919, HP1549, HP0681 ve SecF genlerinin ekspresyonunda artma olduğu, bu artışa bağlı olarak da hücre duvarı yapısının değiştiği gösterilmiştir²².

2.5.2. İn-vitro Şartlarda Üreme

H.pylori genomik ve fizyolojik özellikleri sebebi ile mide mukozasına iyi uyum sağlamıştır. Ancak, küçük olan genomu ve regülatör genlerin azlığı sebebi ile invitro şartlarda üretilmesi son derece zordur. Optimize edilmiş besiyerlerinde bile son derece yavaş ürer. *H.pylori* % 7-10 oranında eskitilmiş at kanı, % 1 izovitaleks, % 0.25 maya ekstraktı içeren Brusella agar, Beyin Kalp İnfüzyon agar ve Kolombiya agar gibi katı besiyerlerinde % 5 O₂, % 75 N₂ (nitrojen), % 10 H₂ (hidrojen) ve % 5-10 CO₂ içeren nemli atmosferde (% 98) 3-7 günlük inkübasyon süresinde üretilebilirler. Besiyerlerine Vankomisin, Trimetoprim, Polimiksin-B, Kanamisin, Sefoperazon, ve Amfoterisin-B gibi antibakteriyel ve antimikotikler ile aktif karbon ilavesi kontamine örneklerden izolasyon şansını artırır. Genellikle % 8 at kanı, Vankomisin (10 µg/ml), Polimiksin-B (2.5 U/ml), ve Trimetoprim (5 µg/ml) içeren Skirrow agar besiyeri izolasyonda başarı ile kullanılmaktadır. At kanı dışında koyun, fötal dana kalp ve insan kanı da kullanılabilir. *H.pylori* suşları inkübasyon süresi sonunda besiyerinin yüzeyinde

0.3–1 mm çaplı gri, non-hemolitik, su damlasına benzeyen koloniler şeklinde ürerler. Yapısal olarak şüpheli koloniler Gram boyanma ile görülen mikroskopik morfolojik özellikleri ve oksidaz, katalaz, üreaz aktiviteleri gibi biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak ön tanı alırlar^{21,22}.

Mezofilik bir bakteri olan *H.pylori* 30 °C ve 37 °C ısıda ve 3-7 günlük inkübasyon süresinden sonra üreyebilirken, 25 °C’de üreyemez. Transport şartlarına dikkat edilmesi halinde optimal üreme sonuçları elde edilebilir. *H.pylori* midenin asit ortamında üremesine rağmen, asidofilik bakterilerden değildir. Buna karşılık, tölere edebildiği pH aralığı oldukça geniştir (5.5-8.5). Fakat optimal üreme 6.9-8.0 pH aralığında gerçekleşir. *H.pylori* uzamış inkübasyon süresi, düşük pH derecesi ve oksijen ile temas gibi çevresel faktörlere son derece duyarlıdır. Safralı ortamlardan olumsuz etkilenir. Subkültürlerinde üretilmesi zor olan bir bakteridir. Klasik besiyerlerinde genellikle dört pasajdan sonra canlılığını kaybederler. *H.pylori* tanısı almış izolatların saklanması % 0.25 maya ekstraktı, % 10 at kanı ve % 15 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon buyyonu (BHIB - Brain Heart Infusion Broth) kullanılabilir. Katı besiyerinden toplanan örnekler bu saklama buyyonu içerisine toplanarak –70°C de aylarca korunabilir^{1,3,22}.

2.6. Biyokimyasal Özellikleri

H.pylori laboratuvarında; oksidaz, katalaz ve güçlü üreaz aktivitesi, nitratı redükte edememesi, sülfürlü bileşikler kullanarak H₂S oluşturabilmesi, hippuratu hidrolize edememesi, nalidiksik aside dirençli, sefalotine duyarlı olması ile ayırt edilebilir. Bazı *H.pylori* suşlarının üreaz ve katalaz bakımından negatif olduğu bildirilmişse de, bu suşların klinik izolat olmadığı bildirilmektedir^{1,6,22}.

H.pylori suşları her ne kadar invitro şartlarda majör karbonhidratları katabolize edemeseler de, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile bu bakterilerde monosakkarit kinaz aktivitesinin olduğu gösterilmiştir¹. Bu bakteriler invivo şartlarda vücutta bol miktarda bulunan glukozu fermente etmekten çok, enerji dönüşümünde fosfat alıcı substrat olarak kullanmaktadır⁶. Metabolizmaları için gerekli enerjiyi aminoasitlerden, üreden ve CO₂'den sağlarlar³.

2.7. Patogenez

H.pylori'nin neden olduğu gastroduodenal patolojide mikroorganizmaya ait çok sayıdaki virulans faktörünün yanı sıra, konak ve çevreye ait faktörlerin de birlikte etkili olduğu bilinmektedir. Bugüne kadar hiçbir virülans faktörü veya predispozan faktörün tek başına spesifik bir patoloji ile ilişkisi fizyopatolojik olarak açıklanamamıştır^{7,8}. Ancak mikroorganizmanın konağın immün cevabından kaçışı ve kaçışta etkili olan faktörlerle konak mukozası arasındaki ilişki virulansa yönelik çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Muhtemelen, konakta oluşan cevap, çoğu kez konağa minimal zarar verirken, bazı olgularda uzun süreçte denge, iyice konak aleyhine bozularak, çeşitli mide hastalıklarına neden olmaktadır^{7-9,74,75}.

2.7.1. Bakteriye Ait Virulans Faktörleri

H.pylori infeksiyonları patogenezinde mikroorganizmanın midenin asit ortamına uyum sağlamasında rol alan üreaz aktivitesi ve mukus tabakasını incelten musinaz ve fosfolipaz A2 ve C gibi proteazlar ve mukus içerisinde hareketi sağlayan flagellar yapı gibi kolonizasyon faktörleri, gastrik hücrelere bağlanmayı kolaylaştıran hücre duvarı protein yapıları ve LPS gibi adezyon faktörleri, sitokrom oksidaz sistemi enzimleri, demir bağlayan proteinler, konak hücre elemanları ile antijenik homoloji gösteren Hsp ve Lewis antijenleri gibi konak savunmasından kaçış faktörleri ile gastrik mukozada hasara neden olan CagA ve VacA gibi effektör proteinleri içeren virulans faktörleri rol oynarlar^{3,8,13,67,75}.

2.7.1.1. Kolonizasyon Faktörleri

Asidofilik bir bakteri olmamasına rağmen *H.pylori* midedeki asit sekresyonu, hareketlilik ve kalın musin tabakasının yarattığı olumsuz şartlara rağmen mukus

içerisinde kolonize olmayı başarır. Midede kardias ve antrum ile duodenumdaki gastrik hücre metaplazisi görülen alanlarında kolonize olan *H.pylori*, % 80-98 oranında lümende ve oksintik kanallarda mukus içerisinde, % 2-20 oranında ise gastrik hücrelerin üzerinde yerleşirler. Mikroorganizma mide mukozasında epitel hücreler dışında nöroendokrin hücreler ve nötrofillere karşı da tropizm gösterir⁷⁴.

2.7.1.1.1. Hareket

Midede lümen ve mukoza arasında viskoelastik bir mukus tabakası yer almaktadır. *H.pylori*'nin bu mukus tabakası içindeki hareketi, bir tarafında bulunan kılıflı flagellaları sayesinde son derece hızlı bir şekilde olmaktadır. Spiral yapı da hareketini son derece kolaylaştırmaktadır. Bu üstün hareket kabiliyeti sayesinde asidik bir ortam olan lümen, nötr bir ortam olan mukus tabakasına hızlı bir şekilde ulaşmasını sağlar. *H.pylori*'nin hareketliliği en önemli virulans faktörü olarak kabul edilmektedir. Domuzlarda yapılan çalışmalarda en virulan suşların en hareketli suşlar olduğu, flagellar mutant suşların enfeksiyon yeteneğinin kaybolduğu gösterilmiştir^{75,76}.

2.7.1.1.2. Üreaz

H.pylori'nin bütün proteinlerinin yaklaşık olarak % 6'sından fazlasını oluşturan üreaz, bakterinin asidik mide ortamında yaşaması için gereklidir. Üreaz enziminin eksprese edilebilmesi için kofaktör olarak nikel ihtiyacı duyulur. Üreaz enzimi mide hücrelerinden salınan üreyi parçalar. Ürenin parçalanması esnasında açığa çıkan CO₂ ve amonyanın bakteriyi koruduğu gibi, aynı zamanda mide epitelinde hasar yaptığı gösterilmiştir. Üreaz aktivitesi ile üreden oluşturulan amonyak ve karbondioksit *invivo* şartlarda bakterinin yaşaması için gereklidir. Bu nedenle de, *H.pylori* karbondioksit ve bikarbonattan zengin ortamlara çabuk adapte olmakta ve *invitro* çoğalabilmesi için de yüksek karbondioksitli ortam gerekmektedir^{22,77}.

2.7.1.2. Adezyon

H.pylori'nin mide epiteline spesifik olarak yapışmasında Lewis ve Bab antijenlerinin etkili olduğu, özellikle de, BabA2 ile atrofik gastrit, artmış epitel proliferasyonu ve gastrik karsinomalar arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir^{66,78,79}. Bu iki temel adezin dışında, N-asetil-nöraminil-laktoz yapıda fibriler hemaglutinin tanımlanmıştır. Bu hemaglutinin gastrik mukoza hücreleri üzerinde özel gastrik gliserolipid reseptörlere sahiptir. *H.pylori* üzerindeki fibriler adezinlerin mukoza hücreleri üzerindeki karbonhidrat reseptörlerine sıkı tutunmalar yapması aktin polimerizasyonu yapması ile gerçekleşir ve bu da epitel hücrelerinin harabiyetini beraberinde getirir. Ayrıca, *H.pylori* hücre yüzeyinde eksprese edilen proteinlerden; 25 kDa ağırlığındaki sialize epitoplara gastrik hücreye bağlanmada, 63 kDa ağırlığındaki glukokonjugatların da epitel hücre yüzeyi ile epitel hücre arası bağ dokuya bağlanmada etkili olduğu gösterilmiştir. Adezyon yetersizliği konağın inflamatuvar cevabını pek etkilemez, ancak epitel hücre hasarının az olmasını sağlar^{66,67,78,79}.

2.7.1.3. Konak Savunmasından Korunma Faktörleri

H.pylori; midede kolonizasyonu engelleyici faktörlere karşı koyabilecek birçok yapı elemanları, enzim ve toksinlere sahiptir. Bu elemanlar; flagellalarla sağlanan güçlü hareket yeteneği, üreaz enzimi, bağlanmadan sorumlu proteinler (adezinler), musinaz gibi suda çözünür extraselüler mediyatör proteinler, katalaz enzimi, proliferasyonu inhibe eden proteinler, VacA ve CagA toksini ile Thioredoxin (11;18)'dir^{78,80}.

2.7.1.3.1. Katalaz ve Superoksid Dismutaz

H.pylori'nin İnfekte mukozadaki kronik inflamasyon alanlarında, artmış makrofaj, lenfosit ve plazma hücreleri tarafından ortama veya fagolizozomal füzyonda

fagozom içerisine sekrete edilen oksijen radikallerine karşı korunmasında süperoksit dismutaz (SOD), oksidaz ve katalaz enzimleri hayati öneme sahiptir^{9,74,79}.

2.7.1.3.2. Thioredoxin (CD59)

H.pylori suşları proteinlerin disülfid bağlarını keserek denatüre edebilen Thioredoxin (CD59) enzimine sahiptir. Bu enzim sayesinde mukus tabakasındaki musinleri ve daha da önemlisi konak tarafından sekrete edilen nonspesifik ve spesifik IgA, IgG ve IgM gibi immunoglobulinleri denatüre edip vücut savunmasından korunurlar^{81,82}.

2.7.1.3.3. Polifosfat Kinaz (PPK)

H.pylori'nin çevresel nutrisyonel şartlar ve strese direncinde, *ppk* geninde kodlanan polifosfat kinaz (PPK) enziminin rol oynadığı ve farelerde yapılan deneysel çalışmalarda enzim mutant suşların infeksiyon yeteneklerinin azaldığı gösterilmiştir⁸³.

2.7.1.4. Doku Hasarı Oluşturan Virulans Faktörleri

H.pylori'nin mide kolonizasyonu sıklıkla asemptomatik seyretmekte, taşıyıcıların ancak % 15-20'sinde hayatın herhangi bir döneminde gastroduodenal patoloji şekillenmektedir. Bu düşük insidans *H.pylori* ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki etiyolojik ilişkiyi kuşkulu hale getirirse de, insanlarda yapılan geniş epidemiyolojik çalışmalar ve eradikasyon tedavisinin klinik sonuçlarının yanı sıra, Pigtail macaque ve Rhesus maymunları ile yapılan deneysel çalışmalarda *H.pylori*'nin yüzeysel gastrite yol açtığı ispatlanmıştır^{7,74,75,84}. Rhesus maymunlarında *H.pylori* infeksiyonu ile yaratılan gastritin *H.pylori* eradikasyonu ile iyileşme sürecine girdiği de gösterilmiştir⁷⁴. *H.pylori* patogenezi ile ilgili çok sayıda iddia bulunmakla birlikte, bakteriye ait güçlü antijenik özelliğe sahip toksin, enzim ve yapısal elemanların

yarattığı kronik inflamasyonun midedeki doku hasarından sorumlu olduğu ispatlanmıştır⁸⁴. İmmunopatogenez dışında, *H.pylori* enfeksiyonu esnasında 4-4.5'a kadar yükselen mide pH'ı, midede adi bakteriler ve metabolitlerinin artışına izin vermektedir. Bu metabolitler içerisinde bulunan nitrat ve nitritler çeşitli gıdalar veya ilaçlarla alınan aminler ve amidlerle birleşerek karsinojen nitrozo aminler ve nitrik oksid radikalleri (NOS) gibi N-nitrozo bileşiklerini oluşturmaktadır. Kronik inflamasyonda yer alan polimorf nüveli lokositler, lenfositler ve makrofajların yarattığı oksijen ve nitrik oksit radikalleri de NOS'lar gibi mukozal hücrelerde hasarı ve neoplastik transformasyonu tetikleyebilmektedir. Diğer taraftan *H.pylori* ile enfekte hastalarda mukozal askorbik asit miktarının düştüğü ve lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir⁸⁴. Bu metabolitlerdeki değişim de karsinogenezi tetiklemektedir. Bu olaylar sonucunda *H.pylori* ile kolonize kişilerin % 2-4'ünde, kronik aktif gastritle başlayan gastrik kolonizasyon yaklaşık 10 yıllık bir süre içerisinde mukoza hücrelerindeki hasara bağlı olarak diffüz veya intestinal tip adenokarsinoma ile sonlanabilmektedir. Nitekim *H.pylori* pozitif kişilerde mide kanseri gelişme riski, negatif hastalara göre en az 20 kat fazla bulunmuştur⁸⁴.

H.pylori'nin genetik yapısındaki rekombinasyon yeteneği ve gen esnekliği özelliği bu bakteriye ait virulans genlerinin de önemini tartışılır hale getirmektedir. Mesela, mide kanseri insidansının yılda 235.000 olgu veya % 0.4 gibi oldukça yüksek oranda görüldüğü Japonya ve Çin gibi ülke izolatlarında virulansla ilişkilendirilemeyen *cagA* ve *vacA* gibi bazı genler Batı dünyasında gastrik adenokarsinoma ve peptik ülser için prediktif değer taşımaktadır. Bu nedenle, virulansa etki eden bu genlerdeki mutasyonel değişimler ve allelik farklılıkların önemini ortaya koyan ve daha geniş vaka gruplarını içine alan moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır⁸⁴.

Burada bu genler ve kodladıkları efektör proteinlerin patofizyolojik olaylara katkısı ile yine virulansla ilişkilendirilen diğer bazı önemli genlerden bahsedilecektir.

2.7.1.4.1. *cag* Patojenite Adası (*cagPAI*) Genleri

cagPAI, 40kb büyüklüğünde ve *cagA*, *cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*, ve *virB11* gibi 27'den fazla genden oluşan bir ORF (open reading frame) bölgesidir. Bu

gen adası diğer bakterilerde olduğu gibi bakterinin ortama adaptasyonu ile ilgili, özellikle de Tip-IV sekresyon sisteminde rol alan agresif proteinleri kodlar. *cagPAI* genleri, ya aralıksız olarak peşpeşe dizilerek bir bütünlük gösterir veya araya giren insersiyon segment IS605 ile ayrılmış sağ, *cagPAI-I* ve sol, *cagPAI-II* olarak tanımlanan iki altüniteye bölünürler. *cagPAI-II* subünitinin 3' ucunda yer alan ve tip IV sekresyon sisteminin en önemli komponenti olan *cagE* geni virulans faktörlerinin hücre membranından salgılanmasını sağlayan 101 kDa luk bir polipeptidi kodlar. *cagPAI*'de yer alan *cagA* geni *cagPAI* için bir indikatör olarak kullanılmaktadır. Ancak bakterinin konağa uyum çabasının bir sonucu olarak *cagPAI*'de *cagA*'nın da dahil olduğu genlerde yüksek oranda delesyonel mutasyonlar görülmektedir³³. Bilinmeyen bir bakteriden aktarıldığı düşünülen ve glutamat rasemaz (Ras) geni içerisine yerleşen bu gen adası suşlar arasında horizontal olarak aktarılmaktadır. *cagPAI* taşıyan suşlar tip I suşlar olarak tanımlanırlar ve bu suşlar ülser ve mide kanserleri gibi ciddi klinik tablolarla ilişkilendirilirler. *cagPAI* taşımayan suşlar ise tip II suşlar olarak tanımlanıp, daha çok non-ülser dispepsi gibi benign gastrointestinal rahatsızlığı olan hastalardan izole edilirler⁸⁴.

cagPAI gen adasına sahip suşlar en az iki farklı mekanizma ile konak mide mukozasında kronik inflamasyonu başlatırlar. Bu gen adası tarafından kodlanan Tip-IV sekresyon sistemi, hücre duvarında yer alan peptidoglikan heteropolimeri ve CagA proteinini, konak hücre sitoplazmasına ve mikroçevreye transfer eder. Hücre içerisine gönderilen CagA tirozin bağımlı veya tirozin bağımsız mekanizmalarla konak hücreye ait farklı moleküllerle ilişkiye geçerken, peptidoglikan konak hücre intrasitoplazmik sensörü olan, Nod-I (nucleotide-binding oligomerization domain-I) tarafından algılanır. Bu sensör de nükleer faktör kappa-B'yi (NF-κB) aktive ederek proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1β, IL-6 ve IL-8) sekresyonunu başlatır. Özellikle IL-8 kronik aktif gastritin en önemli histopatolojik bulgusu olan inflamasyondan sorumludur. Diğer taraftan *cagPAI* barındıran suşlar EGF üzerinden early growth response gen-1'i aktive ederler. Bu gen aktivasyonu MMP-1 (Matriks Metalloproteaz-1), JNK (Jun N-terminal kinase) ve ERK'nin (Extracellular signal-related kinase) aktivasyonuna sebep olur. MMP-1 mide epitelinde hücreler arasındaki desmozomları parçalayarak mukoza bütünlüğünü bozar. Ekstrasellüler matriksdeki bu degradasyon transforme hücrelerin metastazına ve invazyonuna sebep olur^{84,85}.

2.7.1.4.1.1. *cagA* Geni

Bu gen, Tip I suşlarında, 128 kDa (120-140 kDa) molekül ağırlığında, 1147-1181 amino asit uzunluğunda, güçlü immunojen ve sitotoksin olan, CagA olarak tanımlanan, bir dış membran proteinini kodlar. Bu toksin etnik ve bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte klinik izolatların % 50-100'ünde üretilir. *cagA*'nın 5' ucu son derece konservatif iken 3' ucunda farklı sayı ve büyüklükte tekrarlayan diziler yer alır. Bu diziler içerisinde Tirozin'in yer aldığı EPIYA (Glu-Pro-Ile-**Tyr**-Ala) motiflerini kodlarlar ve bu sebeple de EPIYA gen kaseti olarak da adlandırılırlar. Konak hücrenin hücre sinyal sistemini tirozin fosforilasyonu yolu ile bozan bu kasetlerin büyüklükleri ve bölgesel olarak 0 ila 6 arasında değişebilen sayıları virulansla ilişkilidir. Mesela Hindistan ve Asya kökenli suşlarda 900-950 bp kadar büyük olan kaset Avrupa kökenli suşlarda 825 bp kadardır. Bu fark Asya kökenli suşlardaki kasetin kodladığı proteinin yaklaşık olarak 10-12 aminoasit daha büyük olmasına yol açmaktadır. Çok sayıdaki çalışmada immünojenik aktiviteyi artıran bu büyüklük farkının Asya ülkelerinde sık görülen mide kanseri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür⁸⁶⁻⁹⁸.

Buna karşılık, gastrik adenokarsinoma, duodenal ülser, mide ülseri, non-ülser dispepsi ve asemptomatik gruplardan izole edilen Avrupa ve Asya kökeni suşların karşılaştırıldığı çok sayıdaki çalışmada ise *cagA* geneotiplerinin ileri sürüldüğü gibi prognozu etkilemediği gösterilmiştir^{13,16,99-102}.

CagA proteini bakteri sitoplazması içerisinde membrana yakın bir bölgede lokalizedir ve dış ortamdaki pH'n düşmesine cevap olarak ribozomlarda üretilir. Sitoplazmik membranı, proton bağımlı üre kanalı (*ureI*) ile geçtikten sonra periplazmik alana gelen CagA proteini, burada şeparon proteinler tarafından şekillendirildikten sonra Tip-IV sekresyon sistemi aparatı ile konak hücre sitozolüne gönderilir. Konak hücre sitozolünde iç membrana lokalize olan CagA hücre içerisinde gerek tirozin fosforilasyonu yolu ile gerekse fosforilasyondan bağımsız olarak çok sayıdaki hücre molekülü ile interaksiyona girerek fonksiyonlarını bozar¹⁰³.

Sitozole transloke olan *cagA* burada SRC kinazlarla ilişkiye girerek yapısında taşıdığı EPIYA motifindeki tirozinle bu kinazları fosforiller. EPIYA hem tirozin

fosforilasyonu, hem de membrana lokalizasyon için gereklidir¹⁰⁴. Fosforillenen kinazlar ökaryotik sinyal transdüksiyon şantını, nükleer faktörleri ve sitoskeletal esnekliği düzenlerler. Fosforilasyon sonucu hücre sinyal sistemleri bozulur. Bu sinyal karışımı, hücrede fonksiyonel ve anatomik bozukluklarla transformasyonel değişimlere sebep olur. CagA'nın hücre içerisinde tespit edilmiş en belirgin hedefi SHP-2 fosfatazıdır. Fokal Adezyon Kinaz (FAK), CagA ile uyarılmış SHP-2'nin substratıdır. FAK'ın SHP-2 ile defosforilasyonu FAK kinaz aktivitesini inhibe eder. Aktif FAK fokal adezyon spotlarını çevirmek için gereklidir. CagA'nın SHP-2'yi fosforillemesi ile fokal adezyonu yavaşlatır, buna bağlı olarak hücreler uzar ve hareketleri artar. Mide kanseri hücrelerinde SHP-2'yi kodlayan *PTPN11* geninin 3. intronundaki G-A değişimine bağlı tek nokta mutasyonu gastrik atrofi ve kanser için yüksek için prediktif bir bulgudur. Bu mutasyonun CagA tarafından indüklendiği düşünülmektedir. Böylece CagA'ya bağlı SHP-2 genindeki deregülasyonların kanser gelişimi için prekürsör bir özellik olabileceği ileri sürülmüş, CagA, SHP-2 dışında, SH2 bölgesi içeren Crk proteinini de taşıdığı tirozin ile fosforile eder. Bu proteinlerin fosforilasyonu da hücreler arası sıkı bağlar ve bağ kompleksinde bozulmaya, sonuç olarak da, epitelyal bütünlüğün bozulmasına sebep olur. CagA fosforilasyon spesifitesini tespit için 19 farklı hücre ile yapılan çalışmada, fosforilasyonun sadece mide mukoza hücrelerinde gerçekleştiği gösterilmiştir^{84,105}.

Hücre sitozölü içerisindeki CagA, fosforilasyondan bağımsız olarak, özellikle, antral ve fundik mukoza hücrelerinde, önce PAK-1 (p21-aktive edilmiş kinaz-1) ve MAPK (Mutasyonla Aktive Edilen Protein Kinaz) kinazları aktive eder. MAP kinazların aktivasyonu ile NF-κB indüklenir. NF-κB'nin uyarılması ile TNF-α (Tümör Nekroz Faktörü), IL-8, GRO-α (Büyüme (Growth) Faktörü alfa), VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme (Growth) Faktörü) ve C-X-C kemokinlerin ekspresyonunda artış görülür. CagA'nın Ras/MAPK üzerinden NF-κB'yı aktive etmesi ile sadece IL-8 üretimini sağlanmakta, IL-1β üretilmemektedir. Diğer taraftan *cagPAI*'a sahip suşlarda peptidoglikan ve CagA'dan bağımsız olarak IκB kinaz (IKK) da NF-κB indükleyebilmektedir. Peptidoglikan, CagA ve IKK tarafından kollektif olarak üretilen proinflamatuvar sitokinler inflamasyonu başlatırlar^{84,106-108}.

İnflamasyon bölgesinde biriken PMNL, monositler, B ve T lenfositler gibi inflamatuvar hücrelerin, *H.pylori* antijenleri ile ilişkisi sonucu aktive olan Th ve Tc

lenfositler, IL-12, IL-18 ve IFN- γ 'nın etkisi ile bölünerek çoğalmaya başlarlar. İlk cevap Th2 nin kontrolündeki humoral cevap olup, karakteristiği IgM, sIgA (sekretuar immün globulin-A) ve IgG dir. Enfeksiyonun kronikleşmesi ile antijen sunan hücrelerde IL-12 üretimi başlar. IL-12 Doğal katil hücreler (NK) tarafından IFN- γ sekresyonuna sebep olur. Bu sitokin sekresyonu ile, dolaşımdaki Th hücre profilide değişir, Th2 ve T0 sayısı azalır, buna karşılık, Th1 sayısı artar. Sonuç olarak doku yıkımı ile karakterize hücresel immunité, yani patolojik otoimmün cevap başlar. Böylece bir taraftan hücresel hasar artarken diğér taraftan da T hücreler tarafından uyarılmış B-lenfositlerin plazmositlere proliferasyonu sonucu, B hücre bazlı foliküler gastrit başlar⁸⁴.

Bu ülserleşmiş veya foliküler yapıdaki primer lezyonlar MALT lenfoma veya mide kanseri için prekürsör lezyonlardır. Otoimmün gastrit ile *H.pylori* gastriti farklı olarak kabul edilmekle birlikte, otoimmün gastrit ile korpus predominant atrofik gastrit histolojik olarak birbirine çok benzemektedir. İmmunolojik çalışmalar aslında bu iki gastrit türünde *H.pylori* kökenli olduğunu göstermektedir. CagA tarafından uyarılan ERK-1 ve ERK-2 (extracellular signal-related kinase), MAP kinazlar hücrede Bcl ailesinden olan anti-apoptotik (Bcl-2, Mcl-1 ve Bclx) ve pro-apoptotik (Bax, Bak ve Bad) proteinlerin ekspresyonunu etkileyerek, özellikle Bcl-2 üretimini azaltır, bax üretimini artırır. Bcl-2 mitokondriya bağlı caspas-3'ü inaktive ederek vakuolizasyon ve apoptozu engeller. Bu engelleme hatalı hücre proliferasyonunun apoptozis yolu ile temizlenmesinin önünü keser ve neoplastik hücrelerin transformasyonunu artırır⁸⁴.

H.pylori tarafından indüklenmiş proinflatuvar sitokinlerden TNF- α da bir endojen tümör promotordur ve bu Tip-alpha olarak tanımlanan gen familyası proteinlerini indükler. Tip-alpha ve HP-MPI, *H.pylori* karsinogenik proteinleri olarak tanımlanır. Diğér taraftan COX-2 (cyclooxygenase-2) ekspresyonundaki artış, *H.pylori* tarafından indüklenmiş kronik gastritin, midenin distalindeki adenokarsinomaya dönüşümü için çok güçlü bir risk faktörüdür ve ayrıca midedeki diğér kanserler içinde muhtemelen yapıcı bir faktördür^{84,109}.

Mongolian gerbillerde yapılan çalışmalarda cagA pozitif *H.pylori* suşlarının gastrik adenokarsinoma ve displaziye provoke ettiğ-i gösterilmiştir. Bu suşlar özellikle β -catenin sinyali aktive ederek ve gastrik hücre membranında ve nükleusunda β -catenin birikimine sebep olur. β -catenin ile ilişkili genler gastrik karsinogenez için bir başlatıcı faktör olarak kabul edilir^{84,110}.

Diğer taraftan korpus dominant atrofik gastrit, mide kanseri için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilir. *H.pylori* suşlarının mide korpusuna kolonizasyonunda *cagPAI* ve CagA'nın şart veya çok önemli bir faktör olduğu yine gerbillerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{76,84}. Bu kolonizasyon, düşük asiditeli korpus predominant atrofinin sebebidir ve prekanseröz lezyon olan atrofi ve mide kanserine gider. Bütün bu verilere dayanarak CagA'nın bir onkoprotein olduğu söylenebilir⁸⁴.

CagA aynı zamanda bakterinin mide epiteline adezyonunu da düzenler. *H.pylori* O antijeni *H.pylori*'nin gastrik epitele bağlanmasında önemli bir adezyon faktörüdür. O antijeni spesifik olarak β -galaktosine bağlı lektin, galektin-3 tarafından tanınır. *H.pylori* infeksiyonlarında galektin-3 ekspresyonu artar ki, bu CagA tarafından aktive edilen MAPK tarafından düzenlenir^{106,107}.

2.7.1.4.2. *vacA* (Vacuolating Cytotoxin) Geni

vacA geni 3933 bp büyüklüğünde bir ORF'dir. *H.pylori* suşlarının tamamında bu gen bölgesi bulunmasına karşılık, suşların yaklaşık olarak % 40-60'ında gen ya inaktif veya düşük aktiviteye sahiptir¹¹¹⁻¹¹⁴.

vacA geni memeli hücrelerinde vakuolizasyona yol açan 87–93 kDa ağırlığında VacA proteinini kodlar. *vacA* geni ilk olarak 1287-1296 aminoasitlik bir prekürsör VacA proteini kodlar. Bu amino asit dizisi sekresyon esnasında karboksiterminal ve aminoterminal bölgelerinden delesyona uğrar ve önce 142 kDa'a düşer, sekresyondan sonra da proteazlar tarafından kesilerek 87-93 kDa'luk aktif protein haline dönüşür. Bu protein bütün ekstrasellüler toksinler gibi iki parçalıdır. Küçük parça p37 apoptozisten sorumlu iken, p58 olarak tanımlanan büyük parça küçük parça ile birlikte vakuolizasyondan sorumludur. *H.pylori* suşlarında iki genetik element birbirleri ile kesinlikle bağlantılı olmasa da *vacA* genellikle *cagA* ile birlikte TipI suşlarında aktif olarak üretilir. Asya kökenli suşların % 98'inde *vacA* ve *cagA* birlikte görülür. *vacA* *Neisseria* ve *Hemofiluslar* gibi bazı bakterilerde görülen mozaik gen yapısına benzer polimorfizm gösterir. Gende bir işaret bölgesi "s" ve bir de yüksek toksisite ile ilişkili olan proteinin kodlandığı orta bölge "m" bulunmaktadır. *vacA* geninin 4 farklı "s" (*s1a*, *s1b*, *s1c* ve *s2*) işaret dizisi^{11-13,16} ile 3 farklı "m" (*m1a*, *m1b* ve *m2*) bölge dizisi¹⁴⁻¹⁶

alleli bulunur. *vacA s1* allelleri, özellikle *s1/m1* kombinasyonu *s2* allelllerine göre daha fazla toksin üretir^{14,100,115}. *cagA/vacA* birlikteliği sadece *vacAs1* alleleline sahip suşlarda görülür. Kuzey Avrupa, İngiltere, İrlanda ve İskoçya gibi Avrupa kökenli suşların çoğunda *s1a*, Merkezi ve Güney Afrika kökenli suşlarda *s1b* allellerinin kombinasyonları görülürken, Asya kökenli suşların % 80'inden fazlasında *s1c* allelinin hakim olduğu gösterilmiştir. Klinik izolatlarda yapılan çalışmalarda *vacAs1/m1cagA* pozitif suşlar, peptik ülser ve gastrik adenokarsinoma ile ilişkili suşlarda daha yüksek prevalansta bulunmuştur. Buna karşılık, *s2/m2* allel kombinasyonu non-toksijenik suşlarda, *s1/m2* kombinasyonu ise nispeten düşük toksisite ile iyi huylu hastalıklarla ilişkili suşlarda bulunmuştur. *vacA m2* alleleline sahip suşların da MALT lenfomalı hastalarda predominant alt tip olduğu ileri sürülmüştür. Asya kökenli suşlar arasında ise *m1* allelinin gerek çocuklarda, gerekse yetişkinlerde görülen duodenal ülserle ilişkili suşlarda daha yüksek prevalansta bulunmuştur^{11-16,86,101}.

VacA toksini bakteride anyon transport kanalları içerisinde birikir. Bu kanallar bakteri ile konak hücre arasındaki pasif transport kanallarıdır. VacA'nın p33 ve p58 bölgeleri VacA'nın vakuolizan, internalizasyon ve bağlanma aktivitelerini düzenlemek üzere birbirlerine yardım ederler. VacA konak hücre duvarındaki fibronektinin arginin-glisin-aspartik asit içeren bölgesi ile ilişkiye girer. VacA – fibronektin ilişkisi hücre içerisinde integrinle düzenlenen fonksiyonları karıştırır ve bozar. VacA ilk olarak, Rac1 GTP'ase tarafından kontrol edilen, F-aktin yapısının üzerinde lokalize olan plazma membran bölgesine bağlanır. Daha sonra pinositoz yolu ile erken endositik kompartman içerisinde hücre içerisine alınır. Geç dönemde endosomdan ayrılır ve hücre nükleusuna yakın bölgelerde vakuolizasyonu indükler. VacA proapoptik proteinler olan Bax ve Bak'ı aktive ederek mitokondriden sitokrom-C salınımını indükler. VacA tarafından indüklenen apoptozis hücre vakuolizasyonundan bağımsızdır⁸⁴.

2.7.1.4.3. *iceA* Geni (Inducible by Contact with Epithelium Gene)

H.pylori'nin önemli virulans faktörlerinden birisi de, mide epitel hücresi ile temas sonrası uyarılan *iceA* genidir. *H.pylori* suşlarında sayıları 14-15 tane olan tip II restriksiyon metilasyon (R/M) enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerden *iceA1* olarak

tanımlanan *hpyI-R* geni epitel hücre ile temas sonucu aktive olmaktadır. Bazı suşlarda *hpyI-M* korunmuş olmasına karşılık, *hpyI-R* mutasyona uğramış ve *iceA2* gen alleli ortaya çıkmıştır. *hpyIII-R*'de görülen mutasyonda yer alan *hrgA* alleli gibi *iceA2* de artan sıklıkta *iceA1*'in yerini almaya başlamıştır. Bu allellerin virulansa katkıları ve klinik önemleri tartışılmaktadır. Batı toplumlarından izole edilen suşlarda *iceA1* varlığı peptik ülser için bir risk faktörü olarak gösterilirken, görülme sıklığı giderek artan *iceA2* ise, daha çok non-ülser dispepsili hastalardan izole edilen suşlarda görülmektedir¹¹⁶. Ancak, Asya ve Amerika kökenli suşlarda *iceA* allellerinin spesifik bir patoloji ile ilişkisi gösterilememiştir^{13,79,80,117}. Brezilya'da yapılmış olan çalışmalarda, *iceA*'nın klinik fark gözetmeksizin izolatların %90'ından fazlasında bulunduğu bildirilmiştir^{80,117}.

2.7.1.4.4. *oipA* (Outer Inflammatory Protein) Geni

H.pylori hücre duvarında yer alan OMP'lerinden (outer membrane protein – dış zar proteini) 32'sinin gen yapısı tamamen deşifre edilmiştir. *H.pylori oipA* (HP0638) geninin kodladığı OipA proteininin, *cagPAI* gibi IL-8 ekspresyonunda rol oynadığı ve klinik önem arz ettiği bildirilmiştir^{82,118,119}.

2.7.1.4.5. Diğer Gen Bölgeleri

Mide kanserli hastalardan izole edilen suşlarda esnek bölge - *plasticity region* olarak tanımlanan ve *H.pylori* genomundaki en değişken bölgeyi oluşturan yeni bir ORF bölgesi gösterilmiştir¹²⁰. Büyüklüğü suşlar arasında değişkenlik gösteren (J99 suşunda 45 kb ve 26695 suşunda ise 68 kb) bu bölgelerde, mide kanseri oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen genler (*JHP940* ve *JHP947*) ile gastritle ilişkili olduğu düşünülen ve sadece 26695 suşunda gösterilen bir gen (*HP986*) yer almaktadır^{120,121}. Santos A ve ark.¹²¹; mide kanseri, ülser ve gastritli hastalardan izole ettikleri 200 suş ile yaptıkları PCR bazlı çalışmada, sadece *JHP947* genine sahip suşların kanser ve ülser ile ilişkili olduklarını, diğer iki genin ise hastalığın prognozuna etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Ancak, bu araştırmacılar¹²¹ *JHP947* geninin *cagA* ile birlikteliğine

dikkat çekmiş ve bu yeni genin *vacA* ve *cagA* ile birlikte önemli bir virulans faktörü olabileceği ileri sürmüşlerdir.

H.pylori'nin bir başka önemli virulans faktörü Fts (filamentation-temperature-sensitive) membran proteinidir ve *fts* geninde kodlanır. Bu protein salgılanan proteinlerin transportunda rol oynar ve proteolitik aktiviteye sahiptir. Benzer bir proteinin *E.coli*'de ekstrasellüler virülans faktörlerinin hücre dışına taşınmasında rol oynadığı gösterilmiştir^{122,123}.

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, *HP1118* geni; kodladığı 40 kDa ve 22 kDa'luk iki parçadan oluşan proteinin gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) aktivitesine sahip olması sebebi ile *ggt* olarak adlandırılmıştır. Bu proteinin *H.pylori* infeksiyonlarında gastrik hücrelerdeki apoptozdan sorumlu olduğu, *ggt* geninin blokajı veya *ggt* mutant suşlarla oluşan infeksiyonlarda apoptozun da bloke edildiği gösterilmiştir^{124,125}.

Dış membran proteinleri kodladıkları varsayılan *jhp0870* geni ve onun %90 homoloğu olan *jhp0649* geninin yeni virulans faktörleri olabileceği bildirilmiştir^{126,127}. Bu genlerin allelik varyasyonları orta bölgelerinde gözlenmiştir. *jhp0870* Portekiz'li çocuklarda peptik ülser hastalığı (PUD) ile ve daha virulan genotiplerle (*cagA*, *vacAs1* ve *babA2* genleri pozitif olan suşlarla) ilişkilendirilmiştir¹²⁶. Bu bilgiler ışığında Oleastro M. ve ark.¹²⁷, bu iki genin değişik ülkelerdeki prevalansını ve hastalıklarla ilişkisini araştırmış ve *jhp0870* geninin PUD ile, *jhp0649* geninin ise mide kanseri ile ilişkilendirilmeye eğilimi olduğunu bildirmişlerdir.

2.7.2. Hastaya Ait Faktörler

H.pylori infeksiyonlarının insidansı ve prognozunda hastaya ait; yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, genetik yatkınlık, eğitim düzeyi ve aile yapısı gibi faktörlerin etkisi epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir^{7,49,50,74,84}. Örneğin ailede mide kanseri öyküsünün varlığı *H.pylori* ile birlikte mide kanseri riskini artırmaktadır. Ancak, çoğu gözleme dayalı bu ve benzer tespitlerin moleküler düzeyde izaha ihtiyacı vardır. *H.pylori*'ye yönelik moleküler çalışmalar konakta özellikle gastrik mukozada predispozan genetik materyalin de tespitine yönelmiştir. Örneğin, *H.pylori* mide

kolonizasyonu ile midede epitel hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen sürfaktan protein-D (SP-D) arasındaki ilişki, mide biyopsi örneklerinde SP-D kodlayan gene ait mRNA bölgelerinin kantitatif RT-PCR (Reverse Transcriptase - PCR) kullanılarak tespiti ve epitel yüzeyindeki SP-D'nin varlığının immunfloresan yöntemi kullanılarak tespiti ile gösterilmiştir. MALT'a ait organlarda doğal immunité proteinleri içerisinde yer alan, midede pilordaki mukus salgılayan hücrelerde, akciğerde özellikle tip II alveoler hücrelerde, terde, plasentada ve amniyotik sıvıda görülen SP-D proteinleri bakterilerde LPS'ye bağlanıp hem hareketlerini durdururarak invazyon yeteneklerini sınırlamakta hem de fagositozu kolaylaştırmaktadır. İnsanlarda 10q22.2-23.1 kromozomda kodlanan SP-D gen aktivitesinin *H.pylori* infeksiyonlarında arttığı gösterilmiştir^{3,84}. Yine MALT'la ilgili t(11;18)(q21;q21) spesifik kromozomal translokasyon *H.pylori* MALT lenfomaya zemin hazırlamaktadır. Bu translokasyon AP12 geninin amino terminal ucu ile MALT1 geninin karboksi terminal ucunun birleşmesi sonucu şekillenen bir şimerik füzyon ürünüdür. Kronik inflamatuvar hastalıklarda tetiklenerek lenfomaları başlatan bu yapı, pulmoner lenfomalarda olduğu gibi MALT lenfomada da sık görülmüş ve *cagA* tarafından indüklenen radikallerin bu gen bölgesini aktive ederek MALT lenfomayı başlattığı ileri sürülmüştür⁸⁴.

H.pylori infeksiyonlarında kilo kaybı, anemi ve gelişme geriliği görülen bazı hastalarda fundus bezlerinde mRNA ve salgılanan leptin seviyesinde azalma, buna karşılık, plazma leptin seviyesinde ise artış kaydedilmiştir⁸⁴. Midedeki lokal leptin seviyesindeki düşüklüğün mü *H.pylori*'ye zemin hazırladığı, yoksa *H.pylori* infeksiyonlarının IL-6, IL-8 ve TNF-alfa gibi inflamatuvar mediatörler üzerinden mi mide leptin seviyesini düşürdüğü daha geniş hasta grupları ile yapılacak moleküler çalışmalarla aydınlatılabilecektir.

H.pylori infeksiyonlarının patogenezi aydınlatmak amacı ile moleküler yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma ve hedef olarak belirlenen gen bölgeleri bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmalarda elde edilen sonuçların çoğu hala lokal hipotezden öteye geçmemiş olduğu için, burada sadece nispeten daha çok kişi tarafından kabul görmüş sonuçlar verilmeye çalışılmıştır⁸⁴.

2.8. *H.pylori* İnfeksiyonlarında Tanı

H.pylori infeksiyonlarında tanı klinik bulgular, klinik materyalde mikroorganizmanın kendisinin, genomuna ait spesifik dizilerinin, antijenlerinin veya antijenlerine karşı konakta gelişen antikor cevabının gösterildiği mikrobiyolojik yöntemler ve histopatolojik incelemelerle konur¹²⁸.

2.8.1. Klinik Tanı

H.pylori infeksiyonlarında tedavi ve tanı kriterlerinin belirlendiği Maastrich uzlaşmasına göre; infeksiyonların sporadik olarak görüldüğü gelişmiş ülkelerde hastaların endoskopi altında klinik ön tanılarının konulması ve endoskopi esnasında alınan biyopsi materyali ile laboratuvar tanının desteklenmesi istenmektedir³². Bu ülkelerde endoskopik girişim ve biyopsi materyali gerektirmeyen non-invaziv testler de ikinci derecede tanı kriteri olarak önerilmektedir. Buna karşılık, infeksiyonların endemik şekilde görüldüğü gelişmekte olan ülkelerde 5 yaş altı ve 45 yaş üzeri hastalar ile alarm semptomlara sahip bütün yaş grubundaki hastalar hariç, tanıda endoskopi, pahalı ve zaman alıcı olması sebebi ile önerilmemekte, tanının klinik bulgulara dayandırılması ve non-invaziv testler yardımı ile de desteklenmesi önerilmektedir^{32,129,130}. Kanama, kusma, bulantı, altta yatan kronik bir hastalık, aşırı kilo kaybı gibi alarm semptomları olan hastalarda ise endoskopik girişimi takiben biyopsi bazlı invaziv testlerle tanının konması istenmektedir. Son yıllarda birinci seçenek antibiyotiklere direnç gelişimindeki artış, endemik ülkelerde de alarm semptomlar olmaksızın biyopsi bazlı tanıyı gerekli hale getirmiştir^{129,130}.

Endoskopik muayene; lezyonun lokalizasyonuna bağlı olarak klinik prognozu (antrumdaki lezyon: duodenal ülser, korpusdaki lezyon: atrofik gastrit, gastrik ülser veya karsinomalar), gastritin formlarını (normal mukoza, akut veya kronik gastrit, fokal veya granülatöz gastrit veya lenfositik gastrit) ve tanı için hangi yöntemin (Üre Soluk Testi, biyopsi alınması veya kültürde izolasyon gibi) daha uygun olacağını belirlemesi açısından son derece önemlidir¹²⁹.

2.8.2. Mikrobiyolojik Tanı

H.pylori infeksiyonlarının doğru ve hızlı tanısı, tedaviye erken başlanması ve eradikasyon tedavisinde başarının takibi için önemlidir. *H.pylori* infeksiyonlarında klasik mikrobiyolojik tanı; Dışkı Antijen Testleri (HPSA - *H.pylori* Stool Antigen Tests), Üre Soluk Testleri (ÜST) ve serolojik testleri içeren non-invaziv testler ve endoskopik muayeneyi de zorunlu kılan biyopsi bazlı; Hızlı Üreaz Testleri (HÜT), kültürde izolasyon ve Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri'ni (NAAT) içeren invaziv testler ile konmaktadır^{128,129}.

2.8.2.1. Non-invaziv Testler

Bu grup içerisine, serolojik testler, Üre Soluk Testi (ÜST), dışkıda antijen arayan testler ve PCR bazlı testler girmektedir¹²⁸.

2.8.2.1.1. Serolojik Testler

Serolojik testler ilk uygulanan non-invaziv testlerdir. Hastaların serumunda, plazmasında ve sekresyonlarında IgG antikorlarının tespiti için geliştirilmiştir. Ancak kullanımı vardır. Bu testler mikroorganizma ile teması işaret eder, ancak hali hazırda devam etmekte olan bir infeksiyonu göstermezler. *H.pylori* antikorları tedavi edilen hastalarda bile en az bir yıl kanda ölçülebilir seviyelerde kalmaya devam eder. Buna karşılık, testlerdeki antijen kalitesi ve uygulama farklılığı gibi sebeplerle özellikle de çocuklarda serolojik testlerle olguların % 20-30'una yalancı negatif tanı konur. *H.pylori* tanısında ilk kullanılan serolojik test ELISA'dır (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Onaltı farklı ticari ELISA kiti kullanılarak yapılmış 21 çalışmaya ait meta-analiz sonuçları; bu testlerin duyarlılığının % 85, özgüllüğünün de % 79 olduğunu göstermiştir. Testlerin doğruluk oranı da % 78 (68-82) olarak bulunmuştur. Duyarlılık ve özgüllüğü artırmaya yönelik çabalar sonucu vacA ve cagA gibi klinik ve patolojik

önemi olan spesifik proteinlere karşı antikor cevabını ölçebilen ELISA, Rekombinant IB ve Western Blot (WB) gibi yeni serolojik yöntemler geliştirilmiştir¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.1.2. Üre Soluk Testi

Nispeten pahalı bir yöntem olmakla beraber gerek tanı gerekse tedavinin takibi amacı ile kullanılabilen yüksek duyarlılık (% 95) ve özgüllük (% 100) oranına sahip testlerdir. Hastanın sitrik asit içerisinde 75 mg ¹⁴C veya ¹³C ile işaretli üreyi yutmasından 30 dakika sonra nefes örnekleri toplanır. Mide lümeninde *H.pylori* üreaz enzimi ile parçalanmış radyoaktif karbon işaretli üreden karbon ayrılarak mide mukozasında emilerek kana karışır. Kan yolu ile akciğere gelen radyoaktif karbon mass spektrometre ile kantite edilir. ¹³C içeren ÜST radyoaktif madde içermemesi, gebelerde ve çocuklarda kullanım güvenliği gibi sebeplerle tercih edilmekte olup, non-invaziv testler içinde altın standarttır. Ancak bu test antibiyotik, PPI veya ranitidin kullanan hastalarda % 40 oranında yalancı negatif sonuçlar vermektedir¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.1.3. Dışkıda Antijen Arayan Testler (*H.pylori* Stool Antigen Tests)

Dışkıda *H.pylori* antijenlerini tespiti yönelik testler non-invaziv testler arasında yer alan ÜST'ye en iyi alternatif olarak görülmektedir. Dışkıda *H.pylori* antijenlerini tespit amacı ile kullanılan ve ticari olarak geliştirilmiş iki temel sistem bulunmaktadır. Bunlardan ilki tavşanlardan elde edilen poliklonal antikorların kullanıldığı “Premier Platinum HpSA” (Meridian Diagnostics, Inc., Cincinnati, Ohio) olup, poliklonal antikorlar kullanılmaktadır. Bu testin, yüksek özgüllük göstermesine karşılık, özellikle bakteri yoğunluğunun düşük olduğu örneklerde duyarlılığı genellikle düşük bulunmuştur. Bir diğer test ise monoklonal antikor karışımının kullanıldığı “FemtoLab *H.pylori*” (Connex GmbH, Martinsried, Germany) test kitidir. FemtoLab *H.pylori* HpSA'dan daha duyarlı ve benzer özgüllükte bulunmuştur. Bu testlerin duyarlılıkları lot bağımlı değişmekte ve kullanılan antijenler bilinmemektedir. 260 kDa ağırlığındaki *H.pylori* katalaz enziminin antijen olarak kabul eden monoklonal antikorun kullanıldığı

yeni bir antijen testi daha geliştirilmiştir. Katalaz antijeninin tüm hastaların dışkıında görülen 3 antijenden birisi olması nedeni ile bu testin duyarlılık ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.1.4. Moleküler Bazlı Testler

Diş taşları, tükürük, mide sıvısı aspiratı ve dışkıda *H.pylori* spesifik gen dizilerinin PCR ve modifikasyonları ile amplifikasyonları esasına dayalı testlerdir. Bu testlere ait bilgiler invaziv testlerin sonunda tartışılacaktır¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.2. İnvaziv Testler

İnvaziv testler üst gastrointestinal endoskopi girişimi ve lezyondan alınan biyopsi materyalinin incelenmesi esasına dayalı testlerdir. Bu testler arasında direkt bakı ile doku hasarının lokalizasyonunun tespiti, histolojik muayene, HÜT, mide biyopsi örneğinden veya mide sıvısından bakteri üretilmesi ve *H.pylori* spesifik gen bölgeleri ve allellerinin özgül primerler yardımı ile amplifikasyonu ve muhtemel mutasyonları tespiti yönelik moleküler tanı yöntemleri yer almaktadır¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.2.1. Histolojik Muayene

H.pylori infeksiyonlarında histolojik tanı dokudaki inflamasyonun ve varsa prekarsinojen değişimlerin şiddetini belirlemek amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüğü çeşitli faktörlerin etkisi altında olmakla beraber sırası ile <% 90 ve >% 95'dir. Bu oranlar biyopsi ve araştırmacıya ait faktörler tarafından değişir. Muhtemel örnekleme hataları mikroorganizmanın farklı kolonizasyon yoğunluğuna bağlı olabilir. İnfekte midede pilorun küçük kurvatüründen alınan örneklerde pozitif bulma şansı % 90'ın üzerine çıkmaktadır. Duyarlılık antrum ve gövdeden en az iki örnek alınması ile arttırılabilir. Kullanılan boyama yöntemi de

sonuçları etkiler. Sıklıkla, modifiye Giemsa, Warthin-Stary, modifiye McMullen ve Gimenez gibi histokimyasal veya IFAT (İmmün Floresan Antikor Testi) ve IP (İmmün Peroksidaz) gibi immunohistokimyasal boyalar kullanılmaktadır. İmmunohistokimyasal boyalar histolojik muayenede en duyarlı ve özgül metodlar olup altın standarttır¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.2.2. Kültürde İzolasyon

H.pylori'nin seçici kültür ortamlarında üretilmesi tanıda altın standarttır. Ancak bu yöntem örneğin sayısı veya büyüklüğü, örnekteki bakteri miktarı, örneğin taşınma şekli ve süresi, kullanılan besiyerleri ve inkübasyon şartları ile çalışanın tecrübesine dayanarak değişken duyarlılık gösterir. Optimal şartlarda duyarlılık ve özgüllük sırası ile <%90 ve %100'dür. Bakteri dış şartlardan kolaylıkla etkilenecek şekilde üretilmeyen kok-dormant-formlara dönüştüğü için, örnek materyal hemen laboratuara taşınır ve ekilirse izolasyon şansı artmaktadır. Ancak, hemen değerlendirilemeyecek örnekler için taşıma besiyerleri kullanılmaktadır. Biyopsi örneklerinin taşınmasında tuzlu su, % 20 glukoz ve Stuart transport medium gibi besiyerleri kullanılmıştır. Stuart besiyerinde taşınan örnekteki bakterinin +4 °C'de 24 saat yaşayabildiği, ancak inkübasyon ısısının >+15 °C'ye çıkması halinde ise yaşama süresinin 6 saate kadar indiği gösterilmiştir. *H.pylori* güç üreyen bir bakteridir. Dışkı, dış plakları, tükürük, su ve gıda gibi örneklerdeki *H.pylori* suşlarını üretmek imkansız derecede zordur. Bu amaçla antibiyotikli Wilkins–Chalgren agar kullanılabilir. Ancak optimal şartlarda dahi izolasyon şansı %10'u geçmemektedir. *H.pylori*'nin su ve gıda gibi örneklerdeki varlığını tespit için a) immuno-separation (IMS)- PCR, b) [³H]thymidine işaretli probaların kullanıldığı otoradyografi yöntemi c) ATP- bioluminescence reaksiyonu gibi canlı bakteriyi tanıyan duyarlı ileri teknikler kullanılmaktadır¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.2.3. Hızlı Üre Testi (HÜT)

Mide biyopsi örneklerinde *H.pylori* üreaz aktivitesinin tespiti prensibine dayalı bir testtir. Test ortamında kullanılan üre besiyerinde örnekteki *H.pylori*'nin üreyi

hidrolizi sonucu açığa çıkan amonyağın pH'ı yükselterek renk indikatörü olan fenol kırmızısında renk değişikliği yaratması esasına dayanır. Orofarenkste yerleşen ve üreaz üreten bazı kommensal bakteriler tükürükle gastrik biyopsi örneğini kontamine edebilir. Ancak böyle zayıf enzimler midenin asidik lümeninde (pH<2) kolayca denatüre edileceklerinden testin özgüllüğünü etkilemezler. Ticari olarak kullanıma sunulan gel test (CLO test, Hpfast), strip test (pyloriTek) ve tablet testler bulunmaktadır. Bunların duyarlılığı % 80-95, özgüllüğü de % 95-100'dür. Duyarlılık örnekteki bakteri miktarından etkilenir. Yapılan kantitatif çalışmalarda örnekte en az 10^4 bakteri olması halinde pozitif sonuç alınmaktadır¹³⁰. Birden fazla biyopsi örneğinin kullanılması halinde duyarlılığın artabileceğini bildirmişlerdir. Bu testler kanayan, aklorhidrili, antibiyotik ve/veya proton pompa inhibitörü kullananlarda düşük duyarlılık göstermektedir¹²⁸⁻¹³⁰.

2.8.2.2.4. Moleküler Tanı Yöntemleri

Son yıllarda moleküler biyolojik tanı yöntemleri *H.pylori* biyolojisi, infeksiyonlarının tanısı, spesifik virulans faktörlerinin tayini, konakta ortaya çıkan cevabın genetik temeli, antibiyotik direncinin belirlenmesi, eradikasyon tedavisinden sonraki tekrarlayan infeksiyonların nedeninin tespit edilmesi ve kültürde üretilmeyen kokoid formların tanımlanması gibi amaçlar için yoğun olarak kullanılmıştır. Ancak nükleik asit amplifikasyon bazlı teknikler, canlı ve ölü bakteri ayırımını yapamadıkları için yalancı pozitif sonuçlar verebileceklerinden eradikasyon tedavisinin takibinde önerilmemiştir. *H.pylori* izolatlarında moleküler tanı yöntemleri kullanılarak belirlenen gen mutasyonları, suşların coğrafî ve etnik dağılımlarının yanı sıra kolonize toplulukların etnik geçmişlerini tayinde de önemli bilgiler üretmiştir. Moleküler yöntemlerle, kültür ortamlarında üretilen bakterilerin yanı sıra, tükürük ve diş plakları, mide sıvısı ve biyopsi örnekleri ile dışkı gibi örneklerde de *H.pylori* suşlarına ait spesifik nükleik asit dizilerini direkt olarak araştırmak mümkündür¹²⁹.

H.pylori ile yapılan moleküler düzeyli çalışmalarda, suşların özgül nükleik asit bölgelerinin PCR, RT-PCR, nested-seminested-PCR, kalitatif-kantitatif PCR, multipleks PCR, RAPD, AFLP-PCR, RFLP ve PCR-RFLP gibi amplifikasyon ve

restriksiyon bazlı fingerprinting yöntemleri ile DNA dizi analizi ve mikroarray yöntemi gibi modifiye moleküler teknikler kullanılmıştır. Birçok mikroorganizmanın genotipik tanımlamasında kullanılan PFGE yöntemi, suşlarının uzun tanıma bölgesine sahip restriksiyon enzimlerine ve in-situ hibridizasyona dirençli olmaları sebebi ile *H.pylori* genotiplemesinde çok fazla kullanılmamıştır¹²⁹⁻¹³¹.

2.8.2.2.4.1. Amplifikasyon Bazlı Yöntemler

Amplifikasyon yöntemleri ile *H.pylori*'nin 16S rRNA geni, *cagA*, *vacA* ve allelleri, *cagE* ve alleli, *iceA* ve allelleri, *babA* ve *babB*, *ureA*, *ureB* ve *ureC(glmM)* geni, RNA polimeraz altünitlerini kodlayan *rpoB* ve *rpoD* genleri ve HP0638 gibi özgül ve virulansla ilgili olduğu düşünülen genlerin varlığı araştırılmıştır. Çalışmalarda çeşitli PCR modifikasyonları denenmiştir. Bu tekniklerin tamamı kültür ve histolojik inceleme başta olmak üzere kıyaslandıkları diğer yöntemlere göre daha yüksek özgüllük (% 98-100) ve duyarlılık (10-100 cfu bakteri/0.1 pg DNA) ile yüksek pozitif ve negatif prediktif değerlerine (PPV – NPV) sahip, hızlı ve güvenilir testler olarak yorumlanmıştır¹²⁹. Ancak bu yöntemler, sonuçları etkileyecek olan örnek seçimi, taşınma şekli, DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntemler, amplifikasyon için seçilen gen bölgeleri ile primer dizilerinin tam olarak standardize edilememiş olması sebebi ile rutin tanıdan çok araştırma amaçlı olarak kullanılmıştır. *H.pylori* araştırmalarında kullanılan amplifikasyon bazlı yöntemlerde iki önemli sorun bulunmaktadır. Bunlar; a) örnekleme ve nükleik asit ekstraksiyonu, b) hedef diziler ve seçilen primerlerdir¹²⁹⁻¹³¹.

2.8.2.2.4.1.1. Örnek Seçimi ve Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Örnek sıklıkla mide biyopsi dokusudur. *H.pylori* mide mukozasında yamalı bohça benzeri dağılım gösterdiği için, alınan her örnek kolonizasyonu temsil etmeyebilir. Antrum ve korpustan alınan biyopsi örneklerinde, farklı suşlarla kolonizasyon farklı sonuçlar yaratabilir. Hastanın yaşı veya hastalığın süresi de mide biyopsisi bazlı yöntemlerde duyarlılığı düşürür. Çünkü uzun süren enfeksiyona bağlı

olarak gelişen atrofik gastrit veya intestinal tip hücre artışı *H.pylori* için duyarlı epitel alanını azaltır. Bu nedenle yaşlı veya kronik infeksiyonu olan hastalarda örnek iyi seçilmeli ve birden çok alınmalı veya biyopsi yerine gastrik sıvı örnekleri amplifikasyon amacı ile kullanılmalıdır. Biyopsi örneklerinden *H.pylori* nükleik asitlerini elde etmek için genellikle 3 yöntem kullanılmaktadır. Bunlar DNA ticari ekstraksiyon kitlerinin kullanımı, Proteinaz-K, fenol kloroform ekstraksiyonu ve kaynatmadır. Çeşitli çalışmalarda bu üç yöntem için farklı değerlendirmeler yapılmıştır. Proteinaz-K, fenol-kloroform yönteminin en kaliteli DNA eldesine imkan veren yöntem olduğu bir çok yayında ileri sürülürken, işlemlerin artması halinde taşınma kontaminasyon riskinin artacağı, proteinaz-K ve fenol tam olarak uzaklaştırılamayacağı için duyarlılığın düşeceği, işlemin ne kadar basit olursa, sonuçta elde edilen DNA'nın o derecede saf olacağını bildiren yayınlar da vardır^{6,129,130}. Örneğin doku biyopsi örnekleri çalışılıyorsa inhibitörleri engellemek ve temiz DNA elde etmek için; dokunun mekanik olarak parçalanması, daha sonra ya olduğu gibi veya Chelex-100 gibi bir zayıf katyonik ajan ilave edilerek kaynatılması önerilmektedir. Klinik örneklerde moleküler yöntemlerin duyarlılığını düşürecek muhtemel inhibitörler çok sayı ve miktarda bulunabilir. Bunlardan korunmak için PCR reaksiyon karışımına % 0.5 bovin serum albumin ilave edilmesi ve ekstraksiyonda mümkün olduğu kadar az kimyasal kullanılması önerilmektedir. Dışkı gibi bakteri yoğunluğunun düşük, inhibitör maddelerin yoğunluğunun yüksek olduğu örneklerde DNA ekstraksiyonu esnasında % 0.5 bovin serum albumini kullanımı veya QIAmp Stool Mini Kit (Qiagen, Milan, Italy) gibi standardize edilmiş ekstraksiyon kitlerinin kullanımı önerilmektedir¹³⁰. Ayrıca, örnekteki bakteriyi yoğunlaştırmak için *H.pylori* kaplanmış manyetik partiküllerin kullanılmasının duyarlılığı artırdığı bildirilmiştir¹²⁸⁻¹³¹.

2.8.2.2.4.1.2. Hedef Bölge ve Primerlerin Seçimi

Hedef bölgeler çalışma amacına göre belirlenmelidir. Örneğin 16S rRNA diğer helikobakterlerde ve bazı gram negatif bakterilerde ortak dizilere sahip olduğu için bu bölgeleri hedef alan primerlerle yüksek duyarlılıkta ancak düşük özgüllükte sonuçlar alınmaktadır. Bu bölge hedef alındığında, ampikonlar uygun bir restriksiyon

endonükleaz enzimi ile kesildikten sonra ortaya çıkan band profiline göre (PCR-RFLP) *H.pylori* veya diğer helikobakterlerin tanısı konulabilir. Oysa *ureC* ve *ureA* genleri *H.pylori* için son derece spesifik olup, NAAT direkt tanı için kullanılacaksa bu genlere ait spesifik dizilerin hedef olarak alınması tanıyı yüksek özgüllük kazandıracaktır. *H.pylori* tanısında uygulanan farklı PCR protokollerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kültür pozitif 24 biyopsi örneği ile kültür negatif 26 biyopsi örneği, *16S rRNA* genini hedef alan 3 farklı primer seti, *ssa* genini tanıyan bir primer seti, random seçilmiş dizileri tanıyan bir primer seti, *ureA* geni ve *ureC* genini hedef alan primer setleri kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar kültür pozitifliği ile kıyaslanmıştır¹³¹. Sonuçta, *16S rRNA*'yı hedef alan primerlerin diğer primerlere göre 10 kat daha duyarlı olmasına rağmen (0.01 pg DNA - 0.1 pg DNA) özgüllüğünün çok düşük olduğu gösterilmiştir. Beş farklı bölgeyi hedefleyen PCR protokolleri içerisinde *ureA* genini hedef alan PCR'nın duyarlılığı düşük, özgüllüğü yüksek olarak bulunmuştur. Hem duyarlılığı, hem de özgüllüğü yüksek olarak gösterilen *ureC* genini hedef alan PCR'nın PPV değeri %100, NPV değeri de %96 olarak bulunmuştur¹³¹. Mide biyopsi örneklerinde patogenezele ilişkili olduğu için çalışmalarda öncelikli hedef olan *vacA* ve *cagA* gibi genlerin aynı allellerinin amplifikasyonu için kullanılan farklı primerlerin farklı duyarlılıkta sonuçlar ürettiği gösterilmiştir¹¹⁻¹⁶. Bu sebeple biyopsi örnekleri önce *ureC* veya *ureA* genleri için pozitif bulunduktan sonra, kalan DNA ekstraktı ile gerekiyorsa *H.pylori* için araştırılması düşünülen *cagA*, *vacA*, *iceA* gibi diğer gen bölgelerinin amplifikasyonuna geçilmelidir¹³¹.

Dışkıda *H.pylori* tanısında NAAT kullanılacaksa, hedef gende mümkün olan en kısa fragmenti tanıyan primerlerin seçilmesi önerilmiştir. Diş taşlarında *H.pylori* tespiti için dizayn edilmiş PCR çalışmalarında % 0-97 arasında prevalans bildirilmiştir. Bu büyük fark toplumsal hijyen veya kültür farkından çok PCR protokollerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır^{6,129}.

H.pylori PCR tekniklerinde amplifikasyon tekniklerindeki genel problemlere karşı duyarlı olunmalı, yalancı negatiflik veya pozitifliğe karşı universal tedbirler alınmalıdır. Yalancı negatif sonuçların belirlenmesi için mutlaka internal kontroller kullanılmalıdır. Özellikle ekstraksiyon aşaması birden fazla olan protokollerde kros kontaminasyonlar her zaman risk olarak kabul edilmeli ve bunun için dTTP yerine dUTP kullanılmalıdır. Ayrıca primer-dimer oluşumunu engellemek için de "hot-start"

yöntemi kullanılmalı ve reaksiyon karışımı içerisine 16mM amonyum sulfat veya DMSO ilave edilmelidir^{6,130}.

2.8.2.2.4.2. Restriksiyon Bazlı Yöntemler

Bu yöntemlerde ya total genomik DNA veya genomda amplifiye edilmiş spesifik bir bölgenin, restriksiyon enzimleri (SauII, BglII, HhaI, HaeIII, MboI veya MseI) ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan fragmentlerin sayısı ve büyüklükleri dikkate alınarak tür, suş ve allel düzeyinde tanı konabilir^{6,129,130}.

Genel olarak, seçilecek tanı yöntemi bölgenin ve hastanın özellikleri dikkate alınarak seçilmelidir. Testlerin birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları tablo 2.2’de özetlenmiştir¹³⁰.

Tablo 2.2. *H.pylori* tanı yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıkları.

Testler	Tedavi öncesi (n=192)		Tedavi sonrası (n=81, 18 <i>H.pylori</i> positive)	
	Sensitivite	Spesifite	Sensitivite	Spesifite
Giemsa	% 90	% 100	% 47	% 100
W. Stary	% 59	% 95	% 47	% 65
IH	% 83	% 100	% 72	% 100
Kültür	% 87	% 100	% 72	% 100
CLO test	% 87	% 100	% 72	% 100
HÜT	% 84	% 99	% 83	% 100
IgA	% 78	% 86	% 80	% 63
IgG	% 81	% 86	% 76	% 37
Tam Kan Ig	% 85	% 83	% 89	% 42
13C-UBT	% 74	% 96	% 35	% 95
HpSA	% 61	% 100	% 25	% 100

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve Taşınması

H.pylori genotipleri ile gastrit/mide ülseri ve duodenal ülser arasındaki muhtemel ilişkiyi moleküler epidemiyolojik yöntemlerle tespiti amaçlayan bu çalışmaya; Ocak 2005 – Ocak 2006 tarihleri arasında kalan toplam 12 aylık süre içerisinde gastroduodenal yakınmalarla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı ile Sağlık Bakanlığı Adana Çukurova Devlet Hastanesi Gastroenteroloji polikliniklerine başvuran ve endoskopik olarak gastrit ve mide ülseri veya duodenal ülser tanısı konulan, daha önce tedavi almamış, 96'sı (% 41.6) kadın, 135'i (% 58.4) erkek olmak üzere toplam 231 hastadan birisi antrum ve birisi korpus bölgelerinden olmak üzere alınan 462 biyopsi örneği dahil edildi. Örnekler, gastritli ve/veya mide ülserli (G/MÜ) hastalar ile duodenal ülserli (DÜ) hastalar olmak üzere iki hasta grubuna ayrılarak, moleküler epidemiyolojik araştırma için kullanıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Antrum ve korpus biyopsi örnekleri değerlendirilen hastaların cinsiyete ve hasta gruplarına göre dağılımı.

	Kadın Sayı (%)	Erkek Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
G/MÜ	69 (71.9)	89 (65.9)	158 (68.4)
DÜ	27 (28.1)	46 (34.1)	73 (31.6)
Toplam	96 (41.6)	135 (58.4)	231

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar;

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

Biyopsi örnekleri % 3 gliserin içeren Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu (BHIB) içerisine alınarak en geç 2 saatte laboratuvara ulaştırıldı ve *H.pylori* genotiplemesi için kullanılmak üzere ekstrakte edilene kadar -20 °C'de saklandı.

3.1.1. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu

Biyopsi örneklerinin laboratuvara taşınması amacı ile kullanıldı (OXOID LTD. CM0225).

Calf brain infusion solids	12.5 gr
Beef heart infusion solids	5 gr
Proteose peptone	10 gr
Glucose	2 gr
Sodium chloride	5 gr
Di-sodium phosphate	2.5 gr
Distile Su	1000 ml
pH: 7.4 ± 0.2	

3.1.1.1. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonunun Hazırlanışı

37 gram toz besiyeri 1000 ml distile suda çözülüp, otoklavda 121 °C’de 15 dakikada steril edildi. Üzerine otoklavda steril edilmiş gliserinin alt fazından son konsantrasyonu % 3 olacak şekilde eklenerek karıştırıldıktan sonra tüplere ikiye ml döküldü.

3.2. PCR Uygulamaları

Mide biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapıldı ve bu ekstraktlar önce *ureC* (*glmM*) gen dizisinin tespiti yönünden spesifik primerler yardımı ile PCR yöntemi ile incelendi. *ureC* geni pozitif bulunan örneklerin DNA ekstraktları *cagA* ve *vacA* genlerinin, *vacA* geni pozitif bulunan örneklerin DNA ekstraktları da *vacA* allellerinin tespiti için PCR yöntemi ile değerlendirildi.

3.2.1. Biyopsi Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

Bu çalışmada biyopsi örneklerinden *H.pylori* DNA'sının ekstraksiyonu için QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (Lot No: 11872534, Kat No: 51306) doku ekstraksiyon kiti kullanıldı.

3.2.1.1. Uygulama

1. Yaklaşık 25 mg doku örnekleri 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı. Bunların üzerlerine 180 µl ATL buffer (doku lizis tamponu) ve 20 µl pK (proteinaz K) eklenip vortekslendi ve 56 °C'de bir gece bekletilerek tam olarak erimesi sağlandı.
2. İnkübasyondan sonra kısaca santrifüj (short spin) edildi (kapakta sıvı kalmaması için). Üzerine 200 µl AL buffer (guanidine hydrochloride + guanidine tuzları) eklenip 15 sn pulse vorteks yapıldı ve 70 °C'de 10 dk bekletildi. Kısaca santrifüj (short spin) edildi.
3. Üzerine 200 µl etanol (% 96-100) eklenip 15 sn pulse vorteks yapıldı. Kısaca santrifüj (short spin) edildi.
4. Karışım 2 ml'lik toplama tüpü içindeki QIAamp spin kolonlara kenarlarını ıslatmadan boşaltıldı ve 6000 x G'de 1 dk santrifüj edildi (HERAEUS Biofuge Primo R). Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, içi sıvı dolu olan tüp atıldı.
5. Filtrenin üzerine kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW1 buffer (yıkama solusyonu: guanidium isothiocyanate + ethanol) eklenip 6000 x G'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı, içi sıvı dolu olan tüp atıldı.
6. Filtrenin üzerine kenarlarını ıslatmadan 500 µl AW2 buffer (yıkama solusyonu: yüksek konsantrasyonda tuz + ethanol + sodium azide) eklenip 20000 x G'de 3 dk santrifüj edildi (Eğer istenirse, spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılır, içi sıvı dolu olan tüp atılır ve bu aşama tekrar edilir).
7. Spin kolon yeni temiz bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. Üzerine 200 µl AE buffer veya distile su eklendi ve oda ısısında 1 dk bekletilip, 6000 x G'de 1

dk santrifüj edildi. Spin kolon atıldı ve tüpteki sıvıda DNA kaldı (İstenirse, bu aşama da tekrarlanabilir).

Ekstrakte edilmiş DNA içeren tüpler, spektrofotometrede (CHEBIOS s.r.l. Optimum-One UV-VIS Spectrophotometer) 260 nm dalga boyunda DNA yoğunluğu yönünden incelendi ve yoğunluklarının amplifikasyonlar için yeterli olduğu (>3 µg/ml) tespit edildi. Daha sonra bu tüpler araştırılacak olan gen bölgelerinin amplifikasyonları tamamlanincaya kadar -20 °C’de saklandı.

3.2.2. Amplifikasyon

Amplifikasyon aşamalarının gerçekleştirilmesi için Termal Cykler (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Termal Cykler) kullanıldı.

3.2.2.1. *H.pylori ureC (glmM)* Geninin Amplifikasyonu

ureC geninin varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 294 bp uzunluğundaki fragmenti hedef alan glmM1-F (5’-AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T-3’) ve glmM2-R (5’-AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC-3’) primerleri kullanıldı (Tablo 3.2). Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP’den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2.5 U *Taq* polymerase ve 5 mikrolitre kalıp DNA içeren toplam 50 mikrolitre PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları aşağıdaki şekilde tamamlandı:

1. 94 °C’de 4 dak. - ilk denaturasyon
 2. 93 °C’de 1 dak. - denaturasyon
 - 55 °C’de 1 dak. - bağlanma (annealing)
 - 72 °C’de 1 dak. - uzama (extension)
 3. 72 °C’de 7 dak. - son uzama (extension)
- } 35 döngü

Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile incelendi ve *ureC* geni pozitif bulunan örnekler *cagA* ve *vacA* genleri yönünden araştırıldı.

3.2.2.2. *cagA* Geninin Amplifikasyonu

cagA varlığını PCR ile göstermek için bu gene ait 349 bp uzunluğundaki gen bölgesini hedef alan *cagA*-F1 (5'-GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G-3') ve *cagA*-B1 (5'-CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A-3') primerleri kullanıldı (Tablo 3.2). Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2.5 U *Taq* polymerase ve 5 mikrolitre kalıp DNA içeren toplam 50 mikrolitre PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları aşağıdaki şekilde tamamlandı:

1. 95 °C'de 4 dak. - ilk denaturasyon
 2. 94 °C'de 1 dak. - denaturasyon
 - 55 °C'de 1 dak. - bağlanma (annealing)
 - 72 °C'de 1 dak. - uzama (extension)
 3. 72 °C'de 7 dak. - son uzama (extension)
- } 35 döngü

3.2.2.3. *vacA* Geninin Amplifikasyonu

vacA varlığını PCR ile göstermek amacı ile bu gene ait 259 bp veya 286 bp uzunluğundaki gen bölgesini hedef alan ve bu gen için son derece spesifik olan VacAva1-F (5'-ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC-3') ve VacAva1-R (5'-CTG CTT GAA TGC GCC AAA C-3') primerleri kullanıldı (Tablo 3.2). Amplifikasyon 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 200 µM, herbir primerden 25 pmol, 2.5 U *Taq* polymerase ve 5 mikrolitre kalıp DNA içeren toplam 50 mikrolitre PCR karışımında gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşamaları aşağıdaki şekilde tamamlandı:

1. 95 °C’de 4 dak. - ilk denaturasyon
 2. 94 °C’de 1 dak. - denaturasyon
 - 52 °C’de 1 dak. - bağlanma (annealing)
 - 72 °C’de 1 dak. - uzama (extension)
 3. 72 °C’de 7 dak. - son uzama (extension)
- } 35 döngü

vacA geni pozitif bulunan örneklerde *vacA* gen allellerinin (işaret bölgesindeki *s1a*, *s1b*, *s1c* ve *s2* ile toksinin kodlandığı orta bölgedeki *m1a*, *m1b* ve *m2* allellerinin) amplifikasyonları yapıldı.

3.2.2.4. *vacA* Gen Allellerinin Amplifikasyonu

vacA allellerinin varlığını göstermek için kullanılan primerler Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Amplifikasyon *vacA* amplifikasyonundaki ile aynı PCR karışımında ve aynı aşamalardan geçerek gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. Çalışmamızda kullanılan primerler.

Gen	Primer	Primer Dizisi ^a (5' – 3' yönünde)	PCR Ürününün Boyutu (Konum)	Kaynak
ureC	glmM1-F glmM2-R	AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC	294 bp (784-1077) ^b	131, 132, 133
cagA	CagA-F1 CagA-B1	GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A	349 bp (1228-1576) ^c	13, 134, 135
vacA	VA1-F VA1-R	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	259 bp (797-1055) ^d 286 bp (284-569) ^e	13, 14, 98
vacA s1a	SS1-F VA1-R	GTC AGC ATC ACA CCG CAA C CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	190 bp (866-1055) ^d	14, 136
vacA s1b	SS3-F VA1-R	AGC GCC ATA CCG CAA GAG CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	187 bp (869-1055) ^f	14, 16
vacA s1c	SIC-F VA1-R	CTC TCG CTT TAG TGG GGY T CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	213 bp (843-1055) ^f	13, 16
vacA s2	SS2-F VA1-R	GCT AAC ACG CCA AAT GAT CC CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	199 bp (371-569) ^e	14, 136
vacA m1a	VA3-F VA3-R	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	290 bp (2741-3030) ^d	14, 16
vacA m1b	VAm-F3 VAm-R3	GGC CCC AAT GCA GTC ATG GAT GCT GTT AGT GCC TAA AGA AGC AT	291 bp (2741-3031) ^f	16, 86
vacA m2	VA4-F VA4-R	GGA GCC CCA GGA AAC ATT G CAT AAC TAG CGC CTT GCA C	352 bp (2284-2635) ^e	16, 137

^a Y = C veya T.^b *H.pylori* 26695 suşunun *ureC* genindeki nükleotid pozisyonları.^c *H.pylori* ATCC 53726 suşunun *cagA* genindeki nükleotid pozisyonları (GenBank ulaşım numarası: L117714).^d *H.pylori* 60190 suşunun *vacA* genindeki nükleotid pozisyonları (GenBank ulaşım numarası: U05676).^e *H.pylori* Tx30a suşunun *vacA* genindeki nükleotid pozisyonları (GenBank ulaşım numarası: U29401).^f *H.pylori* 60190 suşunun nükleotid pozisyonlarına uygun.

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon ürünleri etidyum bromürlü % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile araştırıldı. Hem tank tamponu olarak, hem de agaroz jelinin hazırlanmasında TBE tamponu kullanıldı. TBE (Tris, Borik asit, EDTA) konsantre şeklinde (10xTBE) stok solusyon olarak hazırlandı ve gerektiğinde, 1xTBE olacak şekilde sulandırıldı.

3.2.3.1. 10xTBE tamponunun hazırlanması

108 gr Tris-Base

55 gr Borik asit

8.3 gr EDTA
eritilip distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.(pH: 8.8)

3.2.3.2. Uygulama

1. 10xTBE 1xTBE şeklinde sulandırıldı.
2. Eridiğinde % 2'lik jel oluşturacak şekilde agaroz tartılıp bir balon içerisine konuldu.
3. Üzerine 1xTBE tamponu (% 2'lik jel oluşturacak hacimde) ilave edilerek mikrodalga fırında eritildi.
4. Bir süre bekleterek (60 °C'nin altına düşmeyecek şekilde) soğutuldu.
5. İçerisine etidyum bromid (30 ml'lik jel için 3-4 µl (10 mg/ml'lik stok) yeterlidir) eklenerek karıştırıldı.
6. Önceden hazırlanmış ve tarakları uygun olarak yerleştirilmiş jel kalıp tepsisinin üzerine yavaşça döküldü.
7. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilerek katılaşması sağlandı.
8. Jel kalıbı tanka (OWL Separation Systems Model B2 Mini Gel Electrophoresis System) (Resim 1) yerleştirilerek taraklar yavaşça çıkarıldı.
9. Örneklerden 5'er µl alınarak parafilm üzerinde 3 µl yükleme tamponu (% 20 süktroz, % 0.25 brom fenol mavisini (1xTBE ile hazırlanmış)) ile karıştırılarak, açılan her kuyuya bir örnek olacak şekilde konuldu (İlk kuyuya DNA markeri yüklenir).
10. Tankın güç kaynağı (LABNET International Power Station 300) (Şekil 3.1) çalıştırılarak 80 mA – 120 V akım verildi.
11. Brom fenol mavisinin migrasyonu takip edilerek jelin 2/3'lik kısmına ulaştığında elektroforez durduruldu.
12. Jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems Visible & Ultraviolet Transilluminator, MiniBIS Bio-Imaging System) (Şekil 3.2) ile görüntülenerek incelendi.



Şekil 3.1. Elektroforez tankı ve güç kaynağı.



Şekil 3.2. Jel görüntüleme sistemi

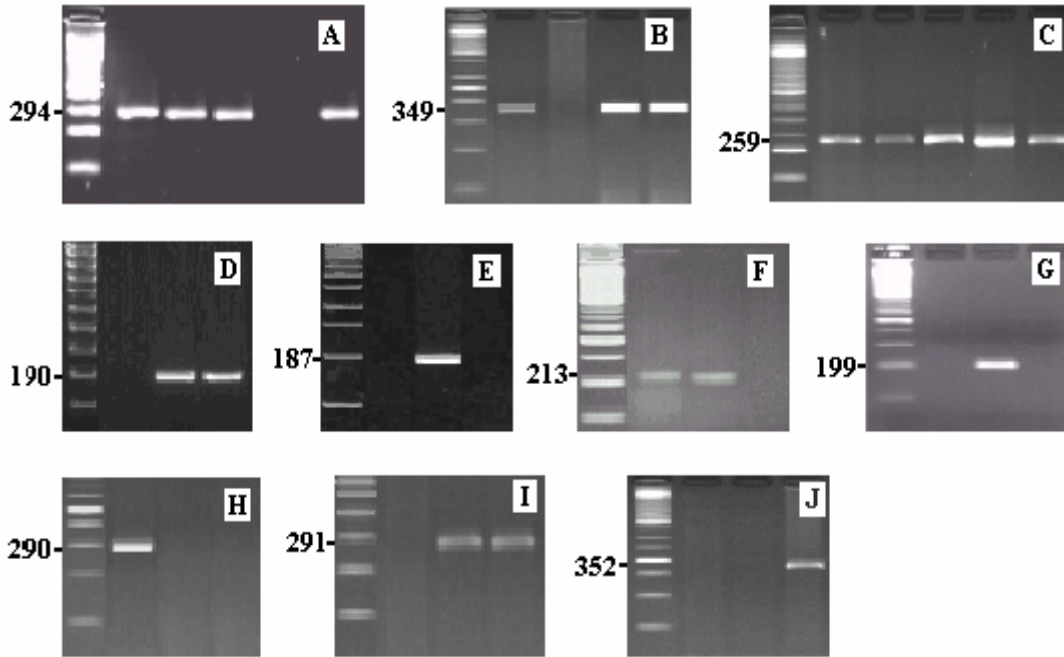
3.3. İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizi için Ki kare Fisher exact testi kullanıldı.

4. BULGULAR

H.pylori genotiplerinin gastroduodenal patoloji ile muhtemel ilişkisini PCR yöntemi ile tespiti amaçlayan bu çalışmada 96'sı (% 41.6) kadın, 135'i (% 58.4) erkek olmak üzere toplam 231 hastanın antrum ve korpusundan alınan biyopsi örnekleri değerlendirildi (Tablo 3.1).

H.pylori ureC genini (294 bp uzunluğundaki spesifik fragmentini) hedefleyen PCR testi ile 72'si (% 75.0) kadın, 129'u (% 95.6) erkek olmak üzere toplam 201 (% 87.0) olguda örneklerin en az birinde *H.pylori*'nin mide kolonizasyonunu gösteren PCR pozitifliği tespit edildi (Tablo 4.1 ve Şekil 4.1).



Şekil 4.1. PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri. A) *ureC* (*glmM*) genine spesifik diziler (294 bp); B) *cagA* genine spesifik diziler (349 bp); C) *vacA* genine spesifik diziler (259 bp); D) *vacAs1a* alleleline spesifik diziler (190 bp); E) *vacAs1b* alleleline spesifik diziler (187 bp); F) *vacAs1c* alleleline spesifik diziler (213 bp); G) *vacAs2* alleleline spesifik diziler (199 bp); H) *vacAm1a* alleleline spesifik diziler (290 bp); I) *vacAs1a* alleleline spesifik diziler (291 bp); J) *vacAs1a* alleleline spesifik diziler (352 bp).

Tablo 4.1. Kadın ve erkek hastaların mide biyopsisi örneklerinden en az birinde *ureC* genini hedefleyen PCR testi ile *H.pylori* dağılımı.

Cinsiyet	<i>ureC</i> -PCR(+) Sayı (%)	<i>ureC</i> -PCR(-) Sayı (%)	Toplam
Kadın	72 (75.0)	24 (25.0)	96
Erkek	129 (95.6)	6 (4.4)	135
Toplam	201 (87.0)	30 (13.0)	231

Biz hastalarımızın 201 (%87)'inde antrum biyopsi örneklerini *ureC*-PCR yöntemi ile *H.pylori* yönünden pozitif olarak bulmuş iken, tamamı antrum pozitif hastalar arasından olmak üzere 154 (%76.6) hastanın korpus örneklerinin de aynı yöntemle *H.pylori* yönünden pozitif olduğunu tespit ettik. Yani, 47 (%23.4) hastada korpus örnekleri negatif iken, antrum örnekleri pozitif olarak bulundu. Bu 201 hastadan endoskopik muayene ile G/MÜ tanısı alan 131'inin (% 65.2) 113'ünde (% 86.3) hem korpus, hem antrum örnekleri pozitif iken, 18 (% 13.7) hastada sadece antrum örnekleri pozitif bulundu. Buna karşılık, *H.pylori* kolonizasyonu gösterilen 201 hastadan endoskopik muayenede DÜ tanısı alan hastaların 70'inin (% 34.8) 41'inde (% 58.6) hem antrum, hem de korpus örnekleri pozitif iken, 29 (% 41.4) hastada sadece antrum biyopsi örneği pozitif bulundu. Buradan anlaşıldığı gibi, bu iki grupta yer alan hastaların hiç birisinde tek başına korpus pozitifliği tespit edilemedi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde *H.pylori ureC*-PCR ile pozitif bulunan hastaların endoskopik tanıya ve lokalizasyona göre dağılımı.

Endoskopik tanı	Antrum Sayı (%)	Korpus Sayı (%)	Antrum+Korpus Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
G/MÜ	18 (13.7)	-	113 (86.3)	131 (65.2)
DÜ	29 (41.4)	-	41 (58.6)	70 (34.8)
Toplam	47 (23.4)	-	154 (76.6)	201

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

Endoskopik olarak G/MÜ tanısı alan hastaların antrum örneklerinde *ureC* pozitiflik oranları erkek hastalarda % 95.5'e ulaşırken, kadınlarda bu oran % 66.7 olarak tespit edildi. Korpus örneklerindeki *ureC* pozitiflik oranları ise erkek ve kadın hastalarda sırası ile % 86.5 ve % 52.2 olarak bulundu. Korpus örneklerinde *ureC* pozitif bulunan hastaların tamamına ait antrum örnekleri de pozitif bulundu (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. G/MÜ’li hasta grubunda antrum ve korpus biyopsi örneklerinin *ureC*-PCR testi sonuçlarına ve cinsiyete göre dağılımı.

	Antrum			Korpus		
	Kadın Sayı (%)	Erkek Sayı (%)	Toplam Sayı (%)	Kadın Sayı (%)	Erkek Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
<i>ureC</i> -PCR(+)	46 (66.7)	85 (95.5)	131 (82.9)	36 (52.2)	77 (86.5)	113 (71.5)
<i>ureC</i> -PCR(-)	23 (33.3)	4 (4.5)	27 (17.1)	33 (47.8)	12 (13.5)	45 (28.5)
Toplam	69	89	158	69	89	158

Endoskopik olarak DÜ alan hastaların antrum örneklerindeki *ureC* pozitiflik oranları erkek hastalarda % 95.7, kadınlarda % 96.3 olarak bulunmuş iken, korpus örneklerindeki *ureC* pozitiflik oranları erkek ve kadın hastalarda sırası ile % 63.0 ve % 44.4 olarak bulundu. Korpus örneklerinde *ureC* pozitif bulunan hastaların tamamına ait antrum örnekleri de *ureC* yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. DÜ’li hasta grubunda antrum ve korpus biyopsi örneklerinin *ureC*-PCR testi sonuçlarına ve cinsiyete göre dağılımı.

	Antrum			Korpus		
	Kadın Sayı (%)	Erkek Sayı (%)	Toplam Sayı (%)	Kadın Sayı (%)	Erkek Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
<i>ureC</i> -PCR(+)	26 (96.3)	44 (95.7)	70 (95.9)	12 (44.4)	29 (63.0)	41 (56.2)
<i>ureC</i> -PCR(-)	1 (3.7)	2 (4.3)	3 (4.1)	15 (55.6)	17 (37.0)	32 (43.8)
Toplam	27	46	73	27	46	73

ureC-PCR ile biyopsi örneklerden en az birinde *H.pylori* pozitifliği tespit edilen 201 hastanın endoskopik tanı gruplarına dağılımında, pozitifliğin 131 olgu ile gastrit / mide ülserli grupta yoğunlaştığı görüldü. Buna karşılık, endoskopik tanıya dayalı hasta grupları kendi içerisinde *ureC*-PCR pozitifliği dağılımı yönünden değerlendirildiğinde, *H.pylori* pozitifliğinin 70 (% 95.9) olgu ile duodenal ülserli hastalarda 131 (% 82.9) olguda pozitif bulunan G/MÜ’li olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p=0.006$; Ki kare testi) yüksek oranda olduğu görüldü (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. G/MÜ’li hastalar ile DÜ’li hastalarda *ureC*-PCR testine göre *H.pylori* dağılımı.

Hasta grupları	<i>ureC</i> -PCR(+) Sayı (%)	<i>ureC</i> -PCR(-) Sayı (%)	Toplam
G/MÜ	131 (82.9)	27 (17.1)	158
DÜ	70 (95.9)	3 (4.1)	73
Toplam	201 (87.0)	30 (13.0)	231

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

p=0.006 (Ki kare testi).

Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde *ureC* pozitif olan toplam 201 hastadan 169’unda (% 84.1) *cagA* için spesifik olan 349 bp uzunluğundaki DNA fragmenti, 199’unda (% 99.0) ise *vacA* için spesifik olan 259 bp veya 286 bp uzunluğundaki DNA fragmenti PCR testi ile biyopsi örneklerinden en az birinde pozitif olarak bulundu (Şekil 4.1). Her iki grupta da *cagA* ve *vacA* yönünden korpus örnekleri pozitif bulunan hastaların antrum örnekleri de pozitif olarak tespit edildi. Bu sebeple, *ureC*-PCR pozitifliği tespit edilen G/MÜ’li olgulardan 103’ü (% 78.6) *cagA* ve 129’u (% 98.5) *vacA* yönünden örneklerden en az birinde pozitif iken, DÜ’li olguların 66’sının (% 94.3) *cagA* ve tamamının (% 100) *vacA* yönünden örneklerden en az birinde pozitif olduğu görüldü (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde *cagA* ve *vacA* pozitifliğinin hasta gruplarına dağılımı.

Hasta Grupları (<i>ureC</i> -PCR(+) olgu sayısı)	<i>cagA</i>		<i>vacA</i>	
	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)
G/MÜ (131)	103 (78.6)	28 (21.4)	129 (98.5)	2 (1.5)
DÜ (70)	66 (94.3)	4 (5.7)	70 (100)	-
Toplam (201)	169 (84.1)	32 (15.9)	199 (99.0)	2 (1.0)

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

Böylece, *cagA* ve *vacA* pozitif *H.pylori* oranlarının DÜ’li grupta G/MÜ’li gruba göre daha yüksek olduğu görüldü ve bu fark *cagA* pozitiflik oranları için istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*cagA*: p=0.004, *vacA*: p=0.544; Ki kare Fisher exact testi) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Hasta gruplarında *cagA* ve *vacA* pozitifliğinin Ki kare testine göre değerlendirilmesi.

Genler	G/MÜ (131) Sayı (%)	DÜ (70) Sayı (%)	p Değeri
<i>cagA</i>	103 (78.6)	66 (94.3)	0.004
<i>vacA</i>	129 (98.5)	70 (100)	0.544

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

G/MÜ’li olgulardan alınan ve *ureC*-PCR ile pozitif bulunan 131 antrum örneğinin 103’ünde (% 78.6) PCR testi *cagA* yönünden pozitif olarak bulunmuş iken, 129’unda (% 98.5) *vacA* yönünden pozitif olarak tespit edildi. Bu hasta grubundaki 113 korpus örneğinin 102’sinde (% 90.3) *cagA* pozitif iken, tamamında (% 100) *vacA* pozitifliği görüldü. Buna karşılık, DÜ’li olgulardan alınan ve *ureC*-PCR ile pozitif bulunan 70 antrum örneğinin 66’sı (% 94.3) *cagA* pozitif iken, tamamında (% 100) *vacA* pozitifliği görüldü. Bu hasta grubundaki 41 korpus örneğinin tamamı (% 100) hem *cagA*, hem de *vacA* yönünden pozitif bulundu (Tablo 4.8). G/MÜ’li hastalardan 2’sinin (% 1.5) antrum örnekleri hem *cagA*, hem de *vacA* yönünden negatif bulundu. Bu hastaların korpus örnekleri *ureC*-PCR negatif olmaları sebebi ile değerlendirilmedi.

Tablo 4.8. *ureC*-PCR testi ile pozitif bulunan antrum ve korpus biyopsi örneklerinin hasta gruplarına ve *cagA*, *vacA* genlerinin pozitifliklerine göre dağılımı.

		<i>cagA</i> Sayı (%)	<i>vacA</i> Sayı (%)
Antrum	G/MÜ (131)	103 (78.6)	129 (98.5)
	DÜ (70)	66 (94.3)	70 (100)
Korpus	G/MÜ (113)	102 (90.3)	113 (100)
	DÜ (41)	41 (100)	41 (100)

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

H.pylori’nin gastrik kolonizasyonunun prognozu üzerinde *cagA* ve *vacA* pozitifliğinin yanı sıra, *vacA* gen allellerinin de belirleyici olduğu ileri sürülmektedir. *vacA* pozitif olan 199 olguya ait örneklerde *vacA* geninin “s” bölgesindeki mutasyonları göstermek amacı ile yaptığımız allel tespit çalışmasında 92 (% 46.2) suş ile *vacAs1a* allelinin en sık rastlanan allel olduğu, bunu 87 (% 43.7) suş ile *vacAs1c* allelinin izlediği görüldü. Benzer şekilde, *vacA* geninin “m” bölgesindeki allelik mutasyonları hedef alan

primerler kullanarak yaptığımız PCR çalışmasında ise 99 (% 49.8) suş ile *vacAm1b* allelinin en sık görülen allel olduğu, bunu 83 (% 41.7) suş ile *vacAm1a* allelinin izlediği tespit edildi (Tablo 4.9 ve Şekil 4.1).

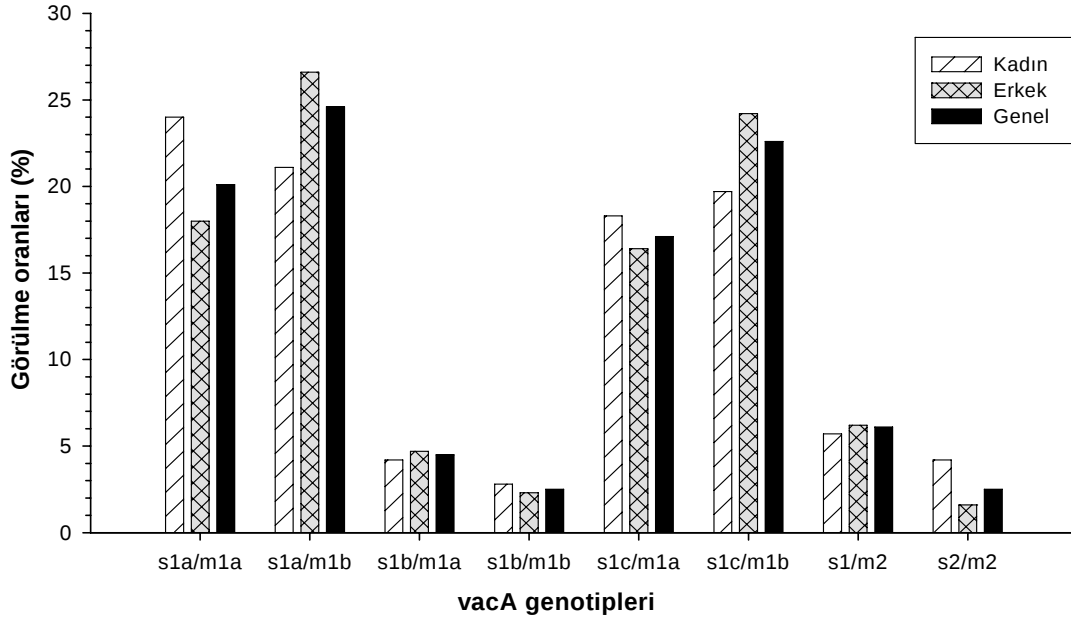
Tablo 4.9. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde *vacA* geni pozitif bulunan olguların *vacA* allelleri göre dağılımı.

“s” allelleri (199) Sayı (%)				“m” allelleri (199) Sayı (%)		
<i>s1a</i>	<i>s1b</i>	<i>s1c</i>	<i>s2</i>	<i>m1a</i>	<i>m1b</i>	<i>m2</i>
92 (46.2)	15 (7.6)	87 (43.7)	5 (2.5)	83 (41.7)	99 (49.8)	17 (8.5)

vacA geni pozitif bulunan toplam 199 olguya ait örneğin *vacA* genotiplerine göre dağılımında; *s1a/m1b* allel kombinasyonunun (genotipinin) 15’i kadın, 34’ü erkek olmak üzere toplam 49 (% 24.6) olguya ait örnekte en yüksek oranda görüldüğü, bunu 45 (% 22.6) örnekle *s1c/m1b*, 40 (% 20.1) örnekle *s1a/m1a* ve 34 (% 17.1) örnekle *s1c/m1a* genotiplerinin izlediği görüldü. Örneklerin hiç birisinde *s2/m1* genotipi tespit edilmedi (Tablo 4.10 ve Şekil 4.2).

Tablo 4.10. Mide biyopsisi örneklerinden en az birinde *vacA* geni pozitif bulunan olguların *s/m* allel kombinasyonlarının (genotiplerinin) cinsiyete göre dağılımı.

Allel Kombinasyonları	Kadın (71) Sayı (%)	Erkek (128) Sayı (%)	Toplam (199) Sayı (%)
<i>s1a/m1a</i>	17 (24.0)	23 (18.0)	40 (20.1)
<i>s1a/m1b</i>	15 (21.1)	34 (26.6)	49 (24.6)
<i>s1b/m1a</i>	3 (4.2)	6 (4.7)	9 (4.5)
<i>s1b/m1b</i>	2 (2.8)	3 (2.3)	5 (2.5)
<i>s1c/m1a</i>	13 (18.3)	21 (16.4)	34 (17.1)
<i>s1c/m1b</i>	14 (19.7)	31 (24.2)	45 (22.6)
<i>s1/m2</i>	4 (5.7)	8 (6.2)	12 (6.1)
<i>s2/m2</i>	3 (4.2)	2 (1.6)	5 (2.5)



Şekil 4.2. *vacA* genotiplerinin cinsiyet gruplarına göre dağılımı.

G/MÜ'li hastaların antrum örneklerindeki *vacA* allel kombinasyonlarının dağılımı incelendiğinde, en sık tespit edilen genotipin 33 (% 25.6) örnek ile *s1c/m1b* olduğu görüldü. Bu genotipi 26 (% 20.1) örnek ile *s1c/m1a* izledi. Bu hastaların korpus örneklerindeki genotiplerin dağılım sıklığına bakıldığında ise, antrumda olduğu gibi 33 (% 29.2) örnek ile *s1c/m1b* genotipinin ilk sırayı aldığı, ikinci sırada da *s1c/m1a* genotipinin 26 (% 23.0) örnek ile yer aldığı görüldü. Antrum örneklerinde *s1c/m1b* genotipi tespit edilen 33 hasta ile *s1c/m1a* genotipi tespit edilen 26 hastanın tamamının korpusunda da aynı genotiplere sahip olan suşların kolonize olduğu tespit edildi.

DÜ'li hastalara ait antrum örneklerinde ise, en sık karşılaşılan genotipin 27 (% 38.6) örnek ile *s1a/m1b* olduğu, bunu 19 (% 27.2) örnek ile *s1a/m1a* genotipinin izlediği görüldü. Bu hasta grubunda korpusa ait biyopsi örneklerinde de yine ilk sırayı 19 (% 46.4) örnek ile *s1a/m1b* genotipinin aldığı, bunu 16 (% 39.0) örnek ile *s1a/m1a* genotipinin izlediği tespit edildi. Korpus örneklerinde *s1a/m1b* genotipi tespit edilen 19 hasta ile *s1a/m1a* genotipi tespit edilen 16 hastanın tamamının antrumunda da aynı genotiplere sahip olan suşların kolonize olduğu görüldü.

Genel olarak, bizim bölgemizde en sık rastlanan genotipin antrum için 49 (% 24.6) örnek ile *s1a/m1b* olduğu, bunu 45 (% 22.6) örnek ile *s1c/m1b* ve 40 (% 20.1) örnek ile *s1a/m1a* genotiplerinin izlediği görüldü. Korpus örneklerinde de en sık

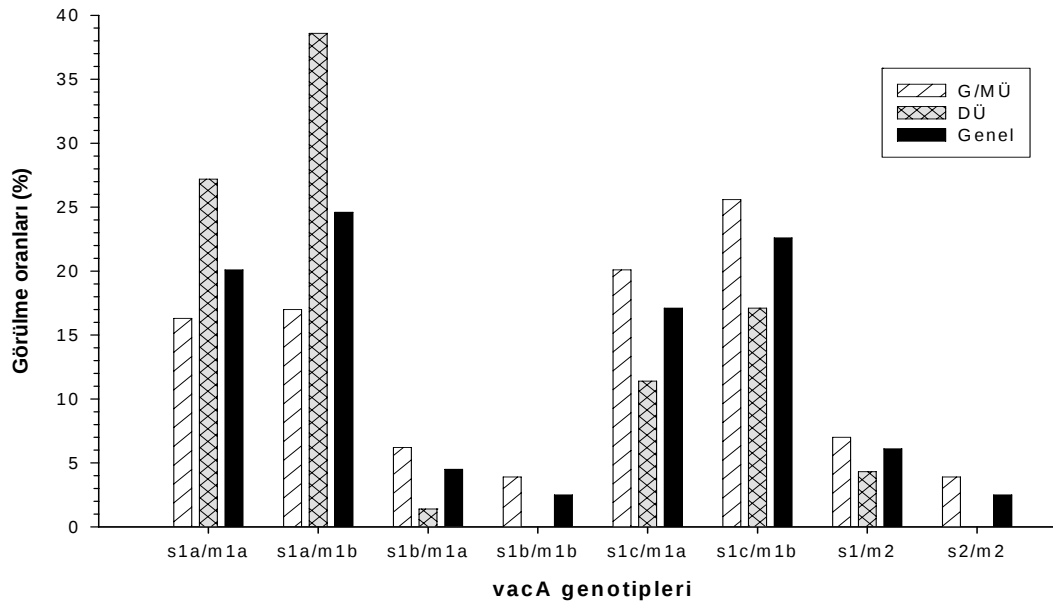
rastlanan genotipler sırası ile, 40 (% 26.0) örnekte *sla/mlb*, 36 (% 23.4) örnekte *slc/mlb* ve 36 (% 23.4) örnekte *sla/mla* şeklinde tespit edildi (Tablo 4.11 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.11. *vacA* genotiplerinin lokalizasyona ve hasta gruplarına göre dağılımı.

	Antrum			Korpus		
	G/MÜ Sayı (%)	DÜ Sayı (%)	Toplam Sayı (%)	G/MÜ Sayı (%)	DÜ Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
<i>sla/mla</i>	21 (16.3)	19 (27.2)	40 (20.1)	20 (17.7)	16 (39.0)	36 (23.4)
<i>sla/mlb</i>	22 (17.0)	27 (38.6)	49 (24.6)	21 (18.6)	19 (46.4)	40 (26.0)
<i>s1b/mla</i>	8 (6.2)	1 (1.4)	9 (4.5)	4 (3.5)	-	4 (2.6)
<i>s1b/mlb</i>	5 (3.9)	-	5 (2.5)	2 (1.8)	-	2 (1.3)
<i>slc/mla</i>	26 (20.1)	8 (11.4)	34 (17.1)	26 (23.0)	3 (7.3)	29 (18.8)
<i>slc/mlb</i>	33 (25.6)	12 (17.1)	45 (22.6)	33 (29.2)	3 (7.3)	36 (23.4)
<i>s1/m2</i>	9 (7.0)	3 (4.3)	12 (6.1)	5 (4.4)	-	5 (3.2)
<i>s2/m2</i>	5 (3.9)	-	5 (2.5)	2 (1.8)	-	2 (1.3)
Toplam	129	70	199	113	41	154

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.



Şekil 4.3. *vacA* genotiplerinin hasta gruplarına göre dağılımı.

G/MÜ’li hasta grubumuzda *slc/mla* genotipine sahip 26 suş ile *slc/mlb* genotipine sahip 33 suşun tamamında (% 100) *cagA* geni bulunmuş iken, *sla/mla* genotipine sahip 21 suştan 20’sinde (% 95.2) ve *sla/mlb* genotipine sahip 22 suştan

20'sinde (% 90.9) *cagA* geninin varlığını tespit ettik. Buna karşılık, *s2/m2* genotipine sahip 5 suşun ve *slb/mlb* genotipine sahip 5 suşun tamamının (% 100) ve *sl/m2* genotipine sahip 9 suştan 8'inin (% 88.9) *cagA* geni bulundurmadığı görüldü.

DÜ'li grupta ise *slc/mla*, *slc/mlb*, *sla/mla* ve *sla/mlb* genotiplerine sahip suşların tamamında (% 100) *cagA* geni bulunmasına karşılık, *sl/m2* genotipine sahip 3 suşun ve *slb/mla* genotipine sahip 1 suşun tamamının (% 100) *cagA* geni bulundurmadığı tespit edildi.

Genel olarak baktığımızda ise, *slc/mla* genotipine sahip 34 suş ile *slc/mlb* genotipine sahip 45 suşun tamamında (% 100) *cagA* geni mevcut iken, *sla/mla* genotipine sahip 40 suştan 39'unun (% 97.5) ve *sla/mlb* genotipine sahip 49 suştan 47'sinin (% 95.9) *cagA* geni bulundurduğu görüldü. Buna karşılık, *s2/m2* genotipine sahip 5 suşun ve *slb/mlb* genotipine sahip 5 suşun tamamında (% 100) ve *sl/m2* genotipine sahip 12 suştan 11'inde (% 91.7) *cagA* geni bulunmadığı kaydedildi (Tablo 4.12). Yukarıda da bahsedildiği gibi, G/MÜ'li gruptaki 2 suşta *cagA* ve *vacA* genlerinin ikisi de tespit edilemedi.

Tablo 4.12. Hasta gruplarındaki farklı *vacA* genotiplerinin *cagA* ile birlikteliği.

Genotip	G/MÜ (129)		DÜ (70)		Toplam (199)	
	<i>cagA</i> (+) Sayı (%)	<i>cagA</i> (-) Sayı (%)	<i>cagA</i> (+) Sayı (%)	<i>cagA</i> (-) Sayı (%)	<i>cagA</i> (+) Sayı (%)	<i>cagA</i> (-) Sayı (%)
<i>sla/mla</i>	20 (95.2)	1 (4.8)	19 (100)	-	39 (97.5)	1 (2.5)
<i>sla/mlb</i>	20 (90.9)	2 (9.1)	27 (100)	-	47 (95.9)	2 (4.1)
<i>slb/mla</i>	3 (37.5)	5 (62.5)	-	1 (100)	3 (33.3)	6 (66.7)
<i>slb/mlb</i>	-	5 (100)	-	-	-	5 (100)
<i>slc/mla</i>	26 (100)	-	8 (100)	-	34 (100)	-
<i>slc/mlb</i>	33 (100)	-	12 (100)	-	45 (100)	-
<i>sl/m2</i>	1 (11.1)	8 (88.9)	-	3 (100)	1 (8.3)	11 (91.7)
<i>s2/m2</i>	-	5 (100)	-	-	-	5 (100)

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

Tip-I olarak adlandırdığımız *cagA*⁺*vacA*⁺ suşlardaki “s” allelleri baktığımızda, G/MÜ'li hasta grubuna ait 103 suştan 59'unun *slc* ve 40'inin *sla*, DÜ'li gruba ait 70 suştan ise 46'sının *sla* ve 20'sinin *slc* alleleline sahip olduğu görüldü. G/MÜ'li grupta *slc* allelinin, DÜ'li grupta ise *sla* allelinin daha yüksek bulunması istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.001; Ki kare Fisher exact testi) (Tablo 4.12 ve 4.13).

Tablo 4.13. Hasta gruplarındaki *cagA*⁺*vacA*⁺ (Tip-I) suşların *vacAs1a* ve *vacAs1c* allelik tiplerine göre dağılımı.

Hasta grupları	<i>vacAs1a</i>	<i>vacAs1c</i>
G/MÜ	40	59
DÜ	46	20

G/MÜ – Endoskopik olarak gastrit ve/veya mide ülseri tanısı almış hastalar.

DÜ – Endoskopik olarak duodenal ülser tanısı almış hastalar.

P<0.001 (Ki kare Fisher exact testi).

vacA geni pozitif bulunan korpus ve antrum örneklerindeki muhtemel kolonize suşların gastrit tanısı alan bir kadındaki suşlar hariç, hastaların tamamında aynı genotiplere sahip oldukları görüldü. Farklı genotipe sahip suşlarla infekte olduğu görülen bu kadın hastada antrumda *s1a/m1a*, korpusta ise *s2/m2* genotipine sahip suşların varlığı tespit edildi. Bu durum dışında, korpus biyopsi örneğinde herhangi bir testin pozitif sonuç verdiği her hastaya ait antrum örneğinde de aynı test ile pozitif sonuç bulundu, ancak, antrum örneğinde pozitif sonuç bulunan her hastanın korpus örneğinde de pozitif sonuç görülmedi (Tablo 4.2, 4.3, 4.4, 4.8 ve 4.11).

5. TARTIŞMA

H.pylori, insanlar ve primatlarda mide mukozasına kolonize olarak, asemptomatik taşıyıcılıktan peptik ülser, atrofik gastritten gastrik karsinomalara kadar değişen patolojilere sebep olan gram negatif, mikroaerofilik bir mikroorganizmadır. Dünya nüfusunun yaklaşık olarak % 50'sinden fazlasını infekte eden *H.pylori*, infekte kişilerin % 10-15'inde semptomatik infeksiyon oluştururken, bu olguların % 2-4'ünde gastroduodenal patoloji intestinal veya diffuz tip mide kanseri ile sonlanmaktadır^{3,23,74}. *H.pylori* infeksiyonlarının prognozunu mikroorganizma ve konağa ait çok sayıda faktörün etkilediği ileri sürülmüştür^{8,74,75,84}. Patojenitenin mekanizmasını tespiti yönelik olarak yapılan moleküler bazlı çalışmalarda, mide mukozasındaki doku hasarından, konak mide mukozasında kronik ve güçlü inflamatuvar cevap oluşturan, özellikle CagA ve VacA gibi mikrobiyal ürünler ile konağın mikroorganizmanın antijenik özellikteki ürünlerine karşı verdiği güçlü ancak bakteri eradikasyonunu sağlamak için yeterli olmayan immun cevabının sorumlu olduğu ileri sürülmüştür^{10,14,84,113,114}. Bu sebeple, etkili antimikrobiyallerin kullanılmaması halinde, *H.pylori* infekte ettiği mide mukozasında ömür boyu kolonize olabilmektedir. Ancak, 1990'lı yıllarda bir proton pompa inhibitörü (PPI) ile kombine edilerek kullanılan antibiyotik kombinasyonları % 98-100 oranında klinik ve bakteriyolojik kürü sağlarken, son yıllarda özellikle *H.pylori* infeksiyonlarının epidemik seyrettiği gelişmekte olan ülkelerde ilk seçenek antibiyotiklere karşı gelişen direnç sebebi ile eradikasyon tedavilerinde başarı oranlarının % 40-60'lara kadar gerilediği bildirilmektedir^{5,74}. Bu sebeple, *H.pylori* ile ilişkili çalışmalar bir taraftan patogenezi aydınlatmaya yönelik olarak devam ederken, diğer taraftan bu mikroorganizmanın antibiyotik direnci ve dirence yol açan mutasyonların tespiti konusunda yoğunlaşarak devam etmektedir. Biz, bu çalışmada endoskopik muayene ile G/MÜ tanısı almış hastalar ile DÜ'li hastalarda *H.pylori*'nin gastrik kolonizasyon sıklığını, cinsiyet faktörünün kolonizasyona olan etkisini, histolojik lokalizasyonun ve kolonize suşların *cagA* ve *vacA* genleri ile *vacA* gen allelik tiplerinin klinik prognoza etkisini moleküler yöntemlerle araştırdık.

Mide mukozasında *H.pylori* kolonizasyonunu tespit için kültür ortamında izolasyon altın standart olmakla beraber, mikroorganizmanın % 10 ve üzerindeki oksijene duyarlılığı ve genomda regülatör genlerin azlığı sebebi ile invitro şartlardaki üreme güçlüğü bu yöntemin sensitivitesini % 40-60 gibi oldukça düşük oranlara çekmektedir. Mide biyopsisi örnekleri, ve mide sıvısı gibi klinik örneklerde bakteri izolasyonu için farklı besiyerlerinin kullanıldığı kültür bazlı yöntemler ile bakterinin *16S rRNA* geni, 26-kDa'luk türe spesifik antijen (*SSA*) geni, *ureA*, *ureB* ve *glmM (ureC)* geni gibi spesifik gen dizilerini hedef alan nükleik asit amplifikasyon teknikleri (NAAT)'nin karşılaştırıldığı çok sayıdaki çalışma yapılmıştır^{131,141,145,147}. Bu çalışmalar sonunda *H.pylori* tanısı için, *16S rRNA* genini hedef alan NAAT'nin yüksek sensitivite, ancak düşük spesifiteye sahip olmasına karşılık, *ureC* ve *SSA* genini hedef alan NAAT'lerin en az *16S rRNA* kadar sensitif ve kültürde izolasyon yöntemi kadar spesifik olduğu gösterilmiştir^{131,141,145,147}.

Tanı yöntemlerinin sensitivite ve spesifitesinin karşılaştırıldığı Tiveljung A ve arkadaşlarına¹³⁸ ait bir çalışmada, gastrik biyopsi örneklerindeki *H.pylori* varlığını tespit için 16S rRNA, *vacA*, *ureA* ve *cagA* genlerini hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR testi sonuçlarını hastaların klinik, histolojik ve serolojik bulguları ile karşılaştırılmıştır. Bu grup en az 3 test pozitifliğini tanı için kriter olarak kullandıkları çalışmalarında sonuç olarak, insan mide dokusundaki *H.pylori* tespiti için PCR bazlı testlerin son derece sensitif bulduklarını belirtmişlerdir¹³⁸.

Casazza S ve arkadaşları¹³⁹ da İtalya'da gastrik karsinomalı ve MALT lenfomalı 164 hastaya ait 201 gastrik biyopsi örneği ile yaptıkları bir çalışmada histolojik yöntemler, immünohistokimyasal yöntemler ve PCR'ın tanı değerini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar, biyopsi örneklerinin % 41'inin PCR ile pozitif bulunmasına karşılık, diğer iki yöntemle pozitiflik oranının % 31 olduğunu belirterek, PCR'ın hızlı, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir¹³⁹.

Moncayo JI ve arkadaşları¹⁴⁰ Kolombiya'da yaptıkları bir çalışmada, 73 hastadan aldıkları antral biyopsi örneklerini *H.pylori* tanısı için *ureC*-PCR ile değerlendirirken, eşzamanlı olarak aynı hastaların antrum, korpus ve fundusundan aldıkları birer biyopsi örneğini kültür ile, antrumdan aldıkları birer biyopsi örneğini HÜT ile ve korpustan alınan birer biyopsi örneğini de histolojik yöntemlerle değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar biyopsi örneklerinin % 94.5'ini histolojik olarak

H.pylori yönünden pozitif bulmuşken, kültür pozitifliğini % 75.4, HÜT pozitifliğini % 79.5, *ureC*-PCR pozitifliğini de % 86.3 olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, *ureC*-PCR'ın sensitivitesinin % 89 olduğunu belirtmişlerdir¹⁴⁰.

Buna karşılık, Mishra KK ve arkadaşları¹⁴¹ Hindistan'da 116 dispeptik hastaya ait gastrik biyopsi örneklerini *ureC*-PCR, HÜT, kültür ve histolojik yöntemlerle değerlendirdikleri bir çalışmada; sırası ile % 53, % 43, % 48 ve % 50 oranlarında pozitiflik elde etmişler ve *ureC*-PCR yönteminin histolojik değerlendirme de dahil olmak üzere diğer üç yöneme göre daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu grup *ureC*-PCR testinin sensitivitesinin % 95, spesifitesinin de % 100 olduğunu belirtmişlerdir¹⁴¹.

Lage AP ve arkadaşları¹⁴² Belçika'da 104 hasta ile yaptıkları ve tanıda *ureC*-PCR, kültür, HÜT ve giemsa boyalı preparasyonları histolojik olarak değerlendirdikleri çalışmalarında; gastrik biyopsi örneklerinden sırası ile % 38.5, % 36.5, % 34.6 ve % 33.7 oranında pozitiflik tespit etmişler ve *ureC*-PCR'ın en az kültür kadar spesifik, ancak kültürden daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu grup¹⁴², Moncayo'nun¹⁴⁰ aksine histolojik muayenenin tanı değerinin diğer yöntemlerden düşük olduğunu vurgulamıştır.

Bickley J ve arkadaşları¹⁴³ İngiltere'de 14 hastadan topladıkları 62 gastrik biyopsi örneğinde kültür ve PCR'ın tanı ve identifikasyon değerlerini karşılaştırmışlar, *ureC*-PCR'ın kültür kadar spesifik olmasına karşılık, % 96 kadar yüksek bir sensitivite oranına sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Lee MA ve Hong KS¹⁴⁴; kronik gastrit, GÜ'li ve DÜ'li 81 hastaya ait gastrik biyopsi örneklerinde *H.pylori* varlığını kültür ve *ureC*-PCR yöntemi ile araştırdıkları bir çalışmada, testlerin sensitivite, spesifite pozitif ve negatif anlamlılık değerleri ile tanı değerlerini sırası ile kültür için % 85, % 100, % 100, % 58 ve % 88, *ureC*-PCR için ise % 96, % 100, % 100, % 82 ve % 96 olarak bildirmişlerdir. Bu grup *ureC*-PCR'ın hem sensitivitesinin, hem de negatif anlamlılık değeri ile tanı değerinin kültürden daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir¹⁴⁴.

Romero Lopez C ve arkadaşları¹⁴⁵ da *ureA*, *ureA+B* ve *ureC* genlerini hedef alan primerlerin kullanıldığı üç PCR modifikasyonunu duyarlılık yönünden karşılaştırdıkları bir çalışmada, bizim çalışmamızda da hedef aldığımız *ureC* genine ait

294 bp'lık gen parçasını amplifiye etmek üzere dizayn edilen PCR'ın diğer iki teste göre daha duyarlı olduğunu göstermişlerdir.

Bir başka çalışmada Smith SI ve arkadaşları¹⁴⁶ Nijerya'da 189 biyopsi örneğini *ureA*, *ureC* ve *SSA* genlerini hedef alan PCR yöntemleri ile değerlendirmişler, testlerin sensitivite ve spesifitesini, HÜT ve kültür sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, *ureC*-PCR'ın pozitif anlamlılık oranını % 91, negatif anlamlılık oranını % 56, *SSA*-PCR'ın pozitif anlamlılık oranını % 100, negatif anlamlılık oranını ise % 67 olarak kaydetmişlerdir. Bu grup, *SSA*-PCR'ın biyopsi örneklerindeki *H.pylori*'yi tespitinde daha kabul edilebilir olduğunu ileri sürmüşlerdir¹⁴⁶.

Buna karşılık, Ho YW ve arkadaşları¹⁴⁷ 134 *H.pylori* izolatu ile yaptıkları bir çalışmada, *ureC*-PCR'ın sensitivite ve spesifitesinin *SSA*-PCR ile aynı olduğunu belirtmişlerdir.

Lu JJ ve arkadaşları¹³¹, *H.pylori* tespitinde kullanılan 16S rRNA geni, rastgele kromozom dizisi, *SSA* geni, *ureA* geni ve *ureC* genini hedef alan beş farklı PCR yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışmada, yine bizim çalışmamızda hedef aldığımız *ureC* genine ait 294 bp'lık gen parçasını hedef alan PCR'ın gastrik biyopsi örneklerinde *H.pylori* tespiti için en sensitif ve spesifik yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar *ureC*-PCR'ın pozitif ve negatif anlamlılık değerlerini de sırası ile % 100 ve % 96 olarak tespit etmişlerdir¹³¹.

Biz bu çalışmada *H.pylori*'nin gastrik kolonizasyonunu tespit için *ureC* geninin 294 bp'lık parçasını hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR yöntemini uyguladık. Literatürde de belirtildiği gibi *ureC* geninin 294 bp uzunluğundaki fragmentini hedef alan primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi, biyopsi örneklerindeki *H.pylori* varlığını tespit için günümüzde kullanılan tanı yöntemlerinin en sensitif, spesifik ve güvenilir olanıdır. Biz çalışmamızda bu yöntemle, klinik olarak gastroduodenal yakınması olup, endoskopik olarak G/MÜ veya DÜ tanısı almış 231 hastanın % 75'i kadın ve % 95.6'sı da erkek olmak üzere toplam % 87'sinde antrum ve korpus biyopsi örneklerinden en az birisinde *H.pylori ureC* genine ait hedef dizileri yani "*H.pylori* gastrik kolonizasyonu" tespit ettik (Tablo 4.1) Bölgemizdeki farklı hasta gruplarında *H.pylori*'nin gastrik prevalansını tespiti yönelik olarak yapılan bir çalışmada, Sandıkçı ve arkadaşları³⁶, semptomatik ve asemptomatik gruplara ait antral biyopsi örneklerini kültür ve histopatolojik yöntemlerle değerlendirmişlerdir. Bu grup³⁶ *H.pylori* kolonizasyon

sıklığının asemptomatik gruplarda % 7, peptik ülserli hastalarda ise % 91 olduğunu bildirmişlerdir. Yine bölgemizde yapılan başka bir çalışmada, Erkişi M ve arkadaşları³⁷ mide kanserli 203, peptik ulserli 61, gastritli 60 hasta ile asemptomatik 100 gönüllüden aldıkları antral biyopsi örneklerini histolojik yöntemlerle değerlendirerek, olgu gruplarında sırası ile % 58.1, % 54, % 63.3 ve %27 oranında pozitiflik tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Her iki grup^{36,37} da semptomatik gruplarda *H.pylori*'nin gastrik kolonizasyonu ile gastroduodenal patoloji arasında epidemiyolojik bir ilişkinin varlığına dikkat çekmişlerdir. Diğer taraftan Yetkin M¹⁴⁸ 3 yıl süren çalışmasında, kültür yöntemi ile değerlendirdiği 194'ü kadın, 293'ü erkek hastalara ait olmak üzere toplam 487 antral biyopsi örneğinden, % 76.2'si kadın ve % 81.2'si de erkek hastalara ait olmak üzere % 79.2'sinde *H.pylori* varlığını tespit etmiştir. Ülkemizde farklı coğrafi bölgelerde yapılan çalışmalarda da benzer prevalans sonuçları bildirilmiştir. Oğuz D ve arkadaşları³⁵ ile Özden A⁹, *H.pylori*'nin semptomatik gruplardaki gastrik kolonizasyon oranının farklı gruplarda % 60-81 arasında değiştiğini bildirerek, asemptomatik taşıyıcılığın yüksek oranlarda olduğuna dikkat çekmişlerdir. Kantarçeken B ve arkadaşları¹⁴⁹, Malatya bölgesinde MÜ'li hastalara ait antral biyopsi örneklerini kültür ve PCR bazlı yöntemler kullanarak değerlendirdikleri bir çalışmada; 142 biyopsi örneğinden % 75.4'ünde en az bir yöntemle *H.pylori* kolonizasyonu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Erzin Y ve arkadaşları¹⁵⁰ da, DÜ'li ve NÜD'li 125 hastaya ait antrum ve korpus biopsi örneklerini kültür, histolojik muayene ve HÜT ile değerlendirdikleri bir çalışmada, en az bir yöntemle pozitif olgu oranının % 95 olduğunu bildirmişlerdir. Sarıbaşak H ve arkadaşları¹⁵¹ ise, gastroduodenal patoloji tespit edilen 73 olguya ait antral biyopsi örneklerini kültür, HÜT ve PCR yöntemleri ile değerlendirdikleri çalışmalarında, örneklerin % 89'unda *H.pylori* varlığını en az bir yöntemle gösterdiklerini bildirmişlerdir. Yine, Bolek BK ve arkadaşları¹⁵² İstanbul'da yaptıkları bir çalışmada; PCR yöntemi ile değerlendirdikleri biyopsi örneklerinden % 84.6'sında *H.pylori ureC* genine ait hedef fragmentin varlığını tespit etmişlerdir. Bizim semptomatik hasta gruplarına ait ortalama % 87'lik oranımız bölgemizde yapılmış olan çalışmalardan kültür ve/veya histolojik sonuçları kriter olarak alan Sandıkçı ve arkadaşlarının³⁶ % 91'lik oranından daha düşük, ancak Kültürde izolasyon yöntemini kullanan Yetkin M'nin¹⁴⁸ % 79.2'lik, sadece histolojik incelemeyi kullanan Erkişi M ve arkadaşlarının³⁷ % 54.0-63.3'lük oranlarından daha yüksektir. Çok sayıdaki çalışmada kültürde izolasyonun

spesifitesinin % 100 olmasına karşılık, bakterinin üreme güçlüğü sebebi ile yöntemin sensitivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir¹²⁸⁻¹³¹. Benzer çelişkili sonuçlar histolojik incelemeler için de geçerlidir. Moncayo JI ve ark.¹⁴⁰ histolojik incelemenin sensitivitesini % 94.5 olarak verirken, Casazza S ve ark.¹³⁹, Mihsra KK ve ark.¹⁴¹ ve Lage AP ve ark.¹⁴² histolik incelemenin sensitivitesinin PCR'dan çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. Burada kullanılan boyanın türü, incelemeyi yapan kişinin tecrübesi ve örneğin kalitesi sonuçların sensitivite ve spesifitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bizim Erkişi M³⁷ ve Yetkin M¹⁴⁸'den daha yüksek olan prevalans oranımız yöntem farklılığından ve bizim kullandığımız *ureC*-PCR yönteminin daha sensitif olmasından kaynaklanmaktadır. Benzer sebeplerle, bizim sonuçlarımız ülkemizde farklı bölgelerden bildirilen, kültür ve histopatolojik incelemelere dayalı Erzin Y ve arkadaşlarının¹⁵⁰ % 95'lik sonuçlarından daha düşük, Kantarçeken B ve arkadaşlarının¹⁴⁹ kültür bazlı % 75.4'lük prevalans sonuçlarından daha yüksektir. Buna karşılık, NAAT'lerini tanı amacı ile kullanmış olan Sarıbaşak H ve arkadaşlarının¹⁵¹ % 89'luk ve Bolek BK ve arkadaşlarının¹⁵² % 84.6'luk oranları bizim sonuçlarımızla uyumludur. Bizim bulgularımızla birlikte farklı bölgelerden bildirilen ve küçük sapmalarla % 85 gibi bir ortalama değere ulaşan *H.pylori* prevalansı hastalığın epidemik seyrettiği ülkeler için ön görülen değerlerle örtüşmektedir.

H.pylori'nin mide mukozasındaki kolonizasyonu ve gastroduodenal patolojinin insidansında konağa ait yaş, beslenme alışkanlığı, sosyal çevre ve genetik polimorfizmin yanı sıra cinsiyetin de önemli bir faktör olduğu epidemiyolojik ve patofizyolojik bulgularla desteklenmiştir. *H.pylori* patogenezinde proinflamatuvar sitokinlerin aşırı ve sürekli uyarılmasına bağlı olarak Th1 popülasyondaki artış ve hücrel immüniteye bağlı olarak gelişen doku hasarı belirleyici rol oynamaktadır. Doğurganlık yaşındaki kadınlarda gebelik döneminde hücrel immünitenin baskılanması doku hasarı ile sonlanan bütün hastalıklarda olduğu gibi *H.pylori*'ye bağlı doku hasarının da sonlanmasına ve ülseratif lezyonların kendiliğinden düzelmesine yol açmaktadır. Bu sebeple kadınlarda ülseratif hastalıklar puberte ile menopoz arasındaki dönemde erkeklere göre daha düşük insidansla seyretmektedir^{153,154}.

Chen TS ve ark.¹⁵⁵ *H.pylori* gastrik kolonizasyonu tespit ettikleri endoskopik muayene ile normal mukozal görünüme sahip 54 hasta ile DÜ tanısı almış 51 hastada *cagA* prevalansı, cinsiyet ve sigara alışkanlığının klinik tabloya etkisini araştırdıkları

çalışmalarında, erkeklerin ve sigara içenlerin kadınlara ve sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede DÜ riskine sahip olduklarını göstermişlerdir.

Matsuhisa T ve ark.¹⁵⁶ da Çin, Tayland ve Vietnam'lı antrum ve korpus gastritli *H.pylori* pozitif hastaları yaş, cinsiyet ve endoskopik bulgularına göre Japon hastalarla karşılaştırdıkları bir çalışmada; Japon'larda diğer asyalılara göre korpus predominant gastritin daha yüksek oranda görüldüğünü, erkeklerde *H.pylori* pozitifliğinin kadınlara göre 3 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Khan AR¹⁵⁷ Suudi Arabistan'da *H.pylori* prevalansı üzerine yaş ve cinsiyetin etkisini tespit amacı ile yaptığı bir çalışmada; biyopsi örneklerini değerlendirdiği erkeklerin % 69, kadın hastaların % 63 *H.pylori* pozitifliği tespit etmiştir.

Falsafi T ve ark.¹⁵⁸ da HpSA testi ile yaptıkları bir çalışmada; *H.pylori* pozitifliğinin kadınlarda % 46, erkeklerde ise % 48 olduğunu bildirmişlerdir.

Ullrich A ve ark.¹⁵⁹ İsviçre ve Almanya'da gastrik lenfomalı hastaları üç yıl boyunca izledikleri bir çalışmada; yaşın ve cinsiyetin insidansı etkilediğini, erkeklerde kadınlara göre insidansın daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Crespi M ve Citarda F¹⁶⁰, IARC'ye dayandırdıkları ve gastrik karsinomaya bağlı ölümler üzerine yaş ve cinsiyetin önemini araştırdıkları bir metaanaliz çalışmasında erkeklerin ülkeler arasında farklılıklar göstermekle birlikte kadınlara göre daha yüksek mortalite hızına sahip olduklarını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, Belçika'da erkeklerde 14.4/100000 olan gastrik kanser mortalitesinin kadınlarda 7.5/100000 olduğunu, bu oranın Finlandiya'da sırası ile 17.2 ve 9.9, İrlanda'da 25.5 ve 7.3, Panama'da 12.3 ve 4.2, ABD'de 5.3 ve 2.7, İsveç'te ise 11.6 ve 6.5 olduğunu belirtmişlerdir¹⁶⁰.

Bizim *ureC* geni pozitifliğini kriter olarak aldığımız çalışmada; biyopsi örneklerinden en az birisindeki *H.pylori* pozitiflik oranımız, erkeklerde (% 95.6) kadınlara göre (% 75) daha yüksektir (Tablo 4.1). Bizim olgularımızın tamamının gastroduodenal patolojiye sahip olmaları ve bölgemizdeki asemptomatik gruplarda *H.pylori*'nin gastrik kolonizasyon sıklığı ile cinsiyetin ilişkisi hakkında daha önceden yapılmış başka bir çalışmaya rastlanmaması sebebi ile bulgumuzun tartışılması mümkün olmamıştır.

H.pylori'nin mide mukozasında lokalize olduğu bölgeye bağlı olarak şekillenen farklı patofizyolojik olayların lezyonun prognozunu etkilediği yapılan çok sayıdaki

klirik çalışmalarla ispatlanmıřtır¹⁶¹⁻¹⁶⁵. Bu alışmalar sonunda antrum predominant gastritin artmış asit sekresyonu ile DÜ’e, korpus predominant gastritin de aklorhidria ile atrofik gastrit ve bağlantılı olarak gastrik karsinomaya yol açabildiği gösterilmiştir. Bu sebeple de, tanıda endoskopik muayenenin, biyopsi materyali almanın dışında gerek bakteri lokalizasyonu ve lezyonun şiddetini, gerekse lokalizasyonun klinik prognoza etkisini tespit için önemli olduğu vurgulanmıřtır¹⁶¹⁻¹⁶⁵. Biz bu çalışmada, mide mukozasında *H.pylori* sıklığı ve kolonize suşun genotipinin yanı sıra, mukozal lokalizasyonun prognoza etkisini de tespiti amaçladık. Bizim endoskopik muayene esnasında antrum ve korpus biyopsi örneklerini alarak çalışmaya dahil ettiğimiz hastalarımızdan 158’i endoskopik muayenede G/MÜ, 73’ü ise DÜ n tanısı almıştır (Tablo 3.1). Çalışmada her iki grupta yer alan hastalarımızdan 201 (% 87)’inde antrum biyopsi örneklerini *ureC*-PCR yöntemi ile *H.pylori* yönünden pozitif olarak bulduk. Buna karşılık, tamamı antrum pozitif hastalar arasından olmak üzere 154 (% 76.6) hastanın korpus örnekleri de aynı yöntemle *H.pylori* yönünden pozitif olarak bulundu. Yani, 47 (% 23.4) hastada korpus örnekleri negatif iken, antrum örnekleri pozitif olarak bulundu (Tablo 4.2). *H.pylori ureC* geni pozitif olarak bulunan biyopsi örneklerinin hasta gruplarına dağılımında antrum ve korpus örnekleri arasında oransal farklılıklar görüldü. G/MÜ tanılı hastalarımızın % 82.9’unda antrum biyopsi örnekleri pozitif iken, bu gruptaki hastalarımızın, % 71.5’inde korpus biyopsi örneklerini de pozitif olarak bulduk (Tablo 4.3). Buna karşılık, DÜ’li hastalarımızda antrum pozitifliği % 95.9 iken, yine tamamı antrum pozitif olan hastalara ait olmak üzere, korpus pozitifliği % 56.2 olarak kaydedildi (Tablo 4.4). Bu bulgular antrum kolonizasyonunun DÜ’li hastalarda (% 95.9) G/MÜ’li hastalara (% 82.9), korpus tutulumunun ise, G/MÜ’li hastalarda (% 71.5) DÜ’li hastalara göre (% 56.2) daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer taraftan, her iki hasta grubundaki antrum pozitifliğinin (% 82.9 ve % 95.9) korpus pozitifliğine (% 71.5 ve % 56.2) göre daha yüksek oranlarda bulunması, *H.pylori*’nin midedeki ilk yerleşiminin antrum mukozası oluşu ve oradan mide mukozasındaki diğer alanlara yayılarak yerleşmesi ile izah edilebilir. Bu sebeple, çalışmaların çoğunda *H.pylori*’nin gastrik kolonizasyonunu göstermek için sadece antrum biyopsi örneklerinin pozitifliği dikkate alınmıştır. Bolek BK ve ark.¹⁵² *H.pylori* prevalansı ile gastroduodenal patoloji arasındaki ilişkiyi tespit amacı ile yaptıkları çalışmalarında DÜ’li hastaların % 85.7’sinde, gastritli hastaların % 100’ünde ve MÜ’li hastaların da %

70'inde antral biyopsi örneklerinin pozitif olduğunu belirtmişlerdir. Bolek BK ve ark.'nın¹⁵² gastritli hastaların antrum örneklerine ait % 100 lük sonuçları mikroorganizmanın önce antrum mukozasına yerleşerek gastriti başlattığını, % 85.7'lik DÜ'li hastalara ait antrum pozitifliği sonuçları da bakterilerin bir kısmının kronik antrum lokalizasyonu ile DÜ'e yol açtığını ima etmektedir. Bu grubun gastritli ve MÜ'li hastalara ait ortalama değerleri % 85.0'dir ve bu oran bizim G/MÜ'li hastalarımıza ait antrum örneklerindeki % 82.9'luk oranımızla benzerdir. Diğer taraftan, Bolek BK ve ark.'nın¹⁵² bulgularında olduğu gibi biz de, en yüksek antrum pozitifliğini % 95.9 ile DÜ'li hasta grubunda kaydettik. Başka bir çalışmada, yine sadece antrum biyopsi örneklerini değerlendiren Oğuz D ve ark.³⁵ *H.pylori* pozitifliğinin; genel popülasyonda % 67, DÜ'li hastalarda % 96, MÜ'lilerde % 45, NÜD'li hastalarda ise % 88 olduğunu bildirmişlerdir. Bu grubun DÜ'li hastalardan elde ettikleri % 96'luk pozitiflik oranları bizim oranımızla bire bir örtüşmekteyken, MÜ'li hastalardaki % 45'lik oranları oldukça düşüktür. Bununla birlikte, bu grubun NÜD'li hastalara ait % 88 olan pozitiflik oranları gerek bizim G/MÜ'li hastalara ait oranımıza benzer olması, gerekse gastrik patolojinin başlangıcı sayılabilecek NÜD'de bakterinin antral yerleşiminin predominant oluşunu göstermesi açısından anlamlıdır. Ancak, her iki çalışmada^{35,152} da korpus biyopsi örneklerinin değerlendirilmemiş olması, *H.pylori*'nin gastrik lokalizasyonu ile klinik patoloji arasındaki muhtemel ilişkiyi gösterme yönünden bu çalışmaların en önemli eksik yanını oluşturmaktadır.

Diğer taraftan bizim gibi, *H.pylori* gastrik kolonizasyonu ve gastroduodenal patoloji arasındaki ilişkiyi tespit için antrum ve korpus biyopsi örneklerini değerlendiren Magalhaes AF ve ark.¹⁶¹; 48 NÜD'li ve 13 DÜ'li hastaya ait antrum ve korpus örneklerini HÜT, gram yayma ve histopatolojik yöntemlerle değerlendirdikleri çalışmalarında NÜD'li hastaların % 89.6 sında antrum örneklerinde HÜT ile pztiflik tespit ederlerken korpus örneklerinin % 81.2'sinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Buna kaşılık, DÜ'li hastalara ait antrum ve korpus örneklerinin tamamının (% 100) üç test ile de pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu grubun bulguları bizim DÜ'li hastalarımıza ait % 95.9'luk antrum bulgularımızla büyük benzerlik göstermektedir. Ancak bizim DÜ'li hastalardaki % 56.2'lik korpus pozitifliğimiz bu grubun bulgularından daha düşüktür. Bu grubun tanıda kullandığı HÜT ve gram yayma preparasyonların sensitivite ve spesifitesi bizim kullandığımız *ureC*-PCR'dan daha

düşüktür. Biyopsi örneklerindeki eser miktardaki kan ve dokudan sızan bikarbonatın HÜT sonuçlarını etkilemesi kaçınılmazdır. Dokuda yamalı bohça şeklinde dağılım gösteren *H.pylori*'nin tespiti, yayma preparatlarda ancak uzman gözü ile ve çok alan taranması ile mümkün olabilmektedir. Bizim *H.pylori* gastrik kolonizasyonunun lokalizasyon ve sıklığına ait bulgularımız literatürde belirtilen sıklık oranları ile uyumludur ve artmış antrum lokalizasyonunun DÜ'ile, artmış korpus lokalizasyonunda G/MÜ ile muhtemel ilişkisini destekler niteliktedir¹⁶¹⁻¹⁶⁵.

Bizim G/MÜ'li erkek hastalarımıza ait antrum ve korpus biyopsi örneklerinde *ureC*-PCR ile *H.pylori* pozitiflik oranlarımız (% 95.5 ve % 86.5) kadın hastalarımıza ait pozitiflik oranlarımızdan (% 66.7 ve % 52.2) daha yüksektir (Tablo 4.3). Benzer şekilde, DÜ'li erkek hastalarımıza ait % 63'lük korpus pozitiflik oranlarımız, kadın hastalarımıza ait % 44.4'lük orandan daha yüksektir. Buna karşılık, bu gruptaki kadınlarda % 96.3 olarak kaydedilen antrum pozitifliği, erkeklerde daha düşük olmak üzere % 95.7 olarak kaydedilmiştir (Tablo 4.4). Literatürde *H.pylori*'nin korpus ve antrum kolonizasyonunun endoskopik bulgu ve cinsiyet ile ilişkisini gösteren başka bir çalışmaya rastlanamamıştır. Altmış yaş ve üzerindeki kadınlarda MÜ'nin, erkeklerde ise DÜ'in daha sık görüldüğü, klinik gözlemlere dayatılarak speküle edilmiş, ancak, menapoz sonrası değişen immunitenin hastalığın prognozuna olan etkisi ile klinik tablo arasındaki muhtemel ilişkiye atıfta bulunulmamıştır. Bizim hastalarımızın endoskopik muayene sonucu aldıkları ön tanı dikkate alındığında, G/MÜ'li kadınların erkeklerden daha yüksek oranda olmalarına karşılık, DÜ ön tanılı erkeklerin kadınlardan daha yüksek oranda oldukları görülmektedir (Tablo 3.1). Yani, klinik tanıya ait cinsiyet dağılımlarımız literatürle uyum göstermektedir. Fakat biyopsi örneklerinde *ureC*-PCR ile *H.pylori* kolonizasyonuna ait bulgularımız klinik ön tanı ile doğrusal orantılı bulunmamıştır. Biz DÜ'li kadın hastalarımızın antrum biyopsi örneklerinde erkek hastalara ait antrum örnekleri kadar yüksek oranda *H.pylori* kolonizasyonu tespit ettik. *H.pylori*'nin gastrik lokalizasyonunun prognoza etkisi dikkate alındığında, bu bulguya göre kadın hastalarda DÜ'in erkekler kadar yüksek olması beklenirdi. Bu aykırı sonuç bölgesel farklılıklar ve çevre faktörlerinin klinik prognoz üzerine olan muhtemel etkisi ile izah edilebileceği gibi, yaşa bağlı olarak değişen hücrel immunité ve inflamatuvar cevabın kontrolü ile de ilişkilidir. Bu iddianın ispatı ise, kadın hastaların yaş gruplarının da bir parametre olarak değerlendirildiği çalışmalarla mümkündür. Bizim hastalarımızın

yaş gruplarına göre dağılımı yapılmamıştır. Bu, çalışmanın eksik tarafıdır. Ancak istatistiki önem arz edecek sayıda vaka bulmanın güçlüğü sebebi ile literatürde de kadın / erkek, MÜ / DÜ ve yaş parametrelerinin birlikte çalışıldığı hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bizim *ureC*-PCR ile *H.pylori* gastrik kolonizasyonu tespit ettiğimiz hastalarımızın klinik bulgu ve cinsiyet ayrımına bakılmaksızın tamamında antrum pozitifliği görüldü. Özetle, antrum pozitifliği kriter olarak alındığında, *H.pylori* kolonizasyon oranının DÜ'li olgularda (% 95.9) G/MÜ'li olgulara (% 82.9) göre daha yüksek oranda olduğu tespit edildi. Genel olarak da gastroduodenal yakınması olup biyopsi endikasyonu alan hastalarımızın 201 (% 87)'inde *H.pylori* kolonizasyonu bulduk (Tablo 4.5).

Blaser M¹⁶⁶, *H.pylori* infeksiyonu sıklığının kronik aktif gastritli toplam 401 hastada araştırıldığı 9 çalışmanın sonuçlarını incelemiş ve bu hastalardaki *H.pylori* pozitiflik oranlarının % 64-95 arasında değiştiğini, ortalama oranın ise % 88 olduğunu bildirmiştir. Yine, Blaser M¹⁶⁶, MÜ'li toplam 178 ve DÜ'li toplam 246 hastadaki *H.pylori* pozitiflik oranlarının araştırıldığı çoğu biyopsi bazlı 8 çalışmanın sonuçlarını değerlendirerek, *H.pylori* pozitifliğinin MÜ'lilerde ortalama % 64 olduğunu (% 35-86), DÜ'lilerde ise ortalama % 85 olduğunu (% 75-100) bildirmiştir. Sobala GM ve ark.¹⁶⁷, Vaira D ve ark.⁵² ile Patel P ve ark.'nın¹⁶⁸ serolojik yöntemlerle yaptıkları üç benzer çalışmanın sonunda; *H.pylori* seropozitifliğinin endoskopik olarak gastrit tanısı alan hastalarda % 53.5 (92/172), MÜ tanısı alan hastalarda % 83.3 (25/30) ve DÜ tanısı alan hastalarda % 92.2 (59/64) olduğunu bildirmişlerdir. Strauss ve ark.¹⁶⁹ *H.pylori* seropozitiflik oranlarının DÜ'li hastalarda % 90'ın üzerinde, MÜ'li hastalarda ise % 70'in üzerinde seyrettiğini bildirmişlerdir.

Bizim gerek DÜ'li, gerekse G/MÜ'li hastalara ait biyopsi pozitiflik oranlarımız beslenme alışkanlığı, sosyoekonomik seviye ve aile yapısı gibi bölgesel faktörlerden etkilenecek özellik arz etmekle birlikte beklenti sınırları içerisinde.

H.pylori genotiplerinin gastrik kolonizasyona etkisi birçok araştırmacı tarafından geniş vaka grupları ile çalışılmış, *cagA*⁺*vacA*⁺ Tip-I suşların *cagA*⁻*vacA*⁻ Tip-II suşlara göre daha virulan oldukları gösterilmiştir^{10,90,94-97,113}. İleri çalışmalarla, *cagA* ve *vacA* allellerinin de prognoza etkisi yoğun olarak tartışılmıştır^{11-16,86,98-102}. Bu çalışmada; *ureC*-PCR ile pozitif bulunan biyopsi örneklerinden ekstrakte edilen

H.pylori DNA'sından bakteriye ait muhtemel *cagA* ve *vacA* genleri ile *vacA* geninin *sla*, *slb*, *slc*, *s2* ve *m1a*, *m1b*, *m2* allellerinin belirlenmesi amaçlandı. Ancak, *cagA* geninin 3' ucunda yer alan EPIYA gen kasetlerinin prognoza etkisi ile ilgili iddialar yeterince açık olmadığı ve bu bölgeleri tespiti yönelik standardize edilmiş moleküler metodlar olmadığı için *cagA* gen varyantları çalışılmadı. Bizim her iki hasta grubunda, en az bir biyopsi örneğinde *ureC*-PCR pozitifliğini baz alarak *H.pylori* pozitif olarak kabul ettiğimiz 201 hastamıza ait biyopsi örneklerinden en az bir örnekte olmak üzere toplam 169'unda (% 84.1) *cagA* genine ait, 199'unda (% 99) da *vacA* genine ait spesifik fragmentlerin varlığını PCR ile gösterdik. *cagA* pozitif olguların tamamında *vacA* da pozitif iken, *vacA* pozitif 30 örnekte *cagA* negatif idi. Bu bulgular bizim biyopsi örneklerinde *H.pylori ureC* geni tespit ettiğimiz 201 hastamızdan 169'unda *vacA*⁺*cagA*⁺ suşların, 30'unda *vacA*⁺*cagA*⁻ suşların, 2'sinde de *cagA* ve *vacA* negatif suşların kolonize olduklarını göstermektedir (Tablo 4.6). Burada *cagA*⁻*vacA*⁺ suşların da sınıflamada tip-II suşlar arasında sayılması doğru olacaktır. Bilindiği gibi, VacA toksini CagA toksini üreten suşlarda eksprese edilmekle birlikte, *vacA* gen bölgesi aslında bütün suşlarda bulunmakta, ancak suşların önemli bir kısmında defektli oldukları için toksin üretememektedirler¹¹¹⁻¹¹⁴.

Bizim bölgemize ait gastrik kolonizasyon gösteren ve klinik yakınmaya sebep olan muhtemel suşlarımıza ait % 84.1'lik *cagA* pozitiflik oranımız literatürle son derece uyumludur. Bu oran bölge, ülke ve hasta gruplarına göre değişmektedir. Mesela ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda^{151,152} bu oran % 78-80 arasında belirlenmiştir. Ancak farklı hasta gruplarından olmak üzere *cagA* pozitiflik oranları; Şili'de¹⁷⁰ % 38, Sri-Lanka'da¹⁷¹ % 48, Hollanda'da¹⁷² % 67, ABD'de¹⁷³ % 81, Hong Kong'da¹⁷⁴ % 89, Nijerya'da¹⁷⁵ % 93, Brezilya'da¹⁷⁶ % 94 ve Kore'de¹⁷⁷ % 97 olarak bildirilmiştir. Bizim % 84.1'lik *cagA* pozitiflik oranımız Şili, Sri-Lanka ve Hollanda'dan bildirilen oranlardan (% 38-67) daha yüksektir. Ancak ülkemizden bildirilen % 78-80 oranındaki *cagA* pozitiflik oranı ile ABD ve Hong Kong'dan bildirilen % 81-89'luk oranlarla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Buna karşılık, Nijerya, Brezilya ve özellikle Kore'den bildirilen izolatlar arasındaki *cagA* pozitiflik oranları (% 93-97) bizim oranlarımızdan daha yüksektir. Bu farklılıklar literatürde de görüldüğü üzere tamamen bölgesel farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Bizim *H.pylori* pozitif olan hastalarımızın % 99'unda kolonize suşların *vacA* spesifik gen dizilerine sahip oldukları göz önüne

alınırsa, bölgemizde mide patolojisi olan hastalarımızdan en az % 84.1’inde Tip-I, kalan % 15.9’unda da Tip-II suşların kolonize oldukları görülmektedir (Tablo 4.6).

Diğer taraftan, *H.pylori*’nin mide mukozasında kolonize olduğu bölge, klinik ve histopatolojik tablo ve kolonize suşun *cagA* ve *vacA* profili arasındaki ilişki birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır^{170-181,183}. Biz de, hastalarımızdaki bu muhtemel ilişkiye açıklık getirmek amacı ile hasta gruplarımızın antrum ve korpus biyopsi örneklerinde kolonize olan suşların *vacA* ve *cagA* profillerini inceledik. Bizim DÜ’li hastalara ait korpus örneklerinde kolonize olan suşların tamamının *cagA*⁺*vacA*⁺ *H.pylori* suşları, yani Tip-I suşları olduğu görülmüştür. Aynı hasta grubunda antrumda kolonize olan suşların ise 66/70 (% 94.3)’sının Tip-I suşları olduğu görülmüştür. Buna karşılık, G/MÜ’li hastalara ait korpus örneklerinde kolonize olan 113 suşun 102’sinin (% 90.3), antrum örneklerinde kolonize olan 131 suşun da 103’ünün (% 78.6) Tip-I suşları oldukları görüldü. Bir başka ifade ile Tip-I suşlarının DÜ’li hastalardaki prevalansı korpusta % 100, antrumda % 94.3, G/MÜ’li hasta grubunda ise sırası ile % 90.3 ve % 78.6 dır (Tablo 4.7 ve 4.8).

Sarıbaşak H ve ark.¹⁵¹, 92 biyopsi örneğini değerlendirdikleri çalışmalarında 65 örnekte *H.pylori* kolonizasyonu tespit etmişler, bu suşların da 51’inin (% 78) *cagA* pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Sadece antrum örneklerini değerlendiren bu araştırmacılar *cagA*⁺ suşların prevalansının gastritli gruptaki suşlar arasında % 55, MÜ’li hastalara ait suşlar arasında % 100 ve DÜ’li hastalara ait suşlar arasında ise % 89 olduğunu belirtmişlerdir. Bolek BK ve ark.¹⁵² da, sadece antrum örneklerini değerlendirdikleri çalışmalarında kolonize suşların; DÜ’li hastalarda % 87, MÜ’li hastalarda % 71, gastritli hastalarda ise % 57’sinin *cagA* pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Aydın F ve ark.¹⁷⁸ ise *cagA*⁺ suşların prevalansının peptik ülserli hastalarda % 72, NÜD’li hastalarda ise % 44 olduğunu belirtmişlerdir. Bu üç çalışmada^{151,152,178} da beklendiği gibi patolojinin şiddeti ile paralel olarak seyreden bir *cagA* pozitifliği dikkat çekmektedir. Ancak, bu gruplar sadece antrum örneklerini değerlendirmişler ve MÜ ile gastriti klinik tanımlamada farklı skorlamışlardır. Bu sebeple, bizim sonuçlarımızdan sadece antrum bulgularımızın bu çalışmalarla karşılaştırılması mümkündür. DÜ’li gruptaki % 94.3 oranındaki *cagA*⁺ olan prevalansımız Sarıbaşak H ve ark.’nın¹⁵¹ % 89, Bolek BK ve ark.’nın¹⁵² % 87’lik oranına yakın, ancak daha yüksektir. G/MÜ’li hasta grubumuzun antrum örneklerine ait

% 78.6'lık oranımız da Sarıbaşak H ve ark.'nın¹⁵¹ benzer hasta gruplarına ait %77.5'lik ortalama oranına benzer iken, diğer iki çalışmadaki^{152,178} ortalama değerlerden daha yüksektir. Bizim bulgularımızın ülkemizdeki farklı bölgelerden elde edilen çalışmalardaki sonuçlarla bire bir örtüşmemesi, kullanılan yöntem, çalışmayı yapan kişilerin tecrübesi gibi laboratuvarlar arasında tolere edilebilir teknik farklılıklar kadar, bölgesel beslenme alışkanlıkları, sosyoekonomik şartlar gibi hasta gruplarının çeşitliliğinden de kaynaklanabilir. Ancak bizim çalışmamız, özellikle DÜ'li hastalarda prognoza ait delil aranacaksa, örneğin antrumdan çok korpustan alınmasının daha doğru olacağını göstermiştir. Yurt dışından yapılan çalışmalarda da klinik tablo ile *cagA* pozitifliği arasındaki ilişki tartışılır derecede ilgili bulunmuştur. Mesela, Nijerya'da DÜ'li hastalardan izole edilen *H.pylori* suşları arasında % 95 olan *cagA* pozitifliği NÜD'li hastalarda % 91 olarak tespit edilmiştir¹⁷⁵. Bu grubun DÜ'li hastalara ait bulguları bizim aynı grup için tespit ettiğimiz % 94.3'lük oranımızla son derece benzer olmasına karşılık, genel değerlendirmede *cagA* profilinin klinik tabloya etkisini tartışılır hale getirmektedir. Hindistan'da DÜ ve kronik gastritli hasta gruplarından oluşan 116 hasta ile yapılmış olan bir çalışmada¹⁴¹, DÜ'li hasta grubu için bildirilen % 90 oranındaki *cagA*⁺ suşlara ait prevalans yine bizim bulgumuza yakındır. Bu grup kronik gastritli hastalardaki *cagA*⁺ suşların prevalansını da % 82 olarak bildirmiştir. Bu olgularda gastrit veya MÜ şekilleneceği varsayımından hareket edilecek olursa, gastrit ve MÜ için elde ettikleri farz edilen % 82'lik oranları bizim benzer gruptaki % 78.6'lık oranımıza büyük ölçüde benzerdir¹⁴¹.

Belçika'da¹⁴² *cagA* pozitifliğinin prognoza etkisini tespit amacı ile 104 hasta ile yapılmış bir çalışmada DÜ'li hastalarda % 92, kronik gastritli hastalarda % 73 olarak bildirdikleri pozitiflik oranları, benzer şekilde İngiltere'de¹⁷⁹ yapılmış bir çalışmada DÜ'li hastalarda % 94, MÜ'lilerde % 58, NÜD'lilerde ise % 56 olarak bildirilen *cagA*⁺ suş prevalansı, Brezilya'da Ashour AAR ve arkadaşları¹⁷⁶ tarafından yapılmış bir çalışmanın sonunda, DÜ'li hastalarda % 88 olarak bildirilen oran ile aynı ülkede Brito CAA ve arkadaşları¹³⁴ tarafından yapılmış başka bir çalışmada DÜ'li hastalar için bildirilen % 91'lik *cagA*⁺ suş prevalans oranları bizim DÜ'li hastaların antrum örneklerindeki *cagA*⁺ *H.pylori* suşlarına ait % 94.3'lük prevalans oranımızla büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, DÜ'li hastalara ait biyopsi örneklerinden izole edilen suşlar arasındaki *cagA*⁺ *H.pylori* suşları prevalansı; ABD,

İtalya, İngiltere, Hollanda, Avustralya ve Hong Kong'da % 80-100 oranları arasında bildirilmiştir¹⁸⁰⁻¹⁸⁵. Bu sonuçlar, tüm dünyada olduğu gibi bizim ülkemizde de *cagA*⁺ suşlarla kolonizasyonun özellikle DÜ, gastrit ve MÜ için risk oluşturduğunu, ancak, DÜ'li hastalarda korpus biyopsi örneklerinin antrum örneklerinden daha değerli olduğunu göstermektedir.

H.pylori suşlarının virulansına *vacA* geninin katkısı ile ilgili yapılan çalışmalarda bölgesel olarak değişen sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalarda, daha önce de belirtildiği gibi *s1/m1* ve *s1/m2* allelllerine sahip suşların daha virulan olduğu, *s2/m2* suşlarının daha hafif, kendini sınırlandıran klinik tablolara yol açtığı iddia edilmiştir^{14,100,101,115}. Ayrıca, *s1c* suşlarının Asya kökenli suşlarda daha yoğun görüldüğü ve bu bölgede daha sık karşılaşılan mide kanserleri ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüşse de, tek başına *s1c* ile kanser oluşumunun izah edilemeyeceği bu konudaki çelişkili sonuçlar üreten çalışmalarla gösterilmiştir^{11,101,186,187}. Biz, çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta gruplarımızdaki *vacA* allellerinin prognoza etkisinin, allellerin *cagA* ile ilişkisinin ve bölgede hakim olan allel veya allellerin tespiti için allel spesifik primerler yardımı ile *vacA* pozitif 199 örneği değerlendirdik.

Bizim G/MÜ'li hasta grubumuza ait *cagA*⁺ 103 suшта en sık görülen allelik kombinasyonumuz 33 örnekteki *s1c/m1b* idi. Bunu 26 örnekle *s1c/m1a*, 20'şer örnekle *s1a/m1a* ve *s1a/m1b* genotipleri izledi. Bu grupta *s2/m2* genotipi hiçbir örnekte gösterilemedi. Buna karşılık, aynı grupta *cagA*⁺*vacA*⁺ olan 30 örnekte ise en sık karşılaşılan genotipler 8 örnekle *s1/m2* ve 5'er örnekle *s1b/m1a*, *s1b/m1b* ve *s2/m2* idi (Tablo 4.12).

DÜ'li hastalarımızdan *cagA*⁺*vacA*⁺ örneklerde en sık rastlanan *vacA* genotipi 27 örnekle *s1a/m1b* idi. Bunu 19 örnekle *s1a/m1a* ve 12 örnekle *s1c/m1b* kombinasyonları izledi. Yine bu grupta da örneklerin hiç birisinde *s2/m2* genotipi tespit edilemedi. *cagA*⁺*vacA*⁺ biyopsi örneklerinde ise; 3 örnekte *s1/m2* ve 1 örnekte de *s1b/m1a* genotipi görüldü (Tablo 4.12).

Bu bulgulardan hareketle, bizim G/MÜ'li hastalarımızda kolonize olan Tip-I suşlarımızda en sık karşılaşılan “s” allelinin 59 örnekle *s1c* olduğu, bunu 40 örnekle örnekle *s1a* allelinin izlediği, “m” allelleri içerisinde ise en sık karşılaşılan allelin 53 örnekle *m1b* olduğu, bunu 49 örnekle *m1a*'nın izlediği görüldü. Buna karşılık, DÜ'li hastalara ait biyopsi örneklerinde ise en sık karşılaşılan “s” allelinin 46 örnekle *s1a*

olduğu, bunu 20 örnekle *slc*'nin izlediği, “*m*” allelleri içerisinde ise en sık karşılaşılan allelin 39 örnekle *mlb* olduğu, bunu 27 örnekle *m1a*'nın izlediği görüldü. Yani G/MÜ'li hastalarda egemen olan “*s*” allelinin *slc* olmasına karşılık, DÜ'li hastalardaki egemen olan “*s*” alleli *sl1a* idi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.001$; Ki kare Fisher exact testi). Egemen olan “*m*” allelinin ise her iki grupta da *mlb* olduğu görüldü (Tablo 4.12 ve 4.13).

Genel bir değerlendirme yapıldığında ise, bütün Tip-I suşlarımızda en sık karşılaşılan *vacA* genotipinin 47 örnekle *sl1a/mlb* olduğu, bunu 45 örnekle *slc/mlb*'nin izlediği görülmüştür. Yine genelde, *vacA* allelleri tespit edilen 169 Tip-I suşunun % 50.9'u *sl1a* iken, % 46.7'si *slc* olarak tanımlanmıştır. Bu gruptaki suşların % 2.4'ü de *sl1b* alleleline sahip idi.

vacA allellerinin hasta gruplarına dağılımı ile ilgili farklı kaynaklardan farklı sonuçlar bildirilmiş, ancak *sl1a*, *sl1b* ve *m1a* allellerinin Avrupa ve Güney Amerika suşlarında, *slc* ve *mlb* allellerinin ise daha çok Doğu Asya kökenli suşlarda olduğu ortak görüşüne varılmıştır^{16,86,101,134,174}. Bizim ülkemizde *vacA* allelleri dağılımı ve klinik bulguların karşılaştırıldığı çalışma yok denecek kadar azdır. Bolek BK ve ark.¹⁵² İstanbul bölgesinde yaptıkları ve DÜ'li ve MÜ'li hastalara ait biyopsi örneklerini *cagA* ve *vacA* yönünden değerlendirdikleri çalışmalarında, DÜ'li hastalarda kolonize olan Tip-I suşlardaki en sık tespit ettikleri *vacA* genotipinin örneklerin % 81'inde *sl1/ml1*, % 15'inde ise *sl1/ml2* olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar MÜ'li hastalarda da % 60 ile *sl1/ml1* kombinasyonunun en sık karşılaşılan genotip olduğunu, bunu % 40 ile *sl1/ml2* genotipinin izlediğini, ayrıca, her iki hasta grubunda birer tane olmak üzere toplam 2 örnekte *sl2/ml2* genotipi görüldüğünü bildirmişlerdir. Ancak, bu grup “*s*” ve “*m*” allellerinin subgruplarını araştırmamıştır. Bizim çalışmamızdaki Tip-I olarak tanımladığımız suşlardan; G/MÜ'li hastalara ait 1'inde *sl1/ml2* genotipi görülmüş iken, DÜ'li hastalara ait olanlarında *sl1/ml2* genotipi görülmedi. Buna karşılık, Tip-II olarak tanımlanan suşlardan ise; G/MÜ'li hastalara ait 8'i ile DÜ'li hastalara ait 3'ünde *sl1/ml2* genotipi tespit edildi (Tablo 4.12). Bolek BK ve ark.¹⁵² Tip-I suşlarda *sl1/ml2* genotipini % 15 ve % 40 gibi oldukça yüksek oranlarda bildirmişlerdir. Oysa *sl1/ml2* genotipi bizim Tip-II suşlarımızda daha sık görüldü. Biz G/MÜ'li hastalarımızda kolonize olan Tip-II *H.pylori* suşlarından 5'inin *sl2/ml2* genotipine ait olduklarını gördük. Oysa Bolek BK ve ark.¹⁵² bu genotipi Tip I suşlarda ve 2 hastaya ait biyopsi örneğinde tespit etmişlerdir.

Yurt dışından yapılan çok sayıdaki çalışmada *s2* alleleline sahip genotiplerin çok nadir görüldüğü veya asemptomatik taşınan suşlarda olduğu gösterilmiştir^{16,136,188}. Bu bağlamda, bizim sadece Tip II suşlarında gösterdiğimiz *s2* alleleri literatür ile uyum göstermektedir. Bolek BK ve ark.'nın¹⁵² Tip II suşları ve *vacA* “*s*” ve “*m*” subtipleri ile ilgili bilgi vermemeleri, bizim bulgularımızı daha detaylı kıyaslamamızı engellemektedir. Ülkemizde yapılmış diğer bir çalışmada Sarıbaşak H ve ark.¹⁵¹, yine İstanbul bölgesinde 73 hastaya ait biyopsi örneklerini değerlendirerek, bu örneklerin % 89’unda *H.pylori* kolonizasyonu tespit etmişler ve bu suşların da % 78’inin Tip-I suşlar olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar¹⁵¹ Tip-I suşlar içerisinde en sık görülen *vacA* allelinin *s1a/m1a* olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki çalışmada^{151,152} elde edilen sonuçları, bizim sonuçlarımızla karşılaştırdığımızda; *s1* allelinin her üç çalışmada da en sık tespit edilen allel olduğu, Sarıbaşak ve arkadaşlarının çalışmalarında görülmeyen *s1c* allelinin, demografik yapıdaki bölgesel farklılığa bağlı olarak, bizim izolatlarımızda yüksek oranda görüldüğü dikkat çekmektedir (Tablo 4.9) Benzer farklılıklar yurt dışından bildirilen oranlarda da görülmektedir. Mesela, Smith SI ve ark.¹⁷⁵ Nijerya’da DÜ’li ve NÜD’li olgularda yaptıkları *vacA* allel çalışmasında, *s1/m2* allelinin çok yüksek oranda görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu grubun *s1/m2* allel oranları, DÜ’li ve NÜD’li hastalarda sırası ile % 73.7 ve % 72.7’dir. Buna karşılık, *s1/m1* alleli görülme sıklığını da sırası ile % 26.3 ve % 22.7 oranında bulmuşlar, *s2/m2* allelinin ise sadece NÜD’li bir hastada görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu grubun *s2* alleli ile ilgili bulguları hem genel literatür, hem de bizim bulgumuzla uyuşmaktadır. Buna karşılık, Ashour AAR ve ark.¹⁷⁶ da Brezilya’da yaptıkları bir çalışmanın sonunda gastritli hastalardan izole ettikleri 18 suşun 8’i ile DÜ’li hastalardan izole ettikleri 20 suşun 2 sinde *s2/m2* allelinin varlığını bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada *cagA-vacA* birlikteliği ile ilgili yani çalışmaya dahil edilen suşların tipi ile ilgili bilgi verilmemiştir. Bu belirsizlik bulgularımızın tartışılmasını engellemektedir. Yine de, DÜ’li hastalarda gastritli hastalara göre daha düşük orandaki *s2/m2* prevalansları bu allelik kombinasyona sahip suşların daha düşük virulansa sahip olduklarını düşündürmektedir. Yine Brezilya’dan bildirilen başka bir çalışmada ise, Martins LC ve ark.¹⁸⁹; gastritli, MÜ’li ve DÜ’li hastalardan izole ettikleri Tip-I suşlarının % 82.9’unun *s1b/m1* alleleline sahip olduklarını, buna karşılık, aynı gruplarda Tip-II suşlarda en sık görülen allelin % 76.9 oranı ile *s2/m2* olduğunu Tip I suşlarda bu allelin görülmediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada¹⁸⁹ bildirilen “*s*” ve “*m*”

allelere ile ilgili sonuçlar, ülkemizde yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan tamamen farklı olmakla birlikte, bu grubun *s2/m2* sonuçları bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Bu grup, bizim gibi *s2/m2* allelini sadece Tip II suşlarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Van doorn ve ark.¹⁷² da Hollanda'da peptik ülserli hastalara ait izolatlarla yaptıkları bir çalışmada; *vacA* allelik kombinasyonlarının prevalansını *s1a/m1*, *s1a/m2*, *s1b/m1*, *s1b/m2* ve *s2/m2* için sırası ile % 36.2, % 23.4, % 2.1, % 5.3 ve % 20.2 olarak bildirmişler, Tip I izolatlarında *s1* allellerinin yüksek oranda birlikteliğine dikkat çekmişlerdir. Bu grubun, *m1* suptiplerini belirtmemiş olması tam olarak bizim bulgularımızla kıyası engellemektedir. Bununla birlikte, bizim çalışmamızda da *s1a/m1a* ve *s1a/m1b* allellerimizin toplamı % 50.9 ile en yüksek oranı oluşturmuştur. Bu grubun *s2/m2* oranı bizim oranımızdan yüksektir, ancak, bu allelik kombinasyona sahip suşların *cagA* - *vacA* statüleri belirtilmemiştir.

Biz, bir olguya ait antrum biyopsi örneğinde *s1a/m1a* ve korpus biyopsi örneğinde de *s2/m2* alleli ile kolonizasyon yani multiple kolonizasyon tespit ettik. Literatürde multiple kolonizasyon ile ilgili farklı sonuçlar bildirilmiştir. Mesela Van Doorn LJ ve ark.¹⁷², çalışmalarında % 10.6 oranında multiple kolonizasyon tespit ettiklerini bildirmişken, Wong BC ve ark.¹⁷⁴, bu oranın kendi serilerinde % 8.3 olduğunu bildirmişlerdir. Bu oranlar bizim oranımızdan oldukça yüksektir. Buna karşılık, Martins LC ve ark.¹⁸⁹, araştırmalarında hastaların % 3.4'ünde multiple kolonizasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu oran bizim oranımıza oldukça yakındır.

Sonuç olarak, *H.pylori* ve genotipleri ile gastroduodenal hastalıklar arasındaki ilişkiyi tespitiye yönelik olarak yapılan çalışmalarda, farklı ülkelerde veya bir ülkedeki farklı bölgelerde çalışmaya dahil edilen hastaların genetik özellikleri, beslenme alışkanlıkları, yaş, sigara kullanımı ve ailedeki nüfus sayısı gibi sebeplere bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bir genelleme olarak; bütün dünyada Tip-I suşların prognozu olumsuz yönde etkilediği, *vacA* allellerinden *s1a* ve *s1b*'nin Batı toplumlarında, *s1c* allellerinin de Asya kökenli toplumlarda daha sık görüldüğü söylenebilir. Bu genelleme dışında Tip-I ve Tip-II suşlarının farklı hasta gruplarındaki prevalansı, *cagA* genotipleri ile *vacA* genotiplerinin dağılımı bölgesel özellik göstermektedir. Bu sebeple de, özellikle ülkemiz gibi *H.pylori* infeksiyonlarının yüksek insidans ve prevalansa sahip olduğu ülkelerde farklı hasta gruplarındaki allel ve genotiplerin belirlenmesi hem genotip ve hastalığın prognozu arasında kurulacak ilişki

ile prediktif bir veri sağlaması açısından hastaya, hem de ülkeye ve evrensel tıbbı katkı sağlayacaktır. Bu çalışma sonunda, bölgemizde G/MÜ'li ve DÜ'li hastalarda Tip-I suşların sırası ile % 78.6 ve % 94.3 gibi yüksek oranlarda görüldüğü, en sık görülen *vacA* genotipinin G/MÜ'li hastalarda *slc/mlb* ve DÜ'li hastalarda *sla/mlb* olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar bölgemizdeki benzer hasta gruplarından izole edilen suşların genotip tayini sonrası kolonizasyonunun prognozu için prediktif değeri taşımaktadır.

6. SONUÇLAR

Gastrit, mide ülseri ve duodenal ülser ile *H.pylori* arasındaki muhtemel ilişkiyi ve *H.pylori* gastrik kolonizasyonun prognozunu etkileyen konağa ait cinsiyet ile bakteriye ait en önemli virulans faktörleri olan *cagA* ve *vacA* genotiplerinin etkisini tespit amacı ile planlanan çalışma sonunda;

1. *H.pylori* gastrik kolonizasyonun erkek hastalarda (% 95.6) kadın hastalara göre (% 75.0) daha yüksek oranda olduğu,
2. *H.pylori* kolonizasyonu G/MÜ'li hasta grubunda 131 (% 82.9), DÜ'li hasta grubunda 70 (% 95.9) olmak üzere toplam 201 (% 87.0) hastanın tamamının antrum mukozasında tespit edilirken, bu hastaların tamamı antrum mukozasında da kolonize olmak üzere, 113'ü G/MÜ'li, 41'i de DÜ'li, toplam 154'ünün korpus mukozasında görüldüğü, bu sebeple de, farklı hasta gruplarındaki *H.pylori* gastrik kolonizasyonunu gösterebilmek için tek başına antrum biyopsi örneklerinin yeterli olduğu,
3. *H.pylori* Tip-I suşların prevalansının DÜ'li hastalarda (% 94.3) G/MÜ'li hastalardan (% 78.6) daha yüksek olduğu,
4. DÜ'li hastaların korpusunda kolonize olan suşlarının tamamının Tip-I suşları olmasına karşılık, G/MÜ'li hastalara ait korpus örneklerindeki Tip-I kolonizasyon prevalansının (% 90.3) daha düşük olduğu,
5. G/MÜ'li hastalarda en sık karşılaşılan allelik kombinasyonun 33 örnekle *sIc/mIb* olduğu, DÜ'li hastalarda ise 27 örnekle *sIa/mIb*'nin en sık görülen kombinasyon olduğu,
6. G/MÜ'li hastalara ait suşlarda *sIc* allelinin görülmesinin, bu allelin bölgemiz için önemini vurgulamakla birlikte, Doğu kökenli suşlarda gastrik kanserler için önemli bir risk faktörü olduğu gösterilen bu suşlarla meydana gelen gastrik kolonizasyonun bölgemiz için de bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bölgemizde gastroduodenal yakınması olan hastalarda endoskopik muayene esnasında tanı amacı ile antrum biyopsi örneklerinin alınması ve bu örneklerde sadece *H.pylori* kolonizasyonunun gösterilmesi ile yetinilmeyip genotip ve allelik kombinasyonun da tespit edilmesinin, gastrik kansere kadar ilerleme riski olan *s/c* alleleline sahip suşlarla oluşan infeksiyonların erken tanısı ve eradikasyonuna imkan sağlayacağı için önemli olduğu görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. **Dunn BE, Cohen B, Blaser MJ.** *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*, **1997**; 10(4):720-741.
2. **Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez, GI, Blaser MJ.** Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection and Histologic Gastritis in Asymptomatic Persons. *N Engl J Med*, **1989**; 321(23):1562-1566.
3. **Köksal F.** *Helicobacter pylori*. **Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. (Ed) İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.**
4. **Al-Qurashi A, El-Morsy F, Al Quorain A.** Evolution of Metronidazole and Tetracycline susceptibility pattern in *Helicobacter pylori* at a hospital in Saudi Arabia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2001**; 17:233-236.
5. **Alarcon T, Domingo D, Brea ML.** Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **1999**; 12:19-26.
6. **Köksal F.** *Helicobacter pylori* Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler. 3. *Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 28 Haziran-01 Temmuz, Ankara, Program ve Bildiri Özet Kitabı, 2004*; 99-111.
7. **Peek RM, Blaser MJ.** Pathophysiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastritis and Peptic Ulcer Disease. *Am J Med*, **1997**; 102:200-207.
8. **Hocker M, Hohenberger P.** *Helicobacter pylori* Virulence Factors - one Part of a Big Picture. *Lancet*, **2003**; 362(9391):1231-1233.
9. **Özden A.** Midenizdeki Yabancı. *Türk Gastroenteroloji Vakfı yayınları*, **2003**; 1-160.
10. **Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M et al.** Determination of *Helicobacter pylori* Virulence by Simple Gene Analysis of the *cag* Pathogenicity Island. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2001**; 8 (1):181-186.
11. **Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R et al.** Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36:2597-2603.
12. **Cover TL, Tummuru MK, Cao P, Thompson SA, Blaser MJ.** Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter* strains. *J Biol Chem*, **1994**; 269:10566-10573.
13. **Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY.** Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37:2274-2279.
14. **Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL.** Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, **1995**; 270:17771-17771.
15. **Mukhopadhyay AK, Kersulyte D, Jeong JY et al.** Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta. *India J Bacteriol*, **2000**; 182:3219-3227.
16. **Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M et al.** Distinct Diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* Genes of *Helicobacter pylori* Associated with Peptic Ulcer in Japan. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2005**; 43(8):3906-3916.

17. **Marshall BJ and Warren JR**, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1984**; 21:1311–1315.
18. **Kidd M, Modlin IM**. A Century of *Helicobacter pylori*. *Digestion*, **1998**; 59: 1-15.
19. **Blaser MJ**. *Helicobacter pylori* Phenotypes Associated With Peptic Ulceration. *Scand J Gastroenterol*, **1994**; 29:1-5.
20. **Marshall BJ, Armstrong JA, McGechie DB, Glancy RJ**. Attempt to Fulfil Koch's Postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust*, **1985**; 142:436-439.
21. **The European *Helicobacter pylori* Study Group**. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut*, **1997**; 41:8–13.
22. **Goodwin CS, Worsley BW**. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, **1993**; 22(1):15-19.
23. **Forman D**. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, **1995**; 9(2):71-76.
24. **Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb A, Warnke R**. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med*, **1994**; 330:1267-71.
25. **Ahmed N, Sechi LA**. *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathology: New Threats of the Old Friend. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **2005**; 4 (1):1-10.
26. **Zhang ZF, Robert C, Kurtz D, Klimstra S et al**. *Helicobacter pylori* Infection on the Risk of Stomach Cancer and Chronic Atrophic Gastritis. *Cancer Detection and Prevention*, **1999**; 23(5):357.
27. **Duynhoven YTHP, de Jonge R**. Transmission of *Helicobacter pylori*: a Role for Food? *Bultein of the World Health Organization*, **2001**; 79:455-460.
28. **Kikuchi S, Jean E, Crabtree DF, Kurosawa M**. Association between Infections with *cag A* - positive or -negative Strains of *Helicobacter pylori* and Risk for Gastric Cancer in Young Adults. *American Journal of Gastroenterology*, **1999**; 94(12):3455.
29. **Pincock S**. Nobel Prize winners Robin Warren and Barry Marshall. *The Lancet*, **2005**; 366(9495):1429.
30. **Megraud F**. A Humble Bacterium Sweeps This Year's Nobel Prize. *Cell*, **2005**; 123(6):975-976).
31. **Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O et al**. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Letters*, **2002**; 517:180-184.
32. **Megraud F, Malfertheiner P, Morain C, Hungin A, Jones R, Axon et al.**, Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther*, **2002**; 16:167–180.
33. **Kausar F, Khan AA, Hussain MA, Carroll IM et al**. The *cag* Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori* Is Disrupted in the Majority of Patient Isolates from Different Human Populations. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**; 42(11):5302–5308.
34. **Goodman KJ**. Transmission of *Helicobacter pylori* among sibling. *Lancet*, **2000**; 355:358–362.
35. **Oğuz D, Eskioglu E, Köseoğlu T, Unver E et al**. Üst Gastrointestinal Sistem Hastalıklarında *Helicobacter pylori*. *Türk Gastroenterol Derg*, **1995**; 6:440-446.

36. **Sandikci MU, Doran F, Koksall F et al.** *Helicobacter pylori* prevalence in a routine upper gastrointestinal endoscopy population. *Br J Clin Pract*, **1993**; 47(4): 187-189.
37. **Erkisi M, Colakoglu S, Koksall F et al.** Relationship of *Helicobacter pylori* infection to several malignant and non-malignant gastrointestinal diseases. *J Exp Clin Cancer Res*, **1997**; 16(3):289-293.
38. **Us D and Haşcelik G.** Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in an asymptomatic Turkish population. *Journal of Infection*, **1998**; 37:148-150.
39. **Durmaz-Çetin B, Gündüz A, Erdem L, Seber E, Sökmen M.** *Helicobacter pylori* Enfeksiyonları ve Dışkı Antijen Testinin Tanıdaki Değeri. *Klinik Dergisi*, **2004**; 17(3): 177-180.
40. **Alborzi A, Jafar S, Bahman P, Barat O et al.** Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children (south of Iran). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2006**; 5:259-261.
41. **Torres J, Camorlinga PM, Perez G.** Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:2677-80.
42. **Malizia T, Tejada M, Marchetti F et al.** Synergic interactions of macrolides and proton pump inhibitors against *Helicobacter pylori*: a comparative in vitro study. *J Antimicrob Chemother*, **1998**; 41:29-35.
43. **Heep M, Kist M, Strobel S.** Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2000**; 19:538-541.
44. **Gomes BC and Martinis ECP.** The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples *Food Control, Volume*, **2004**; 15:397-403.
45. **Dore MP, Bilotta M, Vaira D, Manca A et al.** High Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Shepherds. *Dig Dis Sci*, **1999**; 44 (6):1161-1164.
46. **Kato S, Fujimura S, Udagawa H, Shimizu H et al.** Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* Strains in Japanese Children. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:649-653.
47. **Malaty HM, Kumagai T, Tanaka E, Ota H et al.** Evidence from a Nine-Year Birth Cohort Study in Japan of Transmission Pathways of *Helicobacter pylori* Infection. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38:1971-1973.
48. **Kalach N, Gergeret M, Benhamou PH et al.** High levels of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* strains in children. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:394-7.
49. **Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B.** Age-Specific Incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **2006**; 130(1):65-72.
50. **Watabe K, Nishi M, Miyake H, Hirata K.** Lifestyle and Gastric Cancer: a Case-Control Study. *Oncol Rep*, **1998**; 5:1191-1194.
51. **Parkin DM, Bray FI, Devesa SS.** Cancer Burden in the Year 2000, The Global Picture. *Eur J Cancer*, **2001**; 8:4-66.
52. **Vaira D, Miglioli M, Mule P et al.** Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. *Gut*, **1994**; 35:309-312.
53. **Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO.** Water Source as Risk Factor for *Helicobacter pylori* Infection in Peruvian Children. *Lancet*, **1991**; 337:1503-1506.

54. **Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD et al.** *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru *Gastroenterology*, **1996**; 110:1031-1035.
55. **Fox JG.** The non-H pylori helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, **2002**; 50:273-283.
56. **Foschini MP, Pieri F, Cerasoli S et al.** *Helicobacter heilmannii*: studio anatomo-clinico di 14 nuovi casi. *Pathologica*, **1999**; 91:18-24.
57. **Yali Z, Yamada N, Wen M, Matsuhisa T, Miki M.** *Gastrosiprillum hominis* and *Helicobacter pylori* infection in Thai individuals: comparison of histopathological changes of gastric mucosa. *Pathol Int*, **1998**; 48:507-511.
58. **Trebesius K, Adler K, Vieth M, Stolte M and Haas R.** Specific Detection and Prevalence of *Helicobacter heilmannii*-Like Organisms in the Human Gastric Mucosa by Fluorescent In Situ Hybridization and Partial 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2001**; 39(4):1510–1516.
59. **Jalava K, On SLW, Harrington CS, Andersen LP et al.** A Cultured Strain of "Helicobacter heilmannii," a Human Gastric Pathogen, Identified as *H. bizzozeronii*: Evidence for Zoonotic Potential of *Helicobacter*. *Emerging Infectious Diseases*, **2001**; 7(6):1036-1038.
60. **Camargo PL, Alfieri AA, Bracarense APFRL et al.** Use of Polymerase Chain Reaction and Enzymatic Cleavage in the Identification of *Helicobacter* spp. in Gastric Mucosa of Human Beings from North Parana, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **2003**; 98(2):265-268.
61. **Tee W, Hinds S, Montgomery J and Dyal-Smith ML.** A Probable New *Helicobacter* Species Isolated from a Patient with Bacteremia. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2000**; 38(10):3846–3848.
62. **Van den Bulck K, Decostere A, Baele M et al.** Identification of Non-*Helicobacter pylori* Spiral Organisms in Gastric Samples from Humans, Dogs, and Cats. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2005**; 43(5):2256–2260.
63. **Altındış M, Özdemir M.** *Helicobacter pylori* ve Tanısı. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **2003**; 2:1-12.
64. **Briede JJ, Pot RGJ, Kuipers EJ et al.** The Presence of the *cag* Pathogenicity Island is Associated with Increased Superoxide Anion Radical Scavenging Activity by *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2005**; 44:227-232.
65. **Matsukura N, Onde M, Tokunaga A et al.** Detection of serum Ig G antibody against *H.pylori* from childhood in Japanese population. *J Gastroenterol*, **1994**; 29:403-405.
66. **Wirth HP, Yang M, Peek RM, Tham KT and Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. *Gastroenterology*, **1997**; 113:1091-1098.
67. **Thoreson ACE, Hamlet A, Celik J, Bystrom M et al.** Differences in Surface-Exposed Antigen Expression between *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Duodenal Ulcer Patients and from Asymptomatic Subjects. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2000**; 38(9):3436–3441.
68. **Isami T, Takashi J, Katsushi W et al.** Suppressive Effects of DNA Vaccines Encoding Heat Shock Protein on *Helicobacter pylori*-induced Gastritis in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2000**; 277:159-163.
69. **Spohn G, Delany I, Rappuoli R and Scarlato V.** Characterization of the HspR-Mediated Stress Response in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, **2002**; 184(11):2925–2930.

70. **Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW, Trust TJ.** Identification, characterization and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. *J Bacteriol*, **1991**; 173:937-946.
71. **Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S.** Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol*, **1995**; 177:3010-3020.
72. **Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S.** Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infect Immun*, **1996**; 64:2445-2448.
73. **Alm RA, Ling LSL, Moir DT, King BL, Brown ED et al.** Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **1999**; 397:176-180.
74. **Suerbaum S and Michetti P.** *Helicobacter pylori* infections. *New Engl J M*, **2002**; 347:1175–1186.
75. **Dunn BE.** Pathogenesis mechanisms of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, **1993**; 22(1):43-57.
76. **Moran AD.** Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol*, **1996**; 31(215):22-31.
77. **Petra V, Marco Z, Nadia H, Christian P.** Human immune response towards recombinant *Helicobacter pylori* urease and cellular fractions. *Vaccine*, **2005**; 26:235-245.
78. **Luciano LG, Ellen KF, Katia RL et al.** *cagA*, *vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2005**; 51:231-235.
79. **Raymond P, Diane P, Podzorski S, Ann W and Vasundhara T.** Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2003**; 46:83-88.
80. **Marcelo LR, Godoy APO, Benvengo YHB et al.** Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2003**; 36:181-185.
81. **Hongxiang L, Hongtao Y, Agnes RF et al.** T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology*, **2002**; 122:1286-1294.
82. **Yamaoka Y, Kikuchi S, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS and Graham DY.** Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production *Gastroenterology*, **2002**; 123:414-424.
83. **Ayraud S, Janvier B, Labigne A et al.** Polyphosphate kinase: a new colonization factor of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, **2005**; 243:45–50.
84. **Hatakeyama M and Brzozowski T.** Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, **2006**; 11(1):14–20.
85. **Krueger S, Hundertmark T, Kalinski T, Peitz U et al.** *Helicobacter pylori* encoding the pathogenicity island activates matrix metalloproteinase 1 in gastric epithelial cells via JNK and ERK. *J Biol Chem*, **2006**; 281:2868–75.
86. **Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatino B et al.** Differences in Genotypes of *Helicobacter pylori* from Different Human Populations. *Journal of Bacteriology*, **2000**; 182(11):3210-3218.

87. **Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O, Meyer TF et al.** *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *The Journal of Cell Biology*, **2003**; 161(2):249–255.
88. **Covacci A, Censini S, Bugnoli M et al.** Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1993**; 90:5791–5795.
89. **Blaser MJ, Perez-Perez, GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM et al.** Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, **1995**; 55:2111–2115.
90. **Bach S, Makristathis A, Pinto A, Quina M, Rotter M and Hirschl AM.** *Helicobacter pylori* type I strains among Austrian and Portuguese patients with gastritis, peptic ulcer or gastric cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **1999**; 18:807–810.
91. **Miehlke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Gunther T et al.** The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer*, **2000**; 87:322–327.
92. **Abasiyanik MF, Sander E and Salih BA.** *Helicobacter pylori* anti-CagA antibodies: prevalence in symptomatic and asymptomatic subjects in Turkey. *Can J Gastroenterol*, **2002**; 16:527–532.
93. **Nomura AM, Lee J, Stemmermann GN, Nomura RY, Perez-Perez GI and Blaser MJ.** *Helicobacter pylori* CagA seropositivity and gastric carcinoma risk in a Japanese American population. *J Infect Dis*, **2002**; 186:1138–1144.
94. **Nomura AM, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G and Blaser MJ.** Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol*, **2002**; 155:1054–1059.
95. **Oliveira AG, Santos A, Guerra JB, Rocha GA et al.** babA2- and cagA-positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41:3964–3966.
96. **Wu AH, Crabtree JE, Bernstein L, Hawtin P et al.** Role of *Helicobacter pylori* CagA⁺ strains and risk of adenocarcinoma of the stomach and esophagus. *Int J Cancer*, **2003**; 103:815–821.
97. **Takata T, Fujimoto S, Anzai K, Shirohani T et al.** Analysis of the expression of cagA and vacA and vacuolating activity in 167 isolates from patients with either peptic ulcers or non-ulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol*, **1998**; 93:30–34.
98. **Van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G et al.** Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene detection and cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36:1271–1276.
99. **Zhou J, Zhang J, Xu C and He L.** cagA genotype and variants in Chinese *Helicobacter pylori* strains and relationship to gastroduodenal diseases. *Journal of Medical Microbiology*, **2004**; 53:231–235.
100. **Atherton J, Peek R, Tham K et al.** Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **1997**; 112:92–99.
101. **Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena AS, Midolo P et al.** Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **1999**; 116:823–830.

102. **Pan ZJ, Berg DE, van de Hulst RW, Su WW et al.** Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis*, **1998**; 178:220–226.
103. **Wu H, Nakano T, Daitoku E, Morita C, Kohno T, Lian HH, Sano K.** Intrabacterial proton-dependent CagA transport system in *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, **2005**; 54:1117–25.
104. **Higashi H, Yokoyama K, Fujii Y, Ren S et al.** EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*, **2005**; 280:23130–7.
105. **Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M.** Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol*, **2006**; 26:261–76.
106. **Kuklinski S, Vladimirova V, Waha A, Kamata H et al.** Expression of galectin-3 in neuronally differentiating PC12 cells is regulated both via *Ras*/MAPK-dependent and -independent signalling pathways. *J Neurochem*, **2003**; 87:1112–1124.
107. **Fowler M, Thomas RJ, Atherton J, Roberts IS and High NJ.** Galectin-3 binds to *Helicobacter pylori* O-antigen: it is upregulated and rapidly secreted by gastric epithelial cells in response to *H. Pylori* adhesion. *Cellular Microbiology*, **2006**; 8(1):44–54.
108. **Hirata Y, Maeda S, Ohmae T, Shibata W et al.** *Helicobacter pylori* induces I κ B kinase nuclear translocation and chemokine production in gastric epithelial cells. *Infect Immun*, **2006**; 74:1452–61.
109. **Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, Drozdowicz D et al.** Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis and functional gastric impairment in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Helicobacter*, **2006**; 11:10–20.
110. **Franco AT, Israel DA, Washington MK et al.** Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**; 102:10646–10651.
111. **Cover TL, Cao P, Lind CD et al.** Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. *Infect Immun*, **1993**; 61:5008–5012.
112. **Cover TL.** The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*, **1996**; 20:241–246.
113. **Phadnis SH, Ilver D, Janzon L et al.** Pathological significance and molecular characterisation of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, **1994**; 62:1557–1565.
114. **Tee W, Lambert JR, Dwyer B.** Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract diseases. *J Clin Microbiol*, **1995**; 33:1203–1205.
115. **Forsyth MH, Atherton JC, Blaser MJ, Cover TL.** Heterogeneity in levels of vacuolating cytotoxin gene (*vacA*) transcription among *Helicobacter pylori* strains. *Infect Immun*, **1998**; 66:3088–3094.
116. **Figueiredo C, Quint WGV, Sanna R, Sablon E, Donahue JP, Xu Q, Miller GG, Peek RM, Blaser MJ, van Doorn LJ.** Genetic organization and heterogeneity of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*. *Gene*, **2000**; 246:59–68.
117. **Ribeiro ML, Godoy APO, Benvengo YHB, Mendonca S, Pedrazzoli J.** Clinical relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian clinical isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **2003**; 36:181–185.
118. **Yamaoka Y, Kwon DH and Graham DY.** A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *PNAS*, **2000**; 97(13):7533–7538.

119. **Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, Crawford S et al.** Correlation between *Helicobacter pylori* OipA Protein Expression and *oipA* Gene Switch Status. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**; 42(5):2279–2281.
120. **Occhialini A, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R and Megraud F.** Distribution of Open Reading Frames of Plasticity Region of Strain J99 in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Gastric Carcinoma and Gastritis Patients in Costa Rica. *Infection and Immunity*, **2000**; 68(11):6240–6249.
121. **Santos A, Queiroz DMM, Menard A, Marais A et al.** New Pathogenicity Marker Found in the Plasticity Region of the *Helicobacter pylori* Genome. *Journal of Clinical Microbiology*, **2003**; 41(4):1651–1655.
122. **GE Z and TAYLOR DE.** Sequencing, Expression, and Genetic Characterization of the *Helicobacter pylori* *ftsH* Gene Encoding a Protein Homologous to Members of a Novel Putative ATPase Family. *Journal of Bacteriology*, **1996**; 178(21):6151–6157.
123. **Rothfield L, Justice S, Garcia-Lara J.** Bacterial cell division. *Annu Rev Genet*, **1999**; 33:423–448.
124. **McGovern KJ, Blanchard TG, Gutierrez JA et al.** g-Glutamyltransferase Is a *Helicobacter pylori* Virulence Factor but is Not Essential for Colonization. *Infection and Immunity*, **2001**; 69(6):4168–4173.
125. **Shibayama K, Kamachi K, Yagi T, Yamane K et al.** A Novel Apoptosis-Inducing Protein from *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **2003**; 8(4):354–364.
126. **Oleastro M, Vicente H, Monteiro L, Lehours P, Menard A and Megraud F.** Search for New Virulence Markers in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Patients with Peptic Ulcer Disease. *Helicobacter*, **2003**; 8(4):360–361.
127. **Oleastro M, Cordeiro R, Menard A, Queiroz D, Yamaoka Y, Megraud F and Monteiro L.** Distribution and Allelic Diversity of a Novel Peptic Ulcer Marker Candidate in Different Geographical Regions. *Helicobacter*, **2006**; 11(4):336.
128. **Yılmaz YA.** *Helicobacter pylori*: mikrobiyolojik tanı yöntemleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **2004**; 35:182–186.
129. **Vaira D, Gatta L, Ricci C and Miglioli M.** Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, **2002**; 16(1):16–23.
130. **Leodolter A, Wolle K, Malfertheiner P.** Current Standards in the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Digestive Diseases*, **2001**; 19(2):116–122.
131. **Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH et al.** Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, **1999**; 37(3):772–774.
132. **Kamali-Sarvestani E, Bazargani A, Masoudian M, Lankarani K, Taghavi AR, Saberifiroozi M.** Association of *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol*, **2006**; 12(32):5205–5210.
133. **Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C et al.** Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *J Lab Clin Med*, **2005**; 146(5):262–270.

134. Brito CAA, Silva LMB, Juca N, Leal NC et al. Prevalence of *cagA* and *vacA* Genes in Isolates from Patients with *Helicobacter pylori*-associated Gastroduodenal Diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **2003**; 98(6):817-821.
135. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI et al. Detection of *Helicobacter pylori* Gene Expression in Human Gastric Mucosa. *Journal Of Clinical Microbiology*, **1995**; 33(1): 28–32).
136. Ito Y, Azuma T, Ito S, Miyaji H 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.
137. Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. Direct determination of *Helicobacter pylori* *vacA* genotypes and *cagA* gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. *Am J Gastroenterol*, **1999**; 94:1525-1531.
138. Tiveljung A, Borch K, Jonasson J, Mardh S, Petersson F, Monstein HJ. Identification of *Helicobacter* in gastric biopsies by PCR based on 16S rDNA sequences: a matter of little significance for the prediction of *H.pylori*-associated gastritis? *J Med Microbiol*, **1998**; 47(8):695-704.
139. Casazza S, Tunesi G, Marinaro E, Caruso F et al. Detection of *Helicobacter pylori* in 201 stomach biopsies using the polymerase chain reaction, histological staining (H&E/Giemsa) and immunohistochemistry. *Pathologica*, **1997**; 89(4):405-11.
140. Moncayo JI, Santacruz JJ, Alvarez AL, Franco B, Lopez MA et al. Comparison of methods in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Quindio, Colombia. *Revista Colombia Medica*, **2006**; 37(3):203-212.
141. Mishra KK, Srivastava S, Dwivedi PP et al. UreC PCR based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and detection of *cagA* gene in gastric biopsies. *Indian J Pathol Microbiol*, **2002**; 45(1):31-37.
142. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of *cagA* Gene in Gastric Biopsy Specimens. *J Clin Microbiol*, **1995**; 33(10):2752-2756.
143. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol*, **1993**; 39(5):338-44.
144. Lee MA and Hong KS. Detection of the *cagA* Gene of *Helicobacter pylori* Using PCR from Gastric Biopsy Specimens. *Korean J Clin Pathol*, **1997**; 17(3):473-480.
145. Romero Lopez C, Owen RJ, Banatvala N, Abdi Y et al. Comparison of urease gene primer sequences for PCR-based amplification assays in identifying the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Cell Probes*, **1993**; 7(6):439-46.
146. Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F et al. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol*, **2004**; 10(13):1958-1960.
147. Ho YW, Ho KY, Ascencio F, Ho B. Neither gastric topological distribution nor principle virulence genes of *Helicobacter pylori* contributes to clinical outcomes. *World J Gastroenterol*, **2004**; 10(22):3274-3277.
148. Yetkin M. Mide Duedenum Hastalıklarında İzole Edilen *Helicobacter* Suşlarında Amoksisilin, Klaritromisin, Tetrasiklin, Metranidazol ve Rifampisin Direncinin Agar Dilüsyon Yöntemiyle Araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Adana*, **2006**.

149. **Kantarceken B, Aladag M, Atik E, Koksall F et al.** Association of CagA and VacA presence with ulcer and non-ulcer dyspepsia in a Turkish population. *World J Gastroenterol*, **2003**; 9(7):1580-1583.
150. **Erzin Y, Altun S, Dobrucali A, Aslan M et al.** Analysis of serum antibody profile against *H.pylori* VacA and CagA antigens in Turkish patients with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol*, **2006**; 12(42):6869-6873.
151. **Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E.** Analysis of *Helicobacter Pylori* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**; 42(4):1648-1651.
152. **Bolek BK, Salih BA, Sander E.** Genotyping of *Helicobacter pylori* strains from gastric biopsies by multiplex polymerase chain reaction. How advantageous is it? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2007**; xx:xxx-xxx.
153. **Shurin MR, Lu L, Kalinski P et al.** Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Seminars in Immunopathology*, **1999**; 21(3):339-359.
154. **Mattapallil JJ, Dandekar S, Canfield DR, Solnick JV.** A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology*, **2000**; 118:307-315.
155. **Chen TS, Chang FY and Lee SD.** Smoking and Male Gender Rather than CagA Protein Are Associated with Increased Risk for Duodenal Ulcer in *Helicobacter pylori*-Infected Patients in Taiwan. *Digestive Diseases and Sciences*, **1999**; 44(10):2076-2080.
156. **Matsuhisa T, Matsukura N and Yamada N.** Topography of chronic active gastritis in *Helicobacter pylori*-positive Asian populations: age-, gender-, and endoscopic diagnosis-matched study. *Journal of Gastroenterology*, **2004**; 39(4):324-328.
157. **Khan AR.** An Age- and Gender-Specific Analysis of *H. Pylori* Infection. *Ann Saudi Med*, **1998**; 18(1):6-8.
158. **Falsafi T, Valizadeh N, Sepehr S and Najafi M.** Application of a Stool Antigen Test to Evaluate the Incidence of *Helicobacter pylori* Infection in Children and Adolescents from Tehran, Iran. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2005**; 12(9):1094-1097.
159. **Ullrich A, Fischbach W and Blettner M.** Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Annals of Oncology*, **2002**; 13(7):1120-1127.
160. **Crespi M, Citarda F.** *Helicobacter pylori* and gastric cancer: what is the real risk? *Gastroenterologist*, **1998**; 6(1):16-20.
161. **Magalhaes AF, Almeida JR, Guerrazzi F, Yamanaka A et al.** Chronic gastritis associated to *Helicobacter pylori* in patients with non-ulcerating dyspepsia and with duodenal ulcer. *Rev Paul Med*, **1991**; 109(5):197-203.
162. **Fiocca R, Villani L, Luinetti O et al.** *Helicobacter* colonization and histopathological profile of chronic gastritis in patients with or without dyspepsia, mucosal erosion and peptic ulcer: a morphological approach to the study of ulcerogenesis in man. *Virchows Arch a Pathol Anat Histopatol*, **1992**; 420(6):489-98.
163. **Blaser MJ and Atherton JC.** *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest*, **2004**; 113(3):321-333.
164. **Nguyen TN, Barkun AN and Fallone CA.** Host Determinants of *Helicobacter pylori* Infection and Its Clinical Outcome. *Helicobacter*, **1999**; 4(3):185-197.

165. **Bahmanyar S, Ye W, Dickman PW and Nyren O.** Long-Term Risk of Gastric Cancer by Subsite in Operated and Unoperated Patients Hospitalized for Peptic Ulcer. *Am J Gastroenterol*, **2007**; 102:1–7.
166. **Blaser M.** *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infectious Diseases*, **1990**; 161:626–33.
167. **Sobala GM, Crabtree JE, Pentith JA, Rathbone BJ et al.** Screening dyspepsia by serology to *Helicobacter pylori*. *Lancet*, **1991**; 338:94–96.
168. **Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Molineaux N et al.** Salivary antibodies to *Helicobacter pylori*: screening dyspeptic patients before endoscopy. *Lancet*, **1994**; 344: 511–2
169. **Strauss RM, Wang TC, Kelsey PB et al.** Association of *Helicobacter pylori* infection with dyspeptic symptoms in patients undergoing gastroduodenoscopy. *Am J Med*, **1990**; 89:464–9.
170. **Martinez A, Gonzalez C, Kawaguchi F, Montoya R et al.** *Helicobacter pylori*: *cagA* analysis and *vacA* genotyping in Chile. Detection of a s2/m1 strain. *Rev Med Chil*, **2001**; 129:1147–1153.
171. **Fernando N, Holton J, Vaira D, DeSilva M, and Fernando D.** Prevalence of *Helicobacter pylori* in Sri Lanka as determined by PCR. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:2675–2676.
172. **Van Doorn LJ, C Figueiredo, R Sanna, A Plaisier et al.** Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, **1998**; 115:58–66.
173. **Straus EW, Patel H, Chang J, Gupta RM et al.** *H. pylori* infection and genotyping in patients undergoing upper endoscopy at inner city hospitals. *Dig Dis Sci*, **2002**; 47:1575–1581.
174. **Wong BC, Yin Y, Berg DE, Xia HH et al.** Distribution of distinct *vacA*, *cagA* and *iceA* alleles in *Helicobacter pylori* in Hong Kong. *Helicobacter*, **2001**; 6:317–324.
175. **Smith SI, Kirsch C, Oyediji KS, Arigbabu AO et al.** Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol*, **2002**; 51:851–854.
176. **Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB et al.** Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2002**; 33:173–178.
177. **Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR et al.** Genotyping *cagA*, *vacA* subtype, *iceA1*, and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. *J Korean Med Sci*, **2001**; 16:579–584.
178. **Aydin F, Kaklikkaya N, Ozgur O, Cubukcu K et al.** Distribution of *vacA* alleles and *cagA* status of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. *Clinical Microbiology and Infection*, **2004**; 10(12):1102–4.
179. **Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP et al.** Clinical and histological associations of *cagA* and *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Clin Pathol*, **1998**; 51:55–61.
180. **Blaser MJ, Crabtree JE.** *CagA* and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Clin Pathol*, **1996**; 106:565–7.
181. **Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A et al.** Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol*, **1989**; 27:225–6.

182. **Cover T L, Glupczynski Y, Lage A P et al.** Serologic detection of infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol*, **1995**; 33:1496-500.
183. **Weel JF, Van der Hulst RW, Gerrits Y et al.** The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis*, **1996**; 173:1171-5.
184. **Tee W, Lambert JR, Pegorer M, Dwyer B.** Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* is more common in peptic ulcer disease. *Gastroenterology*, **1993**; 104:A789
185. **Ching CK, Wong BCY, Kwok E, Ong L, Covacci A, Lam SK.** Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *Am J Gastroenterol*, **1996**; 91:949-53
186. **Lin HJ, Perng CL, Lo WC, Wu CW.** *Helicobacter pylori* *cagA*, *iceA* and *vacA* genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol*, **2004**; 10(17):2493-2497.
187. **Correa P and Schneider BG.** Etiology of Gastric Cancer: What Is New? *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **2005**; 14:1865-1868.
188. **Han SR, Schreiber HJ, Bhak S, Loos M and Macurer MJ.** *vacA* genotypes and diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol*, **1998**; 5:139-145.
189. **Martins LC, Corvelo TCO, Demachki S, Araujo MTF et al.** Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **2005**; 100(8):875-881.

8. ÖZGEÇMİŞ

Azerbaycan uyrukliyum, 02.11.1975 tarihinde Bakü’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Azerbaycan’ın Sumgayıt şehrinde tamamladım. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden 2001 yılında mezun oldum. 2002 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım. Çok iyi derecede Rusça ve iyi derecede İngilizce bilmekteyim. Evliyim.

Dr. Toğrul NAĞİYEV