T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI ENFEKSİYONUNDA BAKTERİYEL DIŞ MEMBRAN PROTEİNLERİNİN İNCELENMESİ

DARYOUSH DAVOUDI OSKOUEI

MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2005970146

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HELICOBACTER PYLORI ENFEKSİYONUNDA BAKTERİYEL DIŞ MEMBRAN PROTEİNLERİNİN İNCELENMESİ

MİKROBİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ

DARYOUSH DAVOUDI OSKOUEI

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Özlem YILMAZ

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2008.KB.SAG.037 sayı ile desteklenmiştir)

TEZ KODU: DEU.HSI.Ph.D-2005970146

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Doktora programı öğrencisi Daryoush DAVOUDI OSKOUEI **"*Helicobacter pylori* enfeksiyonunda bakteriyel dış membran proteinlerinin incelenmesi"** konulu doktora tezini **27.07.2020** tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Prof. Dr. ÖzlemYILMAZ
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hale AKPINAR
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Süheyla SÜRÜCÜOĞLU
ÜYE
Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU
ÜYE
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz DOĞAN
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Aydan ÖZKÜTÜK
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Şafak ERMARTCAN
YEDEK ÜYE
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimim boyunca sınırsız sevgi ve hoşgörüsüyle yetişmemde büyük emek ve katkı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem YILMAZ'a sevgi ve saygıyla teşekkürlerimi sunarım.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı eski Bölüm Başkanı emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BAHAR'a Doktora eğitimim boyunca katkı ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Multidisipliner doktora tez projesinde gastrik biyopsi örneklerinin alınmasını sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hale AKPINAR, öğretim üyesi Sayın Prof Dr. Müjde SOYTÜRK, emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İlkay ŞİMŞEK'e, tüm hastalarımızın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin endoskopi ve histopatoloji bulgularının ayrı ayrı istatistik analizleri için gruplandırılmasında, değerlendirilmesinde Sayın Prof. Dr. Hale AKPINAR'a ve Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU'na, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ ve Prof. Dr. Pembe KESKİNOĞLU'na tezimde tüm istatistik veri analizlerinin gerçekleştirilmesinde çok büyük emek verdiklerinden, sabırlı oldukları ve bilimsel katkılarından dolayı hepinize teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasında yer alan tüm moleküler uygulamalarının yapılmasında ve RT RT-PCR testlerinin gerçekleştirilmesinde büyük emeği geçen Genmar firması çalışanları Emre TEPEDELEN, Duygu ÜNVAR PURCU, Cankut ÇUBUK, Ceren ŞENKAL ve özellikle Genmar firması müdürlüğüne tam bilimsel araştırma laboratuvarları ortamı sağladığı için teşekkürlerimi sunarım.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Gastroenteroloji Polikliniği, Endoskopi Ünitesindeki çalışan uzman doktor ve hemşire kadrosuna katkı ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu dönem boyunca aynı ortamı paylaştığım tüm Doktora ve Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarıma, özellikle Neslihan BEKMEN SAVAŞKAN, Nazlı ARSLAN, Tuba BECERİKLİ SANDIKÇI'ya tez çalışmamde bana içtenlikle verdikleri laboratuvar ve bilimsel destekleri için, ayrıca Sinem GÜLAT'a teşekkür ederim. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli sekreteri Aysun CANER, personeli Şerife KUNT ve Kenan Ata BÜTÜN'e içten davranışları ve emekleri için teşekkür ederim.

Sayın Dr. Hüseyin Ali SADRULEŞRAFİ, Sayın Hossein SOLTANBEİGİ ve annemin öğrencisi Sayın Mustafa JAFARİ'ye doktora dönemimde bana gösterdikleri yakın ilgiye ve desteklerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Daryoush DAVOUDI OSKOUEI

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....I
TABLO DİZİNİ.....VII
ŞEKİL DİZİNİ.....XII
KISALTMALAR.....XV
ÖZET.....1
ABSTRACT.....4
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....7
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....7
1.2. Araştırmanın Amacı ve Kapsamı.....8
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....9
2. GENEL BİLGİLER.....10
2.1. *Helicobacter pylori*'nin Tarihçesi.....10
2.2. *Helicobacter pylori'*nin Mikrobiyolojik ve Genom Özellikleri.....12
2.3. *Helicobacter pylori'*nin Epidemiyolojisi ve Prevalansı.....13
2.4. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Tanısında Kullanılan Yöntemler.....14
2.4.1. İnvaziv Yöntemler.....16
2.4.2. İnvaziv OlmayanYöntemler.....17
2.5. *Helicobacter pylori*'nin Önemli Virülans Faktörleri.....18
2.5.1. *Helicobacter pylori'*nin Flagellaları ve Hareketi 18
2.5.2. *Helicobacter pylori*'nin Üreaz Enzimi Aktivitesi.....19
2.5.3. *Helicobacter pylori*'nin Sitotoksin ile İlişkili Gen A (CagA) Proteini.....19
2.5.4. *Helicobacter pylori*'nin Vakuol Oluşturan Sitotoksin (VacA) Proteini.....21
2.5.5. *Helicobacter pylori*'nin Dış Membran Proteinleri.....23
2.6. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Patogenezi.....28
2.6.1. *Helicobacter pylori'*nin Gastrik Epitel Hücrelerine Tutunması.....29
2.6.2. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunda Toll Benzeri Resptörler (TLR) ve Nükleotit Bağlayan Oligomerizasyon Domain (Nod) Proteinlerinin Rolü.....30
2.6.3. *Helicobacter pylori* CagA Sitotoksinin Etki Mekanizması.....32
2.6.4. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Patogenezinde İmmün Sistemi Yanıtlarının Önemi.....34

2.6.5. *Helicobacter pylori* VacA Sitotoksinin Etki Mekanizması…….....37
2.6.6. *Helicobacter pylori* Dış Membran Proteinlerinin Etki Mekanizması….....38
2.6.7. *Helicobacter pylori* Diğer Virülans Faktörlerinin Etki Mekanizması….....41
2.7. *Helicobacter pylori*'nin CagA ve Dış Membran Proteinleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar…….....42
2.7.1. Proteomiks Araştırmaları…….....42
2.7.2. İmmünoblot ve Serolojik Araştırmalar…….....43
2.7.3. PCR Dışı Diğer Prob Tabanlı Araştırmalar…….....44
2.7.4. Real-time PCR ve DNA Mikroarray Araştırmaları…….....44
2.7.5. Türkiye'de Yapılan Çalışmalar…….....47
2.7.6. Real-time PCR Gen Ekspresyon ve Mikroarray Araştırmaları…….....48
2.8. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda gelecekteki tedaviler.....54
3. GEREÇ VE YÖNTEM…….....56
3.1. Araştırmanın Tipi…….....56
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı…….....56
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi……. …….....56
3.4. Çalışma Materyali…….....57
3.4.1. Biyopsi Örneklerinin Alınması…….....58
i. Endoskopların Sterilizasyonu.....59
3.5. Araştırmanın Değişkenleri…….....60
3.6. Veri Toplama Araçları…….....61
3.6.1. Araştırmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar …….....61
3.6.2. Hasta Başı Hızlı Üreaz Testinin (HÜT) Uygulanması …….....67
i. Hızlı Üreaz Testi (HÜT) Hazırlanması…….....67
3.6.3. *Helicobacter pylori*'nin İzolasyonu ve Kültür Besiyerlerinin Hazırlanması.....67
3.6.3.1. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örnekleri İçin Transport Besiyerinin Hazırlanması.....67
3.6.3.2. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin *Helicobacter pylori* Kültürü İçin Farklı Besiyerlerinin Hazırlanması.....68
i. *Helicobacter pylori* %7 Defibrine At Kanlı Seçici Besiyeri (500 ml).....68
ii. *Helicobacter pylori* %10 Taze İnsan Serumlu Seçici Besiyeri (500 ml).....69
iii. *Helicobacter pylori* %1 Çözünebilir Hemoglobinli Seçici Besiyeri (500

ml).....69
iv. *Helicobacter pylori* %0.004 Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) İndikatörlü Besiyeri (500 ml).....70
v. *Helicobacter pylori* %7 Defibrine At Kanlı Antibiyotiksiz Besiyeri (500 ml).....71
3.6.3.3. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin Kültürü.....71
i. Metilen Mavisi Boyası Hazırlanması…….....73
ii. Gram Boyası Hazırlanması…….....….....73
iii. Modifiye Gram Boyası Hazırlanması…….....73
3.6.3.4. Kültürde *Helicobacter pylori* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu...73
i. Christensen's Üreli Agar besiyeri.....74
ii. Katalaz Testinin Uygulanması…….....74
iii. Oksidaz Testinin Uygulanması…….....….....74
3.6.4. *Helicobacter pylori* Suşlarının Kültür Temelli Fenotipik Yöntemle Antibiyotik Duyarlılık Testi.....74
i. %5 Koyun Kanlı Mueller-Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması….....74
ii. Brucella Buyyon Besiyerinin Hazırlanması…….....75
3.6.4.1. Klaritromisin Gradiyent Diffüzyon Testinin (E-test) Uygulanması 75
3.6.5. *Helicobacter pylori* İzolatlarının Stoklanması…….....76
3.6.5.1. Stok Besiyerlerinin Hazırlanması.....76
i. *Helicobacter pylori* %20 Gliserol İçeren Stok Besiyeri (100 ml).....76
ii. *Helicobacter pylori* %20 Gliserol+%10 Taze İnsan Serumu İçeren Stok Besiyeri (100 ml).....77
iii. *Helicobacter pylori* %20 Gliserol+%10 Taze İnsan Serumu+0.3 M Sakkaroz İçeren Stok Besiyeri (100 ml)…….....77
iv. *Helicobacter pylori* %5 PEG+%10 Taze İnsan Serumu İçeren Stok Besiyeri (100 ml)…….....…….....……78
v. *Helicobacter pylori* %5 DMSO+%10 Taze İnsan Serumu İçeren Stok Besiyeri (100 ml)…….....79
3.6.5.2. Stok Besiyerlerinin Etkinliğinin *Helicobacter pylori* NCTC 11637 Standart Suşu ile Araştırılması.....79
3.6.6. Histopatolojik İncelemeler.....80

3.6.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi.....80
3.6.8. Real-time Reverse Transcriptase PCR (RT RT-PCR)….....…….....81
3.6.8.1. *Helicobacter pylori* Genlerine (*cagA, omp6, omp13, omp18, omp20* Hedef Genler,16S rRNA ve *ureA* House-Keeping genler) Özgül Primer ve Probların Seçilmesi.....81
i. *cagA(cag26, HP0547)* Gen Primerleri…….....….....…81
ii. *omp6 (hopA, HP0229)* Gen Primerleri…….....…….....81
iii. *omp13 (oipA, HP0638)* Gen Primerleri….....…….....82
iv. *omp18 (HP1125)* Gen Primerleri…….....….....82
v. *omp20 (alpA, HP0912)* Gen Primerleri…….....…….....……82
vi. *ureA (HPP12_0077)* House-Keeping Gen Primerleri….....…….....83
vii. 16S rRNA (HPG27_1093) House-Keeping Gen Primerleri….....83
3.6.8.2. Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Çalışması…….....83
3.6.8.3. Pozitif ve Negatif Kontrollerin RT-PCR Gen Ekspresyon Çalışması.....84
3.6.8.3.1. Real-time RT-PCR Testin Standardizasyonu ve Pozitif Kontrolün Uygulanması…….....…….....84
3.6.8.3.2. Real-time RT-PCR Çalışmasında Negatif Kontrollerin Uygulanması.....85
3.6.8.3.3. Bakteriyal RNA Ekstraksiyonu…….....…...…….....86
3.6.8.3.4.Transcriptor First Strand cDNA Sentezi (Reverse Transcription)...88
3.6.8.4. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Çalışması.....89
3.6.8.4.1. Antum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinden Total RNA Ekstraksiyonu.....89
3.6.8.4.2. Elde Edilen Total RNA'ların Ölçümünün Yapılması….....91
3.6.8.4.3. Transcriptor First Strand cDNA Sentezi (Reverse Transcription)..91
3.6.8.5. Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Deneyleri…….....93
3.6.8.5.1. Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Formatının Tasarlanması….93
i. Pozitif/Negatif Kontrollerde Real-time RT-PCR Reaktiflerinin Hazırlanması.....93
ii. Pozitif/Negatif Bakteriyal Kontrollerde Real-time RT-PCR Master Miksin Hazırlanması.....94

3.6.8.5.2. Pozitif ve Negatif Kontrol Suşlarının cDNA Örneklerine Real-time RT-PCR Testinin Uygulanması (Standart suşların çalışılması).....95
3.6.8.5.3. Real-time RT-PCR Çalışmasında *H. pylori cagA* Geninin Varlığı ve Ekspresyonunun Araştırılması…….....96
i. Real-time RT-PCR İçin Reaktiflerin Hazırlanması….....…….....97
ii. Real-time RT-PCR İçin Master Miksin Hazırlanması..….....….....97
iii. Real-time RT-PCR Testinin 96 Kuyucuklu Pleyt Uygulama Düzeni..98
3.6.8.5.4. Antrum ve/veya Korpus Gastrik Biyopsi cDNA Örneklerine Real-time RT-PCR Testinin Uygulanması…….....….....….98
i. Real-time RT-PCR İçin Reaktiflerin Hazırlanması….....….....98
ii. Real-time RT-PCR İçin Master Miksin Hazırlanması …….....….....100
iii. Real-time RT-PCR Testinin 96 Kuyucuklu Pleyt Uygulama Düzeni.100
3.6.8.5.5. Real-time RT-PCR Amplifikasyon Döngüs…….102
3.6.8.5.6. Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi…….....103
3.6.8.5.7. Real-time RT-PCR Testinin Tekrarlama veya Yinelenebilirliği..103
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi…….....104
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi (İstatistiksel Analizler)….....105
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları…….....106
3.10. Etik Kurul Onayı…….....107
4. BULGULAR…….…….....109
4.1. Hastaların Demografik Bulguları…….....109
4.2. Endoskopik Bulgular……...…….....……110
4.3. Hızlı Üreaz Test Bulguları…….…….....…...111
4.4. Histopatolojik Bulgular…….…….....112
4.5. Kültür Bulguları…….....113
4.5.1. *Helicobacter pylori* Tanısında KültürYönteminin Geçerliliği.....115
4.5.2. *Helicobacter pylori* Kültür Besiyeri Geliştirilmesiyle İlgili Bulgular.....116
4.6. Klaritromisin Gradiyent Diffüzyon Test (E-test) Bulguları.....122
4.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi.....122
4.8. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Bulguları…….....…123
4.9. Real-time RT-PCR Bulguları.....….....124
4.9.1. Real-time RT-PCR Testinin Standardizasyonu ve Pozitif Kontrol Bulguları.124

4.9.2.Real-time RT-PCR Testinin Standardizasyonu ve Negatif Kontrol Bulguları.126
4.9.3. *Helicobacter pylori* cagA Gen Ekspresyon Bulguları …….....126
4.9.4. Hastaların Gastrik Biyopsi Örneklerinde *Helicobacter pylori* real-time RT-PCR Bulguları….....127
4.9.5. Hastaların Gastrik Biyopsi Örneklerinde *Helicobacter pylori* real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Bulguları.....141
4.9.6. Hastaların Endoskopik Bulgularına Göre *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları.....142
4.9.6.1. Endoskopik Hasta Gruplarında *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları.....142
4.9.6.2. Endoskopik Hasta Grupları arasında *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları.....145
4.9.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Histopatolojik Bulgular.....165
4.9.8. Hastaların Histopatolojik Bulgularına Göre *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları.....171
4.9.9. Hastaların Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinde *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları.....175
4.9.10. *Helicobacter pylori ureA* Gen Ekspresyon Bulguları.....185
4.9.11. Real-time RT-PCR Testinin Tekrarlanabilirlik Bulguları.....189
4.9.12. Real-time RT-PCR Testinin Analitik Duyarlılık Bulguları…….....190
5. TARTIŞMA…….....192
6. SONUÇ VE ÖNERİLER…….....205
7. KAYNAKLAR…….....207
8. EKLER…….....…….....224
8.1. Etik Kurul Onayı ile İlgili Doküman-1…….....224
8.2. Etik Kurul Onayı ile İlgili Doküman-2…….....229
8.3. Hasta Gönüllü Bilgilendirme Formu…….....232
8.4. Özgeçmiş…….....…….....234

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. *H. pylori*'nin virülans faktörleri ve ilişkili hastalıklar.....28
Tablo 2. *H. pylori*'nin adezinleri ile ilgili reseptörler…….....29
Tablo 3. Araştırmamızda incelenen bağımlı ve bağımsız değişkenler.....60
Tablo 4. Kullanılan sarf malzemelerin özellikleri.....61
Tablo 5. Kullanılan cihazların özellikleri…….....65
Tablo 6. Araştırma planı ve takvimi…….....104
Tablo 7. Yüz yirmi hastanın yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....110
Tablo 8. Yüz yirmi hastanın cinsiyete göre endoskopik bulgularının dağılımı.....110
Tablo 9. Yüz yirmi hastanın hızlı üreaz test (HÜT) bulguları.....112
Tablo 10. Yüz yirmi hastanın histopatolojik (HLO) bulguları.....113
Tablo 11. Yüz yirmi hastanın kültür bulguları.....114
Tablo 12. Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleinde HÜT, histopatoloji (HLO) ve kültür bulguları.....115
Tablo 13. Kültür yönteminin tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü.....116
Tablo 14. Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığının cinsiyete göre dağılımı.....124
Tablo 15. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı stok suşlarından elde edilen gen ekspresyon Ct değerleri.....125
Tablo 16. Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulguları.....128
Tablo 17. *H. pylori* RT RT-PCR testinin tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü.....130
Tablo 18. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada *H. pylori* RT RT-PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması.....130
Tablo 19. Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları ile hastaların demografik, endoskopik ve RT RT-PCR bulguları.....132
Tablo 20. HÜT ve histopatoloji pozitif 48 hastada 45 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri.....135
Tablo 21. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif 66 hastada 60 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri.....137

Tablo 22. Kültür sonucu pozitif saptanan 50 hastada 45 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri.....138
Tablo 23. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif hasta bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....142
Tablo 24. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....143
Tablo 25. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....144
Tablo 26. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....145
Tablo 27. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif hastalarda RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....147
Tablo 28-A. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....149
Tablo 28-B. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....149
Tablo 29-A. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....150
Tablo 29-B. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre

H. pylori gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....150
Tablo 30-A. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı...151
Tablo 30-B. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....151
Tablo 31-A. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....154
Tablo 31-B. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....154
Tablo 32-A. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....155
Tablo 32-B. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....155
Tablo 33-A. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif Saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı..156
Tablo 33-B. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....156
Tablo 34.Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları....159

Tablo 35. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif hasta sonuçlarına göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....162

Tablo 36-A. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif sonuçlara göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....164

Tablo 36-B. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif sonuçlara göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....164

Tablo 37. Hastaların HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulgularına göre gastrik biyopsi örneklerinde histopatolojik bulgular.....166

Tablo 38. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre hastalarda *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile histopatolojik bulguları (PNL, MNH, HLO, İM) arasındaki ilişki.....169

Tablo 39. Hastaların HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde HLO ile PNL ve MNH düzeyleri arasındaki ilişki....170

Tablo 40. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları ile histopatolojik bulgular (PNL, MNH, HLO) arasındaki ilişki.....172

Tablo 41. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik), ayrıca RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeyleri ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki.....174

Tablo 42. Kültür ve RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeyleri ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki.....175

Tablo 43. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 24 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri.....176

Tablo 44. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 25 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri.....178
Tablo 45. Kültür sonucunun pozitif olduğu16 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri.....180
Tablo 46. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı.....182
Tablo 47-A. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....184
Tablo 47-B. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı.....184
Tablo 48. RT RT-PCR testinin tekrarlanabilirliği ve elde edilen CV değerleri.....189

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunun sirküler kromozomunun görünümü…..13
Şekil 2. *Helicobacter pylori* 26695 standart suşunda *cag* PAI'ın şematik görüntüsü…….....20
Şekil 3. VacA'nın yapısı…….....23
Şekil 4. *H. pylori*'nin tipik Gram-negatif bakterilerde bulunan hücre duvarının yapısı…..….24
Şekil 5. İki majör Hop ve Hor ailesindeki dış membran proteinlerinin filogenetik ağacı.....25
Şekil 6. Toll benzeri reseptörler ve patojenin tanınması…….....……...31
Şekil 7. CagA fosforilasyon motifleri ve hücrede görülen morfolojik değişiklikler……....34
Şekil 8. *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerinde bulunan CD74 molekülüne bağlanması ve NF-κB'nın indüklenmesi ile IL-8 sitokinin salınımı…….....35
Şekil 9. *H. pylori* enfeksiyonunda merkezi rol oynayan yardımcı T hücre yanıtı….....36
Şekil 10. *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde OipA sinyal iletim yolaklarının rölü …….....39
Şekil 11. Şimdiki ve gelecekteki *Helicobacter pylori*'ye karşı antibiyotik hedefleri.....55
Şekil 12. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (beş farklı *H. pylori* H.p 1-5 stok suşları) pozitif kontrol; *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 standart suşları ve *C. jejuni* klinik izolatının negatif kontroller olarak *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13 (oipA)*, *omp18*, *omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* gen ekspresyonunun RT RT-PCR deneyinde 96 kuyucuklu pleyt uygulama düzeni.....96
Şekil 13. Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* gen ekspresyonlarının RT RT-PCR deneyinde 96 kuyucuklu pleyt uygulama düzeni.....101
Şekil 14. %1 hemoglobin, %0.004 TTC içeren Columbia Blood agar besiyerinde gastrik biyopsi örneğinden izole edilen altın renkte *H. pylori* kolonilerinin görünümü.....119
Şekil 15. %7 defibrine at kanı ve %0.3 aktif kömür içeren Columbia Blood agar besiyerinde gastrik biyopsi örneğinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinin görünümü.....119
Şekil 16. Hastaların gastrik biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatta *H. pylori*'nin "martı kanadı" morfolojisinin görünümü (metilen mavisi boyama,100X).....120
Şekil 17. Hastaların gastrik biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatta *H. pylori*'nin spiral morfolojisinin görünümü (Gram boyama,100X).....120
Şekil 18. Kültür besiyerinde üreyen kolonilerden hazırlanan preparatta *H. pylori*'nin

spiral morfolojisinin görünümü (Modifiye Gram boyama,100X).....121
Şekil 19. Eski kültürde üreyen kolonilerden hazırlanan preparatta *H. pylori* kokoid formunun görünümü (Modifiye Gram boyama,100X).....121
Şekil 20. Klaritromisin duyarlı *H. pylori* suşunun %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyerinde E-test sonucu (MİK değer 0.032 mg/L) (MİK ≥2 mg/L dirençli, MİK ≤1 mg/L duyarlı).....122
Şekil 21. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı stok subkültürlerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18,* 16S rRNA ve *ureA* genlerinin amplifikasyon eğrileri.....126
Şekil 22. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (H.p-3 stok suşu) beş farklı cDNA dilüsyonlarından elde edilen *H. pylori cagA* geninin amplifikasyon eğrileri.....127
Şekil 23. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA* geninin amplifikasyon eğrileri…….186
Şekil 24. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp6* geninin amplifikasyon eğrileri……..187
Şekil 25. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp13* geninin amplifikasyon eğrileri…...187
Şekil 26. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastric biyopsi örneklerinde *H. pylori omp18* geninin amplifikasyon eğrileri……187
Şekil 27. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp20* geninin amplifikasyon eğrileri…..188
Şekil 28. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* 16S rRNA geninin amplifikasyon eğrileri..188
Şekil 29. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori ureA* geninin amplifikasyon eğrileri…..…..188
Şekil 30. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve korpus birlikte gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18, omp20*, 16S rRNAve *ureA* genlerinin amplifikasyon eğrileri…….…..189
Şekil 31. RT RT-PCR çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart stok suşunun subkültüründen hazırlanan cDNA örneklerinde ($1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$ dilüsyonları) 16S rRNA geninin amplifikasyon eğrileri.....191

Şekil 32. RT RT-PCR çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun subkültüründen hazırlanan cDNA örneklerinde.....191

KISALTMALAR

AlpAB	: Aderans ile ilişkili lipoprotein AB
AlpA	: Aderans ile ilişkili lipoprotein A
alpA	: Aherans ile ilişkili lipoprotein gen A
AlpB	: Aderans ile ilişkili lipoprotein B
alpB	: Aderans ile ilişkili lipoprotein gen B
Alp	: Alkalin fosfataz
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPase	: Adenozin trifosfataz
AGS	: İnsan gastrik adenokarsinoma mukozal hücre
AP1	: Aktivatör protein 1
A	: Adenin
amiE	: Amidaz gen E
AmiE	: Amidaz E proteini
ATTC	: American type culture collection
BabA	: Kan grubu antijeni bağlayan adezin A
babA	: Kan grubu antijeni bağlayan gen A
BabB	: Kan grubu antijeni bağlayan adezin B
babB	: Kan grubu antijeni bağlayan gen B
bp	: Baz çifti
BHI	: Brain Heart Infusion
BLAST	: Basic local alignment search tool
BOF	: Bilgilendirilmiş onam formu
cagA,cag26	: Sitotoksin ile ilişkili gen A
CagA,Cag26	: Sitotoksin ile ilişkili gen A protein
***cag*PAI**	: Cag patojenite adası
cagE	: Sitotoksin ile ilişkili gen E
Ct	: Cycle threshold/Eşik döngüsü
ΔCt	: Delta cycle threshold/Eişik döngü değişikli
CV	: Coefficient of variation/Varyasyon katsayısı
CO_2	: Karbondioksit
CD18	: Integrin beta-2
CM	: Sitoplazmik membran
C	: Sitozin
CT	: Sitozin-timin
CCL	: Sitozin-sitozin ligand (protein)
CAMPs	: Katyonik antimikrobiyal peptidler
CD4+	: Yardımcı T lenfosit
CD8+	: Süpressör T lenfosit
CpG	: Sitozin-Guanin dinükleotit
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat

CREB–1 : cAMP yanıt elemanı bağlayan protein1
CFU : Koloni oluşturan ünite
cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit
CLSI : Clinical and laboratory standards institute
C. jejuni : *Campylobacter jejuni*
CM : CagA multimerizasyon
Csk : C-terminal Src kinaz
c-Met : Hepatosit büyüme faktörü reseptörü
CD : Farklılaşma kümeleri

DNA : Deoksiribonükleik asit
dupA : Duodenal ülser oluşumunu destekleyen gen A
DupA : Duodenal ülser oluşumunu destekleyen pro. A
DEIA : DNA enzim immün assay
DÜ : Duodenal ülser
DC_s : Dendritik hücreler
DAF : Yıkım hızlandırıcı faktör
d : Delesyon bölgesi
DC-SIGN : Dendritik hücre spesifik intrasellüler adezyon molekülü 3 bağlayan non-integrin
DMSO : Dimetil sulfoksit
DENT : *Helicobacter pylori* selective supplement
dNTP : Deoksi nükleotit tri-fosfat

EPIYA : Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
ERK1/2 : Ekstasellüler sinyal ile ilgili kinaz 1/2
EGFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
E-test : Gradiyent epsilometre testi
EIA-G : Enzim immün assay-IgG :
EHSG : European Helicobacter Study Group
EMF : Elektromanyetik alan
E. coli : *Escherichia coli*

FISH : Floresan in situ hibridizasyon
FrpB1/2 : Ferritin bağlayıcı protein B1/2
Fur : Ferrik kaldırma regülatuvar protein
FAK : Fokal adezyon kinaz
flaA : Flajellin gen A
fliP : Flajellanın taban kısmını kodlayan gen

G : Guanin
GGT : Gamma-glutamyl transpeptidase

Grb-2 : Büyüme faktörü reseptörü bağlayan protein-2
GPI-AP : Glikozilfosfatidilinozitola tutunan protein
GRO-α : Büyüme faktörü alfa
GERD : Gastroözefajiyal reflü hastalığı
GIS : Gastrointestinal sistem
g : Gram/ Rölatif santrifüj kuvveti

H. pylori : *Helicobacter pylori*
HÜT : Hızlı üreaz testi
H&E : Hematoksilin-eozin boyası
HP-NAP : *H. pylori* nötrofil aktive edici protein
Hop gen : Dış membran ile ilişkili gen
HopZ : Dış membran ile ilişkili protein Z
HopA : Dış membran ile ilişkili protein A
HopH : Dış membran ile ilişkili protein H
HopQ : Dış membran ile ilişkili protein Q
hopH : Dış membran ile ilişkili gen H
HP0638 : *hopH/oipA/omp13* geni
HLO : Helicobacter benzeri organizmalar/HLO
HTRA : High temperature requirement A
HSPs : Isı şok proteinleri
HpaA : *Helicobacter pylori* adezin A
HpSA : *Helicobacter pylori* dışkı antijeni
HIV : İnsan immün yetmezlik virüsü
HBV : Hepatit B virüsü
H_2O_2 : Hidrojen peroksit
HpaA : *Helicobacter pylori* adezin A

ITP : İdiyopatik trombositopenik purpura
IceA : Epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gene A protein
iceA : Epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gen gen A
IS : İnsersyon sekans
IL-6, 8, 10, 12, 18, 1β : İnterlökin 6, 8, 10, 12, 18, 1β
IL1R1Hinf1 : İnterlökin 1 reseptörü 1Hinf1 alleli
IL–1ra : İnterlökin 1 reseptörü antagonisti
IFN-γ : İnterferon γ
IFN-α : İnterferon α
i : İntermediate bölgesi
Ice : IL-1beta dönüştüren enzim
IRF1 : İnterferon regülatör faktörü 1
ISRE : İnterferon estimüle edici responsiv elemanı

IgA, IgM, IgG : İmmunoglobulin çeşitleri
IM : İntestinal metaplazi

JAM : Bağlantı adezyon molekülü
JAK-STAT : Janus kinaz-transkripsiyonun sinyal transdüser ve aktivatörü

κ : Kappa değeri
kDa : Kilo dalton
katA : Katalaz gen A
KATO-III : İnsan gastrik karsinoma hücre hattı
KC : Keratinocyte-derived chemokine/Keratinosit kökenli kemokin

LPS : Lipopolisakkarit
LipA : Line prob assay
LP : Lipoprotein
LFA-1 : Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen 1
Leb : Lewis b
LB : Luria buyyon

MALT : Mukoza ile ilişkili lenfoid doku
MNH : Mononükleer hücreler
MHC-II : Temel doku uyum kompleksi sınıf II
m : Orta bölgesi
MAPK : Mitojen aktive edici protein kinaz
MD-2 : Myeloid farklılaşma faktörü 2
MEK : Mitojen aktive edici kinaz
MIF : Migrasyon inhibitör faktörü
mRNA : Mesajcı RNA
µl : Mikrolitre
ml : Mililitre
µm : Mikrometre
MİK : Minimal inhibisyon konsantrasyonu
M : Molar
MMP-7, 9 : Metalloproteinaz 7, 9
Mg : Magnezyum

NH_3 : Amonyak
NTP_{ase} : Nükleotid tri-fosfataz
NapA : Nötrofil aktive edici protein A
napA : Nötrofil aktive edici protein gen A
NF-κB : Nükleer faktör kappa B
NFAT : Aktif T hücre nükleer faktörü
Nod-Like : Nükleotit bağlayan oligomerizasyon domaini

NLRs : NOD benzeri reseptörler
NaOH : Sodyum hidroksit
N : Normal
NCTC : National collection of type cultures
NCBI : National center for biotechnology information
NSAID : Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç
NK : Natural killer cells/Doğal katil hücreler
NO : Nitrit oksit

OM : Dış membran/Outer membrane
OMPs : Dış membran proteinleri/Outer membrane proteins
omp6 : Dış membran protein 6 ile ilgili gen
Omp6 : Dış membran protein 6
omp13 : Dış membran protein 13 ile ilgili gen
Omp13 : Dış membran protein 13
OipA : Dış inflamatuvar protein A
oipA : Dış inflamatuvar protein gen A
omp18 : Dış membran protein 18 ile ilgili gen
Omp18 : Dış membran protein 18
omp20 : Dış membran protein 20 ile ilgili gen
Omp20 : Dış membran protein 20
Ompp30 : Dış membran protein 20
OLA : Oligonükleotit ligasyon assay
ORF : Açık okuma bölgesi
OGD : Özofago gastro duodenoskopi

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
Real-time RT-PCR (RT RT-PCR) : Gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
PMN : Polimorfonükleer hücreleri
pH : Asidite değeri
PNL : Polimorfonükleer lokositler
PG : Peptidoglikan
P : Porin
PPS : Periplazmik aralık
PL : Fosfolipit
PAL : Peptidoglikan ile ilişkili lipoprotein
PLC-γ : Fosfolipaz C gama
PAMPs : Patojen ile ilişkili moleküler paternler
pldA : Fosfolipaz kodlayan gen A
PÜD : Peptik ülser hastalığı
Par1 : Partitioning defektif 1

PCNA : Prolifere hücre nükleer antijeni
PPI : Proton pompa inhibitörü
PBS : Phosphate buffered saline
PEG : Polietilen glikol
p : Olasılık p değeri
PLCγ : Fosfolipaz C-γ
PBP : Penisilin bağlayan protein

RNA : Ribonükleik asit
16S rRNA : 16S ribozomal RNA ile ilgili house keeping gen
r : Korelasyon katsayısı
RFLP : Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi
RAPD : Randomize amplifiye polimorfik DNA
rRNA : Ribozomal RNA
ROS : Reaktif oksijen türleri
RAS : Rat sarkoma virüsü
RAF : RAS ile ilişkili faktör
Ras : Glutamat rasemaz
RGD : Arg-Gly-Asp
RPTP-α/β : Reseptör-tipi protein tirozin fosfataz- α/β
RhpA : RNA helikaz protein A
rocF : Arginaz kodlayan gen
rpm : Revolutions per minute

SabA : Siyalik asit bağlayan adezin A
sabA : Siyalik asit bağlayan gen A
sRNA : Kısa RNA molekülleri
s : Sinyal bölgesi
SSM : Kaymış iplikle eşleşme hatası
SHP-2 : Tirozin fosfataz içeren Src homoloji 2 domaini
Src : Non-reseptör sitoplazmik tirozin kinaz
STAT1 : Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatör 1
SNP : Tek nükleotit polimorfizm
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
SOD : Süperoksit dismutaz
tRNA : Taşıyıcı RNA
T4SS : Tip IV sekresyon sistemi
TNF-α : Tümör nekroz faktörü alfa
TLRs : Toll benzeri resptörler
Th1/2 : Yardımcı T lenfosit 1/2
Treg : Regülatör T hücreleri

TLR2, 3, 4, 5, 9	: Toll benzeri reseptörler 2, 3, 4, 5, 9
TFF1	: Trefoil faktörü1
TTC	: 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride
T	: Timin
Tm	: Erime sıcaklığı
ureA	: Ure A ile ilgili house keeping gen
ureB	: Ure B ile ilgili gen
ureI	: Ure I ile ilgili gen
ÜNT	: Üre nefes testi
UPL	: Universal probe library
U	: Ünite
VacA	: Vakuol oluşturan sitotoksin A
vacA	: Vakuol oluşturan sitotoksin ile ilgili gen A
VBNC	: Canlı fakat kültürü yapılamayan form
VirB1-11	: Tip IV sekresyon sistemi ile ilgili protein
VirD4	: Tip IV sekresyon sistemi ile ilgili protein
WHO	: Dünya sağlık örgütü
WT	: Vahşi tip/wilde type
ZO-1	: Zonula occludens protein 1/sıkı bağlantı protein 1

HELICOBACTER PYLORI ENFEKSİYONUNDA BAKTERİYEL DIŞ MEMBRAN PROTEİNLERİNİN İNCELENMESİ

Daryoush DAVOUDI OSKOUEI, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-35340/İzmir

ÖZET

Helicobacter pylori enfeksiyonu dünya çapında en yaygın enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Bu bakteri kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik adenokarsinoma gibi gastrik hastalıklar ile ilişkilidir. Bakteriyal virülans faktörlerinin gastrik kanser gelişimindeki rolü ve patofizyolojik mekanizmalar araştırılmaktadır. *H. pylori* suşlarında CagA ve dış membran proteinleri (OMPs) virülans genlerindeki polimorfizmler hastaların klinik sonuçlarını etkilemektedir.

H. pylori cagA ve OMPs *omp6*, *omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeylerinin TaqMan real-time reverse transcriptase PCR (RT RT-PCR) yöntemi ile saptanabilirliğini ve bu genlerin *H. pylori* enfeksiyonunda hastaların klinik, endoskopi ve histopatoloji bulguları ile ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin kültürü ve izolasyonunda farklı kültür besiyerlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi, ayrıca stok ve indikatör besiyerlerinin geliştirilmesi de amaçlanmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Gastroenteroloji Polikliniği Endoskopi Ünitesi'ne üst gastrointestinal sistem yakınması ile başvuran ve endoskopi endikasyonu konulan, toplam 179 hasta çalışmaya alındı. Antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerine hızlı üreaz testi (HÜT) ve histopatoloji uygulandı. Antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü ve antimikrobiyal duyarlılık testi yapıldı. İzole edilen *H. pylori* suşlarının klaritromisin duyarlılığı E-test yöntemi ile araştırıldı. Ellidokuz hastada farklı içerikli kültür besiyerleri ile *H. pylori'*nin optimal izolasyonu indikatörlü ve transport besiyerleri kullanılarak araştırıldı. Yüz yirmi hastanın 101'inde antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* genlerinin ekspresyon varlığı ve düzeylerinin saptanmasında gastrik biyopsi örneklerinden total RNA ekstraksiyonu yapıldı. cDNA sentezi ile cDNA'lar elde edildi. *H. pylori omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20* ve *cagA* genleri ayrıca house-keeping genlerinin ekspresyonu real-time RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Verilerin istatistiksel analizleri yapıldı ve değerlendirildi.

Yüz yirmi hastanın HÜT ve histopatoloji bulguları her ikisi pozitif olan 48 (%40) hasta *H. pylori* enfeksiyonu pozitif saptandı. Antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde HÜT testi uygulanan 120 hastanın 79 (%66)'u HÜT pozitif, 88 hastanın 63 (%72)'ü HLO pozitif saptandı. Sadece kültür yöntemi tek başına değerlendirildiğinde, 120 hastadan 104 hastanın 50 (%48)'si *H. pylori* kültür pozitif; HÜT ve histopatoloji ikisi birlikte pozitif 48 hastada 30 hasta *H. pylori* kültür pozitif saptandı. Kültür yönteminin duyarlılığı %86.0, özgüllüğü %90.0 saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu endoskopik, histopatolojik ve demografik bulgular ile değerlendirildi. *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı açısından kadın ve erkek hastalar arasında, ayrıca ortalama yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.324, p=0.529). Histopatolojik bulgularda antrum ve korpusta *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile polimorfonükleer lökosit (PNL), mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu ve HLO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişki saptandı (p=0.006, p=0.001), (p=0.001, p=0.010) (p<0.001), ancak *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile intestinal metaplazi (İM) arasında anlamlı düzeyde ilişki bulunmadı (p=0.616, p=0.870).

Real-time RT-PCR yöntemi ile çalışılan 101 hastanın antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde iki house-keeping geninin birlikte Ct (eşik döngüsü) değeri saptandığında 77 (%76.0) hastada *H. pylori* real-time RT-PCR gen ekspresyonu pozitif saptandı. Bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü %94.0 ve %60.0 bulundu. *cagA, omp6, omp13* (*oipA*)*, omp18*, *omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinin Ct değerleri saptandı. Real-time RT-PCR çalışmasında *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun subkültüründe de bu genlerin Ct değerleri elde edildi. Bu değerler gastrik biyopsi örneklerinden elde edilen değerlere göre daha düşük saptandı. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48/120 hastada *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliğine göre real-time RT-PCR yöntemi ile pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı *cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* genleri için sırasıyla 30 (%66.7), 35 (%77.8), 37 (%82.2), 45 (%100.0) ve 37 (%82.2) saptandı. *cagA* geninin ekspresyon görülme sıklığı diğer dış membran proteinlerine göre daha düşük ve *omp18* geninin tüm hastalarda ekprese edildiği saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olan 48 hastanın endoskopik bulguları gastrik ülser/erozyon (n=6), duodenal ülser/erozyon (n=6), eroziv gastrit (n=11) ve non-eroziv gastrit (n=25) saptandı. *H. pylori* gen ekspresyonu görülme sıklığı ile endoskopik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p>0.05), ancak *omp13 (oipA)* geninin rölatif ekspresyon düzeyi (ΔCt) gastrik ülser/erozyonu olan ayrıca eroziv gastritli hastalarda, non-eroziv gastritli hastalara

göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük saptandı (p=0.005, p=0.045). Araştırdığımız genlerin ekspresyonunun görülme sıklığı ve düzeyleri ile histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (p>0.05). Araştırdığımız genlerde ortalama Ct değeri antrumda, korpusa göre daha düşük saptandı. *omp6* ve *omp13* genlerinin rölatif ekspresyon düzeyleri (ΔCt) korpusta, antruma göre daha yüksek saptandı (p=0.014, p=0.026). %7 at kanlı, *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerinde şeffaf gri koloniler, TTC'li indikatör besiyerinde izole edilen *H. pylori* suşlarının altın renkli koloniler oluşturmasıyla özgün *H. pylori* varlığı saptandı.

Real-time RT-PCR yöntemi ile *H. pylori* virülans geni *cagA*'nın varlığının saptanmasının yanı sıra hem *cagA* geni hem de dış membran proteinlerinden *omp6, omp13, omp18*, *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı ve düzeylerinin belirlenmesinin, *H. pylori* enfeksiyonlu hastalarımızda araştırdığımız genlerin ekspresyonlarının hastaların klinik sonuçları üzerinde istatistiksel anlamlı etkisi olmadığı saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde inflamatuvar ve adezin proteinini kodlayan *omp13* geninin önemli bir rolü olabileceği düşünüldü. Antrum ve korpus arasında *omp6* ve *omp13* gen ekspresyon düzeylerinde görülen farklılıklar klinik açıdan önem taşıyabileceği düşünüldü. Real-time RT-PCR testinin güvenilir bir yöntem olarak *H. pylori* enfeksiyonu patogenezi ile ilgili gen ekspresyon çalışmalarında kullanılabileceği, ancak daha fazla hasta sayısı ile çalışılması ve daha ileri moleküler yöntemlerin yer alması kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: *Helicobacter pylori,* dış membran proteinleri, *cagA,* gen ekspresyon, real-time RT-PCR

INVESTIGATION OF BACTERIAL OUTER MEMBRANE PROTEINS IN *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION

Daryoush DAVOUDI OSKOUEI, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-35340/İzmir

ABSTRACT

Helicobacter pylori is one of the most prevalent infectious disease worldwide. This bacterium is closely associated with human diseases of the upper gastrointestinal tract such as chronic gastritis, peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. The role of bacterial virulence factors and pathophysiological mechanisms involved in the development of *H. pylori* related gastric cancer still remain to be determined. Heterogeneity among *H. pylori* strains in expression of the CagA as well as outer membrane proteins (OMPs) might be important in determining clinical outcome of patients with *H. pylori* infection.

TaqMan real-time reverse transcriptase PCR (RT RT-PCR) was used to study the frequencies and levels of the expression of *H. pylori cagA* and *omp6*, *omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* OMPs genes in patients with *H. pylori* infection in association with clinical, endoscopic and histopathologic findings and to evaluate the effectiveness of different culture media for isolation of *H. pylori* from gastric biopsy specimens and to develop stock and indicator culture media for isolated *H. pylori* strains.

A total of 179 patients with upper gastrointestinal complaints who were admitted to Outpatient Gastroenterology Polyclinic and Endoscopy Unit at Dokuz Eylül University Hospital and referred to upper endoscopy were included in this study. Antral and/or corporal gastric biopsy specimens were taken from each patient. Rapid urease test (RUT), histopathologic examination as well as culture and clarithromycin susceptibility testing were performed. Culture media containing different supplements as well as indicator and stock culture media were used for isolation and optimal bacterial culture of *H. pylori* from gastric biopsy specimens of 59 patients.The gene expression status of *H. pylori cagA* and *omp6*, *omp13 (oipA)*, *omp18*, *omp20 (alpA)* outer membrane protein genes were investigated in antrum and/or corpus gastric biopsy specimens of 101 patients by real-time RT-PCR. Total RNA from each antrum and corpus was extracted and cDNA was synthesized to determine the gene expression frequencies and levels of *H. pylori omp6, omp13, omp18, omp20* and

cagA target genes as well as two house-keeping genes by real-time RT-PCR. Statistical analyses were performed on the data.

H. pylori infection was found in 48 (40%) of 120 patients based on both positive RUT and histopathology. Seventy nine (66%) patients were positive for *H. pylori* by RUT. HLO was found positive in 63 (72%) of 88 patients examined by histopathology. Considering only culture method, gastric antrum and/or corpus biopsy specimens of 104 patients were cultured and 50 (48%) patients were culture positive for *H. pylori*. Among 48 patients with *H. pylori* infection, 30 (62.5%) patients were culture positive. The sensitivity and specificity of culture were 86.0% and 90.0% respectively. The endoscopic, histopathologic and demographic findings of patients were evaluated in associaton with *H. pylori* infection. There was no statistically significant difference between male and female patients as well as mean age in terms of incidence of *H. pylori* infection (p=0.324, p=0.529). *H. pylori* infection was found statistically significant and associated with infiltration of polymorphonuclear (PNL), mononuclear leukocytes (MNL) and high density of *H. pylori* (HLO) in the antrum and corpus (p=0.006, p=0.001), (p=0.001, p=0.010), (p<0.001) but not associated with intestinal metaplasia (IM) (p=0.616, p=0.870).

Of the 101 patients 77 (76.2%) patients were real-time RT-PCR positive determined by Ct (threshold cycle) values obtained for both *H. pylori* 16S rRNA and *ureA* house-keeping genes. The sensitivity and specificity of the test were 94.0% ve 60.0% respectively. The Ct values of *cagA, omp6, omp13* (*oipA*)*, omp18, omp20 (alpA),* 16S rRNA and *ureA* genes were determined in gastric biopsy specimens as well as *H. pylori* NCTC 11637 subcultures. The Ct values were lower in *H. pylori* standard strain subcultures compared to gastric biopsy specimens. *H. pylori* gene expression frequencies of *cagA, omp6, omp13, omp18* and *omp20* in 45 (93.8%) out of 48 patients with *H. pylori* infection were 30 (66.7%), 35 (77.8%), 37 (82.2%), 45 (100.0%) and 37 (82.2%) respectively. *cagA* gene expression was positive in 30 out of 45 patients. This rate was lower than those of *omp6, omp13, omp18* and *omp20* genes. *omp18* was expressed in gastric biopsy specimens of all 45 (100%) patients. Endoscopic findings of 48 patients were gastric ulcer/erosion (n=6), duodenal ulcer/erosion (n=6), erosive gastritis (n=11) and non-erosive gastritis (n=25). There was no significant association between gene expression frequencies of five studied genes with endoscopic findings (p>0.05). However, the relative expression level (ΔCt) of *omp13* gene (gene transcripts) was found statistically significant (p=0.005, p=0.045) between patients with gastric ulcer/erosion and

non-erosive gastritis as well as patients with erosive and non-erosive gastritis which was lower in patients with gastric ulcer/erosion and erosive gastritis compared to non-erosive gastritis. There was no significant association between gene expression frequencies/levels with histopathologic (*H. pylori* density, PNL, MNL) findings ($p>0.05$). The mean Ct values of the genes in antrum were lower than those of corpus. The relative expression levels (ΔCt) of *omp6* and *omp13* genes (gene transcripts) were higher in corpus than in antrum ($p=0.014$, $p=0.026$). *H. pylori* strains were isolated from gastric biopsy specimens on Columbia Blood agar supplemented with 7% defibrinated horse blood and *H. pylori* selective supplement (DENT) as well as TTC supplemented indicator medium. *H. pylori* isolates showed translucent and grey colonies on Columbia Blood agar but golden appearance on indicator medium supplemented with TTC which was specific and facilitated the identification of isolated *H. pylori* strains.

Detection and determination of the gene expression frequencies and levels of *H. pylori* virulence gene *cagA* and genes of some outer membrane proteins *omp6, omp13, omp18* and *omp20* by real-time RT-PCR method revealed that neither *cagA* nor OMPs genes expression status had a statistically significant impact on patients' clinical outcome in our hospital. *omp13* gene which encodes an inflammatory protein or adhesin might play a role in the pathogenesis of *H. pylori* infection in our hospital. The difference in *omp6* and *omp13* gene expression levels between the antrum and corpus may be clinically important. Real-time RT-PCR method was also found a reliable method and can be used in *H. pylori* pathogenesis related gene expression studies. However studies with larger sample size and more advanced molecular methods should be considered.

Key words: *Helicobacter pylori,* oute rmembrane proteins, *cagA*, gene expression, real-time RT-PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Helicobacter pylori (H. pylori) Gram-negatif, mikroaerofilik, yavaş üreyen spiral morfolojide bir bakteridir. *H. pylori*, akut ve kronik gastritler, gastrik ülser (GÜ) ve duodenal ülser (DÜ) nedeni, gastrik kanser (GK) ve mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma ile ilişkilidir (1-3). Son yıllarda *H. pylori* ile gastrointestinal sistem dışı hastalıklar arasında ilişki bildirilmiştir. Maastricht V/Florence konsensus raporuna göre idiopatik trombositopenik purpura (ITP), demir eksikliği anemisi ve vitamin B12 eksikliği gibi hastalıklar ile tam bir ilişki kurulmuştur ancak kardiyovasküler, nörolojik, dermatolojik, immünolojik ve metabolik hastalıklar ile ilişkisi olup olmadığı komusu halen tartışılmaktadır (4,5). Gelişmekte olan ülkelerde populasyonun %70-90'ı *H. pylori* ile kolonize olmakta ve dünya popülasyonunun %50'si bu bakteri ile enfektedir. Buna rağmen enfekte hastaların %10-20'sinde peptik ülser ve %1-2'sinde gastrik kanser görülmektedir. Bu hastalıkların gelişiminde bakteriyal, konak ve çevresel faktörlerin birlikte etkisi olduğu düşünülmektedir (6-9). Türkiye'de *H. pylori* enfeksiyonu yaygın olarak gözlenmektedir ve prevalans %53-86 bildirilmiştir (10).

Bakteriyal faktörler ile ilgili bakterinin hareketi, üreaz enzimi aktivitesi, dış membran proteinleri (OMPs) ile ilişkili adezin proteinleri bakterinin kolonizasyonunda ve vakuol oluşturan sitotoksin (VacA), sitotoksin ile ilişkili gen A (CagA), epitel ile etkileşim tarafından indüklenen gen (IceA), nötrofil aktive eden protein (HP-NAP) ve duodenal ülser oluşumunu destekleyen gen A protein (DupA) gibi sitotoksinlerin hastalıkla ilişkili en önemli virülans faktörleri olarak belirlenmiştir (6,9,11). *H. pylori*'nin 95 paralog virülans genleri içerisinde 32 üyeden oluşan dış membran proteinlerini (Hop ailesi) kodlayan ve çoğu adezin proteini olarak görev alan proteinler bulunmaktadır. Diğer kısımlar ise proinflamatuvar proteinlerden ve mikroporlardan oluşmaktadır. Son yıllarda Omp1 (HopZ), Omp6 (HopA), Omp28 (BabA), Omp19 (BabB), Omp17 (SabA), Omp20 (AlpA), Omp21 (AlpB) gibi adezin proteinleri ve Omp13 (OipA), Omp18, Omp30 gibi proinflamatuar proteinlerinin gastroduodenal hastalıkların gelişiminde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (12-15). *H. pylori* yüksek derecede genetik polimorfizm gösteren bir bakteridir. Genomdaki çeşitlilik hastalık riskini etkileyebilmekle beraber bakterinin bağışıklık sisteminden kaçışını sağlayarak mide kanserine yol açan persistan enfeksiyon oluşturmasında rolü düşünülmektedir (16-18). Bu nedenle 1994 yılında epidemiyolojik kanıtlara göre Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından *H. pylori* sınıf I

karsinogen olarak sınıflandırılmıştır (9,19). Omp28, Omp17 ve Omp13 gibi bakteriyal dış membran proteinlerinin ekspresyonu ile duodenal ülser veya gastrik kanser arasında ilişki bildirilmiştir (11,20,21). Omp6, Omp18, Omp20, Omp26 ve Omp30 dış membran proteinlerinin virülans özelliği bildirilmektedir (14,15). Dış membran proteinlerin dışında bakteri genomunda bulunan *cag* patojenite adası (*cag* PAI) denilen gen bölgesi ile kodlanan CagA, *H. pylori*'nin en önemli virülans faktörü olarak Batı ülkelerinde peptik ülser ve gastrik kanser ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (11,20).

Bakteriyal dış membran proteinlerinin yapısı ve özellikleri ile ilgili bilgilerin birçoğu proteomiks araştırmalarından ve immünoblot analizlerinden elde edilmiştir (15,22,23). Son yıllarda DNA ve RNA bazlı real-time PCR (RT PCR) nükleik asit amplifikasyon yöntemleri *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneklerinde saptanmasında ve bakteriyal virülans faktörlerinin belirlenmesinde önemli katkılar sağladığı bildirilmiştir (24-27). "Real-time reverse transcriptase PCR" (RT RT-PCR) yöntemi ile *H. pylori*'nin tanısı konulmakla beraber bakteriyal virülans genleri ile konak reseptörlerinin ekspresyonu birlikte incelenerek *H. pylori* enfeksiyonu sırasında konak-patojen etkileşimlerinin araştırılması ve hastalığın patogenezinde rol oynayan mekanizmaların açıklanmasına olanak sağladığı bildirilmektedir (27-34). *H. pylori*'de CT dinükleotit tekrarları sayısına bağlı olarak faz varyasyonu ile regüle edilen *omp13 (oipA)*, *sabA/B*, *babA/B* ve *hopZ* dış membran protein genlerinin ekspresuonu ile ilgili araştırmalar bildirilmekte (11,20,21,29,34-38), ancak faz varyasyonundan etkilenmeyen *omp6, omp18* ve *omp20 (alpA)* dış membran protein gen ekspresyonları hakkında daha az bilgi bulunmaktadır (14,15,34). Türkiye'de *H. pylori*'nin *cagA* ve *vacA* virülans genleri üzerinde PCR yöntemine dayalı çalışma yapılmış (10,39-42), ancak *omp13 (oipA)* ve diğer dış membran protein genleri ile ilgili az sayıda araştırma bulunmaktadır (42). Ayrıca CagA'nın yanı sıra, dış membran proteinlerin ekspresyonu ile ilgili geniş kapsamlı bir çalışma bulunmadığı için bu araştırma planlanmıştır. Hastalığın gelişiminde bu genlerin marker olarak hastalıkların ayrımında veya tedavisinde yararlı olabileceği düşünülerek ökaryotlara uygulanan pleyt formatı RT RT-PCR yönteminin prokaryot hücre yapısında olan *H. pylori*'ye uygulanabilirliği ve ileriki gen ekspresyon çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmüştür.

1.2. Araştırmanın Amacı ve Kapsamı

Endoskopi endiksyonu konulan üst gastrointestinal sistem yakınmalı erişkin hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerine hızlı üreaz testi (HÜT), kültür ve/veya

histopatolojik inceleme uygulanarak *H. pylori* varlığının ve enfeksiyonunun saptanması, *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde rolü olduğu düşünülen dış membran protein genlerinden *omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* ayrıca *cagA* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin TaqMan prob RT RT-PCR yöntemi ile saptanması, hastaların endoskopik ve histopatolojik bulguları ayrıca yaş ve cinsiyete göre dağılımının istatistiksel olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. NCTC 11637 *H. pylori* standart suşu kullanılarak farklı içerikli hazırlanan besiyerlerinde bakterinin kültüre edilmesi, en etkin kültür ortamının/ortamlarının *H.pylori* kültür besiyeri olarak kullanılabilirliliğinin değerlendirilmesi, antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori* klinik suşlarının izole edilmesinde %7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif DENT suplement içeren Columbia Blood agar besiyerine alternatif olarak diğer besiyerlerinin (kan içermeyen suplementli, indikatörlü ve stok besiyerleri) araştırılması da amaçlanmıştır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmamızda amaçlara yönelik hipotezler aşağıda belirtilmiştir:

H1: *H. pylori* pozitifliğinin saptanmasında kültür yönteminin duyarlılığ ve özgüllüğü HÜT ve histopatoloji yöntemlerine göre daha yüksektir.

H1: *H. pylori* pozitifliğinin saptanmasında RT RT-PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü HÜT, histopatoloji ve kültür yöntemlerine göre daha yüksektir.

H1: *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığının hastaların ortalama yaş veya cinsiyete göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

H1: *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA)*, *omp18* ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin hastaların antrum veya korpus gastrik biyopsi örneklerine göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

H1: *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin hastaların endoskopik bulgularına göre (GÜ/E, DÜ/E, EG, NEG) dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

H1: *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığının hastaların histopatolojik bulgularına göre (PNL, MNH, HLO, İM) dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

H1: *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin hastaların histopatolojik bulgularına göre (PNL, MNH, HLO) dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Helicobacter pylori*'nin Tarihçesi

Yaklaşık yüz sene önce 1893 yılında İtalyan Anatomi Uzmanı *Guilio Bizzozero* tarafından köpeklerin midesinde spiral bakteriler gözlenmiş ve tanımlanmıştır. Birkaç sene sonra Alman araştırmacı *Hugo Salomon*, *Bizzozero*'nun yaptığı deneyleri fareler üzerinde genişletmiştir. Yirminci yüz yılın başlangıcında *W. Krienitz* gastrik karsinomalı hastaların midesinde spiral şeklinde bakterileri bulmuş, ancak bu araştırmacıların hiç birisi bu bakterileri gastrointestinal hastalığın en yaygın nedeni olarak düşünmemişlerdir (43). 1940'da *Freedberg ve Baron* ayrıca *Doenges* tarafından maymun midesinde spiral organizmaların gözlendiği bildirilmiştir. *Palmer'*in incelediği bin gastrik biyopsi kesitte herhangi bir spiral bakteri bulunmamış ve bu çelişkili sonuçların uygun olmayan boyaların kullanılmasından kaynaklandığını bildirmiştir. 1950 ve 1960'da *Susumu Ito* gastrik pariyetal hücre ve korpustaki asit salgılayan glandlerde spiral organizmaları bulmuş ve bunlardan birinin pariyetal hücre glandleri içinde oldukça belirgin, kılıflı flagella ve tipik spiral morfolojiye sahip *H. pylori*'nin 1967 yılında ilk fotoğrafını yayınlamıştır. 1970'lerin ortalarında spiral bakteriler *Steer* ve *Colin-Jones* tarafından peptik ülserin tedavisinde yeni ilaçların etkisi incelenmiştir. Gastrik ülseri olan hasta örneklerinin %80'inde spiral bakterilerin gözlendiği bildirilmiştir. Gastrik mukozanın histolojik görünümü ile *H. pylori*'nin mukus tabakasında varlığı ve hatta nötrofillerin içinde fagosite edilmiş bakterinin resimleri yayınlanmıştır. Mikroaerofilik Campylobacter izolasyonuna kadar kültürde sadece Pseudomonas üretilebildiği, spiral bakterilerin üretilemediği bildirilmiştir (44). Avustralyalı bilim adamları Dr. *Barry Marshall* ve Dr. *J. Robin Warren* spiral bakteriler ile üst gastrointestinal sistem endoskopisi bulguları arasındaki ilişkiyi inceleyerek 1982'de *H. pylori*'nin saf kültürünü elde edip *Koch* postulatlarını doğrulayarak *H. pylori* ile gastrit arasında ilişkinin varlığını ortaya koymuşlardır. Hastaların verileri 1984'te Lancet de yayınlanmıştır. Önce "*Campylobacter pyloridis*", sonra "*Campylobacter pylori*" ve daha sonra 16S rRNA sekans analizine göre "*Helicobacter pylori*" olarak adlandırılan bakterinin peptik ülser ve MALT lenfoma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (1,43-45). 2005 yılında Dr. *Barry Marshall* ve Dr. *Robin Warren* hipotezinde *H. pylori'*nin gastrit ve peptik ülser hastalığın gelişiminde rolünün keşfi ile fizyoloji veya tıp Nobel ödülü kazanmışlardır (2,46). Yeni bir ilgi alanı olarak bu bakteri ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır.

***Press Release: The 2005 Nobel Prize in Physiology or Medicine**

3 October 2005

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet has today decided to award

The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2005

Jointly to

Barry J. Marshall and J. Robin Warren

for their discovery of

"the bacterium *Helicobacter pylori* and it's role in gastritis and peptic ulcer disease"

Inventas vitam juvat excoluisse per artes

"And they who bettered life on earth by new found mastery"

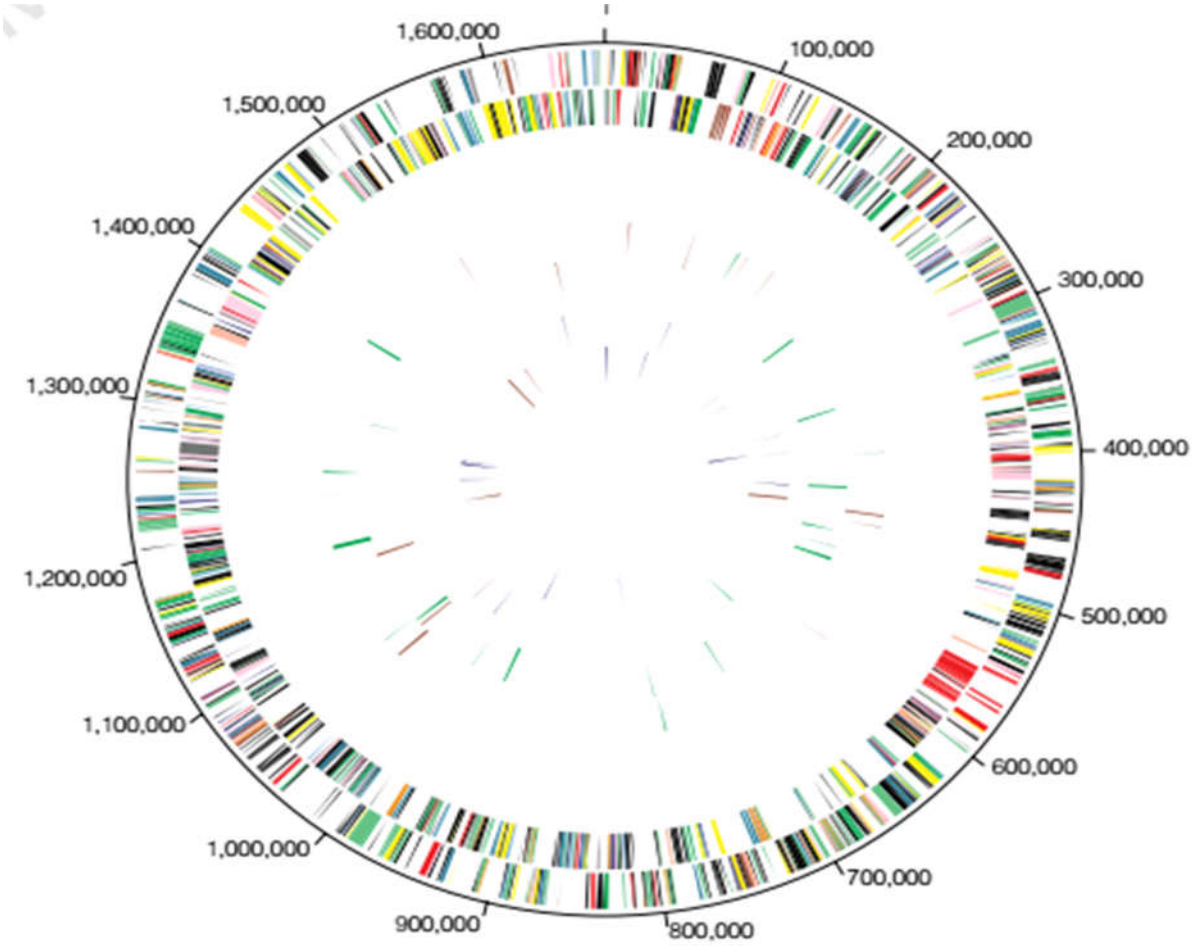
(inventions enhance life which is beautified through art)

* 46 numaralı referanstan alınmıştır.

2.2. *Helicobacter pylori* 'nin Mikrobiyolojik ve Genom Özellikleri

H. pylori mikroaerofil, 0.5-0.9×2-4 μm boyutlarında, sarmal şeklinde Gram-negatif bir bakteridir. Tek uçtan çıkan 4-7 adet kılıflı flagellaları sayesinde hareketli olup, insanda mide veya duodenum yüzey epitelinin altında kolonize olur. Mukus tabakası altına yerleşen *H. pylori* bu bölgenin hafif alkali yapısı sayesinde mide asidinin bakterisidal etkisinden korunur. Salgılamış olduğu üreaz enzimi ile üreyi parçalar ve açığa çıkan bikarbonat ve amonyum, ortamı *H. pylori*'nin yaşaması için uygun hale getirir. *H. pylori* kısa sarmallı veya spiral şekilli bazen kokoid formunda, katalaz, oksidaz ve üreaz pozitiftir. *H. pylori* ideal olarak 37°C'de, %90 nemli ve %5-10 karbon dioksit içeren mikroaerofilik ortamda 3-7 günde ürer. *Campylobacter* cinsine çok benzerlik gösterdiği için önce bu cinse ait olduğu bildirilmiştir. Sonra *Helicobacter* cinsine aktarılmıştır. Bu güne kadar *Helicobacter* cinsi içinde 20'den fazla tür saptanmış ve birçok hayvanda patojen olarak tanımlanmıştır (1,47).

H. pylori 26695 standart suşunun genomu 1.667.867 bp, sirküler bir kromozom, G+C içeriği %39 nükleik asitten oluşmaktadır. Genomun beş bölgesi farklı oranda G+C içermektedir. İki gen bölsesinde bir veya birden fazla IS605 insersiyon dizisi (IS) kopyaları bulunmaktadır. *cag* patojenite adasında (*cag* PAI) yandan desteklenen 31 bp'lik direkt tekrarlamalar yer almaktadır. Bakteri genomunda 36 tRNA türü, iki grupta yer alan 23S-5S ve 16S ribozomal RNA (16S rRNA) gen kümeleri belirlenmiştir. *H. pylori* genomu 1.590 gen içermektedir. Doksan beş paralog gen ailesinde 266 gen ürününün kodlandığı belirlenmiştir (Şekil 1). Porin veya adezin benzeri dış membran proteinleri 32 üyeden oluşan en büyük gen ailesi olarak bildirilmiştir. *H. pylori*'de 11 restriksiyon-modifikasyon sistemi bulunmaktadır. *H. pylori* yüksek derecede polimorfizm gösteren bir bakteridir. Bakteri genomunda antijenik ve faz varyasyon da bildirilmiştir (48).



Şekil 1. *H. pylori* 26695 standart suşunun sirküler kromozomunun görünümü. Dış halkada pozitif iplikte yer alan genler renkli kodlarla gösterilmiştir (varsayılan ve bilinmeyen bölgeler siyah renkte). İkinci iç halkada negatif iplikte yer alan genler görülmekte, üçüncü ve dördüncü halkalarda insersiyon dizileri (IS) kırmızı renkte, pozitif ve negatif iplikte yer alan diğer tekrarlamalar yeşil renkte görülmektedir. Beşinci ve altıncı halkalarda pozitif ve negatif iplikte sırasıyla tRNA'lar (mavi renkte), rRNA'lar (kırmızı renkte) ve sRNA'lar (yeşil renkte) yer almaktadır (48).

2.3. *Helicobacter pylori* 'nin Epidemiyolojisi ve Prevalansı

H. pylori'nin prevalansı popülasyon gruplarına ve ülkelere göre değişmektedir. Gelişmiş ülkelerde erişkinlerin %50'sinde ve gelişmekte olan ülkelerde erişkinlerin %90'ında *H. pylori* seropozitifliği bildirilmiştir. Türkiye'de *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı %53-86 olarak saptanmıştır. *H. pylori* kronik seyirli bir enfeksiyon oluşturarak tedavi edilmediğinde gastrik kanserine neden olabileceği bildirilmiştir. Epidemiyolojik kanıtlara göre 1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından *H. pylori* sınıf I karsinojen olarak tanımlanmıştır. *H. pylori* enfeksiyonu genellikle çocukluk döneminde kazanılır. *H. pylori*'nin majör rezervuarının insan olduğu düşünülmektedir. Bulaşma yollarından fekal-oral ve oral-oraldır.

Endoskopi ile de bulaşma bildirilmiştir. Düşük sosyoekonomik durumu ile *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı arasında bir ilişkinin varlığı tespit edilmiştir (7,10,19,49).

H. pylori, canlı fakat kültürü yapılamayan "viable but not culturable" (VBNC) forma dönüşerek çevredeki atık sularda kokoid formda canlılığını sürdürebilmekle beraber bulaşta önemli olduğu bildirilmektedir (50,51).

H. pylori'nin tonsiler kriptlerde kokoid formda bulunduğu ve rezervuar olarak hastalığın bulaşmasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir (52). *H. pylori*, *Escherichia coli*'ye göre klorin ve ozona daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Dezenfektanlara karşı tolerans gösterdiği için su yolu ile çevreye yayılabilir (53). *H. pylori*'nin biyofilm oluşturmasının yanı sıra kokoid forma dönüşebilmesi ile persistan enfeksiyona yol açabileceği düşünülmektedir (54,55).

2.4. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Tanısında Kullanılan Yöntemler

1997 yılında Avrupa *H. pylori* Çalışma Grubunun (EHPSG) verdiği güncel bilgiler ışığında *H. pylori* enfeksiyonunun eradikasyonunda tanı ve tedavi protokolleri belirtilmiş olup, sonucusu 2000, 2005, 2012 ve 2015 yıllarında yapılan uzlaşı toplantıları ile sırasıyla Maastricht II, Maastricht III, Maastricht IV/Florence ve Maastricht V/Florence konsensus raporları yayınlanmıştır. Bu raporlarda *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında ve hastalığın tedavisinde birçok önemli kriter yer almaktadır (5,56-58).

Maastricht II konsensus raporunda "test et ve tedavi et" yaklaşımı sadece 45 yaş altındaki dispeptik hastalar için önerilmektedir. Bu hastalarda *H. pylori* infeksiyonunun tanısında üre nefes testi (ÜNT) veya dışkı antijen testi (HpSA) gibi invaziv olmayan yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Eradikasyon tedavi başarısının değerlendirilmesinde endoskopi endikasyonu varsa bu yönteme dayalı bir test, ÜNT veya alternatif olarak dışkı antijen testi kullanılabilir. Bu raporda peptik ülser ve gastrik kanser gelişme riski açısından *H. pylori*'nin eradike edilmesi şiddetle önerilmektedir (56).

Maastricht III konsensus raporunda birinci basamak sağlık hizmetlerinde *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında ve eradikasyon etkinliğini değerlendirmede gastrik ülseri olmayan hastalar için ÜNT veya dışkı antijen testi gibi invaziv olmayan yöntemlerin dışında kesinliği yüksek olan bazı serolojik testlerin kullanılabileceği de bildirilmiştir. Bu raporda gastrik kanser gelişimini önlemek için *H. pylori* eradikasyonunun önemli olduğu vurgulanmaktadır. Kültür ve antimikrobiyal testler rutin olarak yapılmalıdır. Klinik uygulamada endoskopi için

bir endikasyon varsa ve hasta hiç bir tedavi almamışsa, birinci basamak tanı testi olarak hızlı üreaz testi (HÜT) önerilmektedir. Pozitif test durumunda tedavi başlatılabilir (57).

2012 yılında yayınlanan Maastricht IV/Florence konsensus kriterlerine göre günümüzde *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olan peptik ülser tanısı konan her hastada eradikasyon tedavisi önerilmektedir. Bu raporda "test et ve tedavi et" stratejisinin *H. pylori* prevalansı yüksek olan bölgelerde (≥%20) dispeptik hastalara uygulnması uygun görülmektedir. Bu yaklaşım alarm semptomu olan veya yaşlı hastalarda önerilmemektedir. "test et ve tedavi et" stratejisinde kullanılan başlıca invaziv olmayan testlerden ÜNT ve monoklonal dışkı antijen teslerdir. Bazı serolojik testler de kullanılabilir. Ancak bu serolojik testlerin eradikasyon tedavi başarısının değerlendirilmesinde geçerli olmadığı bildirilmiştir. Gastrik kanser gelişme riski yüksek olan hastalarda "endoskopi et ve tedavi et" yaklaşımı önerilmektedir. Yaşlı hastalarda invaziv olmayan testlerin geçerliliğinin düşük olduğu bildirilmiştir. Endoskopi ile hastalardan alınan biyopsi örneklerine HÜT, histoloji, kültür veya floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) gibi moleküler tanı yöntemleri uygulanabilir (58).

Kyoto konsensus raporuna göre *H. pylori* ile ilişkili gastrit bir enfeksiyon hastalığı olarak belirtilmiş olup, *H. pylori* ile enfekte tüm bireylerin tedavisi önerilmektedir. 2015 yılında Floransa'da gerçekleşen toplantıda *H. pylori*'nin klinik rolünün temel noktaları yeniden değerlendirilerek en güncel 5. Maastricht V/Florence konsensus raporu olarak bildirilmiştir. Bu raporda "test et ve tedavi et" stratejisinin dispeptik hastalara uygulnması, alarm semptomu olan veya yaşlı hastalara uygulanmaması vurgulanmaktadır. Genç hastalara proton pompa inhibitörün (PPI) verilmesi veya direkt özofago-gastro-duodenoskopi (OGD) müdahalesi yerine *H. pylori* enfeksiyonunun invaziv olmayan testler ile tanısının konulması tercih edilmektedir. ÜNT testi tavsiye edilir. Monoklonal dışkı antijen testi de kullanılabilir. Serolojik yöntemleri kullanılmadan önce mutlaka validasyon testlerinin yapılması gerekmektedir. Klinik uygulamada endoskopi endikasyonu varsa ve biyopsi için herhangi bir kontrendikasyon yoksa, birinci basamak tanı testi olarak HÜT önerilmektedir. Pozitif test durumunda tedavi başlatılabilir. Ancak eradikasyon etkinliğini değerlendirmede bu testin kullanılması önerilmemektedir. Endoskopi ile antrum ve korpustan birer gastrik biyopsi örneği alınmalıdır. *H. pylori* enfeksiyonunun tanısı çoğu zaman histokimyasal boyama yöntemi ile konulabilir. Bu yöntem ile tanı konulamayan kronik gastriti olan olgularda ek olarak immünohistokimyasal yöntemi kullanılabilir. Histoloji bulguları normal olan hastalarda bu yöntem kullanılmamalıdır. Maastricht V/Florence konsensus raporunda *H.*

pylori'nin gastrik kanser gelişiminde majör rol oynadığı bildirilmiştir. *H. pylori*'nin eradikasyonu ile gastrik kanser gelişim riski azalır. Gastrik kanser riski yüksek olan toplumlarda *H. pylori* eradikasyon tedavisinin maliyet-etkili olduğu bildirilmiştir. Eradikasyon tedavi başarısının değerlendirilmesinde ÜNT testi en iyi seçenektir. Alternatif olarak monoklonal dışkı antijen testi kullanılabilir. Bu testler tedavi bittikten dört hafta sonra yapılmalıdır. İlk tedavi başarısızlığından sonra endoskopi yapılırsa ve bizmut içeren dörtlü tedavi verilmemişse kültür ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması önerilir (5).

H. pylori enfeksiyonunun tanısında kabul edilmiş altın standart yöntem bulunmamaktadır. Kullanılan tek bir test güvenilir olmamaktadır. Bu yüzden en az iki testin bir arada yapılması önerilmektedir. Tanısal testlerin seçilmesinde klinik koşullar, pozitif ve negatif test sonucu olasılık oranı, maliyet etkinliği ve farklı ülkelerde testlerin kullanılabilirliği dikkate alınmalıdır. Günümüzde *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında birçok yöntem kullanılmaktadır (24,59).

2.4.1. *İnvaziv Yöntemler*

İnvaziv yöntemler kültür, histopatolojik inceleme, hızlı üreaz testi (HÜT) ve moleküler tanı yöntemlerdir.

Kültürün uygulanmasındaki zorluklardan dolayı rutin uygulamalarda tercih edilmemektedir. Kültür, *H. pylori* suşlarının izolasyonunda ve antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan altın standart yöntemdir. Özellikle ilk tedavi başarısızlığından sonra endoskopi ile alınan gastrik biyopsi örneklerinin kültürü ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması önerilmektedir. Bu yöntemin özgüllüğü yüksek (%100) ve %95'e varan duyarlılık bildirilmiştir (3,5).

Rutinde histopatolojik incelemeler gastrik mukozada görülen gastrit tipinin belirlenmesinde ayrıca histopatoloji açısından gastrik hasarının derecelendirilmesinde önemli yöntemler arasında yer almaktadır. Histokimyasal boyama yönteminde gastrik biyopsi örneklerine hematoksilin-eosin (H&E), Giemsa veya Warthin-Starry gümüş boyası gibi boyalar uygulanır. Fakat gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* yoğunluğu az olduğu veya bakterinin tipik morfolojisi olmadığı zamanlar immünohistokimyasal boyama veya floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemleri kullanılarak daha kısa bir süre içinde gastrik biyopsi örneğinde az sayıda bulunan *H. pylori*'nin doğru tanısı konulabilir. Histopatolojik tanı yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %95 olarak bildirilmiştir (3,5).

HÜT, hasta başında uygulanabilen, hızlı, kullanımı kolay ve ekonomik bir test olarak kullanılmaktadır. Antibiyotikler ve proton pompa inhibitörleri (PPI) *H. pylori* yoğunluğunu veya üreaz enzimi aktivitesini azaltarak yalancı negatif sonuçlara yol açabilir. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %90 ve %95-100 olarak bildirilmiştir. Histopatoloji ve HÜT sonuçları antrum ile korpus arasında farklılıklar göstermektedir (3,5,60).

Günümüzde *H. pylori* varlığının saptanmasında ve bakteriyal virülans genlerinin incelenmesinde dezoksiribonükleik asit veya ribonükleik asit tabanlı testler kullanılmaktadır. PCR temelli yöntemler ile gastrik dokudan DNA veya RNA elde edilip klasik veya geliştirilmiş real-time PCR yöntemine dayalı moleküler yöntemler uygulanarak genetik markerler incelenir. PCR restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP), randomize amplifiye polimorfik DNA PCR (RAPD-PCR) ve sekans analizleri gibi diğer teknikler gen polimorfizmini araştırmak amacıyla geliştirilmiştir. FISH, DNA enzim immün assay (DEIA), PCR line prob assay (PCR-LiPA) ve PCR oligonükleotit ligasyon assay (PCR-OLA) teknikleri de kullanılmaktadır. cDNA mikroarray yöntemi birçok gen ekspresyonunun saptanması için geliştirilmiştir (16,24).

Klinik örneklerde az sayıda bulunan, geç üreyen ve identifikasyonu zor olan bakterilerin tespitinde PCR yöntemin duyarlılığının yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemin %100'e varan duyarlılığı ve özgüllüğü vardır. DNA veya RNA tabanlı real-time PCR yöntemi hızlı bir test olarak jel elektroforez işlemine gereksinim duymadığı nedeni ile kontaminasyon riski daha az olduğundan ve özellikle işaretleyici problar kullanıldığı için konvansiyonel PCR yöntemine göre daha üstündür. Real-time reverse transcription PCR (RT RT-PCR) yöntemi ile RNA transkriptleri incelenerek gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyi saptanır (24,61).

2.4.2. *İnvaziv Olmayan Yöntemler*

Bu yöntemler ^{13}C veya ^{14}C işaretli üre nefes testi (ÜNT), serolojik testler ve dışkı antijen (HpSA) testlerdir. ^{13}C ÜNT, radyoaktif madde içermediği için gebelerde ve çocuklarda kullanım güvenliği gibi sebeplerle ^{14}C radyoaktif işaretli ÜNT testinin yerine tercih edilmektedir. ÜNT testi hem tedavi edilmemiş hastalarda hem de tedavinin 6. haftadaki etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılan testtir. Bu yöntemin duyarlılığı %88-95, özgüllüğü %95-100 olarak bildirilmiştir (5,58).

Hastaların klinik durumuna bağlı olarak gastrik mukozadaki *H. pylori* yoğunluğunun az olduğu zaman bazı valide edilmiş serolojik testler kullanılabilir. Bu testler

daha önce geçirilmiş *H. pylori* enfeksiyonunu saptadığı için eradikasyon etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılmamalıdır. Serum örneklerinde CagA, gastrin veya pepsinojene özgül antikorların aranması gibi serolojik testlerin gastrik kanser gelişme riski yüksek olan hastalarda bir marker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu testler dispeptik genç hastalarda kabul edilen testlerdir. Serolojik testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü %90'nın üzerinde olduğu bildirilmiştir. Dışkı antijen testi (HpSA) alternatif bir test olarak *H. pylori* enfeksiyonu tanısında veya eradikasyon tedavi başarısının değerlendirilmesinde kullanılması önerilmektedir. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğü %94 ve %92 bildirilmiştir (5,58,60,62).

2.5. *Helicobacter pylori* 'nin Önemli Virülans Faktörleri

H. pylori'nin midede kolonizasyonu üst gastrointestinal hastalıkların gelişme riskini arttırdığı bildirilmiştir. *H. pylori* ile enfekte tüm hastalarda histolojik gastritin görülmesine rağmen hastaların bir kısmında klinik tablo görülmektedir. *H. pylori* ile enfekte hastaların %10-20'sinde ülser ve %1-2'sinde gastrik kanserine rastlanmaktadır. Hastalığın gelişiminde bakteriyal, konak ve çevresel faktörlerin birlikte etkisi olduğu düşünülmektedir (6,9).

H. pylori mideye ulaştığında üreaz enzimi, flagellaları, adezyon molekülleri ayrıca membran kolestrolü ile birleşmesinin yanı sıra T hücrelerinin süpresyonunu indükleyen vakuol oluşturan sitotoksin (VacA) ve demir bağlayan proteinler ile ilgili diğer virülans faktörleri sayesinde mukus ile epitel hücreleri arasında kolonize olup salgıladığı sitotoksinler ile epitel hücreler arasındaki bağlantıları bozar ve gastrik mukozada doğal bağışıklık sistemini uyararak inflamatuvar yanıtları oluşturur. *H. pylori*'nin gastrik kolonizasyonu ile antrum ve korpus mukozasında nötrofil ve mononükleer hücreleri içeren doku infiltrasyonu meydana gelir. Bu kronik aktif gastritin gastrointestinal hastalığın ortaya çıkışından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Besin maddelerinden daha fazla yararlanabilmesi için *H. pylori*'nin epitel hücreleri arasında kurulan sıkı bağlantı "zonula occludens" bölgesinde kolonizasyonu gerçekleşmektedir (63,64).

2.5.1. *Helicobacter pylori'nin Flagellaları ve Hareketi*

H. pylori'nin spiral şekli ve flagellaları, bakterinin midenin duvarında bulunan mukus içine gömüldüğünü sağlar. *H. pylori*'nin kılıflı polar flagellaları bakterinin viskoz gastrik mukus tabakasından geçişi ve nötral bir pH'da yerleşimi için önemlidir (63). Peptidoglikan modifikasyonu ve hücre şeklinin belirlenmesinde rolü olduğu düşünülen iki protein bakterinin

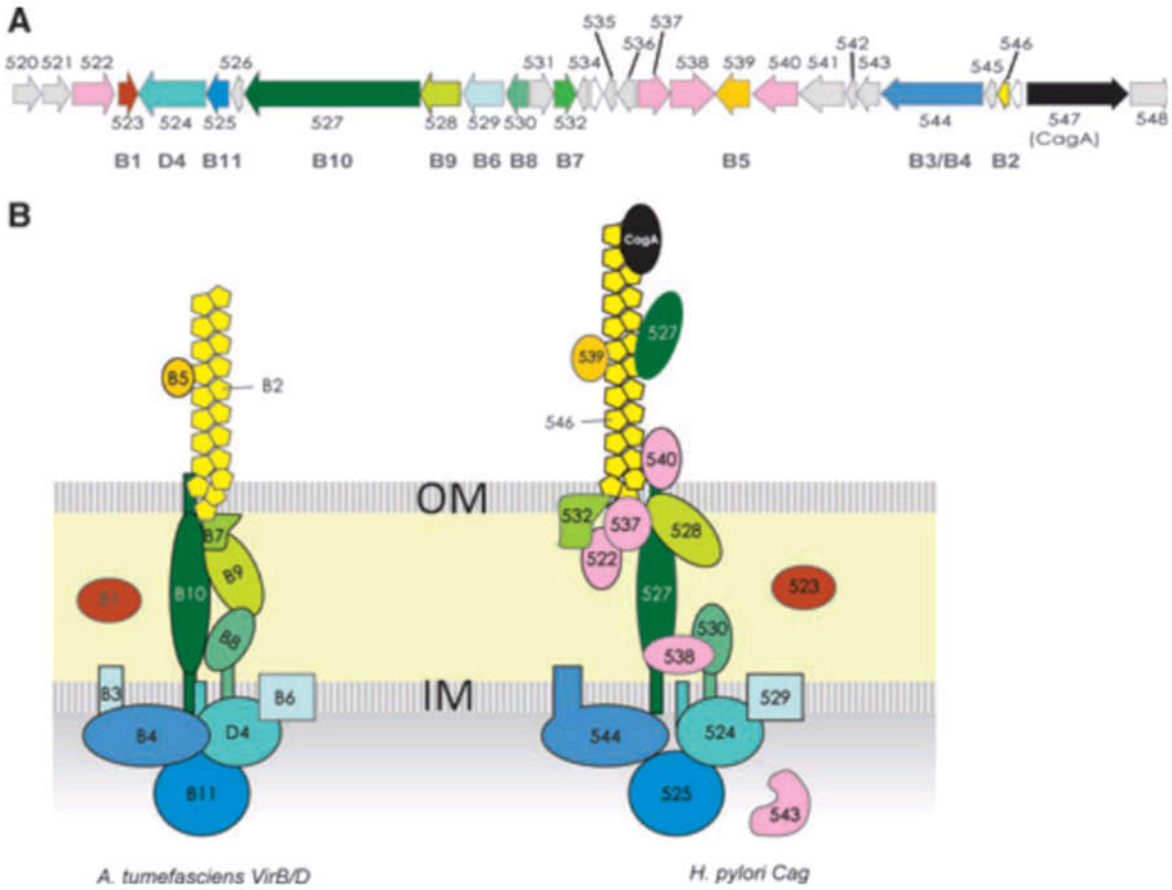
mukus tabakası içinde hareketini etkileyen önemli faktörlerdendir. DL-karboksipeptidaz peptidoglikan tripeptid monomerleri (Csd4) ayrıca varsayılan bir "scaffold" proteini (Csd5) bakterinin spiral veya helikal şeklini sağlar. *H. pylori csd4* negatif (mutant) suşlar tüm eğriliğini kaybeder ve basiller şeklinde görülür. Bu mutantların farede zayıf bir şekilde kolonize olup, ancak proinflamatuvar yanıtları ile ilgili belirgin bir azalma gözlenmemiştir. Mutant suşların buyyon gibi sıvı besiyerlerinde çok hareketli olduğu, jel benzeri besiyerinde ise bakteri hareketinin azaldığı bildirilmiştir (65,66).

2.5.2. *Helicobacter pylori'nin Üreaz Enzimi Aktivitesi*

H. pylori salgıladığı üreaz enzimi ile üreyi parçalar, CO_2 ve NH_3 oluşturarak bakteriyi mide sıvısı içindeki düşük pH'dan korur. Asidik pH'da üreaz enziminin bakteriyal iç ve dış membran arasındaki periplazmik aralığının tamponlamasında rolü olduğu bilinmektedir. Üreaz enzimi 24 kDa ve 68 kDa moleküler ağırlığında α ve β subünitelerden oluşmuştur. Toplam bakteri proteinin %5-10'nunu oluşturmakta ve bakteri kolonizasyonu için gereklidir. Hayvan modeli çalışmalarında üreaz negatif (mutant) suşların kolonizasyonunun başarısız olduğu bildirilmiştir. Bakterinin yüzeyel üreaz enzimi bir adezyon molekülü olarak görev alırken, üreaz B subünitesi gastrik epitel hücreleri ve makrofajlardan inflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmaktadır. Üreaz enzimi temel doku uyum kompleksi sınıf II (MHC II) ve CD74'e bağlandığında sırasıyla apoptozu ve interlökin 8 (IL-8) üretimini tetikler (63,67).

2.5.3. *Helicobacter pylori Sitotoksin ile İlişkili Gen A (CagA) Proteini*

cagA geni, *cagA* patojenite adasının (*cag* PAI) 3′ ucunda yer almaktadır. *cag* PAI, 40kb büyüklüğünde 30 genden oluşmuş, *H. pylori*'nin evrimsel süreçte bir bakteriden aktarıldığı ve glutamat rasemaz (Ras) geni içerisine yerleştiği düşünülmektedir. Bu gen bölgesi *H. pylori* suşları arasında horizontal olarak aktarılmakta olup, tip IV sekresyon sistemini (T4SS) kodlamaktadır. Bakteriyal proteinlerin bu sistem ile konak hücreye translokasyonu gerçekleşir (68,69). T4SS sistemi 12 proteinden (VirB1-11 ve VirD4) oluşmuştur. Bu proteinlerin işlevleri üç ATPaz enzimi tarafından yürütülmektedir (Şekil 2) (69).



Şekil 2. A: *Helicobacter pylori* 26695 suşunda *cag* PAI'nın şematik görüntüsü. HP0XXX'in açık okuma bölgesine (ORF) karşılık gelen numaralar oklar ile gösterilmiştir. **B:** Solda prototip olarak *Agrobacterium tumefaciens*'in T4SS VirB/D sistemi ve sağda *H. pylori* Cag-T4SS sisteminin bileşenleri görülmektedir. Sitoplazmik NTPaz'lar mavi renkte, kor transmembran kompleksi oluşturan proteinler yeşil renkte, pilus bileşenleri sarı veya turunç renkte gösterilmiştir. Dörtgen şeklinde integral transmembran segmentler veya proteinler görülmektedir. Cag-T4SS kompleksinin diğer bileşenleri pembe renkte ayrıca pilus ucundaki CagA efektörü siyah renkte gösterilmiştir (69).

CagA proteini 120-145 kDa'luk sitotoksik bir protein olarak *cag* PAI'daki *cagA* (HP0547) geni tarafından kodlanmaktadır. CagA sitotoksini epitel hücrelerinden IL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler. *H. pylori*'nin CagA pozitif ve CagA negatif suşları bulunmaktadır. CagA pozitif suşların, CagA negatif suşlardan daha virülan olduğu düşünülmektedir (11,70). *cagA* geninin 3´ucundaki bölgede tekrarlayan nükleotit dizileri bulunmaktadır. Buna göre *cagA* geninin A, B, C ve D yapısal tipleri belirlenmiştir. CagA proteininde tirozin fosforilasyon motiflerini çevreleyen sekanslar incelendiğinde herbiri

birer EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) motifi içeren EPIYA -A,-B,-C ve -D olmak üzere dört farklı EPIYA tipi bulunmaktadır. Bu tipler coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermekte olup, tip C'nin gastrik mukozanın şiddetli atrofisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Moleküler epidemiyolojik araştırmalarda CagA pozitif *H. pylori* suşları arasındaki virülans farklılıklarının açıklamasında *cagA* genotip özelliğinin bir marker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (71,72). CagA EPIYA motifleri önce birinci tekrarlayan bölgeye göre EPIYA-A ve EPIYA-B olarak adlandırılmıştır. Son yıllarda her iki tipteki EPIYA motiflerinin ikinci tekrarlayan bölgelerinde farklılıklar görüldüğü için şuanda ikinci tekrarlayan bölgeye göre Batı ülkelerinde EPIYA-C, Doğu Asya'da ise EPIYA-D motif tipleri olarak belirlenmiştir. Batı tip CagA'nın EPIYA ABC, ABCC, ABCCC, Doğu Asya tipi ise EPIYA ABD olduğu bildirilmiştir (72).

EPIYA motiflerinde tirozin fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Batı CagA tipleri arasında EPIYA-C motifin CagA tirozin fosforilasyonu ve tirozin fosfataz içeren Src homoloji 2 domainine (SHP-2) bağlanma aktivitesi ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. Buna rağmen EPIYA-D motifi içeren CagA'nın, EPIYA-C motifi içeren CagA'ya göre SHP-2'ye daha yüksek afinite ile bağlandığı bildirilmiştir. Batı ülkelerinde çoklu EPIYA-C motif tekrarlarını içeren (ABCCC) *H. pylori* suşları ile enfekte hastalarda tek bir EPIYA-C motifi içeren (ABC) hastalara göre gastrik kanser insidansı anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır. Doğu Asya ülkelerinde ise CagA tek bir EPIYA-D motifi içerdiğinden dolayı hasta ayırımında bu tekrarlamaların marker olarak kullanılmasını zorlaştırmıştır. EPIYA motiflerinin sayısı ile CagA fosforilasyon düzeyi arasındaki ilişkinin incelenmesi ile *H. pylori* enfeksiyonunun patogenezine yeni bir bakış açısı kazandırabileceği düşünülmektedir (70,72).

Doğu Asya CagA pozitif *H. pylori* suşları ile enfekte hastalarda peptik ülser veya gastrik kanser gelişme riskinin Batı CagA pozitif suşları ile enfekte olanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Deneysel hayvan modelleri üzerinde ve yapılan *in vitro* çalışmalarda Doğu Asya CagA pozitif suşların, Batı CagA pozitif suşlara göre daha güçlü karsinojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Buna rağmen Batı CagA pozitif suşların predominant olarak bulunduğu bölgelerde gastrik kanser insidansı yüksek saptanmaktadır (11).

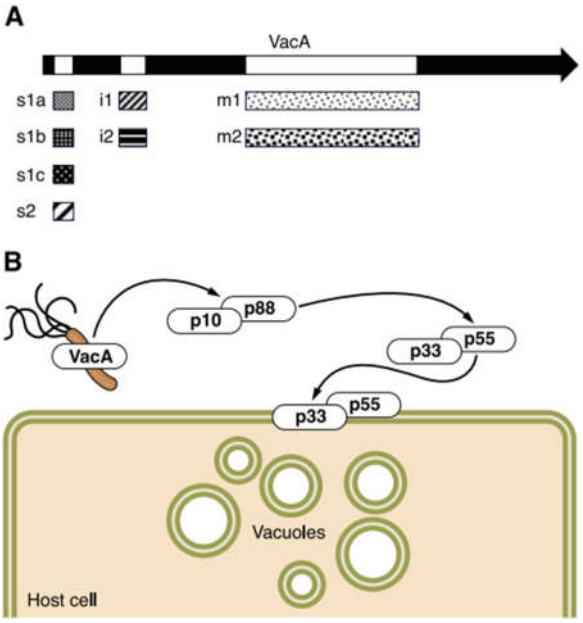
2.5.4. *Helicobacter pylori'nin Vakuol Oluşturan Sitotoksin (VacA) Proteini*

Tüm *H. pylori* suşları VacA sitotoksinini fonksiyonel olarak üretmektedir. VacA proteini epitel hücre reseptörlerine bağlanarak hücrede por oluşturup mitokondrilerden

sitokrom c salınımına yol açarak apoptoza neden olur. Genelde proinflamatuvar yanıtları tetikler. Aynı zamanda spesifik olarak T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder (68). *vacA* geninin sinyal (s) bölgesindeki (s1 ve s2) ve orta bölgedeki (m1 ve m2) allellerine göre farklı aktiviteye sahip *H. pylori* suşları (s1/m1, s1/m2, s2/m2 genotipleri) bulunmaktadır. s1/m1 suşları, s1/m2 suşlarına göre daha sitotoksiktir. s2/m2 genotipi ise sitotoksik olmayan suşlardır. *vacA* s1/m1 suşları ile enfekte hastalarda peptik ülser veya gastrik kanser gelişme riski *vacA* s2/m2 suşları ile enfekte olanlara göre daha yüksek saptanmıştır. *H. pylori* suşlarının virülans genleri coğrafi bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir (11,72).

vacA genindeki sekans çeşitliliği tam olarak belirlenmiştir. Bu genin 5´ ucuna yakın bölgesinde s1a, s1b, s1c veya s2, orta bölgedeki m1 veya m2 ayrıca iki bölgenin arasında i1 veya i2 sekans varyasyonları, allelik tipler olarak tanımlanmıştır. *vacA* s1/m1/i1 allelleri içeren *H. pylori* suşları ile enfekte hastalarda gastrik kanser gelişme riskinin s2/m2/i2 allelleri taşıyan hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (73). Son yıllarda Türkiye *H. pylori* suşlarında *vacA* geninde i3 adında yeni bir allel tanımlanmıştır (11). Bakteri membranından VacA proteinin taşıma sırasında 96 kDa'luk salgılanan VacA proteini, 88 kDa moleküler ağırlığında olgun protein (p88) ve 10.5 kDa'luk "passenger domain" (p10) olmak üzere iki parçaya ayrılır. Salgılanan olgun p88 subünitesi daha sonra proteolitik enzimler tarafından p55 ve p33 olmak üzere ikiye bölünerek sırasıyla konak hücreye bağlanmasında ve por oluşumunda görev alır (Şekil 3) (73).

Vakuollerin oluşumu ile *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerinde lizozomal yolağı bileşenlerinin bakterisidal etkisinden korunduğu ve persistan enfeksiyona yol açtığı düşünülmektedir (12).

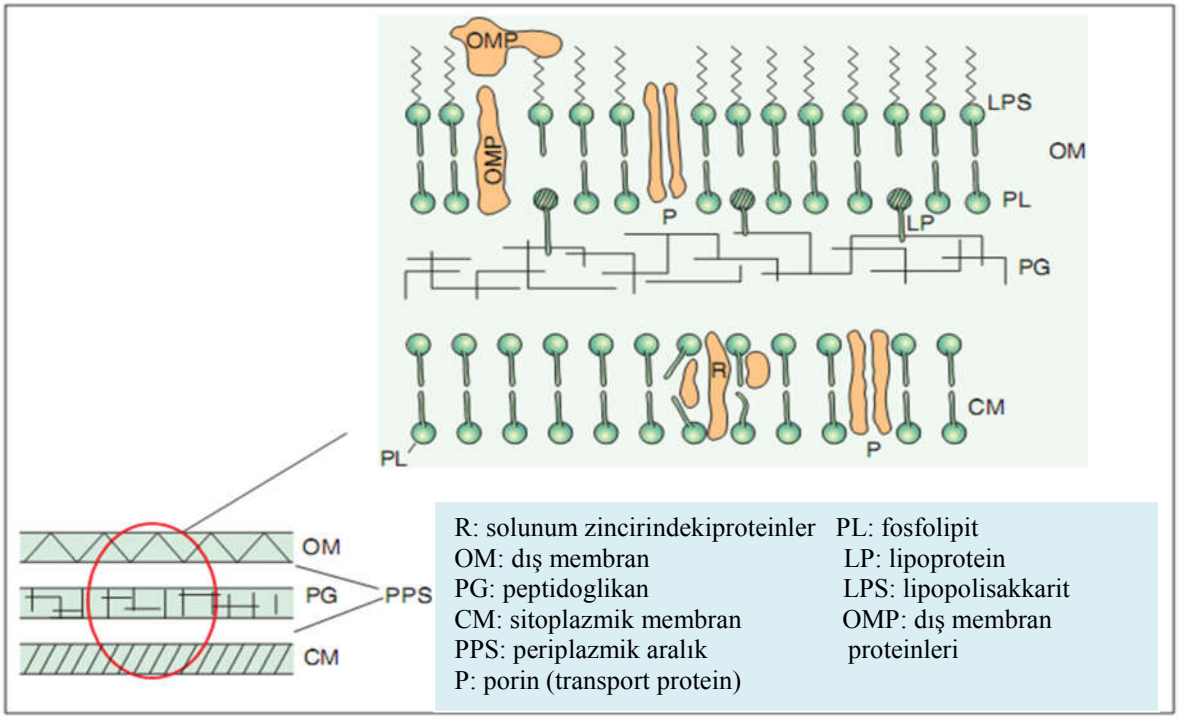


Şekil 3. VacA'nın yapısı. **A:** *vacA* geninin 5´ ucuna yakın bölgesinde allelik çeşitlilik (s1a, s1b, s1c ve s2 tipleri), orta bölgede (m1 ve m2 tipleri) ve iki bölgenin arasında (i1 ve i2 tipleri) bulunmaktadır. **B:** Salgılanan VacA'nın parçalanması ile hedef konak hücrede vakuollerin oluşumu gösterilmiştir (73).

2.5.5. *Helicobacter pylori'nin Dış Membran Proteinleri*

H. pylori'nin hücre duvarı Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi sitoplazmik membran (CM), peptidoglikan (PG) ve hidrofobik lipopolisakkarit (LPS) tabakasından oluşmuştur. Fosfolipid içeren iç CM tabakasında bakterinin solunum ve geçirgenliği ile ilgili proteinler yer almaktadır. CM tabakası ince bir PG tabakası ile kaplanmıştır. PG tabakasının dış yüzeyinde ikinci fosfolipit içeren hidrofobik LPS (endotoksin) tabakası bulunmaktadır.

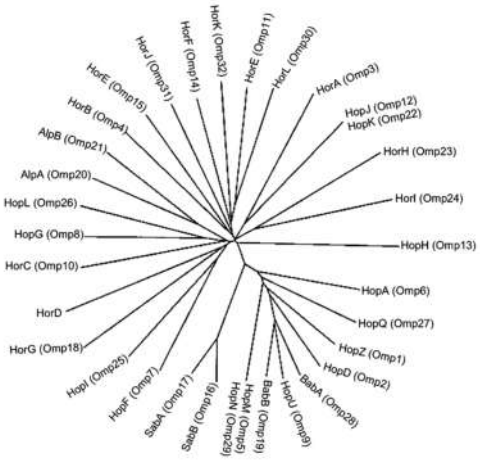
Elektron mikroskopi incelemede CM-PG ve PG-LPS arasında periplazmik aralık (PPS) bulunur ve hücre duvarının üç tabakalı yapıya sahip olduğu görülmektedir. Hücre duvarı sentezi için enzimler ve transpeptidazlar (β-laktam antibiyotiklerin hedefi olan penisilin bağlayan proteinler) (PBP) periplazmik aralıkta bulunmaktadır (Şekil 4) (74).



Şekil 4. *H. pylori*'nin tipik Gram-negatif bakterilerde bulunan hücre duvarının yapısı (74).

H. pylori'nin dış membran proteinleri (OMPs) karboksil uçlarında hidrofobik kalıntıları içermektedir. Dış membran proteinleri ailesindeki tüm üyelerinin amino ucunda tek bir domain, karboksil ucunda ise birbirine benzer yedi domain bulunmaktadır. Bu proteinler ile ilgili genler en büyük gen ailesinde 32 üyeden oluşmaktadır. Bakteriyal dış membran proteinlerinden 11'i birbirine çok benzerlik göstermektedir (48). Omp1 (HopZ), Omp28 (BabA), Omp19 (BabB), Omp20 (AlpA, HopC), Omp21 (AlpB, HopB) ve HpaA gibi adezinler integral proteinlerin içerisinde yer almaktadır (14,15,67). Amino ucunda aynı sekansları içeren OMP'lerin dördü porin olarak tanımlanmıştır. Bunlar Omp6 (HopA), Omp20, Omp21, Omp2 (HopD) proteinlerdir (48). *H. pylori* enfeksiyonunun patogenezinde rolü düşünülen ve hastalık ile ilişkili olduğu önemli OMP'lerden Omp13 (OipA, HopH) ve Omp18 inflamatuvar proteinler ayrıca "ferro regulated protein" (FrpB1) gibi demir metabolizmasında görev alan proteinlerdir (14,15,65,75).

*H. pylor*i genomunun yaklaşık %4'ü dış membran proteinlerini kodlamaktadır (72). Bu proteinler iki majör Hop ve Hor ailesinde yer almaktadır. *H. pylori* 26695 standart suşunda dış membran proteinler ile ilgili 33 gen ve *H. pylori* J99 standart suşunda ise 32 gen bulunmaktadır (Şekil 5) (15).



Şekil 5. İki majör Hop ve Hor ailesindeki dış membran proteinlerinin filogenetik ağacı. Hop ailesi 21 üyeden ve tümünün aderans ile ilişkili olduğu bilinen BabA, SabA, AlpA, AlpB ve HopZ gibi proteinlerden oluşmaktadır. Hor ailesindeki proteinler ise fonksiyonu bilinmeyen 12 üyeden oluşmaktadır. HopJ/HopK ve HopM/HopN ailesinde proteinler aynı amino asit sekansları içermektedir (15).

Omp1 (HopZ), 76.6 kDa moleküler ağırlığında dış membran proteini ve HP0009 geninin ürünü olarak bakterinin yüzeyinde bulunur ve 126-281 amino asitten oluşan bir adezin olarak tanımlanmıştır. Fare modelinde bu protein ile *H. pylori* yoğunluğu ve kolonizasyonu arasında ilişki bildirilmiştir (14,15).

H. pylori babA (HP1234) ve *babB* (HP0896) genleri tarafından kodlanan 80.1 ve 77.7 kDa'luk Omp28 (BabA) ve Omp19 (BabB) proteinler adezin olarak insan gastrik epitel hücrelerinde bulunan Lewis b (Leb) kan grubu antijenine bağlanır. *babA'*nın bir alleli olan *babA2* ile ilgili proteinin bağlanma aktivitesi daha yüksek saptanmıştır (14). BabA'yı düşük seviyede eksprese eden *H. pylori* suşlarının bu proteini yüksek düzeyde eksprese edenler veya *babA* genini içermeyen suşlara göre daha şiddetli mukozal hasara neden olmakla beraber duodenal ülser veya gastrik kanser gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Lewis b'ye bağlanmada görülen aktivite derecesi veya *cagA*+/*vacA* s1/*babA-B* pozitif *H. pylori* suşları ile mukozadaki hasar şiddeti ve klinik bulguları arasında tam bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (12). *babA* ve *babB* gen ekspresyonlarının antijenik ve faz varyasyonu ile regüle edildiği bildirilmiştir. *H. pylori* ile enfekte maymunlarda birkaç hafta sonra *babA*'nın eksprese olmadığı ve *babB* ekspresyonunda bir artış gözlemlenmiştir. İnsandan izole edilen *H. pylori* suşlarında da gen ekspresyon değişmeleri izlenmiş ve BabA'nın Lewis b'ye bağlanmadığı bildirilmiştir. Böylece antijenik varyasyon veya faz varyasyon mekanizmaları ile *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerine daha uzun süre tutunmasını sağlayarak enfeksiyonun kronikleşmesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (35).

H. pylori'nin aderansı ile ilişkili lipoprotein (AlpAB) aslında HopB ve HopC kanal oluşturan membran por proteinlerinin iki çeşididir. Bu proteinler ile ilgili genlerin tek bir

operonda yer aldığı belirlenmiştir. Omp20 (AlpA) ve Omp21 (AlpB) proteinlerin spesifik aderans aktivitesinin bakteriyal lipopolisakkaritten (LPS) bağımsız olduğu bildirilmiştir. Omp20 ve Omp21, 56.1 ve 57.2 kDa'luk adezin olarak sırasıyla HP0912 ve HP0913 genleri tarafından kodlanır. C57BL/6 fare modelinde *H. pylori alpA/alpB* tam negatif (mutant) suşların zayıf bir şekilde kolonize olduğu ve mukozada proinflamatuvar kemokin "keratinocyte-derived chemokine" (KC) ve IL-6 seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. *alpA* veya *alpB* geninin delesyonu ile insan gastrik adenokarsinoma mukozal hücrelerinden (AGS) salınan IL-8 seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu azalma Doğu Asya *H. pylori* suşlarında saptanmışken, Batı suşlarında gözlenmemiştir (12,14,15).

HopQ dış membran proteini 70 kDa moleküler ağırlığında bir adezin olarak HP1177 geni tarafından kodlanır. *hopQ* geninde iki allelik tip bulunmakta, tip I allelin yaygın olarak peptik ülseri olan hastalardan izole edildiği bildirilmiştir (15,20).

Omp17 (SabA), 69.3 kDa'luk adezin olarak siyalil Lewis X reseptörlerine bağlanır. Nötrofilleri aktive ederek oksidatif patlamaya neden olur. Bu protein HP0725 geni tarafından kodlanır. SabA pozitifliği gastrik kanser, intestinal metaplazi ve korpusta atrofi riskini arttırır. SabA negatifliği ile duodenal ülser ve nötrofil infiltrasyonu arasında ilişki bildirilmiştir. *H. pylori* ile enfekte primatların gastrik epitelinde siyalil Lewis X reseptörlerinin ekspresyonunda bir artış gösterilmiştir (12,15,67,73).

HpaA, lipoprotein yapısında bir adezin olarak HP0797 geni tarafından kodlanır. Fare modelinde yapılan çalışmada *H. pylori'*nin mide mukozasına kolonizasyonunda HpaA'nın önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. Bu proteinin antijen sunan dendritik hücrelerin (DC) matürasyonunu indüklediği de gösterilmiştir. Aşı geliştirmesinde uygun bir antijen olduğu düşünülmektedir (15,73).

Omp13 (OipA), 34 kDa moleküler ağırlığında önemli bir dış membran proteini olarak HP0638 geni tarafından kodlanır. Bu proteinin inflamasyondaki rolü ilk defa Yamaoka ve ark. tarafından açıklanmıştır. OipA'nın hücreye bağlanmasında ve β-kateninin aktivasyonunda önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Gastrik epitel hücrelerinden IL-8 salınımını indüklediği için dış inflamatuvar protein A olarak (OipA) tanımlanmıştır (15,36,73,76).

H. pylori oipA negatif (mutant) suşların gastrik epitel hücrelerine daha az derecede tutunduğu bildirilmiştir. Buna rağmen IL-8 seviyesinde herhangi bir azalma saptanmamıştır. *oipA* geninin ekspresyonu genin 5´ ucundaki "cytosine-thymine" (CT) dinükleotit tekrarları sayısına bağlı olarak kaymış iplikle eşleşme hatası "slipped-strand mispairing" (SSM)

mekanizması ile regüle edilmektedir (switch "on" veya fonksiyonel *oipA*, switch "off " veya fonksiyonel olmayan *oipA*). *H. pylori*'nin "on" genotipleri ile *vacA* s1/m1, *bab2 ve cagA* genotipleri arasında ilişki bildirilmiştir. *in vivo* çalışmalarda fonksiyonel *oipA* geninin mukozal IL-8'in yüksek seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. OipA ekspresyonu ile duodenal ülser ve gastrik kanser ayrıca *H. pylori* yoğunluğu ve nötrofil infiltrasyon şiddeti arasında korelasyon saptanmıştır. "Gerbil" modelinde yapılan bir çalışmada *H. pylori*'nin mide mukozasına kolonizasyonunda OipA'nın önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (12,72).

oipA dışında, lipopolisakkarit sentezinde görev alan genler, fosfolipaz kodlayan gen (*pldA*), flagellanın taban kısmını kodlayan *fliP* genin ayrıca *sabA*, *babB* ve *hopz* gen ekspresyonlarının SSM mekanizması ile regüle edildiği bildirilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu translasyonel düzeyde faz varyasyonu ile sürekli olarak değişmektedir (switch "on" veya switch "off ") (21,77,78).

H. pylori kromozomunda *oipA* geninin *cag* PAI'dan 100 kbp uzaklığında olmasına rağmen *cag* PAI'ı içeren *H. pylori* klinik izolatları tipik olarak fonksiyonel *oipA* (switch "on") genini eksprese etmektedir. Bu virülans faktörlerin birbiriyle ilişkili olduğu ve birbirini etkilediği düşünülmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun patogenezinde bu faktörlerin sinerjistik etkileri ile daha ciddi hastalık oluşturabileceği için biyolojik açıdan önem taşır (11).

Almanya gibi Batı ülkelerindeki *H. pylori* suşlarının %59'u fonksiyonel *oipA* genini içermektedir. Bu genin 5´ ucundaki sinyal peptit kodlayan bölgesinde dominant olarak 6, 5+2 veya 9 CT dinükleotit tekrarları (tüm suşlarda ≥5 CT) görülürken, Çin ve Japonya gibi Doğu Asya ülkelerindeki tüm suşlar fonksiyonel *oipA* genini içermekte olup, 3+1 CT dinükleotit tekrarları göstermektedir (tüm suşlarda ≤5 CT). CT polimorfizmi ile klinik bulguları arasında herhangi bir ilişki olmadığı bildirilmiş, ancak coğrafi dağılımında gözlenen farklılıkların epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir (36,79).

Omp6 (HopA) ve Omp30 proteinleri 53 ve 27.7 kDa'luk porin olarak sırasıyla HP0229 ve HP1395 genleri tarafından kodlanır. Omp6 proteinini eksprese etmeyen/Omp30 proteinini eksprese eden *H. pylori* suşları ile duodenal ülser arasında ilişki bildirilmiştir (12,15).

Omp18 proteini 20 kDa moleküler ağırlığında peptidoglikan ile ilişkili lipoprotein prekürsörü (PAL) olarak HP1125 geni tarafından kodlanır ve tüm *H. pylori* suşları tarafından eksprese edilir. Omp18 proteinin DC hücrelerinden IL-12 salınımını indüklediği gösterilmiştir. Omp18 bir immünojen olarak bağışıklık sistemi tarafından tanınır ve *H. pylori* ile enfekte hastaların serumu ile spesifik reaksiyon gösterir. *Campylobacter jejuni*'nin Omp18

proteini ile yapısal benzerlik göstermesine rağmen nükleotit dizileri arasında faklılıklar bulunmaktadır. Omp18, HpaA ve iç membran proteini olan HP0596 rekombinant proteinleri antijen olarak kullanılarak serolojik testler geliştirilmiştir. Bu testlerin *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında, aynı zamanda eradikasyon tedavisinin izlenmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (15,75,73,80). Omp18 proteinin güçlü bir antijen olduğu ve interferon gamma (IFN-γ)'nın üretimini indüklediği bildirilmiştir. Bu proteinin interferon gammanın modülayonu ile enfekte hastalarda persistan enfeksiyona yol açtığı düşünülmektedir (81).

H. pylori'nin birkaç dış membran proteininin (HopA-E proteinleri) porin olarak bakteri metabolizmasında ayrıca hidrofobik moleküllerin ve antibiyotiklerin hücre içine taşınmasında rolü olduğu bildirilmiştir (82). *H. pylori*'nin dış membran proteini olan FrpB2'nin hemoglobine bağlandığı ve bakterinin demir ihtiyacını karşıladığı bildirilmiştir (83).

2.6. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Patogenezi

H. pylori enfeksiyonunda gastrointestinal hastalığın gelişiminde önemli rol oynayan bakteriyal virülans faktörleri aşağıda özetlenmiştir (Tablo 1) (63).

Tablo 1. *H. pylori*'nin virülans faktörleri ve ilişkili hastalıklar

Virülans faktörü	Patogenezdeki rolü	İlişkili hastalık
CagA	-Tip IV sekresyon sistemi (T4SS) ile gastrik epitel hücrelerine salınımı, fosforilasyonu ve SHP-2'ye bağlanması ile gastrik sitokin üretiminin indüklenmesi (IL-8) -Epitel hücrelerinde glikan biyosentezi	-Batı ülkelerinde peptik ülser gelişimi veya gastrik kanser riskini arttırır %50-70 *H. pylori* suşlarında (+)
VacA	-Membranın depolarizasyonu -Apoptozun indüklenmesi -T lenfosit aktivasyonun inhibisyonu -Endosomal ve lizozomal aktivitesinin bozulması	%50 *H. pylori* suşlarında (+) -Batı ülkelerinde, Latin Amerika ve Orta Doğu ülkelerinde peptik ülser veya gastrik kanser riskini arttırır
LPS	-X ve Y Lewis kan grubu antijenleri ile yapısal homolojisi -Lenfotoksin a, CCL19 ve CCL21 sitokinlerin salınımının tetiklenmesi	—
BabA (HopS)	Gastrik epitel hücrelerine bağlanması	Peptik ülser ve gastrik adenokarsinoma riskini arttırır

SabA ve SabB (HopP)	Gastrik epitel hücrelerine bağlanması ve nötrofillerin aktivasyonu	Gastrik kanser, intestinal metaplazi ve korpus atrofi riskini arttırır
HspA ve HspB	Gastrik epitel hücrelerine bağlanması	MALT lenfoma riskini arttırır
AlpA ve AlpB	Gastrik epitel hücrelerine bağlanması ve sitokin üretimi	—
OipA (HopH)	Gastrik epitel hücrelerine bağlanması ve IL-8 ekspresyon seviyesinin artması	Duodenal ülser ve gastrik kanser riskini arttırır
IceA	Restriksiyon endonükleazın kodlanması	Peptik ülser riskini arttırır
DupA	IL-8 seviyesinin artması	-Duodenal ülser riskini arttırır -Kanser riskini azaltır
NapA	Nötrofillerin toplanması ve ROS üretimi ve IL-12, IL-23, TNF-α, IFN-γ'nın upregülasyonu	—

Alp: alkalin fosfataz, Bab: kan grubu antijeni bağlayan, Cag: sitotoksin ile ilişkili antijen, CCL: sitozin-sitozin ligand (protein), Dup: duodeal ülser oluşumunu destekleyen, Hop: Helicobacter dış membran porinleri, Hp: *Helicobacter pylori*, HSPs: ısı şok proteinleri, Ice: IL-1 beta dönüştüren enzim, IFN: interferon, IL: interlökin, LPS: lipopolisakkarit, MALT: mukoza ile ilişkili lenfoid doku, Nap: nötrofil aktive edici protein, Oip: dış membran inflamatuvar protein, ROS: reaktif oksijen türleri, SabA: siyalik asit bağlayan adezin A, SHP-2: tirozin fosfataz içeren Src homoloji 2 domaini, TNF: tümör nekroz faktörü, VacA: vakuol oluşturan sitotoksin A (63).

2.6.1. *Helicobacter pylori'nin Gastrik Epitel Hücrelerine Tutunması*

H. pylori enfeksiyonu bakteriyal adezinlerin gastrik mukozaya tutunması ile başlar. Adezinlerin birçoğu bakteriyal dış membran proteinlerdir. Bakteriyal adezinler ve ilgili reseptörler aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2) (67).

Tablo 2. *H. pylori*'nin adezinleri ve ilgili reseptörler

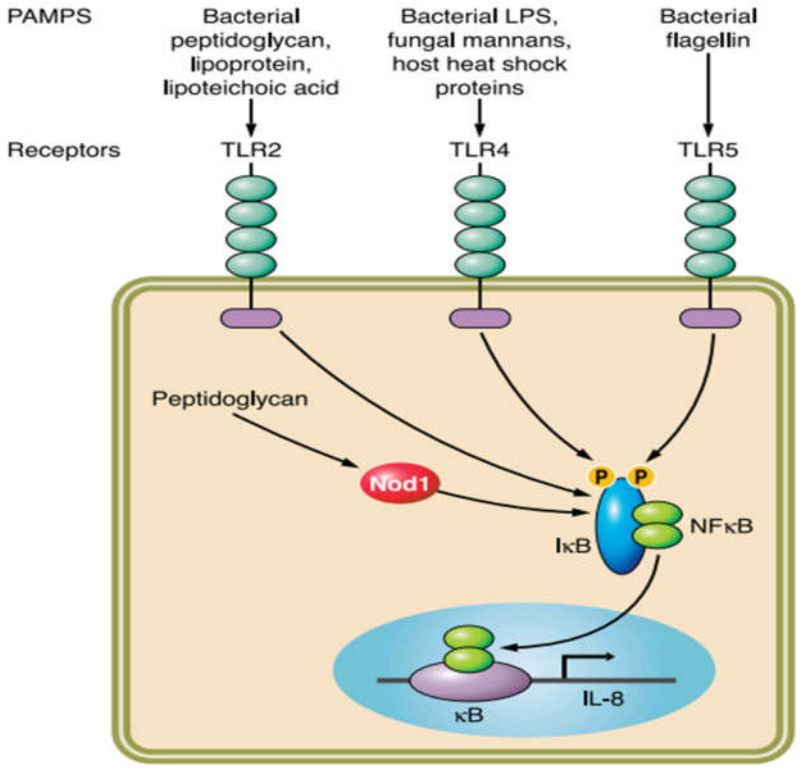
Bakteriyal adezin	**Konakçı reseptörü**
BabA	Lewis b kan grubu antijenleri
SabA/B	Siyalil Lewis X
HpaA	Siyalil Lewis X
UreB	CD74
UreA?	MHC sınıf II
AlpA/B	?
HopZ	?
?	DAF (yıkım hızlandırıcı faktör)
?	Sulfatlanmış moleküller (Heparin sülfat)
?	Fosfolipidler
?	Trefoil faktör 1

Gastrik epitel hücrelere tutunmanın ardından *H. pylor i*çeşitli virülans faktörleri ile gastrik mukozanın bütünlüğünü bozarak gastrointestinal hastalığın gelişiminde bu faktörlerin önemli rolleri olduğu bildirilmiştir.

2.6.2. *Helicobacter pylori Enfeksiyonunda Toll Benzeri Resptörler (TLR) ve Nükleotit Bağlayan Oligomerizasyon Domain* (*Nod) Proteinlerinin Rolü*

H. pylori suşlarında bulunan patojen ile ilişkili moleküler paternler (PAMPs) gastrik epitel hücrelerin yüzeyinde bulunan özgül reseptörlerine bağlanarak doğal bağışıklık yanıtların oluşumunu tetikler. Bu yanıtlar "Toll" benzeri reseptörler (TLR) ve nükleotit bağlayan oligomerizasyon domain (Nod-Like) benzeri reseptörlerin aktivasyonu ile meydana gelir. "Toll" benzeri reseptör ilk kez *Drosophila'*da bulunmuş ve bu reseptörlerin embriyonik gelişimde rolü olduğu bildirilmiştir. TLR'ler lösin'den zengin tekrarları içeren ekstrasellüler domainler ve IL-1 reseptör ailesine benzer intrasellüler domainlerden (TIR domain) oluşmuştur. Bu güne kadar 13 TLR türü tanımlanmış olup, ligand özgüllüğü açısından birbirinden farklılık gösterdiği bildirilmiştir. TLR3, TLR5 ve TLR9 gibi reseptörler PAMP'ların yalnızca bir tipinin tanınmasını sağlarken, TLR2 reseptörü ise bakteriyal lipoprotein, lipoteikoik asit ve peptidoglikan ile etkileşime girer. TLR3 ile çift iplikli RNA, TLR5 ile flagellin, TLR9 ile metillenmemiş nükleik asit (bakteriyal CpG DNA motifleri) ve TLR4 reseptörü ile lipopolisakkaridin bağlandığı bildirilmiştir (Şekil 6). Bu reseptörler özgül ligandlarına bağlanarak nükleer faktör kappa B (NF-κB), aktivatör protein 1 (AP-1), siklik adenozin monofosfat (cAMP) yanıt elemanı bağlayan protein 1 (CREB-1) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek IL-8, IL-12, IL-6, IL-1β, IL-18, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ve IL-10 inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır (63,73).

H. pylori enfeksiyonunda doğal bağışıklık yanıtlarının regülasyonunda NF-κB ve mitojen aktive edici protein kinazların (MAPK) önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Monosit hücrelerinde *H. pylori* HP0175 geninin ürünü olan peptidil prolil sis-trans-izomeraz, TLR4'e bağlandığı zaman NF-κB ve MAPK sinyal iletim yolaklarını aktive ederek IL-6 sitokinin salınımına neden our. Makrofajlardan IL-1β ve IL-6 salınabilmesi için *H. pylori*'nin TLR2 veya TLR4 resptörlerine bağlanması gerektiği bildirilmiştir. Aynı şekilde *H. pylori* HSP60 proteini TLR2'ye bağlandığında, NF-κB ve MAPK sinyal iletim yolaklarını aktive ederek IL-8 sitokinin salınımını indükler. *H. pylori* patogenezinde TLR aracılığı ile NF-κB ve MAPK sinyal iletim yolakların transdüksiyonunun önemli rolü olduğu bildirilmiştir (12).



Şekil 6. Toll benzeri reseptörler ve patojenin tanınması. PAMP'lar, TLR'lere veya intrasellüler patojen tanıma mölekülüne (Nod1) bağlandığında bu reseptörleri aktive ederek birçok intrasellüler sinyal iletim yolağı üzerinden nükleer faktör kappa B'yi (NFκB) uyararak IL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin yanı sıra bağışıklık efektörlerin üretimine neden olur (73).

H. pylori'nin gastrik epitel hücre hattı üzerinde etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada TLR4 ve myeloid farklılaşma faktörü 2'nin (MD-2) ekspresyonun artışının ardından *H. pylori* LPS'nin stimülasyonu ile NF-κB ve IL-8 promotörlerinde aktivasyon gözlenmiştir. Buna rağmen LPS'nin tanınmasının TLR4'den bağımsız olduğu düşünülmektedir. TLR4'e karşı monoklonal antikorların varlığında IL-8 üretiminin inhibe edilmediği bildirilmiştir. Son zamanlarda LPS'nin gastrik mukozada bulunan ve sisteinden zengin bir protein olan trefoil faktörü 1'e bağlandığı (TFF1) bildirilmiştir. *H. pylori*'nin mide mukozasına kolonizasyonunda bu proteinin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. TLR4 geninin 4. ekzonunda +896. pozisyonda fonksiyonel bir polimorfizm tanımlanmıştır. Bu tek nükleotit polimorfizmin (SNP) (Asp299Gly) TLR4 reseptörünün ekstrasellüler domaininde yapısal değişimler gözlemlenmiştir. TLR4 reseptöründe defektli sinyal iletim varlığında fazla bağışıklık yanıtlarının oluştuğu bildirilmiştir. *H. pylori* ile enfekte hastalarda bu yanıtların kronik inflamasyon ve sonuçta gastrik kansere yol açabileceği düşünülmektedir. *H. pylori*'nin virülans faktörü olan nötrofil aktive edici proteini (HP-NAP) TLR2 agonisti olarak gastrik

epitel ve monosit hücrelerde Th1 inflamatuvar sitokin ekspresyonunda artışa neden olur. TLR2 genindeki (-196 ile -174) delesyon polimorfizminin de gastrik kanser gelişiminde rolü olduğu bildirilmiştir. Gram-negatif bakterilerin aksine *H. pylori* flagellaları TLR5'i aktive etmemektedir. Flagellin subünitesi olan FlaA ile ilgili *flaA* geninin inaktivasyonu ile LPS'nin TFF1'e bağlanmasında azalma ve pürüzlü tip kolonilerin üretilmediği bildirilmiştir (73).

H. pylori peptidoglikanı, *cag* PAI ile kodlanan tip IV sekresyon sistemi vasıtası ile konak hücre içerisine enjekte olduktan sonra Nod1'e bağlanarak gastrik epitel hücrelerinde bağışıklık yanıtlarının oluşumuna neden olur (67). Bu yanıtlar NF-κB faktörünün aktivasyonu ve nükleer translokasyonu ile başlar ve IL-8, β-defensin 2, anti-apoptotik faktörler, matriks metalloproteinaz 7 ve 9 (MMP-7, 9) genlerinin transkripsiyonu ile sonuçlanır (68).

2.6.3. *Helicobacter pylori CagA Sitotoksinin Etki Mekanizması*

Gastrik epitel hücrelerinde CagA'nın lokalizasyonunda integrin reseptörlerinin ayrıca CagL'nin önemli rol oynadıkları bilinmektedir. CagL,Arg-Gly-Asp (RGD) motifi ile tip IV sekresyon sistemini (T4SS) hedef hücrelerde bulunan $\alpha_5\beta_1$-integrine bağlar. Ayrıca konak hücredeki fokal adezyon kinazı (FAK) ve non-reseptör sitoplazmik tirozin kinazı (Src) aktive eder. β_1-integrin'nin konak hücre motilitesi ve uzamasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir. CagL proteini integrinlere bağlanarak lokal membranın kırılmasına "local membrane ruffling" neden olur (73). CagA sitotoksini ve ihtimalen bakteriyal peptidoglikan, tip IV sekresyon sistemi ile gastrik epitel hücrelerine enjekte edildikten sonra farklı suşlarda sayıca değişiklik gösteren tirozin bölgelerindeki EPIYA motiflerinden (tirozin fosforilasyon motifleri) Src ailesi kinazlar tarafından fosforilasyona uğrar. Fosforilasyon seviyesi bakteride bulunan EPIYA motiflerin sayısına bağlı olarak bakteri suşlarının sadece virülans derecesi değil, aynı zamanda bağışıklık sistemi tarafından verilen inflamatuvar yanıtları da belirtmektedir. CagA fosforillendikten sonra tirozin fosfataz içeren Src homoloji 2 domaini (SHP-2) ile etkileşime girerek fosfataz aktivitesini indükler ve konak hücrede bir takım proteinler defosforillenir. SHP-2'nin aktivasyonu Ras/Raf üzerinden MAP kinaz/MEK/ERK1/2 gibi diğer sinyal moleküllerini indükler. Bu yolağın deregülasyonu ile epitel hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu (hücre dağılımı) ayrıca hücre uzaması veya "hummingbird fenotipi" diye adlandırılan morfolojik değişiklikler ortaya çıkar. Fosforillenmiş CagA, Src kinazların aktivasyonunu inhibe ederek konak hücrede aktin bağlayan kortaktin gibi bir takım proteinler defosforillenir (67,68).

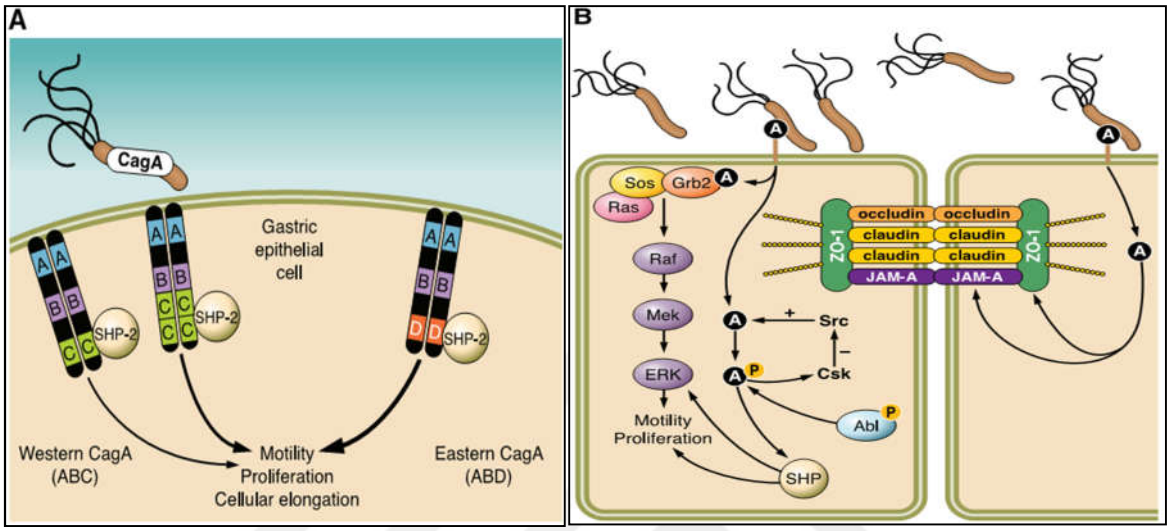
CagA proteini, c-Src reseptörleri dışında c-Abl kinaz tarafından da fosforillenir. c-Abl kinaz, CagA ile etkileşime girerek dinamik sitoiskelet yapıları oluşturan fokal adezyon komplekslerinde ve membran kırılmalarında lokalize olup hücre motilitesini etkiler. Ayrıca CagA'nın hücre döngüsü regülatörü olan cyclin D1 ekspresyonu üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir. *cagA* negatif (mutant) *H. pylori* suşlarında Ap1 ve cAMP yanıt elemanları (CRE) devreye girerek siklin D1'in ekspresyonunda azalmaya neden olur (12).

Fosforillenmemiş CagA, tirozin fosforilasyonundan bağımsız olarak gastrik epitel hücrelerine etki eder. CagA, hücre adezyon proteini olan E-kaderin, hepatosit büyüme faktörü reseptörü (c-Met), fosfolipaz C gama (PLC-γ), büyüme faktörü reseptörü bağlayan adaptör protein-2 (Grb-2) ve kinaz "partitioning" defektif 1 (Par1) ile etkileşime girerek proinflamatuvar ve mitojenik yanıtları indükler. Ayrıca hücreler arası bağlantıları bozarak hücrede polarite kaybına yol açabilir (67,73). Fosforilasyon mekanizması dışında CagA molekülleri multimerizasyon (CM) sekans (FPLxRxxxVxDLSKVG) bölgesinde birbirine bağlanark CagA dimerlerin oluşumuna neden olur. CM sekansı CagA EPIYA-C ve EPIYA-D motif tiplerinde bulunur. CagA-Par1 ve CagA-c-Met komplekslerin oluşumu için CM sekansın varlığının gerekli olduğu bildirilmiştir (72).

Fosforilasyondan bağımsız diğer yolaklardan CagA'nın sıkı bağlantı protein 1 (ZO-1) ve bağlantı adezyon molekülüne (JAM) bağlanmasıdır. CagA proteini epitel bariyeri bozarak epitel hücre morfolojisinde displastik değişikliklere yol açar. CagA'nın E-kaderine bağlandığında E-kaderin ve β-katenin komplekslerin oluşumunu engelleyerek nükleer β-katenin birikimine neden olur. β-katenin'in deregülasyonu ile intestinal spesifik CDX1 transkripsiyon faktörünü kodlayan *cdx1* geni transaktive edilerek intestinal metaplazi gelişiminde rolü olduğu düşünülmektedir. *H. pylori*'nin anti-apoptotik bir fonksiyonu olarak CagA proteini JAK-STAT sinyal iletim yolağını süprese ederek B hücre proliferasyonunu durdurur. CagA proteini fosforilasyon yolağından bağımsız olarak *H. pylori*'ye karşı gelişen bağışıklık yanıtlarını azaltarak p53 bağımlı apoptoz yolağının inhibisyonu ile MALT lenfoma gelişimine yol açabilir (12,67,73).

CagA EPIYA motiflerinde bulunan fosforilasyon bölgelerinin sayısı ile CagA'nın fosforilasyon derecesi ve hücredeki değişikliklerin şiddeti arasında ilişki bildirilmiştir. Batı *H. pylori* suşları tipik olarak CagA EPIYA-C, Doğu Asya *H. pylori* suşları ise CagA EPIYA-D motiflerini içermektedir. Üç'ten fazla EPIYA motif tekrarları içeren *H. pylori* suşları ile enfekte hastalarda gastrik atrofi, intestinal metaplazi ve gastrik kanser gelişimi daha sık

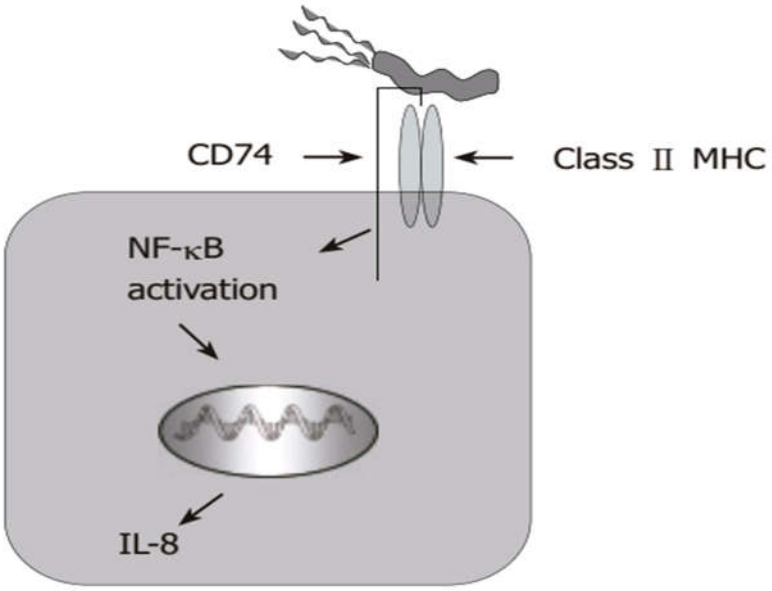
görülmektedir. *in vitro* şartlarda EPIYA motiflerinin sayısı ile CagA fosforilasyon şiddeti, epitel hücrelerin uzaması ayrıca sitokinlerin indüklenmei arasında ilişki bildirilmiştir. CagA EPIYA motifleri çeşitli sinyal iletim mekanizmaları ile hücrelerde değişikliklere yol açmaktadır (Şekil 7) (73).



Şekil 7. CagA fosforilasyon motifleri ve hücrede görülen morfolojik değişiklikler. **A:** Batı ve Doğu Asya ülkelerindeki CagA EPIYA motifleri. **B:** CagA proteini Src ve Abl kinazlar tarafından fosforillenir. İnhibitör kinaz (Csk), fosfo-CagA düzeyinin azalmasını sağlar. Fosforillenmiş CagA, SHP-2 ve ERK'yı aktive ederek hücrede morfolojik değişikliklere yol açar. Fosforillenmemiş CagA, ZO-1 ve JAM-A sıkı bağlantı proteinleri ile etkileşime girip apikal bağlantı komplekslerin disregülasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca fosforillenmemiş CagA, Grb2'ye bağlanarak Raf/ERK/MEK sinyal iletim yolağı üzerinden hücre motilitesini ve proliferasyonunu arttırır (73).

2.6.4.Helicobacter pylori Enfeksiyonunun Patogenezinde İmmün Sistemi Yanıtlarının Önemi

H. pylori ile gastrik epitel hücreler arasında sürekli temas sonucu bakteriyal virülans faktörlerinin etkisinde bağışıklık sistemine ait proinflamatuvar yanıtlar oluşur. Bu yanıtlar hem spesifik hem de non-spesifik olarak enfeksiyona karşı gelişir ve doku hasarına neden olabilir. Üreaz enzimi ve CagA sitotoksini sinyal yolaklarını uyararak IL-8 ve büyüme faktörü alfa (GRO-α) gibi proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin upregülasyonunu sağlar. Üreaz enzimi gastrik epitel hücrelerinde bulunan MHC sınıf II'ye bağlanarak apoptoza yol açar. Üreaz enzimi B subünitesi CD74 moleküllerine bağlanıp IL-8 salınımını uyarır (Şekil 8) (67).



Şekil 8. *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerinde bulunan CD74 molekülüne bağlanması ve NF-κB'nin indüklenmesi ile IL-8 sitokinin salınımı (67).

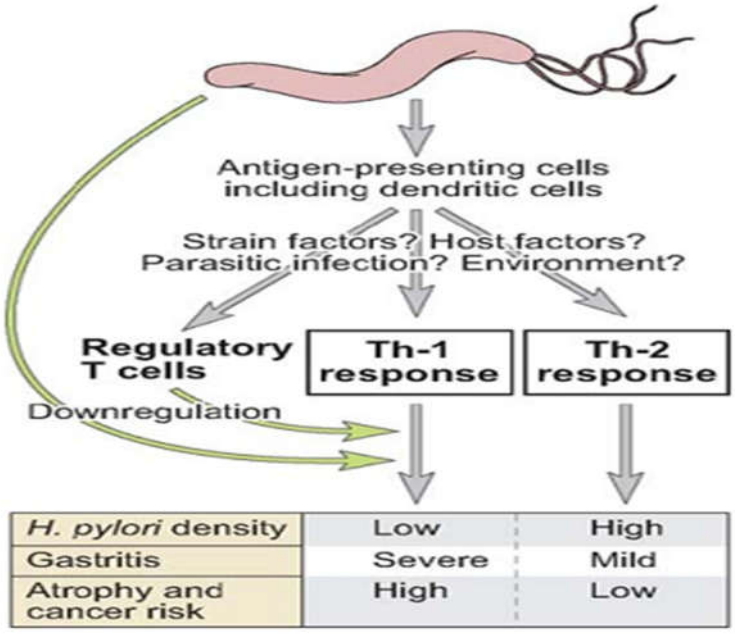
CagA proteini gastrik epitel hücrelerinden makrofaj migrasyon inhibitör faktörünün (MIF) salınımını indükleyerek doğal ve edinsel bağışıklık yanıtlarının ortaya çıkmasına neden olur. MIF faktörü, makrofaj ve T hücrelerinden de salınarak epitel hücreler prolifere olur. MIF tümör supresör faktörü, *p53* genini inaktive ederek ERK1/2 proliferasyon sinyal yolağını uyarır (67). MIF'nin gastrik epitel hücreleri yüzeyinde yüksek düzeyde eksprese olan CD74'lere bağlandığı gösterilmiştir. MIF'nin bu hücrelerde proliferasyonu ve kanser gelişimi üzerine etkisinin CagA'ya bağlı olduğu bildirilmiştir. CagA negatif suşların yanı sıra CD74 reseptörlerine özgül monoklonal antikorların varlığında hücre proliferasyonu azaldığı gözlemlenmiştir (12).

CagA proteini, ERK1/2 sinyal molekülünün yanı sıra NF-κB'nin ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu upregüle eder. IL-8 üretimi sonucu nötrofiller enfeksiyon bölgesine daha fazla toplanarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) yanı sıra IL-8'in fazla salınımı ile doku hasarı meydana gelir. Aynı zamanda gastrik epitel hücrelerinden salınan ROS, DNA'da hasar oluşturarak apoptoza yol açabilir (67).

CagA'nın, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) ligandlarını etkilediği ve reseptörün transaktivasyonunu indüklediği de bildirilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunda görülen bu etkileşimler gastrik epitel hücre proliferasyonuna neden olur. IFN-γ gibi sitokinler gastrik epitel hücrelerinde MHC sınıf II, CD74 veya siyalil Lewis X reseptörlerin ekspresyonunu arttırarak apoptozu uyarır (67).

Tüm *H. pylori* suşları bağışıklık sistemini uyararak lokal ve sistemik antikorların (IgA, IgM ve IgG) gelişimini, aynı zamanda hücre aracılığıyla bağışıklık yanıtlarını oluşturur. İnflamatuvar yanıtlar polimorfonükleer ve mononükleer hücrelerden oluşmuş ve enfekte hastaların gastrik mukozasında fazlasıyla artmış seviyede IL-1β, TNF-α, IL-8 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler bulunmaktadır. Bu yanıtların hastalığın patogenezinde önemli olmasına rağmen *H. pylori* enfeksiyonunu ortadan kaldıramadıkları ve persistan enfeksiyona yol açabileceği düşünülmektedir (68,73).

H. pylori'nin indüklediği hastalığın patogenezinde merkezi rol oynayan faktör inflamasyondur. Proinflamatuvar sitokin genlerindeki polimorfizmlerinin yanı sıra CagA ve OipA gibi bakteriyal virülans faktörlerinin inflamasyon şiddetini arttırdığı bildirilmiştir. Yardımcı T hücreleri (Th) ile yanıtın tipi ve sitokin üretimi regüle edilerek inflamatuvar yanıtların modülasyonu gerçekleşir. *H. pylori* hem Th1 (hücresel immünite) hem de Th2 (antikor bağımlı immünite) edinsel bağışıklık yanıtlarını stimüle etmektedir. Th1 yanıtlarının dominant olduğu gözlemlenmiştir. *H. pylori*'nin indüklediği hastalığın patogenezinde bu yanıtların önemli olduğu bildirilmiştir (Şekil 9) (68).



Şekil 9. *H. pylori* enfeksiyonunda merkezi rol oynayan yardımcı T hücre yanıtı.
Th1, Th2 ve T regülatuvar hücreler (Treg) aktive olur. İnflamatuvar yanıtların dengede tutulmasına rağmen bu yanıtlar diğer faktörlerden etkilenmekte olup, insanlar arasında farklılıklar göstermektedir. İnsan ayrıca hayvan üzerinde yapılan çalışmalarda kuvvetli Th1 yanıtının gastrit şiddetini ve kanser riskini arttırdığı bildirilmiştir. Th1 yanıtı hem *H. pylori* hem de konak hücre tarafından downregüle edilmektedir. Bu mekanizma ile *H. pylori*'nin daha yoğun bir şekilde kolonizasyonunun sağlandığı düşünülmektedir (68).

2.6.5. *Helicobacter pylori VacA Sitotoksinin Etki Mekanizması*

VacA sitotoksini hücrede vakuol oluşturarak hücrenin normal membran trafiğini negatif yönde etkiler. VacA proteini tüm *H. pylori* suşları tarafından eksprese edilir. Gastrik epitel hücreler, antijen sunan hücreler, mast hücreler ve lenfositlerin bu proteinden etkilendiği bildirilmiştir. VacA, konak hücrelerin plazma membranındaki EGFR ve reseptör-tipi protein tirozin fosfataz reseptörüne (RPTP-α ve -β) bağlanarak anyon-seçici kanalları oluşturur. RPTP-$\beta^{+/+}$ farelerde şiddetli hemorajik gastrit ve ülser gelişimi gözlenmiştir. VacA'nın fibronektin, heparin sülfat, T hücrelerdeki CD18 (integrin β2) ve sfingomiyeline bağlandığı bildirilmiştir. VacA sitotoksini hücrelerde bulunan deterjan-dirençli mikrodomain yapıları (lipid rafts) ve glikozil fosfatidil inozitol "anchored" proteininine (GPI-AP) bağlanarak hücreden besin maddelerin salınımına neden olur. Bakterinin bu besin maddelerinden yararlandığı düşünülmektedir. VacA'nın p33 domaininde bulunan hidrofobik amino-terminal sekansının por oluşturmasında, p55 kısmının ise toksinin hedef hücreye bağlanmasında rolleri olduğu bildirilmiştir (67,73).

Hücre zarında porların oluşumu ile anyon konsantrasyonunda yükselmenin ardından hücrenin proton pompalaması bir artış göstererek zayıf bazların hücre içine girmesi ile ozmotik şişme ve sonuçta vakuol oluşumuna neden olur. VacA sitotoksini mitokondriyal membranı bozarak hücrede ATP konsantrasyonunu negatif yönde etkiler. Hücre döngüsü ilerlemesinin durdurulması ile apoptoz meydana gelir. VacA toksini B hücrelerinde antijen işlenmesini ve antijenin CD4+T hücrelere sunulmasını engeller. Ayrıca T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe ederek *H. pylori* enfeksiyonunun patogenezinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (67).

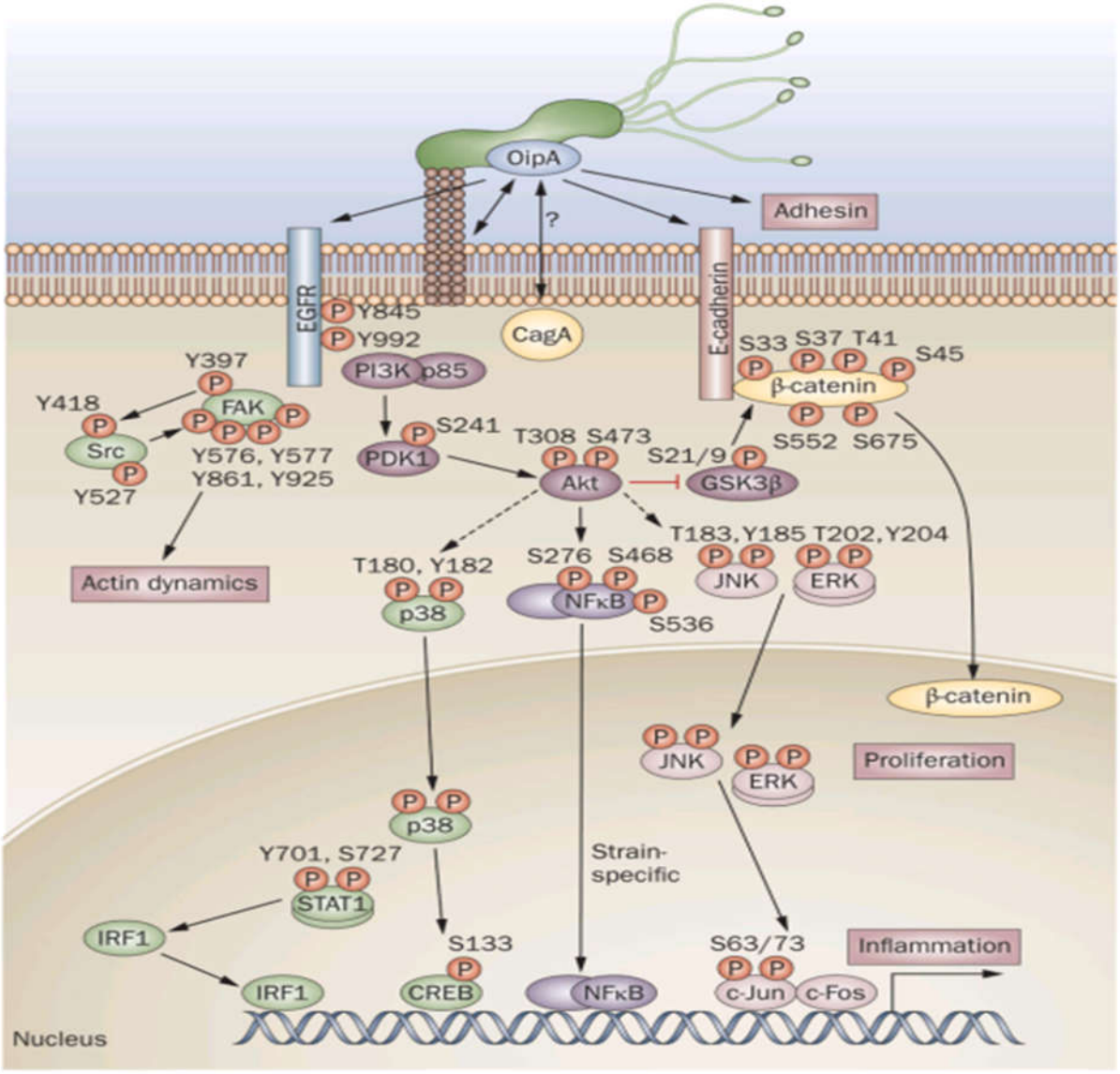
H. pylori vahşi tip suşları, *vacA* negatif (mutant) suşlara göre makrofajlarda daha fazla canlılığını sürdürmektedir. VacA sitotoksini, CD18 reseptörüne bağlanarak aktive olmuş insan T lenfositlerin içerisine girip lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen 1'in (LFA-1) geri dönüşümünü inhibe eder. LFA-1 eksikliği olan Jurkat T hücrelerinin vakuolizasyona dirençli olduğu bildirilmiştir. VacA sitotoksini, T hücrelerinde transkripsiyon faktörü olan aktif T hücre nükleer faktörü (NFAT), IL-2 ve IL-2 reseptörün ekspresyonunu süprese ederek bu hücrelerin proliferasyonunu ve canlılığını negatif yönde etkiler. Böylece T hücrelerin klonal artışını engeller. T hücre aktivasyonu ile sinyal yolakları etkilenerek bu mekanizma ile bakterinin edinsel bağışıklık sisteminden kaçışı düşünülmektedir. Ayrıca VacA epitel hücrelerinde p38 ve ERK-1/2 MAP kinazları aktive ederek gastrik epitel hücrelerinde

bağışıklık sistemini uyarır. Fare modelinde bağışıklık yanıtların insanlarınkine benzer doku hasarı oluşturduğu gösterilmiştir (67,73).

2.6.6. *Helicobacter pylori Dış Membran Proteinlerinin Etki Mekanizması*

H. pylori dış membran proteinlerinin birçoğu adezin olarak görev almaktadır. *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerine aderansını sağlayan reseptörler ve bunlarla ilgili bakterinin dış membran yüzeyinde adezinler belirlenmiştir. Omp28 (BabA) dış membran proteini adezin olarak *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerine bağlanmasını sağlar, ancak konak hücrede inflamatuvar veya bağışıklık yanıtlarını oluşturmaz. Omp17 (SabA) ise nötrofillerin siyalil reseptörlerine bağlanıp onları aktive ederek oksidatif patlamaya neden olur. Omp20 ve Omp21 (AlpA ve AlpB), ayrıca Omp1 (HopZ) proteinleri adezin olarak bakterinin epitel hücrelerine tutunmasını sağlar, fakat bu proteinler ile ilgili reseptörler bilinmemektedir. Omp13 (OipA) proteini gastrik epitel hücrelerinden IL-8 salınımını indükler. Omp13 proteini Stat1'i fosforillerken, CagA proteini NF-κB'yi aktive eder. Bu iki sinyal yolağının aktivasyonu IL-8 salınımı ile sonuçlanır. IL-8'in tam aktivasyonu için hem CagA hem de Omp13'ün birlikte olması gerektiği bildirilmiştir (67,76). Omp13 proteini bir adezin olarak *H. pylori*'nin hücreye bağlanmasını sağlamakla beraber CagA gibi β-katenin'ni aktive edip hücreler arası bağlantıları bozarak hücre proliferasyonuna neden olur (72). Omp1, Omp13, Omp20 ve Omp21 dış membran proteinleri ile CagA translokalizasyonu veya IL-8 salınımı arasında herhangi bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (77).

İnsan gastrik biyopsi örnekleri üzerinde yapılan çalışmada Omp13 (OipA)'nın diğer faktörlerden bağımsız olarak IL-8'in artan seviyesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. IL-8 geninin promotör bölgesinde transkripsiyon faktörü olan NF-κB, aktivatör protein 1 (AP1) ve interferon stimüle edici responsiv elemanı (ISRE) ile ilgili genler yer almaktadır. Bu genler IL-8 gen tanskripsiyonunun regülasyonunda görev alır. OipA'nın sinyal iletim yolakları ile ilgili mekanizmalar aşağıdaki şekilde açıklanmıştır (Şekil 10) (72).



Şekil 10. *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde OipA sinyal iletim yolakları. OipA'nın fosforilasyonu epitel hücrelerinde bir çeşit sinyal yolaklarını regüle eder. Bu yolaklar *cag* PAI sinyal yolaklarını da içermektedir. P38/STAT1 yolakları *cag* PAI'dan bağımsız olarak regüle edilir. IL-8 promotörünün tam aktivasyonu için hem *cag* PAI hem de OipA'nın birlikte olması gereklidir. Fakat bu yolaklar IRF1 upstreaminde birbirinden ayrılır. OipA proteini sadece STAT1/IRF1/ISRE yolaklarını aktive eder. OipA proteini bir adezin olarak bildirilmiş, ancak hedef reseptörü tanımlanmamıştır. EGFR'nin 10'dan fazla fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır. Ancak OipA için sadece ikisi araştırılmıştır. OipA proteini FAK'ı Y397, Y576, Y577, Y861 ve Y925 tirozininden fosforillerken, *cag* PAI, FAK'ı Y407 tirozininden fosforiller. Yapılan bazı çalışmalarda Y397 tirozin fosforilasyonunun *cag* PAI'ya bağlı olduğu bildirilmiştir. Konfirme edilmemiş etkileşimler kesikli oklar ile gösterilmiştir. S: serin; T: treonin (72).

H. pylori'nin dış membran proteinleri fenotipik olarak birbirinden farklılıklar göstermekte olup, ekspresyonlarının antijenik varyasyon veya faz varyasyonu ile regüle edildiği birdirilmiştir. *H. pylori*'de faz varyasyonu yaygın olarak görülmektedir. *H. pylori*'nin *omp28 (babA)* ve *omp19 (babB)* dış membran protein genlerinin hem antijenik hem de faz varyasyonu ile regüle edildiği gösterilmiştir. Hayvan modeli ile yapılan bir çalışmada *H. pylori* enfeksiyonunun ardından *babA*'nın ekprese edilmediği ve *babB*'nin ekspresyonunda bir artış gözlendiği bildirilmiştir. *babA* ekspresyonunun yokluğunda bakterinin konak bağışıklık sisteminden kaçışının sağlandığı, aynı zamanda *babB*'nin fazla ekspresyonu ile BabB'nin bir adezin olarak bakteri tarafından kullanıldığı ve konakta persistan enfeksiyona yol açtığı düşünülmektedir (35). *H. pylori* dış membran proteinlerinde repertuvar çeşitliliğinin yanı sıra genomdaki genetik esneklik (genetic plasticity) bakterinin konak reseptörleri ile çeşitli biçimlerde etkileşime girmesini kolaylaştırır. Adezin-reseptör arası etkileşim açısından gözlenen farklılıklar sadece enfekte hastalarda değil, aynı zamanda enfeksiyon sürecinde tek bir hastada görülmektedir. *H. pylori* konak hücre reseptörlerine bağlanmanın ardından kolonizasyonu sağlanmakla beraber bakterinin gastrik epitel doku aralıklarından sızan besin maddelerinden yararlanabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan gastrik epitel hücrelerine adere olan bakteriler bağışıklık yanıtlarını stimüle ederek inflamasyona neden olur. Böylece besin maddeleri ve konağın bağışıklık yanıtına bağlı olarak *H. pylori* suşlarının gastrik epitel hücrelerine bağlanıp bağlanmadığı bakterinin geçirdiği seleksiyon dönemleri içerisinde belirlenmiş olur (17).

Farklı aderans özelliği gösteren *H. pylori* suşlarının seçilmesinde gastrik ortamdaki değişikliklerin etkili olduğu düşünülmektedir. *H. pylori* kronik inflamasyon oluşturması ile gastrik ortamın pH'sını yükselterek hastalarda hipoklorhidriye yol açmaktadır. Kronik inflamasyon siyalil Lewis X reseptörlerinin ekspresyonunda artışa neden olup *H. pylori*'nin diğer adezini olan Omp17 (SabA)'nın bu reseptörlere bağlanmasını sağlar. Bu etkileşimin BabA etkileşimine göre daha zayıf olduğu bildirilmiştir. SabA ekspresyonu faz varyasyonu ile regüle edilerek bakterinin bağışıklık sisteminden kaçışını sağlar. *H. pylori* aderansının rekombinasyon olayından etkilendiği bildirilmiştir. Son zamanlarda ypılan bazı çalışmalarda *babA* veya *babB*'nin duplikasyonu ve paralog geninin delesyonu gösterilmiştir. *H. pylori*'nin Omp1 (HopZ) ve Omp13 (OipA) dış membran protein gen ekspresyonunun faz varyasyona bağlı olduğu bildirilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu kaymış iplikle eşleşme hatası (SSM) mekanizması ile regüle edildiği gösterilmiştir. Bu mekanizma ile genlerin mutasyon veya faz

varyasyona üğradıkları bilinmektedir. Böylece bakteri genomundaki çeşitlilik, *H. pylori* ile konak hücre arasındaki etkileşimleri modüle etmektedir (17,78).

2.6.7. *Helicobacter pylori Diğer Virülans Faktörlerinin Etki Mekanizması*

Nötrofil aktive edici protein (HP-NAP), lenfosit ve nötrofiller için önemli bir kemoatraktandır. HP-NAP proteini nötrofillerin endotel hücrelerine bağlanmasını sağlamakla beraber müsin ve nötrofillerde bulunan glikosfingolipitlere de bağlanır. Ayrıca *in vitro* şartlarda bu proteinin demire bağlandığı bildirilmiştir. Nötrofil aktive edici protein A geninin (*napA*) regülasyonunda demir düzenleyici proteinin (Fur) rolü olduğu gösterilmiştir. Bakterinin oksidatif strese maruz kaldığı zaman HP-NAP seviyesinin artması ile DNA'nın toksik serbest radikallerin etkisinden korunduğu düşünülmektedir (84). Isı şok protein 60 (HSP60), makrofaj ve gastrik epitel hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını indükler. Bu etkileşimin TLR'ler aracılığı ile gerçekleştiği bildirilmiştir (67). *H. pylori*'nin lipid A komponentindeki modifikasyonların oluşumu nedeni ile lipopolisakkarit yapısının diğer Gram-negatif bakterilere göre daha zayıf bir immünojen olduğu bilinmektedir. Buna rağmen proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca lipid A yapısındaki modifikasyonlar *H. pylori*'nin negatif yükünü azaltarak hücrenin antimikrobiyal katyonik peptitlerin (CAMPs) tahrip edici etkisinden korur. Lipid A, fosfataz enzimleri tarafından defosforillenerek CAMP direncine yol açar. Böylece TLR4'ün aktivitesini düşürerek konakta *H. pylori* klerensinin azalması ile bakterinin kolonizasyonunu kolaylaştırır (65,67,73). *H. pylori*'nin gastrik epitel dokusuna penetrasyonunda "High temperature requirement A" (HtrA) proteaz enziminin etkili olduğu bildirilmiştir. Sıkı bağlantılarda E kaderin proteinin parçalanması ile CagA sitotoksinin salınımı kolaylaşır. Üreaz enzimi dışında birkaç proteinin *H. pylori*'nin kolonizasyonunda önemli rol oynadığı da bildirilmiştir. Bunlar konak immün sistemine karşı "gamma-glutamyl transpeptidase″ (GGT), bakterinin hareketini etkileyen ve soğuk ortama adaptasyonunu sağlayan RNA helikaz (RhpA) proteinlerdir (85).

Son yıllarda *H. pylori*'nin biyofilm oluşturma yeteneği dikkat çekmiştir. Biyofilm oluşumunun bakteri kolonizasyonunda rolü olmakla beraber antibiyotik tedavisinin başarısızlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Biyofilm oluşturmasının moleküler mekanizmaları açıklanmıştır. k74_10375, k747_09130 ve k747_06625 genlerinin biyofilm oluşturması ile korelasyonu bildirilmiştir. Diğer önemli genlerden flagella proteini kodlayan gen (*jhp*_1117), "alpha-(1,3) fucosyltransferase" geni (*fucT*), dış membran protein (OMP)

geni (*homD*) ve *cag* PAI proteinini kodlayan gen (*cagA*) biyofilm oluşturması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (86).

H. pylori'nin kollajenaz enzimi, ekstrasellüler matriksteki kollajeni parçalar ve açığa çıkan amino asitler bakteri tarafından besin kaynağı olarak kullanılır. Kronik enfeksiyonun seyrinde kollajenaz enziminin ülserin gelişimini hızlandırdığı, aynı zamanda ülserin iyileşmesini engellediği düşünülmektedir (67). Bakteriyal peptidoglikanın çözünebilir komponentleri olan muramil dipeptidler, tip IV sekresyon sistemi ile gastrik epitel hücrelerine translokalize olup inflamatuvar yanıtlarını tetikler (68).

H. pylori ile gastrik epitel hücrelerin temasının ardından *iceA* geninin ekspresyonu indüklenir. Bu gen için iki allelik tip tanımlanmıştır. *iceA1* alleli ile duodenal ülser ve *iceA2* alleli ile kronik gastrit arasında ilişki bildirilmiştir. *iceA1* pozitifliği ile *H. pylori* metilaz *bpyM1* geninin fazla ekspresyonu arasında ilişki bulunmuştur. *bpyM1* geninin fazla ekspresyonu ile bakteri DNA'sını restriksiyon enziminin etkisinden koruyarak *H. pylori* enfeksiyonunun patogenezinde *iceA1*'in önemli rolü olduğu düşünülmektedir (39,68).

2.7. *Helicobacteri pylori* 'nin CagA ve Dış Membran Proteinleri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

2.7.1. *Proteomiks Araştırmaları*

Baik ve ark. tarafından *H. pylori* 26695 standart suşunun dış membran proteinleri çeşitli yöntemlerle izole edilerek proteomik analizleri yapılmıştır. Bakteriyal dış membran proteinlerinden Omp11, Omp14, Omp20 (AlpA) ve Omp21 (AlpB) proteinleri iki boyutlu jel elektroforez ve immünoblot yöntemleri ile incelenerek analizler sonucunda bu proteinlerin immünoreaktif olduğu bildirilmiştir (22).

Carlsohn ve ark. proteomiks çalışmasında subsellüler fraksiyonlama ve bir boyutlu jel elektroforez ile Nano-Sıvı Kromatografi Fourier Transform-iyon Siklotron Rezonans Mass Spektrometre (nano-LC FT-ICR MS) ayrıca Tandem Mass Spektrometre yöntemleri birlikte kullanılarak 15 klinik izolatında *H. pylori* dış membran proteinlerinin analizleri yapılmıştır. Bu proteinler ile hastaların klinik bulguları arasındaki ilişki incelenmiştir. Omp6 ekspresyonunun yokluğu ve Omp30 ekspresyonunun varlığı ile duodenal ülser arasında ilişki bildirilmiştir (15).

Govorun ve ark. tarafından yürütülen proteomiks araştırmasında iki boyutlu jel elektroforez yöntemi ile dört hastanın antrum gastrik biyopsi örneklerinin kültüründen elde

edilen *H. pylori* izolatlarının protein paternleri araştırılmıştır. Bakteriyal genler ile ilgili proteomik paterni belirlenerek farklı suşlarda proteinlerin ekspresyon görülme sıklıkları incelenmiştir. Proteomik paterninin benzerliklerine göre farklı bölgelerden alınan suşlar iki grupta yer almıştır (23).

2.7.2. *İmmünoblot ve Serolojik Araştırmalar*

Sheikhian ve ark. *H. pylori*'nin dış membran proteinlerini ekstrakte edip immünoblot yöntemi ile hastaların dışkı örneklerinde bu antijenleri özellikle 26 kDa'luk antijeni tespit ederek hasta dışkı örneklerinde *H. pylori* varlığının saptanmasında geliştirilen bu tanı yönteminin kullanılabileceğini bildirmişlerdir (87).

Yamaoka ve ark. çalışmasında immünoblot yöntemi kullanılarak hastalardan izole edilen bakteri suşlarında *H. pylori*'nin Omp13 (OipA), Omp28 (BabA), Omp19 (BabB), Omp17 (SabA) dış membran proteinleri ayrıca CagA proteinin ekspresyonu araştırılmıştır. SabA ekspresyonunun varlığı ile gastrik kanser, intestinal metaplazi ve korpus atrofisi arasında ilişki gösterilmişken, SabA ekspresyonunun yokluğu ile duodenal ülser, ayrıca nötrofil infiltrasyonu arasında ilişki bulunmuştur. *H. pylori*'nin asidik bir ortama (pH=5.0) iki saat maruz kaldığı zaman SabA ekspresyonunda bir azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. OipA ekspresyonunun varlığı ile duodenal ülser, gastrik kanser, *H. pylori* yoğunluğu ve nötrofil infiltrasyonu arasında ilişki bildirilmiştir (13).

İmmünoblot, ayrıca RT RT-PCR yöntemleri kullanılarak OipA, BabA ve SabA seropozitifliği gastrik kanseri olan hastalarda duodenal ülseri olan hastalara göre daha yüksek saptanmıştır. Hastalığın ayrımında bu proteinlerin biyomarker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (88).

Tabassam ve ark. *in vitro* şartlarda AGS hücrelerinde *H. pylori* CagA ve OipA sitotoksinlerini araştırmışlar ve gastrik hücrelerde Fak'ın OipA tarafından fosforillendiğini göstermişlerdir. OipA'nın hücrelerde morfolojik değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (89).

Rathinavelu ve ark. yaptıkları çalışmada *H. pylori* Omp18 proteininin fare kemik iliğinden elde edilen DC hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. DC hücrelerin aktivasyonu ile Th1 bağışıklık yanıtlarının geliştiği gösterilmiştir (75).

Jafarzadeh ve ark. yaptığı çalışmada enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak *H. pylori* seropozitifliği erişkinlerde çocuklara göre anlamlı düzeyde fazla bulunmuştur. CagA IgG antikorları erişkinlerde %67.4 ve çocuklarda %72.8

saptanmıştır. Erkek hastaların CagA IgG antikor düzeyleri kadın hastalara göre daha yüksek saptanmıştır. Yaş grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur (90).

Kobay modelinde yapılan bir çalışmada *H. pylori*'nin mide mukozasına kolonizasyonunda Omp20 (AlpA) ve Omp21 (AlpB) proteinlerinin önemli rolü olduğu bildirilmiştir. *alpA* veya *alpB* negatif (mutant) suşları ile enfekte hayvanlarda IgG antikorların düzeyi vahşi suşları ile enfekte olanlara göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (91).

2.7.3. *PCR Dışı Diğer Prob Tabanlı Araştırmalar*

Bergmen ve ark. immünohistokimya yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori*'nin indüklediği Th1 ve Th2 bağışıklık yanıtlarını incelemişler ve bu yanıtların modülasyonunun faz varyasyona bağlı olduğunu ve bakteriyal LPS ve Le antijenleri ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. *H. pylori* Le^+ varyantların dendritik hücrelerde bulunan C-tip lektin reseptörü olan "DC-SIGN" reseptörüne bağlandığını ve Th1 bağışıklık yanıtların aktivitesini süprese ettiğini göstermişlerdir. Le^- varyantların bu reseptörlere bağlanmadığı ve kuvvetli Th1 bağışıklık yanıtlarının geliştiği bildirilmiştir (92).

Lee ve ark. floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi ile yaptıkları çalışmada hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin AmiE enzimi ile ilgili *amiE* geninin ekspresyonunu incelemişler ve bu genin ekspresyonu ile bakteriyal üreaz enzimi aktivitesi arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Antrumda üreaz enzimi aktivitesi ile bakteri yoğunluğu arasında korelasyon bulunmuştur. *amiE* gen ekspresyon düzeyinin korpusta antruma göre anlamlı düzeyde 1.5 kat arttığı saptanmıştır. Antrumda bakteri yoğunluğu veya üreaz enzimi aktivitesi ile kronik aktif inflamasyon arasında anlamlı bir korelasyon bildirilmiştir (93).

Yakoob ve ark. *in vitro* şartlarda *H. pylori* suşları arasında DNA transformasyonunun gerçekleştiğini saptamışlardır. Bu suşlarda *cagA* ve *vacA* m2 genlerinde değişmeler ve bakteri suşları arasında direnç genlerinin aktarıldığı bildirilmiştir (94).

2.7.4. *Real-time PCR ve DNA Mikroarray Araştırmaları*

Caner ve arkadaşlarının real-time PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte hastalarda *iceA* geninin görülme sıklığı araştırılmıştır. *H. pylori* ile epitel hücrelerin temasının ardından *iceA*'nın ekspresyonu indüklenir. Duodenal ülser ve gastrik

adenokarsinomalı hastalarda *iceA1* allelin görülme sıklığının *iceA2* alleline göre daha fazla saptandığı bildirilmiştir (39).

Thyagarajan ve ark. yaptığı çalışmada gradiyent epsilometre testi (E-test) ve disk difüzyon yöntemleri kullanılarak hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında metronidazol, klaritromisin ve amoksisiline direnç oranları sırasıyla %77.9, %44.7 ve %32.8 saptanmıştır. Bu oranların Hindistan'da coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (95). Klaritromisin direncinin bakteri genomundaki 23S rRNA'yı kodlayan genlerde meydana gelen nokta mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Klaritromisin bakterinin 23S rRNA ribozomal subünitesine bağlanarak protein sentezini durdurur. A2142G ve A2143G transizyon ve A2143C transversiyon nokta mutasyonlarının klaritromisin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (96,97).

Odenbreit ve ark. AGS hücrelerinde *cagA*'nın tirozin fosforilasyonunun ve IL-8 salınımının AlpAB, HopZ, OipA ve BabA/B dış membran proteinlerine bağlı olmadığını göstermişlerdir (77).

Yamaoka ve ark. yaptığı çalışmada PCR yöntemi kullanılarak *oipA*, *vacA*, *babA2* ve *cagA* genlerinin görülme sıklığ araştırılmıştır. Fonksiyonel *oipA* geni ile duodenal ülser arasında ilişki bulunmuştur. Fonksiyonel *oipA* geninin (switch "on") görülme sıklığı duodenal ülseri olan hastalarda gastriti veya gastrik kanseri olan hastalara göre daha yüksek saptanmıştır. Fonksiyonel *oipA* geni ile bakteri yoğunluğu, şiddetli nötrofil infiltrasyonu ayrıca IL-8'in yüksek seviyesi arasında ilişki bildirilmiştir. Diğer genler ile *oipA* arasında ilişki bulunmuş, ancak fonksiyonel *oipA*'nın belirlenmesinde *cagA, babA2* ve *vacA* genlerinin önemli bir marker olabileceği bildirilmiştir (98).

Voland ve ark. *H. pylori* ile enfekte hastaların gastrik biyopsi örneklerinde *omp18* geninin görülme sıklığını PCR yöntemi ile saptamışlardır. Bu araştırmacılar rekombinant Omp18 proteininin DC hücrelerin olgunlaşmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir (99). İang ve ark. da moleküler ağırlığı 18 ve 26 kDa olan bakteriyal dış membran proteinlerini *E. coli* BL21 suşunda klonlamışlar ve rekombinant antijen ile tanısal bir kit geliştirerek *H. pylori*'nin tanısında kullanılabileceğini göstermişlerdir (100).

Bir başka çalışmada klaritromisine dirençli *H. pylori* suşlarının AGS hücrelerinde internalizasyon aktiviteleri (canlı bakterilerin sayısı/her bir infekte AGS hücresinde bulunan toplam bakteri sayısı) duyarlı suşlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu dirençli suşların tedavi başarısız olanlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Böylece dirençli suşların

persistan enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir. Bu suşların tümü PCR yöntemi ile *cagA* ve *babA2* pozitif saptanmıştır (101).

Ortiz-Godoy ve ark. yaptığı çalışmada antibiyotik duyarlılık testleri ile PCR yöntemi birlikte kullanılarak hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında *cagA, cagE*, *vacA* ve *iceA* genotipleri belirlenmiştir. Bu genotipler ile antibiyotik duyarlılık bulguları arasında herhangi bir ilişki bulunmamış, ancak *vacA* s1/*cagA* pozitifliği ile peptik ülser arasında ilişki saptanmıştır. *vacA* s1/*cagA* pozitif virülan suşları ile gastroözofajial reflü hastalığı (GERD) arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Böylece *H. pylori* virülan suşlar ile enfekte hastaların GERD hastalığa yatkın olmadığı bildirilmiştir (102).

Hartland ve ark. IL-1 genindeki polimorfizmin *H. pylori* enfeksiyon riskini arttırdığını ve persistan enfeksiyona yol açtığını bildirmişlerdir. IL-1β ve interlökin 1 reseptör antogonist (IL-1ra) ile ilgili genlerde bulunan tek nükleotit polimorfizmin (SNP) gastrik kanser riskini arttırdığı bildirilmiş, ancak bu araştırmada IL-1'in reseptör 1'i olan IL-1R1Hinf1 A alleli ile gastrik kanser arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (103).

Zhang ve ark. hastaların antrum gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarında *dupA*, *cagA*, *vacA* ve *iceA* genlerinin görülme sıklığı ile hastaların klinik bulguları arasındaki ilişki PCR yöntemi ile araştırılmıştır. *dupA* geninin görülme sıklığı duodenal ülseri olan hastalarda gastrik kanseri olan hastalara göre anlamlı düzeyde fazla saptanmış, ancak bu gen ile diğer genler arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. *dupA* pozitifliği ile kronik inflamasyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (104).

Bazargani ve ark. *H. pylo*ri ile enfekte hastalarda *cagA* geninin görülme sıklığını PCR yöntemi ile araştırmışlardır. *cagA* geninin görülme sıklığı peptik ülseri olan hastalarda %82.3, ülseri olmayan dispeptik hastalarda %59.4 saptanmıştır (105).

Ramirez-Lazaro ve ark. yaptığı çalışmada TaqMan prob bazlı real-time PCR ve immünohistokimya yöntemleri birlikte kullanılarak kanamalı peptik ülseri olan hastalarda formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülü biyopsi örneklerinden hazırlanan kesitlerin yanı sıra direkt gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin *ureA*, 16S rRNA ve 23S rRNA genleri araştırılmıştır. İki yöntem ile elde edilen bulgular karşılaştırıldığında doku kesitlerinde *H. pylori* varlığının saptanmasında PCR yönteminin immünohistokimya yöntemine göre daha duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (25).

Nguyen ve ark. hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında *cagA, cagE, vacA* s/m/i, *babA, oipA, iceA* ve *homB* genlerinin görülme sıklığını PCR yöntemi ile araştırmışlardır.

cagA, *cagE* ve *babA* genlerini taşıyan *H. pylori* suşları ile peptik ülser arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (106).

Magalhães Queiroz ve ark. real-time PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada GERD hastalığı ile *cagA* geninin görülme sıklığı arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. GERD hastalarda *H. pylori cagA* pozitifliği, hasta olmayanlara göre daha az saptanmıştır. *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının korpusta daha şiddetli gastrite yol açtığı bildirilmiştir. *cagA* pozitif *H. pylori* suşlarının GERD hastalığa karşı koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmiştir (107).

Dabiri ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte hastalarda *cagA, vacA, cagE, oipA, iceA1, babA2* ve *babB* genlerinin görülme sıklığı sırasıyla %100.0, %69.0, %51.0, %55.0, %26.0, %78.0 ve %28.0 saptanmıştır. *oipA* genotipi gastrik kanser riskinin azalması ile ilişkilendirilmiştir (108).

2.7.5. *Türkiye'de Yapılan Çalışmalar*

Yılmaz ve ark. yaptıkları çalışmada ELISA ve Western blot yöntemleri kullanılarak dispeptik yakınmalı hastalarda *H. pylori* CagA, VacA, UreB, UreA ve OMP IgG ayrıca IgA antikorları araştırılmıştır. ELISA yöntemi ile CagA seropozitifliği %50.0, Western blot yöntemi ile CagA, VacA, UreB, UreA ve OMP seropozitifliği sırasıyla %50.0, %62.5, %87.5, %80.4 ve %57.1 saptanmıştır. Bu proteinlerin seropozitifliği ile hastaların endoskopi veya histopatoloji bulguları arasındaki ilişki incelenmemiştir (8).

Sarıbaşak ve ark. tarafından yürütülen PCR çalışmasında *cagA* ve *vacA* pozitif *H. pylori* suşları ile peptik ülser ve gastrik kanser arasında korelasyon bulunmuştur. Bu araştırmacılar, DNA üzerinde PCR-RFLP yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında Türkiye'de *H. pylori* suşlarının birçoğunun Batı tip suşları gibi *cagA* tip 2a, *vacA* s1a/m1a veya *vacA* m2a genotipe sahip olduğunu bildirmişlerdir (40).

Aydın ve ark. hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında *cagA* pozitifliğini PCR yöntemi ile saptamışlar ve bu genin peptik ülser hastalığın gelişme riskini arttırdığını bildirmişlerdir (10).

Saltık ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada dispeptik yakınmalı çocukların antrum gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA* geninin görülme sıklığı %55.6 saptanmış, ancak bu genin görülme sıklığı ile klinik veya endoskopi bulguları arasında ilişki bulunmamıştır (41).

Serin ve ark. hastaların serumunda *H. pylori* CagA pozitifliğini enzim immün assay yöntemi ile araştırmışlardır. Tüm hastalarda CagA seropozitifliği %97.2 saptanmıştır. Peptik ülseri olan hastalarda CagA seropozitifliği %100.0, ülseri olmayan dispeptik hastalarda ise %95.6 bildirilmiştir. İki hasta grubu arasında anlamlı düzeyde bir ilişki bulunmamıştır (109).

Caner ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte hastalardan izole edilen bakteri suşlarında *cagA*, *vacA* ve *iceA* genleri araştırılmış, gastriti olan hastalarda *cagA*/*vacA* s1m2/*iceA2*, duodenal ülseri olan hastalarda ise *cagA*/*vacA* s1m2/*iceA1* genotipleri saptanmıştır. İki hasta grubu arasında *iceA* allelerinde gözlenen farklılıkların gastrointestinal hastalıkların patolojisinde önemli marker olabileceği bildirilmiştir (39).

Salih ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada hastalardan izole edilen *H. pylori* suşlarında *cag* PAI, *oipA* ve *vacA* genleri araştırılmıştır. Gastriti olan hastalarda *oipA* geninin görülme sıklığı %80.9 ve peptik ülseri olan hastalarda %92.9 saptanmıştır (42).

Tiftikçi ve ark. yaptığı çalışmada histopatoloji yöntemi kullanılarak *H. pylori*'nin mide içerisinde yerleşim yeri araştırılmıştır. *H. pylori*'nin hem antrum hem de korpusta yerleşimi %78.0, sadece antrumda %17.0 ve sadece korpusta %3.7 bildirilmiştir. Antrum negatif hastaların korpusunda *H. pylori* saptama olasılığı çok düşük bildirilmiştir (110).

Saruç ve ark. yaptığı çalışmada Pyloriset EIA-G yöntemi kullanılarak *H. pylori* IgG ve CagA antikorlarının yanı sıra TNF-α ve gastrin düzeyleri incelenerek elde edilen bulgular hastalarda yaş ve cinsiyete göre ayrıca antibiyotik başarılı veya başarısız tedavi yönünden değerlendirilmiştir. Tüm hastalarda *cagA* seropozitifliği %69.1 saptanmıştır. CagA pozitif hastalarda başarılı tedavi oranı %87.4, negatiflerde ise %71.9 saptanmıştır. İki hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. TNF-α düzeyi CagA pozitiflerde CagA negatiflere göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmışken, gastrin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *cag* PAI'nın *H. pylori* suşlarına üreme avantajı sağladığı ve inflamasyon riskini arttırdığı bildirilmiştir. CagA pozitif *H. pylori* suşlarının antibiyotiklere aşırı derecede duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (111).

2.7.6. *Real-time PCR Gen Ekspresyon ve Mikroarray Araştırmaları*

Solnick ve ark. yaptığı çalışmada RT RT-PCR ve DNA mikroarray yöntemleri kullanılarak BabA ve BabB dış membran proteinleri ile ilgili gen ekspresyonları araştırılmıştır. "Rhesus macaques" maymunlarında *H. pylori* enfeksiyonunun ardından izole edilen bakteri suşlarında *babA* geninin eksprese edilmediği, *babA* geninin yerine iki kopya

halinde olan *babB* geninin saptandığı bildirilmiştir. Bu araştırmada BabA ve BabB dış membran protein ekspresyonlarının antijenik varyasyon ve faz varyasyonu ile regüle edildiği gösterilmiştir. *H. pylori*'nin dış membran proteinleri ile ilgili genlerde değişiklikler (antijenik varyasyon) ve bu genlerin ekspresyonunda azalma veya artış (faz varyasyon), bakterinin konak bağışıklık sisteminden kaçışını sağlamakla beraber persistan enfeksiyona yol açabileceği düşünülmektedir (35).

Merrell ve ark. cDNA mikroarray yöntemi ile yaptıkları çalışmada *in vitro* şartlarda *H. pylori* ile ilgili birçok genin ekspresyonu incelenmiştir. *H. pylori* genomunun %7'si ortamın pH'sından etkilendiği bildirilmiştir. Asidik ortamda *cagA* gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (112). Üreaz enzimi dışında izoelektrik noktası yüksek olan bakteriyal iç ve dış membran proteinleri midenin asidik ortamında proton geçirgenliğini azaltarak bakterinin yaşamını sürdürdüğü düşünülmektedir (113).

Bir başka çalışmada *H. pylori*'nin OipA dış membran proteinini kodlayan *oipA* geni pET-32a(+) plazmidine klonlanmış ve Top10 *E. coli* suşuna transforme edilmiştir. *E. coli* suşu tarafından eksprese edilen *oipA* geninin dizileri HP0638 ve JHP0581 referans genlerinin dizileri ile %95.0 oranında benzerlik göstermiştir. OipA proteinin yüksek antijeniteye sahip olduğu, aynı zamanda IL-8 seviyesini arttıran ve duodenal ülseri gastritten ayırt eden bir marker olabileceği bildirilmiştir (114).

Liu ve ark. yaptığı çalışmada RAPD-PCR, qRT RT-PCR ve *in situ* hibridizasyon yöntemleri kullanılarak insan ve maymunların gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının 16S rRNA geninde korunmuş, birçok suşta ortak ve özgül bölge olarak belirtilmiş olup, insan ve maymunların gastrik biyopsi örneklerine real-time PCR testi uygulanarak duyarlılığı ve özgüllüğü araştırılmıştır. Gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının saptanmasında özgüllüğü yüksek olan real-time PCR testinin kullanılabileceği bildirilmiştir (26).

Dossumbekova ve ark. yaptığı çalışmada RT RT-PCR ve cDNA mikroarray yöntemleri kullanılarak *H. pylori* ile enfekte hastaların gastrik biyopsi örneklerinde *oipA (hopH)*, *cagA, cagE, vacA* ve *babA* genlerinin varlığı ve ekspresyonu araştırılmıştır. Ayrıca bu araştırmada, aderans assay ve konfokal floresan mikroskopi yöntemleri ile *H. pylori* B128 vahşi tip suşunun yanı sıra *oipA*, *cagA* ve *cagE* negatif (mutant) suşlarının gastrik kanser hücre hattı KATO-III ve AGS hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Fonksiyonel *oipA* (switch "on") geninin *vacA* s1, *vacA* m1, *babA2* ve *cagA* genotipleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *oipA*

geninin gastrik epitel hücrelere tutunmasında önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Oysa *oipA* negatif (mutant) suşlarının anlamlı düzeyde daha az hücrelere tutunduğu gösterilmiştir. *oipA* geninin sinyal peptit kodlayan bölgesindeki CT dinükleotit tekrarları sayısına bağlı olarak genin fonksiyonel olup olmadığı belirtilmiştir. Bu araştırmada CT polimorfizmi ile klinik bulguları arasında herhangi bir ilişki bulunmamış, ancak coğrafi dağılımında gözlenen farklılıkların epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir (36).

Ando ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada fonksiyonel *oipA* (HP0638) geni ile *cagA* pozitifliği arasında ilişki bulunmuştur. *oipA* genindeki CT dinükleotit tekrarları coğrafik bölgeye göre değişmekte olup, ancak *H. pylori* izolatlarında görülen paternler zaman içerisinde bireylerin yanı sıra aile içi sabit kaldığı bildirilmiştir (115).

Peek ve ark. qRT-PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte hastaların antrum gastrik biyopsi örneklerinde *iceA1*, *iceA2* ve 16S rRNA gen ekspresyonları, aynı zamanda *cagA*, *vacA* ve *iceA* genotipleri araştırılmıştır. *iceA1*, *iceA2* ve 16S rRNA genlerinin transkripsiyon düzeyleri arasında herhangi bir ilişki bulunmamış ve gen ekspresyonlarının birbirinden bağımsız olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada *iceA1*'in transkripsiyon düzeyi ile nötrofil infiltrasyonu şiddeti arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (28).

Boonjakuakul ve ark. qRT RT-PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *in vivo* şartlarda hastaların gastrik biyopsi örneklerinde, aynı zamanda *in vitro* şartlarda kültürde üreyen bakteri suşlarında *H. pylori cag* PAI'daki 16 genin ayrıca bakterinin diğer 18 virülans geninin ekspresyonu araştırılmış ve sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir. Genlerin bazal ekspresyon düzeyi *in vitro* şartlarda *in vivo* şartlara göre daha yüksek saptanmıştır. *in vivo* şartlarda *H. pylori*'nin gastrik ortamda logaritmik üreme fazından duraklama fazına geçtiği düşünülerek gen ekspresyon düzeyinin düşük olduğu bildirilmiştir. *in vivo* şartlarda *cag1* ve *cag25*'in yanı sıra üreaz ve katalaz (*katA*) genlerinin ekspresyon düzeyleri diğer genlere göre daha yüksek saptanmıştır. En düşük gen ekspresyon düzeyi *cag7* ve *cag22* genlerinde saptanmıştır. Bu araştırmada *cag* PAI'daki sekiz genin hem IL-8'in üretilmesinde hem de CagA'nın translokasyonunda önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Hastaların klinik bulguları ile bu genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelenmemiştir (29).

Bu araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada qRT RT-PCR yöntemi kullanılarak *in vivo* şartlarda *H. pylori* ile enfekte "rhesus macaques" maymunların gastrik biyopsi örneklerinde, aynı zamanda *in vitro* şartlarda kültürde üreyen *H. pylori* suşlarında *cag* PAI'daki 24 genin ayrıca diğer 22 virülans genin ekspresyonu araştırılmıştır. *in vitro* şartlarda

H. pylori'nin logaritmik üreme fazından duraklama fazına geçişinde birçok gen ekspresyonunun baskılandığı saptanmıştır. Buna rağmen *H. pylori katA, napA, vacA* ve *cagA* virülans genlerinin ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir. Maymunlarda rölatif gen ekspresyonu ile *in vitro* şartlardaki "mid" logaritmik ayrıca duraklama fazında saptanan rölatif gen ekspresyonları arasında güçlü bir korelasyon bildirilmiştir. *in vivo* şartlarda transkript bolluğu (transcript abundance) *in vitro* şartlardaki "mid" logaritmik fazına göre üç ile dört kat azaldığı gözlenmiştir. Oysa *in vivo* şartlarda transkript bolluğu *in vitro* şartlardaki duraklama fazı ile karşılaştırıldığında *cag* PAI'nın altı ile yedi geninin ekspresyonunda artış saptandığı bildirilmiştir (30).

Garza-Gonzalez ve ark. yaptığı çalışmada RT PCR ve qRT RT-PCR yöntemleri kullanılarak *H. pylori* ile enfekte hastaların gastrik biyopsi örneklerinde *cagA* ve *vacA* genotipleri belirlenerek *H. pylori* suşlarının AGS hücrelerinde bulunan TLR4 ve TLR5 reseptörlerinin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. TLR4 ve TLR5 mRNA düzeyleri ile *H. pylori vacA* s1 klinik izolatları arasında ilişki bulunmamıştır. Bu araştırmada *in vitro* ve *in vivo* şartlarda TLR4 ve TLR5 ekspresyonunun *H. pylori* kolonizasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiş, ancak *vacA*'nın bu reseptörler vasıtası ile doğal bağışıklık yanıtlarının oluşturmasında önemli rolü olmadığı bildirilmiştir (31).

Kato ve ark. real-time PCR yöntemi ile *H. pylori* enfeksiyonunda IL-8, siklooksigenaz-2 ve trefoil faktörü 1 (TFF1) genlerinin ekspresyonu araştırılmıştır. Antrumda inflamasyon ve aktivite düzeyi erkek hastalarda kadın hastalara göre daha yüksek saptanmıştır. Korpusta atrofi ve intestinal metaplazi derecesinin erkek hastalarda kadın hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. IL-8 mRNA düzeyi hem antrum hem de korpusta incelenmiş, cinsiyet açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Siklooksigenaz-2 mRNA ekspresyon düzeyi erkek hastalarda kadın hastalara göre daha yüksek saptanmıştır. *H. pylori* negatiflerde TFF1 mRNA düzeyi kadınlarda erkeklere göre daha yüksek bildirilmiştir (116).

Wen ve ark. yaptığı çalışmada qRT RT-PCR ve cDNA mikroarray yöntemleri kullanılarak *H. pylori* ile enfekte hastalarda ayrıca sağlam bireylerde inflamatuvar yanıtları ile ilgili birçok sitokin, adezyon molekülü ve reseptör genlerinin yanı sıra *H. pylori babA2*, *vacA* ve *cagA* genlerin ekspresyonları araştırılmıştır. Bu araştırmada *H. pylori* ile enfekte hastaların gastrik biyopsi örneklerinde bir takım virülans genlerinin upregülasyonu gösterilmiş ve gen paterni "*H. pylori*-infection signature" olarak bildirilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu ile *H. pylori cagA, vacA* ve *babA* genotipleri arasında ilişki bulunmuştur (32).

Peek ve ark. hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinin ekspresyonunu RT-PCR yöntemi ile araştırmışlardır. Genomik DNA'da saptanan *cagA* gen pozitifliği ile gen ekspresyonu arasında tam bir korelasyon saptanmıştır. *cagA* geninin pozitifliği ile peptik ülser ve duodenit arasında ilişki bulunmuştur. Gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının saptanmasında 16S rRNA ve *ureA* genlerinin özgüllüğü yüksek saptanmış, ancak *ureA* geninin duyarlılığı 16S rRNA genine kıyasla daha düşük olduğu bildirilmiştir (117).

Park ve ark. hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA,* 16S rRNA ve *ureA* genlerinin ekspresyon görülme sıklığını RT-PCR yöntemi ile araştırmışlardır. *cagA* için iki farklı primer çifti (*cagA1 ve cagA2*) kullanılmıştır. Peptik ülseri olan hastaların belirlenmesinde *cagA*'nın uygun bir marker olmadığı bildirilmiştir (118).

Ruzsovics ve ark. SYBR Green I bazlı real-time PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada hastaların parafine gömülü biyopsi kesitlerinde *H. pylori cagA* ve *vacA* genleri araştırılarak bu genlerin varlığı ile histoloji ve immünohistokimya yöntemleri ile elde edilen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve prolifere hücre nükleer antijen (PCNA) seviyeleri birlikte değerlendirilmiştir. *cagA* geninin varlığı ile gastrit görülme sıklığı ayrıca *vacA* geninin varlığı ile intestinal metaplazi görülme sıklığı arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir. İntestinal metaplazi vakalarında *cagA* geninin varlığı ile EGFR ekspresyonu ayrıca gastrit ile PCNA artışı arasında ilişki bulunmuştur. *cagA* pozitif suşlarının daha fazla hücre proliferasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. *Escherichia coli*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus A* ve *Streptococcus B* bakteri suşları negatif kontol olarak kullanılarak real-time PCR testinin özgüllüğü araştırılmış ve herhangi bir çapraz reaksiyon görülmediği bildirilmiştir (119).

Scott ve ark. yaptığı çalışmada qRT RT-PCR ve cDNA mikroarray yöntemleri kullanılarak *H. pylori* ile enfekte gerbillerin gastrik biyopsi örneklerinde ayrıca *in vitro* şartlarda pH'nın gen ekspresyon düzeyine etkisi araştırılmıştır. *in vivo* şartlarda *cagA* PAI'nın dokuz geninin hayvan midesinde upregüle edildiği ve *in vitro* şartlarda bu genlerden beşi düşük pH'dan etkilendiği bildirilmiştir. Bakterinin hareket ve kemotaksi ile ilgili genlerinde ayrıca *cagA* PAI genlerinin ekspresyonunda pH değeri 5'in altında olan *in vivo* şartlarda, pH değeri 7.4 olan *in vitro* şartlara göre iki kat artış saptanmıştır. pH'ya bağlı *cagA*, *ureA, ureB, rocF* ve *ureI* genlerinin upregülasyonu bildirilmiştir (120).

Kumar ve ark. yaptığı çalışmada TaqMan prob bazlı qRT RT-PCR ayrıca klasik PCR yöntemleri kullanılarak *H. pylori* enfeksiyonunda bu yöntemlerin performansı değerlendirilmiştir. Her iki yöntemde *H. pylori* varlığının saptanmasında *ureA* geni kullanılmıştır. Kantitatif RT RT-PCR testinin duyarlılığı ve özgüllüğü klasik PCR yöntemine göre sırasıyla %76.7 ve %80.9 saptanmıştır. *ureA* geninin ekspresyonu ile hastaların klinik bulguları arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır (27).

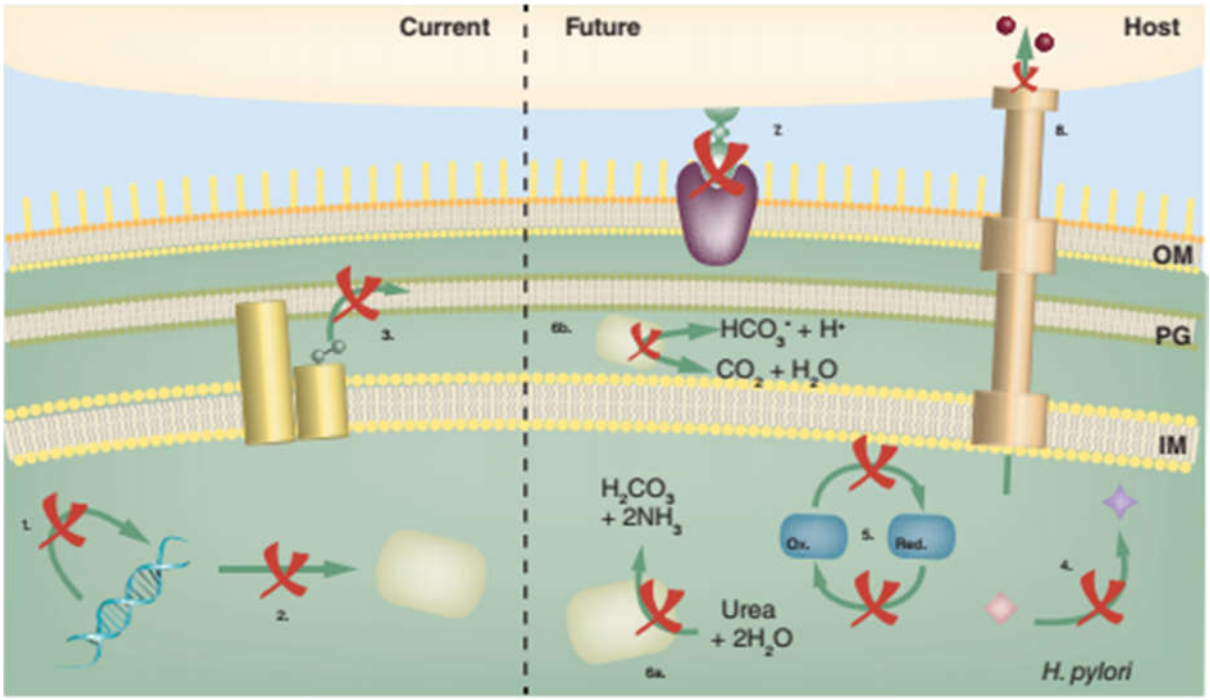
Mannick ve ark. yaptığı çalışmada mikroarray ve SYBR Green bazlı RT PCR yöntemleri kullanılarak hastaların antrum gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonu olan ve olmayan hastalarda MHC sınıf II, B hücre aktivasyonu, apoptoz ve inflamasyonla ilgili genlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Bu genlerin ekspresyonu *H. pylori* enfeksiyonu olan ve olmayan hastalar arasında farklılıklar göstermiştir. *H. pylori* ile enfekte hastalarda immünoglobulin, inflamasyon ve apoptoz ile ilgili genlerde upregülasyon gözlenmişken, bakteride demir homeostazında görev alan "metallothionein" ayrıca gastrik intrinsik faktörü ile ilgili genlerin ekspresyonunda azalma bildirilmiştir (33).

Gieseler ve ark. AGS ve insan polimorfonükleer hücrelerinde (PMN) *H. pylori cagA*, *ureA*, *napA*, *iceA*, *ureA*, *katA*, *alpA*, *vacA* s1, *vacA* s2 ve 16S rRNA genlerinin ekspresyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada TaqMan prob bazlı qRT RT-PCR yöntemi kullanılarak hücrelerde *H. pylori* enfeksiyonu oluşumundan itibaren 1, 3 ve 6 saat sonra bakteriyal genlerin ekspresyonu incelenmiştir. Bu araştırmada sekiz farklı *H. pylori* suşunun AGS ve PMN hücrelerinde gen ekspresyon düzeyleri birbirinden farklılık göstermiştir. AGS hücrelerinde genlerin birçoğunun upregüle edildiği, PMN hücrelerinde ise baskılandığı gösterilmiştir. *H. pylori* suşlarında gen ekspresyon paterninin belirlenmesinde RT RT-PCR spesifik, duyarlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olarak bildirilmiştir (34).

Skoog ve ark. SYBR Green bazlı RT RT-PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *in vitro* şartlarda farklı bireylerde bulunan müsin'nin *H. pylori* proliferasyonu ve gen ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Müsine karşı gelişen yanıtta *babA, sabA, flaA, cagA* ve *ureA* gen ekspresyonlarının etkili olduğu bildirilmiştir. Bu genlerin normalizasyonu 16S rRNA'ye göre yapılarak *babA* ve *ureA* genlerinin ekspresyonu ile *H. pylori* proliferasyonu arasında negatif korelasyon saptanmıştır. *babA* geninin ekspresyonu ilk aşamada bir artış göstermiştir. *cagA* ekspresyonu ile *H. pylori* proliferasyonu ve müsine bağlanma aktivitesi arasında negatif korelasyon gözlenmiştir. *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelere bağlanmasında ve bakterinin proliferasyonunda müsin'nin önemli rolü olduğu bildirilmiştir (37).

2.8. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda gelecekteki tedaviler

Günümüzde *H. pylori* eradikasyon tedavisinde bizmut ile desteklenen, asit baskılayıcı bir ilaç ve iki antibiyotik birlikte kullanılmaktadır. Antibiyotiklere direnç gelişimi, ayrıca bakterinin biyofilm oluşturması ile tedavi başarısızlığı ve relaps görülmektedir. Klinikte kullanılan antibiyotiklerin çoğu doğal kökenli içeriğiyle bakterinin DNA replikasyonunu veya protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik veya bakteriyolitik özelliklere sahiptir. Antibiyotikler hücre membranın veya duvarının bütünlüğünü bozarak bakterilere geniş spektrumlu etki gösterir. Bakteri fizyolojisi ile ilgili moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ile bakteride ilacın hedefi olan yolaklar yeniden incelenerek sentetik ilaçların keşfini sağlar. Bu hedeflerin seçilmesinde bakterideki temel rolleri, ayrıca özgüllüğü dikkate alınmalıdır. Bu konuda araştırmalar hala sürdürülmektedir. "shikimate" yolağı aromatik amino asitlerin ve "ubiquinone" sentezinde görev alan yolaklardan birisidir. Bu yolakta bir çeşit enzim hedef olarak bulunmaktadır. Yeni antibiyotiklere hedef olan diğer yolaklardan *H. pylori*'nin canlılığı için gerekli olan flavodoksin adında elektron taşıyıcı bir protein, sitrik asit siklusunda ve yağ asitlerin sentezinde görev alan koenzim A proteinidir (Şekil 11) (121).



Şekil 11. Şimdiki ve gelecekteki *Helicobacter pylori*'ye karşı antibiyotik hedefleri. *H. pylori* tedavisinde kullanılan birinci ve ikinci hat geniş spektrumlu antibiyotiklerin hedefi olan DNA sentezi ve replikasyonu **(1**: metronidazol, levofloksasin, siprofloksasin, furazolidon), yeni proteinlerin transkripsiyonu ve translasyonu **(2:** tetrasiklin, klaritromisin), hücre duvarı ve membranın sentezi **(3:** amoksisilin, neomisin, monomisin; PG). *H. pylori*'nin tedavisi için geliştirilmekte olan yeni geniş spektrumlu antibiyotiklerin hedefi olan bakteriyal metabolik veya sentetik yolakları **(4:** "shikimate" yolağı, "succinylase", koenzim A biyosentezi), elektron taşıma zinciri ve elektron taşıyıcılar **(5:** flavodoksinler). Ayrıca dar ekspektrumlu bir aktivite gösteren ve spesifik olarak bir kaç hedef yolağını inhibe edenler: pH kontrol yolağı **(6:** üreaz enzim aktivitesi ve olgunlaşma, Ni^{2+} girişi), *H. pylori* aderansı **(7:** ve virülans faktörünün salınımı **(8:** CagA salınımı, aktivite).
IM: İç membran; OM: Dış membran; PG: Peptidoglikan (121).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma kontrollü randomize tek merkezli, multidisipliner deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma birinci ve ikinci Doktora tez projeleri kapsamında Mart 2006-Haziran 2008, Haziran-Ekim 2009, Mart-Temmuz 2011, Mart 2012, Mayıs 2012-Temmuz 2012 tarihlerinde Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Gündüz Hastanesi, Endoskopi Ünitesi ve Genmar firmasının laboratuvar olanaklarından yararlanılarak Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışılmıştır. Ayrıca bu araştırma kapsamında kullanılan *H. pylori* kültürü için gerekli tüm besiyerleri farklı içerikli olarak hazırlanmış ve *H. pylori* suşlarının izolasyonu için kültürde kullanılacak optimal kültür besiyerleri geliştirilerek 2006 Bahar yarıyılı döneminde doktora tez projesi kapsamında literatür tarama ile başlanarak araştırılmış ve Nisan 2020 de tez savunması ile bimiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Mart 2006-Haziran 2008, Haziran-Ekim 2009, Mart-Eylül 2010, Mart-Temmuz 2011, Mart 2012, Mayıs 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Gündüz Hastanesi, Endoskopi Ünitesinde randevusu olan dispeptik yakınması nedeni ile endoskopi endikasyonu konulan hastalardan onam formu (EK 8.3) alındıktan sonra, Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından her bir hastadan antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden HÜT, histopatolojik inceleme ve kültür, ayrıca RT RT-PCR yönteminde kullanılmak üzere toplam sekiz adet gastrik biyopsi örneğinin alınması etik kurul onayı ile belirtilmiş olmasına rağmen, hasta seçiminin klinikte değil endoskopi ünitesinde yapıldığından, Endoskopistin rutin olarak uyguladığı ve gerekli gördüğü takdirde biyopsi alınması nedeni ile her hastadan toplam sekiz adet biyopsi örneği alınamadı. Ancak, ilk alınan hastalarda tek bir antrum ve korpus gastrik biyopsi örneğinden RT RT-PCR deneyi için total RNA miktarı yeterli olmadığından her bir hastaya ait antrum ve korpus gastrik biyopsi örneği birleştirilerek çalışılmış, hem antrum hem de korpusta gen ekspresyon düzeylerinin araştırılması esas hedef olduğundan daha sonraki hastalardan ayrı ayrı iki antrum ve iki

korpus gastrik biyopsi örneği RT RT-PCR yöntemi için alınarak toplam 10 gastrik biyopsi örneği alınmıştır.

Etik kurul onayı ile belirlenmiş dışlama ve kabul kriterlerine göre, 18 yaş ve üzeri olan, ilk kez *H. pylori* tanısı konulan, son dört hafta içinde proton pompa inhibitörü (PPI) ve herhangi bir antibiyotik kullanmayan, gastrik ameliyat, malignansi, HIV ve HBV enfeksiyonu öyküsü olmayan, gastroduodenal kanaması olmayan, son bir ay içerisinde NSAİİ ve immünosüpresif ilaç kullanmayan hastalar araştırmaya alındı.

Etik kurul onayı ile belirlenmiş araştırmaya kabul etme kriterlerine uygun görülen "*Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi" başlıklı birinci doktora tez projesi kapsamında 59 hasta, "*Helicobacter pylori* enfeksiyonunda bakteriyel dış membran proteinlerinin incelenmesi" başlıklı ikinci doktora tez projesi kapsamında 120 hasta olmak üzere toplam179 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalardan antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örnekleri yukarıda yer alan açıklamalara göre Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından Endoskopi Ünitesinde alındı.

Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından hazırlanan endoskopi raporu ile Endoskopistin histopatolojik incelemeyi gerekli gördüğü antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinin patoloji raporu sonuçları ve hastaya ait diğer bilgiler kaydedilerek dosyalandı.

3.4. Çalışma Materyali

Üst gastrointestinal sistem yakınmalı hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerine HÜT, histopatolojik inceleme ve kültür, ayrıca hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerine moleküler yöntemlerden RT RT-PCR yöntemi uygulandı.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvarımızda bu hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerine direkt biyopsiden Christensen's üreli besiyerinde üreaz testi, direkt biyopsiden direkt boyalı bakı (Metilen Mavisi ve Gram boyama) için iki preparat, *H. pylori* kültür ve antimikrobiyal duyarlılık yöntemleri uygulanarak *H. pylori* varlığı ve klaritromisin duyarlılığı araştırılmıştır. Ayrıca moleküler yöntemlerden RT RT-PCR yöntemi kullanılarak antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *ureA* ve 16S rRNA house-keeping genlerinin her ikisinin eksprese edildiğinde *H. pylori* varlığı ve *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri RT RT-PCR yöntemi ile araştırıldı. Hastalardan gastrik biyopsi örneklerinin alımı daha önce etik

kurul tarafından onaylanmış olup, bu örnekler Haziran-Ekim 2009, Mart-Eylül 2010, Mart-Temmuz 2011, Mart ve Mayıs 2012 tarihlerinde Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Gündüz Hastanesi, Endoskopi Ünitesinde Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından alındı.

3.4.1. *Biyopsi Örneklerinin Alınması*

Üst endoskopi endikasyonu konulan ve çalışmaya alınan hastalara, en az sekiz saatlik açlıktan sonra Fujinon SN 2 GN20 A003 veya SN 1 GN20 A923 marka video endoskop kullanılarak Uzman Gastroenterolog /Endoskopist tarafından üst gastrointestinal sistem (GIS) endoskopisi yapıldı.

Hastalardan endoskopi sırasında antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneğinden dörder olmak üzere toplam sekiz biyopsi örneği steril bir iğne ucu kullanılarak endoskopi forsepsinden alındı. Bir antrum ve/veya gerektiğinde alınan bir korpus biyopsi örneğine endoskopi sırasında hasta başı hızlı üreaz testi (HÜT) uygulandı.

Uzman Gastroenterolog/Endoskopist tarafından gerekli görüldüğü takdirde bir antrum ve/veya bir korpus gastrik biyopsi örneği histopatolojik inceleme için Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi.

Bir antrum ve bir korpus gastrik biyopsi örneği çalışmanın başında beş hasta için Phosphate Buffer Saline (PBS) (Biochrom AG), jelatin (Merck) ve *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren transport besiyerine konuldu ve kültür yöntemi uygulanması için hemen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvarımıza ulaştırıldı ve kültürü yapıldı.

Kültürün hemen yapılamadığı 115 hastanın antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örnekleri ise direkt olarak %20 gliserol (Baked Analyzed) içeren Brain Heart Infusion (BHI) buyyon (Oxoid) transport besiyerine konularak hemen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvarımıza ulaştırıldı ve kültür yapılıncaya kadar –80°C'de saklandı.

Hastalardan alınan önce birer, sonra iki antrum ve iki korpus gastrik biyopsi örnekleri ise endoskopi ünitesinde kryotüp (Greiner) içine alınıp hemen sıvı azot içeren sıvı azot tankına (MVE Lab-10, Agtech, USA) koyuldu ve hızlıca donduruldu (snap freezing), sıvı azot tankında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvarımıza getirildi. Biyopsi örnekleri sıvı azot tankından çıkartılıp total RNA ekstraksiyonu ve RT RT-PCR gen ekspresyon çalışması yapılana kadar –80°C'de saklandı.

Sıvı azot tankı (MVE Lab-10, Agtech, USA) Dokuz Eylül Üniversitesi, o dönemin "İleri Biyomedikal ARGE Uygulama ve Araştırma Merkezi" Müdürü Sayın Prof. Dr. Kemal BAYSAL'ın izni ile ARGE'den temin edilmiştir. Çalışma sürecinde kullanılmış ve çalışma bitiminde kendim tarafından Sayın Prof. Dr. Kemal BAYSAL'a teslim edilmiştir. Bu tez projemizde izinleri ile bize temin ettikleri sıvı azot tankını kullanarak RT RT-PCR çalışmamızda yer alan gastrik biyopsi örneklerini doğru koşullarda laboratuvara ulaştırmamızı sağlayan Sayın Prof. Dr. Kemal BAYSAL'a teşekkür ederiz.

i. Endoskopların Sterilizasyonu

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Endoskopi Ünitesinde edoskopların mekanik olarak temizliği için önce sıcak deterjanlı su ile fırçalanarak yıkandıktan sonra %2'lik tamponlanmış glutaraldehit içeren Fujinon Choyang otomatik yıkama makinesi ile 5-20 dakika yıkanıp, sonra iki litre steril su ile durulanıp kurutularak bir sonraki hasta için Uzman Endoskopist tarafından kullanılmak üzere hazırlanmaktadır (122). Güvenilir sonuçlar elde etmek için gastrointestinal ekipmandan *H. pylori* DNA'larının tümüyle uzaklaştırılması amacıyla protokollerin uygulanması bildirilmiştir (123).

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmamızda bağımlı ve bağımsız değişkenler Tablo 3'te sıralanmıştır.

Tablo 3. Araştırmamızda incelenen bağımlı ve bağımsız değişkenler

Bağımlı değişkenler		**Bağımsız değişkenler**	
Değişken	**Tanımlayan veriler**	**Değişken**	**Tanımlayan veriler**
H. pylori enfeksiyonu	varlığı veya yokluğu	cinsiyet	erkek veya kadın
H. pylori enfeksiyonu	varlığı veya yokluğu	yaş	ortalama yaş
GÜ/E, DÜ/E, EG, NEG	bulunan veya bulunmayan	*H. pyloricagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyonu	pozitifliği veya negatifliği
GÜ/E, DÜ/E, EG, NEG	bulunan veya bulunmayan	*H. pyloricagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyonu	düzeyleri
PNL, MNH, HLO, İM	varlığı veya yokluğu/düzeyleri	*H. pylori* enfeksiyonu	varlığı veya yokluğu
PNL, MNH, HLO, İM	varlığı veya yokluğu/düzeyleri	*H. pyloricagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyonu	pozitifliği veya negatifliği /düzeyleri
H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18 ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyonu	pozitifliği veya negatifliği	*H. pylori* lokalizasyonu	Antrum veya korpus
H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18 ve *omp20 (alpA)* gen ekspresyonu	düzeyleri	*H. pylori* lokalizasyonu	Antrum veya korpus

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; PNL: Polimorfonükleer lökosit; MNH: Mononükleer hücre; HLO: Helicobacter benzeri organizma; İM: İntestinal metaplazi

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. *Araştırmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar*

Bu araştırmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazların özellikleri aşağıda yer alan tablolarda açıklandığı gibi sıralanmıştır (Tablo 4,Tablo 5).

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemelerin özellikleri

Sıra No.	Malzeme adı	Marka	Lot No., Model, Seri No., Katalog No.	Kullanıldığı analiz
1	Columbia Blood agar	Oxoid	CM0331	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden *H. pylori* suşlarının izolasyonu ve izole edilen *H. pylori* suşlarının pasajlanması
2	Mueller-Hinton agar	Oxoid	CM0337	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
3	Brain Hearth Infusion buyyon	Oxoid	CM0225	İzole edilen *H. pylori* suşlarının stoklanması
4	Brucella buyyon	BD	211088	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
5	Defibrine at kanı	Oxoid	SR0050C	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden *H. pylori* suşlarının izolasyonu ve izole edilen *H. pylori* suşlarının pasajlanması
6	Defibrine koyun kanı	Oxoid	SR0051B	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
7	*H. pylori* selektif suplement (DENT)	Oxoid	SR0147E	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden *H. pylori* suşlarının izolasyonu ve izole edilen *H. pylori* suşlarının pasajlanması
8	Üre	Merck	1.08487.1000	Hasta başı uygulanan hızlı üreaz testi (HÜT) ile hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinde üreaz enziminin varlığının belirlenmesinde
9	Fenol kırmızısı	Merck	1.07241.0005	Hasta başı uygulanan hızlı üreaz testi (HÜT) ile hastaların antrum ve/veya korpus biyopsi örneklerinde üreaz enziminin varlığının belirlenmesinde
10	Christensen's Üre agar	Oxoid	CM0053	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinde ve izole edilen *H. pylori* suşlarında üreaz aktivitesinin belirlenmesi
11	Taze insan serumu	DEÜ Hastanesi, Mekez Lab. Seroloji Lab.	–	*H. pylori* farklı kültür besiyerlerinin hazırlanması için
12	Klaritromisin E-test	BioMerieux, France	508708	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
13	GasPak EZ Campy Container System	BD	260680	*H. pylori'* nin üretilmesi için mikroaerofilik ortamın oluşturulması

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemelerin özellikleri (devamı)

14	Petri kutusu	Greiner Bio-One	663102	*H. pylori* suşlarının izolasyonu ve izole edilen *H. pylori* suşlarının pasajlanması, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
15	Gliserol	Baked Analyzed	M77809	İzole edilen *H. pylori* suşlarının stoklanması
16	Ependorf tüp 1.5 ml	Greiner Bio-One	616201	Tüm analizlerde
17	Bistüri	Farnell	440930	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin parçalanması
18	Apirojen steril su	Galen İlaç San. Tic. Aş	10501001	*H. pylori* selektif suplement (DENT)'in sulandırılması
19	Steril plastik öze	Greiner Bio-One	731171	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinden *H. pylori* suşlarının izolasyonu ve izole edilen *H. pylori* suşlarının pasajlanması
20	Steril eküvyon	Cultiplast	Q0020	Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
21	Pudrasız eldiven	Beybi	011119031130A	Tüm analizlerde
22	Filtreli pipet ucu (0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Greiner Bio-One	774288, 739288, 740288	Tüm analizlerde
23	Steril plastik pipet	LP ITALIANA	161010	Tüm analizlerde
24	Santrifüj tüpü 50 ml	Greiner Bio-One	227261	Tüm analizlerde
25	Burgulu kapaklı tüp (16x100 mm)	Isolab	7703001	McFarland bulanıklığının hazırlanmasında
26	Pellet pestle uç	Sigma	Z359947-100EA	Gastrik biyopsi örneklerinin homojenizasyonunda
27	Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom AG	L1825	Bakteri süspansiyonu hazırlamak için, antrum ve korpus biyopsi örneklerinin transpotu için
28	PCR tüpü (0.2 ml)	Biologix	60-0082	cDNA sentezi için
29	PCR tüpü (0.5 ml)	Corning	3749	cDNA sentezi için
30	Çözünebilir hemoglobin	Oxoid	LP0053B	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden *H. pylori* izolasyonu için farklı kültür besiyeri hazırlığında
31	*Helicobacter pylori* NCTC 11637 standart suşu	*DSMZ GmbH	–	Kültür optimizasyonu ve RT RT-PCR testinde pozitif kontrol
32	*Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşu	DEÜ Hastanesi, Merkez Lab, Bakteriyoloji Lab.	–	RT RT-PCR testinde negatif kontrol
33	*Staphylococcus aureus*ATCC 25923 standart suşu	DEÜ Hastanesi, Merkez Lab, Bakteriyoloji Lab.	–	RT RT-PCR testinde negatif kontrol

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemelerin özellikleri (devamı)

34	*Campylobacter jejuni* klinik izolatı	DEÜ Hastanesi, Merkez Lab, Bakteriyoloji Lab.	–	RT RT-PCR testinde negatif kontrol
35	Aktif kömür	Galenik	–	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden *H. pylori* izolasyonu için farklı kültür besiyeri hazırlığında
36	Jelatin	Merck	61792405001730	*H. pylori* transport besiyerleri hazırlığında
37	Polietilen glikol (PEG)	Merck	8170635000	*H. pylori* farklı stok besiyeri hazırlığında
38	0.45µm steril şırınga filtre (minisart)	Sartorius Stedim Biotech	1655580390103	İnsan serumunun steril edilmesinde
39	pH metre şeriti	Merck	1.09535.0001	Hızlı üreaz testi için üre solüsyonun pH ölçümünün yapılmasında
40	Kryotüp 2 ml	Greiner Bio-One	122278	Tüm analizierde
41	Şırınga 2, 5, 10 ml	Egeset	–	Tüm analizlerde (insan serumunun steril edilmesi, *H. pylori* selektif suplement (DENT)'in sulandırılması, vb.)
42	Metilen mavisi	Fluka	66720	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden hazırlanan direkt preparatların Metilen mavisi boyamasında
43	Bazik Fuksin	Serva	21916	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin direkt preparatı ayrıca izole edilen *H. pylori* suşlarının Gram ve Modifiye Gram boyamasında
44	Kristal viyole	Merck	1.01407.0250	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin direkt preparatı ayrıca izole edilen *H. pylori* suşlarının Gram ve Modifiye Gram boyamasında
45	Safranin O	Sigma-Aldrich	HT90432	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin direkt preparatı ayrıca izole edilen *H. pylori* suşlarının Gram ve Modifiye Gram boyamasında
46	Fenol kristali	Riedel-de Haen	16017	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin direkt preparatı ayrıca izole edilen *H. pylori* suşlarının Gram ve Modifiye Gram boyamasında
47	İyot kristali (lugol solüsyonu için)	Riedel-de Haen	30305	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin direkt preparatı ayrıca izole edilen *H. pylori* suşlarının Gram ve Modifiye Gram boyamasında
48	Potasyum iyodür (lugol solüsyonu için)	Sigma-Aldrich	P-4286	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin direkt preparatı ayrıca izole edilen *H. pylori* suşlarının Gram ve Modifiye Gram boyamasında
49	Hidrojen peroksit	Riedel-de Haen	18312	Katalaz testi için
50	N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine (Oksidaz)	Sigma-Aldrich	T3134	Oksidaz testi için

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemelerin özellikleri (devamı)

51	2,3,5 triphenyl tetrazolium choride (TTC)	Applichem	298-96-4	Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori* suşlarının izolasyonu ve *H. pylori* kolonileri için indikatör besiyeri hazırlığında
52	TriPure Isolation Reagent kiti	Roche Applied Science	11667165001 Version 2008	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden total RNA'ların ekstraksiyonunda fenol ve guanidine tiyosiyanat bileşenleri ile RNA integritesinin sağlanması için
52-1	MagNA lyser green beads	Roche Applied Science	03358941001	Homojenizasyon sırasında antrum ve korpus biyopsi örneklerinin parçalanması için
52-2	Kloroform	Merck	1.02445.2500	Homojen hale gelen dokuda faz oluşumunun sağlanması
52-3	İzopropanol	Sigma-Aldrich	24137-2,5L-R	Proteinlerin uzaklaştırılması ve RNA'ların çökmesi için
52-4	Etanol (%70)	Merck	1.00971.2500	RNA'ların izolasyonunda ortamda bulunan fazla tuzun uzaklaştırılması için
53	Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kiti	Roche Applied Science	04896866001 Version 2006	Elde edilen total RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi için
53-1	Random hekzamer primerleri	Roche Applied Science	04896866001	cDNA sentezi (reverse transcription) için
53-2	Transcriptor reverse transcriptase, 20 U/µl	Roche Applied Science	04896866001	cDNA sentezi (reverse transcription) için
53-3	Transcriptor reverse transcriptase reaksiyon buffer, 5x	Roche Applied Science	04896866001	cDNA sentezi (reverse transcription) için
53-4	Deoksinükleotit miks her biri 10 mM	Roche Applied Science	04896866001	cDNA sentezi (reverse transcription) için
53-5	Koruyucu RNase inhibitörü, 40 U/µl	Roche Applied Science	04896866001	cDNA sentezi (reverse transcription) için
54	96 kuyucuklu pleyt düzeni RT RT-PCR gen ekspresyon seti	Roche Applied Science	–	RT RT-PCR deneyinde
54-1	*cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA), ureA*, 16S rRNA left ve right primerleri	TIB Molbiol	Primerler sırasıyla (1069654,1069655), (1069656,1069657), (1069658,1069659), (1069660,1069661), (1069662,1069663), (1069650,1069651), (1069652,1069653)	RT RT-PCR deneyinde
54-2	*cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA), ureA*, 16S rRNA primerler ile ilgili TaqMan	Roche Applied Science	Upl probları sırasıyla (#124, 04693582001) (#145, 04694317001) (#138, 04694228001) (#97, 04692144001) (#154, 04694406001)	RT RT-PCR deneyinde

Tablo 4. Kullanılan sarf malzemelerin özellikleri (devamı)

	probları		(#158, 04694457001) (#31, 04687647001)	
54-3	Prob master (HotStart Taq DNA polimeraz enzimi)	Roche Applied Science	04887301001	RT RT-PCR deneyinde
54-4	PCR grade saf su	Zymo Research	W1001-6	RT RT-PCR deneyinde
54-5	96 kuyucuklu pleyt	Roche Applied Science	04729692001	RT RT-PCR deneyinde

*Gesellschaft mit beschränkter Haftung, www.dsmz.de

Tablo 5. Kullanılan cihazların özellikleri

Sıra No.	Cihaz adı	Marka	Lot No., Model, Seri No., Katalog No.	Kullanıldığı analiz
1	MS2 Minishaker Vorteks cihazı	IKA, USA	03.060847	Tüm analizlerde
2	Anaerobik Jar 2.5 L	Oxoid, UK	AG0025A	*H. pylori'*nin üremesi için gereken mikroaerofilik ortamın oluşturulmasında
3	Etüv 37°C	Memmert, Germany	IN55	*H. pylori'*nin üremesi için 37°C'lik enkübasyon ortamının sağlanmasında
4	–80°C ultra derin dondurucu	Thermo Electron Corporation, USA	705 REL#2 805797-117	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin ve izole edilen *H. pylori* suşlarının saklanmasında
5	–20°C derin dondurucu	Beko, Turkey	–	Malzemelerin ve DNA örneklerinin saklanmasında
6	+4°C no-frost buzdolabı	Beko, Turkey	–	Malzemelerin saklanmasında
7	Işık mikroskobu	Olympus, Lifescience Germany	CX31RTSF	Hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin Gram ve Metilen mavisi boyama preparatları ve izole edilen *H. pylori* suşlarının Modifiye Gram boyama preparatlarının incelenmesi
8	Spektrofotometre cihazı	Densimat BioMerieux, Italy SPA	IDN012764	McFarland bulanıklığının ayarlanması
9	Vorteks cihazı*	HDV Lifescience, Latvia	Bio vortex V1 580901079	Tüm analizlerde
10	Homojenizatör cihazı*	MagNA Lyser Roche Diagnostics Ltd.	40986993	Bakteri süspansiyonların ve hastaların antrum ve korpus biyopsi örneklerinin homojenizasyonunda

Tablo 5. Kullanılan cihazların özellikleri (devamı)

11	Soğutmalı santrifüj cihazı*	MICRO 200R Hettich, Germany	Zentrifugen D78532 240S 00028500400	Örneklerin santrifüj edilmesinde
12	Mikrosantrifüj cihazı*	MICRO 120 Hettich, Germany	0001003-01-00	Örneklerin santrifüj edilmesinde
13	Termal cycler cihazı*	TC-4000 Techne, UK	FTC4/H02 168670-1	cDNA sentezinde (reverse transcription)
14	LightCycler 480 II/96 cihazı*	Roche Applied Science Ltd.,Rotkreuz Switzerland	27828	RT RT-PCR analizinde
15	NanoDrop 2000 Spektrofotometre cihazı*	Thermo Scientific, USA	9160	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinden elde edilen total RNA'ların ölçümünde
16	Pleyt santrifüj cihazı*	Eppendorf, USA	Microcentrifuge 5430	96 kuyucuklu pleytlerin içerisindeki karışımların karışması için
17	Blok ısıtıcı cihazı	TS-100 Thermo-shaker, Biosan, Latvia	PSU-20 100910003	Total RNA ekstraksiyonunda
18	Otoklav	Hirayama HiClave HV-85, USA	000685748	Tüm analizlerde
19	Sıvı azot tankı**	MVE Lab-10 10740281 Agtech, USA	–	Antrum ve korpus biyopsi örneklerinin hızlı bir şekilde dondurulması ve –80°C'ye kaldırılana kadar taşınması
20	Su banyosu	Memmert, Germany	WB14	Besiyerinin 55°C'de tutulması için
21	Hassas terazi	Sartorius, USA	Entris124-1S	Besiyerlerinin ve kimyasal maddelerin tartımı
22	SH-5 Hotplate Stirrer	Labart, Poland	2006002	Besiyerlerinin hazırlanmasında
23	Otomatik pipetleyici seti (10, 100,1000 µl)	Eppendorf, USA	22474359	Tüm analizlerde

*Genmar laboratuarında kullanılan cihazlar

**Sıvı azot tankı Dokuz Eylül Üniversitesi, İleri Biyomedikal Uygulama ve Araştırma Merkezi ARGE'den temin edilmiştir.

3.6.2. *Hasta Başı Hızlı Üreaz Testinin (HÜT) Uygulanması*

İkinci doktora tez projesi kapsamında, endoskopi endikasyonu konulan toplam 120 hastadan üst GİS endoskopisi esnasında alınan 120 antrum ve 39 korpus gastrik biyopsi örneklerine Endoskopi Ünitesinde hasta başında (in-house) hızlı üreaz testi (HÜT) uygulandı. Toplam 120 hastada; 120 (%100.0) antrum gastrik biyopsi örnekleri, 39 (%32.5) korpus gastrik biyopsi örnekleri alındı ancak 81 (%67.5) hastadan Uzman Endoskopist tarafından HÜT uygulanması gerekli görülmediği için alınamadı. Hastalar antrum ve korpus, korpustan biyopsi alınmayan hastalar ise sadece antrum HÜT sonuçlarına göre HÜT yönünden değerlendirmeye alındı.

i. Hızlı Üreaz Testi (HÜT) Hazırlanması

HÜT hazırlanması ve uygulanması için steril distile su ile %10 üre solüsyonu hazırlandı [1 g üre (Merck, Germany) 10 ml steril distile suda çözündürüldü] ve pH şeriti kullanılarak pH'sı 0.1N NaOH ile ayarlandı (pH=7.0). Hazırlanan karışımdan her bir test tüpüne birer ml dağıtıldı. Antrum ve/veya korpus örnekleri üre solüsyonu içeren birer test tüpüne konuldu ve üzerlerine ikişer damla %0.1'lik fenol kırmızısı (Merck) solüsyonu eklenerek 1-15 dakika içerisinde hasta başında HÜT sonucu değerlendirildi. Üreli solüsyon içerisindeki gastrik biyopsi örneği *H. pylori* ile enfekte ise, bakterinin üreaz enzimi varlığında üre hidrolizi sonucunda açığa çıkan $2NH_3$ ve $2CO_2$ ortamın pH değerini yükselterek pH indikatörü fenol kırmızısı pembe renge değişimi gözlenir. Üreli solüsyonda pembe renk değişiminin görülmesi pozitif, rengin değişmemesi (sarı renk) negatif sonuç olarak değerlendirildi (3,124). Hazırlanan üre solüsyonu +4ºC de saklandı (124).

3.6.3. *Helicobacter pylori'nin İzolasyonu ve Kültür Besiyerlerinin Hazırlanması*

3.6.3.1. <u>Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örnekleri İçin Transport Besiyerinin Hazırlanması</u>

Endoskopi ünitesinden Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında laboratuvara getirilene kadar *H. pylori*'nin antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilebilmesi ve kültürü yapılana kadar canlı kalabilmesi için transport besiyerleri kullanıldı. İki farklı transport besiyeri hazırlandı:

1) Phosphate buffer saline (PBS) transport besiyeri (pH=7.2): %0.4 jelatin (Merck) ve *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) karışımını içeren transport besiyerine her bir antrum ve/veya korpus biyopsi örneği koyuldu, iki saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı ve kültürü hemen yapıldı (3,125). PBS tamponu hazırlanmasında önce stok solüsyon A hazırlandı. 0.2 mol/L (3.12 g/100 ml) Mono-basic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 100 ml distile suda çözüldü. Stok solüsyon B, 0.2 mol/L (7.17 g/100 ml) Di-basic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.12H_2O$) solüsyonu 100 ml distile su ile hazırlandı. 200 ml PBS (pH=7.2) için 28 ml A solüsyonu +72 ml B solüsyonu ile karıştırıldı, distile su ile 200 ml'ye tamamlanıp 0.9 g NaCl (4.5 g/L) eklendi (126). 100 ml PBS solüsyonuna 0.4 g (%0.4) jelatin (Merck) eklendi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) prospektüsünde 2 ml apirojen distile suda çözündürülmesi gerektiği belirtilirken çalışmamızda 5 ml steril apirojen distile su ile çözündürüldükten sonra 1 ml alınıp besiyerine eklendi. Hazırlanan besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı ve +4°C'de saklandı.

2) %20 gliserollü transport besiyeri: %20 gliserollü transport besiyeri kullanılarak *H. pylori*'nin kültürü hemen yapılamadığı zamanlarda gastrik biyopsi örneklerinin –80˚C'de saklandığında da bakterinin canlı kalmasını sağlamak amacı ile bu transport besiyeri hazırlandı. 100 ml %20 gliserollü transport besiyerinin hazırlanmasında 3.7 g BHI (Oxoid) besiyeri tartıldı ve bir Erlen Mayer'de 50 ml distile suda çözündürüldü. Başka bir Erlen Mayer'e 30 ml distile su konuldu, 20 ml gliserol **(**Baked Analyzed**)** eklendi. İki solüsyon ayrı ayrı 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı ve soğutulduktan sonra birbiriyle karıştırıldı. Hazırlanan transport besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı ve +4˚C'de saklandı. *H. pylori*'nin kültürü hemen yapılmadığı zamanlarda gastrik biyopsi örneklerinin –80˚C'de saklanması ile bakterinin canlı kalması sağlandı (3,127).

3.6.3.2. <u>Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin *H. pylori* Kültürü İçin Farklı Besiyerlerinin Hazırlanması</u>

i. H. pylori %7 Defibrine At Kanlı Seçici Besiyeri (500 ml)

Columbia Blood agar (Oxoid)	19.5 g
Defibrine at kanı (Oxoid)	35 ml
H. pylori selektif suplement (DENT) (Oxoid)	1 vial
Distile su	465 ml

H. pylori %7 defibrine at kanlı, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar seçici besiyerinin hazırlanması için temiz bir Erlen Mayer'e 465 ml distile su konuldu. 19.5 g Columbia Blood agar besiyeri tartıldı ve ısı bloğu (SH-5 Hotplate Stirrer, Labart, Poland**)** üzerinde ısıtılarak eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Kültür besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup aseptik koşullarda defibrine at kanı (Oxoid) yavaşça eklenip karıştırıldı. Daha sonra 1 vial *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) prospektüsünde 2 ml apirojen distile suda çözündürülmesi gerektiği belirtilirken çalışmamızda 5 ml apirojen distile suda çözündürülerek eklendi. Daha sonra besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda petrilere dağıtıldı, kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C'de etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek +4°C'de saklandı.

ii. H. pylori %10 Taze İnsan Serumlu Seçici Besiyeri (500 ml)

Columbia Blood agar (Oxoid)	19.5 g
İnaktive edilmiş taze insan serumu	50 ml
H. pylori selektif suplement (DENT) (Oxoid)	1 vial
Distile su	450 ml

H. pylori %10 inaktive edilmiş taze insan serumlu seçici kültür besiyeri için at kanı yerine 56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş taze insan serumu eklendi. Serum Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Seroloji Laboratuvarından serolojik testler ile taraması yapılmış olarak temin edildi. 0.45 µm steril minisart şırınga filtre (Sartorius Stedim Biotech**)** kullanılarak serum filtre edildi. Serum daha sonra inaktive edildi. Temiz bir Erlen Mayer'e 450 ml distile su koyuldu, 19.5 g Columbia Blood agar besiyeri tartıldı, eklendi ve ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Kültür besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup aseptik koşullarda inaktive edilmiş ve steril edilmiş taze insan serumu yavaşça eklenip karıştırıldı. Daha sonra 1 vial *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) prospektüsünde 2 ml apirojen distile suda çözündürülmesi gerektiği belirtilirken çalışmamızda 5 ml apirojen distile suda çözündürülerek eklendi. Daha sonra besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda petrilere dağıtıldı, kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C'de etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek +4°C'de saklandı.

iii. H. pylori %1 Çözünebilir Hemoglobinli Seçici Besiyeri (500 ml)

Columbia Blood agar (Oxoid)	19.5 g

Çözünebilir hemoglobin (Oxoid)	5.0 g
Aktif kömür (Galenik) %0.3	1.5 g
H. pylori selektif suplement (DENT) (Oxoid)	1 vial
Distile su	250 ml+250 ml=500 ml

H. pylori %1 çözünebilir hemoglobinli seçici besiyerinin hazırlanması için %1 çözünebilir hemoglobin solüsyonu hazırlandı. Temiz bir Erlen Mayer'e 250 ml distile su koyuldu, 5.0 g çözünebilir hemoglobin tartıldı, eklendi ve ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi. Başka bir Erlen Mayer'e 250 ml distile su koyuldu, 19.5 g Columbia Blood agar ile 1.5 g aktif kömür tartıldı, eklendi ve ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi. İki solüsyon ayrı ayrı 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55°C'ye kadar soğutulup birbiriyle karıştırıldı ve 1 vial *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) prospektüsünde 2 ml apirojen distile suda çözündürülmesi gerektiği belirtilirken çalışmamızda 5 ml apirojen distile suda çözündürülerek eklendi. Daha sonra besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda petrilere dağıtıldı, kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C'de etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek +4°C'de saklandı.

iv. H. pylori %0.004 "Triphenyl Tetrazolium Chloride" (TTC) İndikatörlü Besiyeri (500 ml)

Columbia Blood agar (Oxoid)	19.5 g
Çözünebilir hemoglobin (Oxoid)	5.0 g
Aktif kömür (Galenik) %0.3	1.5 g
TTC (Applichem) %0.004	20 mg
H. pylori selektif suplement (DENT) (Oxoid)	1 vial
Distile su	250 ml+245 ml=495 ml

Kültürde *H. pylori* kolonilerinin daha özgün görülebilmesini sağlamak amacıyla *H. pylori* %0.004 "Triphenyl Tetrazolium Chloride" (TTC) indikatörlü besiyeri hazırlandı. Bu besiyerinin hazırlanması için önce 40 mg TTC (Applichem) tartılıp 10 ml distile su ile TTC solüsyonu hazırlandı ve 0.45 µm steril minisart şırınga filtre (Sartorius Stedim Biotech**)** ile filtre edildi. Temiz bir Erlen Mayer'e 250 ml distile su konuldu, 5.0 g çözünebilir hemoglobin eritildi. Başka bir Erlen Mayer'e 245 ml distile su konuldu, 19.5 g Columbia Blood agar besiyeri ayrıca 1.5 g aktif kömür tartıldı, eklendi ve ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi. İki solüsyon ayrı ayrı 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 55°C'ye kadar soğutulup

birbiriyle karıştırıldı ve 1 vial *H. pylori* selektif suplementi (DENT) (Oxoid) prospektüsünde 2 ml apirojen distile suda çözündürülmesi gerektiği belirtilirken çalışmamızda 5 ml apirojen distile suda çözündürülerek eklendi. Daha sonra 5 ml TTC solüsyonu da eklendi. Besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda petrilere dağıtıldı, kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C'de etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek +4°C'de saklandı.

v. H. pylori %7 Defibrine At Kanlı Antibiyotiksiz Besiyeri (500 ml)

Columbia Blood agar (Oxoid)	19.5 g
Defibrine at kanı (Oxoid)	35 ml
Distile su	465 ml

H. pylori'nin selektif suplementli (DENT) (Oxoid) besiyerinde kültürü yapıldığı zaman bazı *H. pylori* suşlarının bu suplementte bulunan antibiyotiklere duyarlı olabileceği için bu suşların izolasyonunu sağlamak amacı ile antibiyotik içeren besiyerinin yanında antibiyotik içermeyen besiyeri de kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanması için temiz bir Erlen Mayer'e 465 ml distile su konuldu, 19.5 g Columbia Blood agar besiyeri tartıldı, eklendi ve ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Kültür besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup aseptik koşullarda 35 ml defibrine at kanı yavaşça eklenip karıştırıldı. Daha sonra besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda petrilere dağıtıldı, kontaminasyon kontrolü için 24 saat 37°C'de etüvde bekletildi. Besiyerleri poşetlenerek +4°C'de saklandı.

Tüm besiyerleri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda 10 cm'lik steril petri kutularına ortalama her biri için 20 ml dağıtıldı, kontaminasyon yönünden bir gün 37°C'de etüvde enkübe edilerek besiyerleri şeffaf poşete konularak +4°C'de saklandı.

3.6.3.3. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin Kültürü

Gastrik biyopsi örneklerinin kültür ve direkt bakısı ayrıca kültürde üreyen kolonilerin *H. pylori* olup olmadığını idantifiye etmek için aşağıdaki testler ve incelemeler yapıldı.

İkinci doktora tez projesi kapsamında çalışmaya alınan 120 hastadan, 104 (%86.7) hastanın antrum ve 98 (%81.7) hastanın korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü yapıldı. Yüz yirmi hastanın 16 (%13.3)'sının kültür için antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için kültürü yapılamadı. Kültüre alınan 104 hastanın, 98 (%94.2)'inin hem antrum hem de korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü yapılırken, 6 (%5.8)'sının sadece antrum gastrik biyopsi örneğinin kültürü yapıldı.

Gliserol içermeyen transport besiyerinde biyopsi örnekleri Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda laboratuvara getirildikten hemen sonra veya –80˚C'de saklanan gliserollü transport besiyerindeki biyopsi örnekleri ise oda ısısına getirildikten sonra hemen Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril petri kutusuna alınıp steril cam tüp ezici ile ezildi ve 200 µl PBS ile homojenize edildi. Her bir antrum ve korpus örneği için ayrı bir steril petri kullanılarak ayrı ayrı kültürleri yapılmak üzere hazırlandı. Hazırlanan 200 µl homojenizat, *H. pylori* %7 defibrine at kanlı, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar seçici besiyerine inoküle edilerek ekimi yapıldı. Ekimi yapılan plaklar anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak ve ıslak steril gazlı bez ile %90 nemli bir ortam sağlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 3-7 gün enkübe edildi (124-128).

Aseptik koşullarda steril petri kabı içerisinde ezilen biyopsi örneklerinden bir parça da Christensen's üreli agar (Oxoid) besiyerine konuldu ve direkt biyopsiden hızlı üreaz testi yapıldı (3).

H. pylori'nin mide biyopsi örneğinde direkt preparatta görülebilmesi ve tipik spiral (martı kanadı) morfolojisini ışık mikroskobunda incelemek için önce direkt biyopsiden preparat hazırlanıp Metilen mavisi ve Gram boyama yöntemleri ile incelendi. Kültür için aseptik koşullarda steril petri içerisinde ezilen biyopsi örneklerinden ufak bir biyopsi parçası temiz bir lam üzerine konulup başka bir lam ile biyopsinin üstü kapatılarak biyopsi örneği iki lam arasında ezildi ve havada kurutulduktan sonra alevden geçirilip fikse edildi. Metilen mavisi boyası 30 dakika uygulandı. Ayrıca Gram boyama da protokole göre önce 1 dakika kristal viyole, sonra 1 dakika lugol, ardından 10-15 saniye alkol ile dekolorize edildi ve 30-60 saniye sulu fuksin ile boyandı. Boyanmış preparatlar kurutulup ışık mikroskobunda (Olympus CX31RTSF) önce 10X objektifte ve sonra immersiyon yağı kullanılarak 100X objektifte direkt preparatlar *H. pylori* tipik spiral morfoloji varlığı yönünden incelendi. Biyopsi örneklerinin kültürü 37°C'de 3-7 gün enkübe edildi ve kültürde üreyen kolonilerin morfolojisi incelendi (128-130).

H. pylori'nin gastrik biyopsi örneklerinden daha özgün ve yüksek oranda kültürde izolasyonunu sağlamak amacıyla yukarıda açıklandığı gibi beş farklı içerikli hazırlanan besiyerlerinin etkinliklerinin değerlendirilmesi için önce *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanılarak optimizasyon çalışması yapıldı. Daha sonra farklı dönemlerde ya birlikte ya da tek besiyeri kullanılarak kültürde *H. pylori* üreme etkinlikleri araştırıldı (3,131-134).

i. Metilen Mavisi Boyası Hazırlanması

Metilen mavisi boyası için 0.3 g boya (Fluka) önce temiz bir havanda ezilip 30 ml etil alkol (%95) (Merck) eklendi ve çözündürüldü, 100 ml distile su ilave edilerek birkaç gün oda ısısında bekletildi. Daha sonra Whatman No. 1 filtre kağıdından filtre edilip ışık geçirmeyen bir şişede oda ısısında saklandı (130).

ii. Gram Boyası Hazırlanması

Gram boyası için önce A ve B solüsyonu hazırlandı. Solüsyon A'nın hazırlanması için 2 g kristal viyole (Merck), havanda ezilip 20 ml %95'lik etanol'de çözündürüldü. Solüsyon B'nin hazırlanması için 0.8 g amonyum okzalat tartıldı ve 80 ml distile suda çözündürüldü. İki solüsyon birbiriyle karıştırılıp 24 saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra Whatman No. 1 filtre kağıdından filtre edilip ışık geçirmeyen bir şişede saklandı.

Lugol için 1 g iyot kristali (Riedel-de Haen) ve 2 g potasyum iyodür (Sigma-Aldrich) havanda ezilip 300 ml distile suda yavaşça çözündürüldü. Sonra ışık geçirmeyen bir şişeye doldurulup oda ısısında saklandı.

Bazik fuksin veya safranin O stok solüsyonunun hazırlanması için 5 g bazik fuksin (Merck) ve 2.5 g safranin O (Sigma-Aldrich) havanda ezilip bazik fuksin 100 ml distile suda, safranin O ise 100 ml %95'lik etanolde çözündürüldü. Çalışma solüsyonu için 10 ml stok solüsyonu 90 ml distile su ile karıştırılıp kullanıldı (135).

iii. Modifiye Gram Boyası Hazırlanması

Modifiye Gram boyama (karbol fuksin) yönteminde önce A ve B solüsyonu hazırlandı. A solüsyonunun hazırlanması için 3 g bazik fuksin 100 ml %95'lik etanol'de çözündürüldü. B solüsyonunun hazırlanması için 45 g fenol kristali (Riedel-de Haen) 900 ml distile suda hafifçe ısıtılarak çözündürüldü. İki solüsyon birbiriyle karıştırıdı, Whatman No. 1 filtre kağıdından filtre edilip ışık geçirmeyen bir şişede oda ısısında saklandı (129).

3.6.3.4. Kültürde *Helicobacter pylori* Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Biyopsi örneklerinin kültürü 37°C'de 3-7 gün enkübe edildikten sonra kültürde üreyen kolonilerin morfolojisi incelenerek idantifikasyonu için kolonilerden preparat hazırlandı. Gram boyama ve Modifiye Gram boyama yöntemleri uygulanarak Gram-negatif spiral tipik

morfolojisi, aynı zamanda katalaz, oksidaz ve üreaz testlerinin pozitif sonuçları ile *H. pylori* olarak idantifiye edildi (128-130).

i. Christensen's Üreli Agar besiyeri

100 ml için 2.4 g Christensen's üreli agar (Oxoid) besiyeri 95 ml distile suda ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup 5 ml %40'lık steril üre solüsyonu (Oxoid) eklendi. Steril ependorf tüplere birer ml dağıtılıp besiyerleri donduktan sonra bir gün 37°C'de etüvde enkübe edilip kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra +4°C'de saklandı. Kültürde üreyen kolonilerden alınıp Christensen's üreli agar besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de 15 dakika içerisinde pembe renk oluşumu izlendi (3,136).

ii. Katalaz Testinin Uygulanması

Katalaz testi için %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu hazırlandı. 10 ml solüsyonun hazırlanmasında %30'luk stok hidrojen peroksitten (Riedel-de Haen) alınacak miktar, C1.V1=C2.V2 formülü ile hesaplandı. Bir ml %30'luk stok H_2O_2 solüsyonu alınıp distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Kültürde üreyen koloniler plastik öze ile lam üzerine aktarıldı ve hazırlanan %3'lük H_2O_2 solüsyonundan bir damla lam üzerine damlatıldı, hava kabarcıklarının çıkışı pozitif test sonucu olarak değerlendirildi (136).

iii. Oksidaz Testinin Uygulanması

Oksidaz testi**,** bir parça Whatman No. 1 filtre kağıdına %1'lik "tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride" indikatörü damlatıldı. Steril plastik öze ile kültürde üreyen kolonilerden alındı ve oksidaz indikatörü damlatılmış Whatman No.1 kağıdının üzerine yayıldı. Bakterinin oksidaz indikatörü ile temas ettiğinde 5-10 saniye içinde gözlenen mavi renk oluşumu pozitif test sonucu olarak değerlendirildi (136).

3.6.4. *Helicobacter pylori* Suşlarının Kültür Temelli Fenotipik Yöntemle Antibiyotik Duyarlılık Testi

i. %5 Koyun Kanlı Mueller-Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması

500 ml için 475 ml distile suya 19 g Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyeri eklenip ısı bloğu üzerinde ısıtılarak eritildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 55°C'ye kadar

soğutulup 25 ml defibrine koyun kanı (Oxoid) eklendi ve besiyeri 4 mm kalınlığında aseptik koşullarda petri kutularına dağıtıldı. Kontaminasyon kontrolü için plaklar 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra +4°C'de saklandı.

ii. Brucella Buyyon Besiyerinin Hazırlanması

500 ml için 14 g Brucella buyyon (Becton Dickinson and Company) besiyeri distile suda eritilip kapaklı cam tüplere ikişer ml dağıtıldı ve 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Kontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra +4°C'de saklandı.

3.6.4.1. Klaritromisin Gradiyent Diffüzyon Testinin (E-test) Uygulanması

H. pylori enfeksiyonu tedavisinde kullanılan en önemli antibiyotik olan klaritromisin duyarlılığını araştırmak amacı ile hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarına antibiyotik duyarlılık testi yapıldı, ancak *H. pylori* kültürü pozitif olan 35 hastanın korpus izolatları stoklanmadığı için, ayrıca stok besiyerinde saklanan izole edilmiş *H.pylori* suşlarının tümü canlandırılamadığından ilk alınan hastalarda sadece 17 antrum izolatında antibiyotik duyarlılık testi yapıldı. İkinci hasta grubunda ise *H. pylori* kültürü pozitif olan 16 hastanın antrum ve/veya korpus izolatı (10 antrum ve 8 korpus gastrik biyopsi izolatı) toplam 35 *H. pylori* suşuna gradiyent difüzyon test (E-test) (BioMerieux, France) yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uygulandı.

Hastalardan izole edilen ve gliserollü stok besiyerlerinde –80°C'de saklanan *H. pylori* suşları oda ısısında çözündürülerek *H. pylori* %7 defibrine at kanlı seçici besiyerine inoküle edildi, *H. pylori* kültür protokolü uygulanarak 37°C'de mikroaerofilik ortamda iki-üç gün enkübe edilerek *H. pylori* suşları canlandırıldı. Steril bir eküvyon ile *H. pylori* kolonilerinin Brucella buyyon (Becton Dickinson and Company) besiyerinde süspansiyonu hazırlandı ve bakteri yoğunluğu spektrofotometre cihazı (Densimat, BioMerieux, Italy) ile McFarland 3 (~$9X10^8$CFU/ml)'e ayarlandı (3,130). Bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak %5 defibrine koyun kanlı (Oxoid) Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyeri üzerine inoküle edildi ve steril eküvyon ile tüm besiyeri yüzeyine yayıldı. Her bir antrum ve/veya korpustan izole edilmiş *H. pylori* bakteri süspansiyonu içeren herbir besiyeri yüzeyine klaritromisin E-test stripi (BioMerieux, France) aseptik koşullarda yerleştirildi ve 37°C'de mikroaerofilik ortamda GasPak Campy Container System kullanılarak üç gün enkübe edildi. Antrum ve/veya

korpustan izole edilen *H. pylori* suşlarının herbirinin minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri o besiyerinde görülen bakteriyal üremenin olmadığı inhibisyon zonu ile stripin kesiştiği nokta MİK değeri olarak kabul edildi. Klaritromisin için MİK değeri ≥2 mg/L dirençli, ≤1 mg/L duyarlı suş olarak değerlendirildi (137,138). Ancak MİK değerleri tam olarak kaydedilmediği için bulgularda yer almamıştır.

3.6.5. *Helicobacter pylori İzolatlarının Stoklanması*

İzole edilen *H. pylori* suşlarının uzun süre canlılığının, yeniden kültürünü ve pasajını yapılabilme özelliklerinin korunması ve ileride yapılacak olan deneylerde bu stoklardan yararlanabilmek için bakteri suşlarının stokları yapıldı.

Ayrıca bu çalışmada hastaların gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları daha önce hazırlanan stok besiyerlerine inoküle edilerek antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılmak üzere –80° C'de saklandı.

3.6.5.1. Stok Besiyerlerinin Hazırlanması

100 ml stok besiyerinin hazırlanması için 3.7 g Brain Heart Infusion buyyon (BHI) (Oxoid) besiyeri 80 ml distile suda eritildi ve 20 ml %20'lik gliserol (Baked Analyzed) eklendi. Hazırlanan besiyeri ependorf tüplere birer ml dağıtıldı ve 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı. Kontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra kullanılıncaya dek +4°C'de saklandı.

Steril eküvyon ile kültürde üreyen *H. pylori* kolonilerinden alınıp stok besiyerinde homojenize edildi, tüpler 30 saniye vortekslenip (MS2 Minishaker IKA, USA) üzerine hasta adı kaydedildi ve –80° C'de saklandı. Aynı zamanda çeşitli kriyoprezervatif maddeler (gliserol, polietilen glikol, dimetil sulfoksit, sakkaroz ve inaktive edilmiş taze insan serumu) kullanılarak farklı stok besiyerleri hazırlanıp izole edilen *H. pylori* suşlarının daha uzun süre canlılığını sağlayan stok besiyerleri geliştirmek amacıyla *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanılarak farklı stok besiyerleri araştırıldı (127).

i. H. pylori %20 Gliserol İçeren Stok Besiyeri (100 ml)

Brain Heart Infusion buyyon (Oxoid)	3.7 g
Gliserol **(**Baked Analyzed)	20 ml
Distile su	50 ml+30 ml=80 ml

Birinci stok besiyerinin hazırlanmasında 3.7 g BHI (Oxoid) besiyeri tartılıp 50 ml distile suda çözündürüldü. Başka bir Erlen Mayer'e 30 ml distile su konulup 20 ml gliserol **(**Baked Analyzed**)** eklendi. İki solüsyon ayrı ayrı 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı ve soğutulduktan sonra birbiriyle karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı vekontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra kullanılıncaya dek +4˚C'de saklandı.

ii. H. pylori %20 Gliserol+%10 İnaktive Edilmiş Taze İnsan Serumu İçeren Stok Besiyeri (100 ml)

Brain Heart Infusion buyyon (Oxoid)	3.7 g
Gliserol **(**Baked Analyzed)	20 ml
İnaktive edilmiş taze insan serumu	10 ml
Distile su	50 ml+20 ml=70 m

İkinci stok besiyerine %10 oranında inaktive edilmiş taze insan serumu da eklendi. Serolojik testlerle taraması yapılmış insan serumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Seroloji Laboratuvarından sağlandı. Serumun sterilizasyonunu sağlamak için inaktivasyondan önce 0.45 μm steril minisart şırınga filtre (Sartorius Stedim Biotech) kullanılarak serum filtre edildi ve 56°C'de 30 dakika su banyosunda (Memmert, Germany) inaktive edildi. İkinci stok besiyerinin hazırlanmasında 3.7 g BHI (Oxoid) besiyeri tartılıp 50 ml distile suda çözündürüldü. Başka bir Erlen Mayer'e 20 ml distile su konulup 20 ml gliserol **(**Baked Analyzed**)** eklendi. İki solüsyon ayrı ayrı 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı ve 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra birbiriyle karıştırıldı. Daha sonra aseptik koşullarda 10 ml inaktive ve sterilize edilmiş taze insan serumu eklendi. Hazırlanan besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı ve kontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra kullanılıncaya dek +4°C'de saklandı.

iii. H. pylori %20 Gliserol+%10 İnaktive Edilmiş Taze İnsan Serumu+0.3 M Sakkaroz İçeren Stok Besiyeri (100 ml)

Brain Heart Infusion buyyon (Oxoid)	3.7 g
Gliserol **(**Baked Analyzed)	20 ml
İnaktive edilmiş taze insan serumu	10 ml

Sakkaroz (Merck)	0.3 M
Distile su	50 ml+20 ml=70 ml

Üçüncü stok besiyerine %10 oranında inaktive edilmiş taze insan serumu ayrıca 0.3 Mol sakkaroz (Merck) eklendi. Serolojik testlerle taraması yapılmış taze insan serumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Seroloji Laboratuvarından sağlandı. Serumun sterilizasyonunu sağlamak için inaktivasyondan önce 0.45 µm steril minisart şırınga filtre (Sartorius Stedim Biotech) kullanılarak serum filtre edildi ve 56°C'de 30 dakika su banyosunda (Memmert, Germany) inaktive edildi. Üçüncü stok besiyerinin hazırlanmasında 3.7 g BHI (Oxoid) besiyeri tartılıp 50 ml distile suda çözündürüldü. Başka bir Erlen Mayer'e 20 ml distile su konulup 20 ml gliserol (Baked Analyzed) eklendi. İki solüsyon ayrı ayrı 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı ve 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra birbiriyle karıştırıldı. Daha sonra aseptik koşullarda 10 ml inaktive ve sterilize edilmiş taze insan serumu ayrıca 0.3 Mol sakkaroz eklendi. Hazırlanan besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı ve kontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra kullanılıncaya dek +4°C'de saklandı.

iv. H. pylori %5 Polietilen Glikol (PEG)+%10 İnaktive Edilmiş Taze İnsan Serumu İçeren Stok Besiyeri (100 ml)

Brain Heart Infusion buyyon (Oxoid)	3.7 g
PEG **(**Merck)	5 ml
İnaktive edilmiş taze insan serumu	10 ml
Distile su	85 ml

Dördüncü stok besiyerinin hazırlanmasında gliserol yerine %5 oranında PEG kullanıldı. 3.7 g BHI (Oxoid) besiyeri tartılıp 85 ml distile suda çözündürüldü ve 5 ml PEG (Merck) eklendi, 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup aseptik koşullarda 10 ml inaktive ve sterilize edilmiş taze insan serumu eklendi. Serolojik testlerle taraması yapılmış insan serumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Seroloji Laboratuvarından sağlandı. Serumun sterilizasyonunu sağlamak için inaktivasyondan önce 0.45 µm steril minisart şırınga filtre (Sartorius Stedim Biotech) kullanılarak serum filtre edildi ve 56°C'de 30 dakika su banyosunda (Memmert, Germany) inaktive edildi. Hazırlanan besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı

ve kontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra kullanılıncaya dek +4°C'de saklandı.

v. H. pylori %5 Dimetil Sulfoksit (DMSO)+%10 İnaktive Edilmiş Taze İnsan Serumu İçeren Stok Besiyeri (100 ml)

Brain Heart Infusion buyyon (Oxoid)	3.7 g
DMSO (Sigma Aldrich)	5 ml
İnaktive edilmiş taze insan serumu	10 ml
Distile su	85 ml

Beşinci stok besiyerinin hazırlanmasında PEG yerine %5 oranında DMSO kullanıldı. 3.7 g BHI (Oxoid) besiyeri tartılıp 85 ml distile suda çözündürüldü ve 5 ml DMSO (Sigma Aldrich) eklendi, 121˚C'de 15 dakika otoklavlandı. Besiyeri 55°C'ye kadar soğutulup aseptik koşullarda 10 ml inaktive ve sterilize edilmiş taze insan serumu eklendi. Serolojik testlerle taraması yapılmış taze insan serumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Seroloji Laboratuvarından sağlandı. Serumun sterilizasyonunu sağlamak için inaktivasyondan önce 0.45 µm steril minisart şırınga filtre (Sartorius Stedim Biotech) kullanılarak serum filtre edildi ve 56°C'de 30 dakika su banyosunda (Memmert, Germany) inaktive edildi. Hazırlanan besiyeri Bunsen beki alev yanında aseptik koşullarda steril ependorf tüplere birer ml dağıtıldı ve kontaminasyon kontrolü için tüpler 24 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra kullanılıncaya dek +4°C'de saklandı.

3.6.5.2. Stok Besiyerlerinin Etkinliğinin *Helicobacter pylori* NCTC 11637 Satandart Suşu ile Araştırılması

H. pylori %7 defibrine at kanlı, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar seçici besiyerinde *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun subkültürü yapıldı. Kültürde üreyen *H. pylori* kolonilerinden PBS (pH=7.4) ile bakteri süspansiyonu hazırlandı ve bakteri yoğunluğu spektrofotometre cihazı (Densimat, BioMerieux, Italy SPA) kullanılarak McFarland 3'e (~$9X10^8$ CFU/ml) ayarlandı (130). Bakteri süspansiyonundan pipetle 100'er µl çekilip her bir stok besiyerlerine inoküle edildi, 1 dakika vortekslendi (MS2 Minishaker, IKA, USA), hemen –20°C ve –80°C'ye kaldırıldı.

Stok besiyerlerindeki *H. pylori* suşları bir ay sonra –20°C ve –80°C'den çıkarıldı ve oda ısısına getirildikten sonra vortekslendi. *H. pylori* suşu içeren her stok besiyerinden 10 µl

alınarak PBS ile $1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$ seri dilüsyonları hazırlandı ve %7 defibrine at kanlı ve *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyerine inoküle edilerek bakteriler canlandırıldı. Kültürde üreyen *H. pylori* kolonilerinin sayısı her stok besiyeri için koloni sayısı×1/dilüsyon formülü ile CFU/ml olarak hesaplandı.

3.6.6. *Histopatolojik İncelemeler*

Hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gastrointestinal Patoloji Uzmanı tarafından gastrik aktivite açısından; lamina propriada, pitlerde inflamasyon ve HLO varlığı ve düzeyleri her biri 0-3 arası skorlama, ayrıca atrofi ve intestinal metaplazi varlığı, Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildi (139).

İkinci doktora tez projesi kapsamında 120 hastanın 67'sinin antrum, 63'ünün korpus gastrik biypsi örnekleri alındı, 32 hastanın ise hem antrum hem korpus gastrik biyopsi örnekleri Uzman Endoskopist tarafından histopatolojik inceleme gerekli görülmediği için alınamadı. Sadece antrumdan 21 hastanın, korpustan 25 hastanın gastrik biyopsi örnekleri alınamadı. Histopatolojik incelemesi yapılan 88 hastanın, 42'sinin antrum ve korpus, 26'sının sadece antrum, 21'inin sadece korpus gastrik biyopsi örneklerinden histopatolojk inceleme yapıldı.

HLO varlığı, histopatolojik tanı ve doku hasarı, aynı zamanda aktivite (pitlerde PNL inflamatuvar hücrelerin varlığı ve düzeyi), kronisite (lamina propriada MNH inflamatuvar hücrelerin varlığı ve düzeyi), ayrıca atrofi ve intestinal metaplazi varlığı incelendi. Bu veriler yaş, cinsiyet, endoskopik bulgular, kültür ve RT RT-PCR bulguları ile birlikte değerlendirildi, istatistiksel analizleri yapıldı.

3.6.7. *Helicobacter pylori Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi*

Çalışmaya alınan toplam 120 hasta içerisinde HÜT ve histopatoloji bulgularının ikisinin birlikte pozitif olduğu hastalar *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olarak değerlendirildi. HÜT ve histopatoloji bulgularının ikisinin birlikte negatif olduğu hastalar *H. pylori* enfeksiyonu negatif olarak değerlendirildi.

Ayrıca, çalışmaya alınan toplam 120 hastada HÜT, histopatoloji ve/veya kültürün en az ikisinin birlikte pozitif olduğu hastalar *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olarak değerlendirildi.

HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularının üçünün birlikte negatif olduğu hastalar *H. pylori* enfeksiyonu negatif olarak değerlendirildi.

3.6.8. *Real-time Reverse Transcriptase PCR (RT RT-PCR)*

3.6.8.1. *Helicobacter pylori* Genlerine (*cagA, omp6, omp13, omp18, omp20* Hedef Genler,16S rRNA ve *ureA* "house-keeping" genler) Özgül Primer ve Probların Seçilmesi

H. pylori'nin *cagA*, *omp6*, *omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* hedef genleri ayrıca 16S rRNA ve *ureA* "house-keeping" genlerinin ekpresyonunun araştırılması için "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" veri tabanında *H. pyori* 26695 suşunun *cagA*, *omp6*, *omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* gen dizileri, ayrıca *H. pylori* G27 ve P12 suşlarının sırasıyla 16S rRNA ve *ureA* house-keeping gen dizileri incelenip "Roche Universal Probe Library (UPL)" online programı kullanılarak bu gen bölgelerine spesifik primerler ile TaqMan probları birlikte tarandı. Aynı zamanda NCBI veri tabanındaki "Primer-BLAST" programı kullanılarak yukarıda belirtilen *H. pylori* suşları ile ilgili elde edilen primerlerin *H. pylori*'deki hedef template'lere özgüllüğü kontrol edildi. Ayrıca Word programı da kullanılarak çoğaltılacak bölge (amplikon) incelendi ve özgül oldukları sonucuna varıldı.

i. cagA (cag26, HP0547) Gen Primerleri

Left/forward primer (21 nükleotit) : 5´ACCACCGACATACAAGGCTTA 3´

Right/reverse primer (25 nükleotit) : 5´ATTACCCCTTTCATCAAGTAAATCC 3´

Forward primer 685-705 pozisyonda ve reverse primer 720-744 pozisyonda *cagA* geninde yer alan 60 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı (Tm) 59°C olarak belirtilmiştir. Ayrıca "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #124 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

ii. omp6 (hopA, HP0229) Gen Primerleri

Left/forward primer (18 nükleotit) : 5´ TTAATGCAAGCGGGAACG 3´

Right/reverse primer (22 nükleotit) : 5´ TCATGCTAGTGATGGCGTTAAA 3´

Forward primer 491-508 pozisyonda ve reverse primer 532-553 pozisyonda *omp6* geninde yer alan 63 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı

(Tm) 60°C olarak belirtilmiştir ve "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #145 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

iii. omp13 (oipA, HP0638) Gen Primerleri

Left/forward primer (23 nükleotit) : 5′ GCCTTAAATGCAGTGAAAGATTC 3′

Right/reverse primer (21 nükleotit) : 5′ CCCAAAGCTGAGCTCATTAAA 3′

Forward primer 160-182 pozisyonda ve reverse primer 232-252 pozisyonda *omp13 (oipA)* geninde yer alan 93 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı (Tm) 59°C olarak belirtilmiştir ve "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #138 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

iv. omp18 (HP1125) Gen Primerleri

Left/forward primer (22 nükleotit) : 5′ TGCAAAAAGCTAAAGAAAACCA 3′

Right/reverse primer (20 nükleotit) : 5′ CGCTAGAGCCAAATTCATCG 3′

Forward primer 230-251 pozisyonda ve reverse primer 279-298 pozisyonda *omp18* geninde yer alan 69 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı (Tm) forward primer için 59°C, reverse primer için 60°C olarak belirtilmiştir ve "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #97 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

v. omp20 (alpA, HP0912) Gen Primerleri

Left/forward primer (20 nükleotit) : 5′ TGTGAAATTGCATGGGAAAA 3′

Right/reverse primer (22 nükleotit) : 5′ TCATCCTCATACCGAAGTCAAA 3′

Forward primer 1257-1276 pozisyonda ve reverse primer 1303-1324 pozisyonda *omp20 (alpA)* geninde yer alan 68 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı (Tm) 59°C olarak belirtilmiştir ve "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #154 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

vi. ureA (HPP12_0077) House-Keeping Gen Primerleri

Left/forward primer (21 nükleotit) : 5′ GCTTCAATACCCACTTCATGG 3′

Right/reverse primer (22 nükleotit) : 5′ GCACTCTTTTAAAACCGGATGA 3′

Forward primer 404-424 pozisyonda ve reverse primer 452-473 pozisyonda *ureA* geninde yer alan 70 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı (Tm) forward primer için 59°C**,** reverse primer için 60°C olarak belirtilmiştir ve "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #158 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

vii. 16S rRNA (HPG27_1093) House-Keeping Gen Primerleri

Left/forward primer (25 nükleotit) : 5′ TTTATTGCGATTTAGTAGGGCTTAG 3′

Right/reverse primer (24 nükleotit) : 5′ CCTTTGGATTTCTATGACTTTTCC 3′

Forward primer 255-279 pozisyonda ve reverse primer 305-328 pozisyonda 16S rRNA geninde yer alan 74 nükleotit dizisi içeren bölgeyi amplifiye eder. Primerlerin erime sıcaklığı (Tm) 59°C olarak belirtilmiştir ve "Roche Universal Probe Library" online programı kullanılarak bu primerler (TIB Molbiol) ile ilgili #31 nolu TaqMan probu (Roche Applied Science) belirlendi (140).

3.6.8.2. Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Çalışması

H. pylori ile enfekte hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden (ilk alınan hastalarımızda antrum ve korpus birlikte, daha sonra alınan hastalarımızda ise iki antrum ve iki korpus ayrı ayrı) elde edilen total RNA'dan cDNA dönüşümü yapılarak *H. pylori*'nin patogenezinde rol oynayan virülans genlerinden *cagA* geni ve dış membran proteinleri ile ilgili *omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* genleri, ayrıca 16S rRNAve *ureA* house-keeping gen dizileri spesifik olarak çoğaltıldı, TaqMan prob RT RT-PCR yöntemi ile eşik döngüsü (Cycle threshold, Ct), değerleri belirlenerek rölatif gen ekspresyonu araştırıldı. Çalışmamızda önce pozitif ve negatif kontroller olarak standart bakteri suşları kullanılarak RT RT-PCR testinin standardizasyon çalışmaları aşağıda açıklandığı üzere herbir basamak için prosedürüne göre yapıldı (140).

3.6.8.3. Pozitif ve Negatif Kontrollerin RT RT-PCR Gen Ekspresyon Çalışması

3.6.8.3.1. *Real-time RT-PCR Testin Standardizasyonu ve Pozitif Kontrolün Uygulanması*

RT RT-PCR çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 (*cagA, vacA, oipA* ve *babA* pozitif) standart suşunun* beş farklı [*H. pylori* (H.p) suş 1-5] stok suşları iki farklı içerikli kültür besiyerinde yapılan subkültürlerinden bakteriyal RNA ekstraksiyonu yapıldı. Daha sonra prosedürde belirtildiği gibi cDNA sentezi yapıldı ve elde edilen cDNA'lar pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere ve ayrıca uygulanan RT RT-PCR testi sonucunda en iyi gen ekspresyonu gösteren veya sahip H.p stok standart suşunun tüm test runlarında pozitif kontrol olarak çalışılabilmesi için seçiminin yapılması amacı ile RT RT-PCR yöntemi ile çalışıldı:

1) *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun H.p-1, H.p-2, H.p-3 ve H.p-5 stok besiyerindeki suşları için %7 defibrine at kanlı, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyeri ve H.p-4 için %1 çözünebilir hemoglobinli, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyeri kullanılarak subkültürleri yapıldı. GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 72 saat enkübe edildi.

2) *H. pylori* kültüründe üreyen kolonilerden alınıp 2 ml DNase/RNase free PBS (pH=7.2) (Biochrom AG) kullanılarak 10 ml'lik steril burgulu kapaklı tüpte (Isolab) bakteri süspansiyonu hazırlandı. %7 defibrine at kanlı, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyerinde H.p-1 stok subkültüründen hazırlanan PBS içerisindeki bakteri süspansiyonunun bulanıklığı spektrofotometre cihazı (Densimat, BioMerieux, Italy) ile McFarland 1 (~$3X10^8$ CFU/ml)'e ayarlanırken H.p-2, H.p-3 ve H.p-5 stok subkültürleri için bakteri süspansiyonunun bulanıklığı McFarland 3 (~$9X10^8$ CFU/ml)'e ayarlandı. %1 çözünebilir hemoglobinli, *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyerinde H.p-4 stok subkültüründen hazırlanan bakteri süspansiyonunun bulanıklığı da McFarland 3 (~$9X10^8$ CFU/ml)'e ayarlandı. Bakteri süspansiyonundan 1 ml alınıp 2 ml'lik steril ependorf tüpe konuldu. Santrifüj cihazı (MICRO 120, Hettich, Zentrifugen, Germany) kullanılarak 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant atılıp pelletin üzerine 200 µl PBS eklendi. PBS ile hazırlanan 10^8 CFU/ml bakteri süspansiyonu kryotüp içinde bakteriyal RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi yapılıncaya kadar –80°C'de saklandı. RT RT-PCR testi *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18,*

omp20 (alpA) hedef genleri ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerine uygulandı, kullanılan H.p suşunda en iyi gen ekspresyonu sahip suş değelendirildi.

3) Analitik duyarlılık kapsamında RT RT-PCR testinin saptayabileceği *H. pylori*'nin en düşük bakteriyal cDNA miktarının araştırılması amacı ile *H. pylori* NCTC standart suşundan McFarland 1 (~3X10^8 CFU/ml) CFU/ml bakteri sayısı ile bakteriyal RNA ekstraksiyonu yapıldı. 10^8 CFU/ml bakteri sayısı ile elde edilen *H. pylori* cDNA örneğinden PCR grade saf su (Zymo Research) ile $1/10^1$-$1/10^5$ seri dilüsyonları hazırlandı, negatif kontrol olarak PCR grade saf su (Zymo Research) ile birlikte bu dilüsyonlarda *H. pylori* RT RT-PCR testi sadece *H. pylori* 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerine uygulandı ve *H. pylori* gen ekspresyonunun saptanmasında RT RT-PCR testinin saptayabileceği en düşük bakteriyal cDNA dilüsyonu araştırıldı.

**H. pylori* NCTC 11637 (*cagA, vacA, oipA* ve *babA* pozitif) standart suşu Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından, Sayın Prof. Dr. Müge Demirbilek tarafından Prof. Dr. Özlem Yılmaz'ın diğer bir projesi kapsamında 2006 yılında temin edilmiştir. Kendilerine teşekkür ederiz.

Not: Ayrıca bu proje kapsamında liyofilize olarak satın alınan *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu (DSMZ GmbH Gesellschaft mit beschrankter Haftung, www.dsmz) sulandırılıp canlandırılmaya çalışılmış, ancak kontaminasyon nedeni ile kullanılamamıştır.

3.6.8.3.2. ***Real-time RT-PCR Çalışmasında Negatif Kontrollerin Uygulanması***

Analitik özgüllük kapsamında RT RT-PCR testinin *H. pylori*'nin özgül genleri ile ilgili primer ve probları ile diğer bakterilerin herhangi bir çapraz reaksyona girip girmediğinin araştırılması için standart bakteri suşları negatif kontroller olarak kullanıldı. Bu amaçla *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşları*, ayrıca *Campylobacter jejuni* klinik izolatının* RNA'ları ekstrakte edilip cDNA'ları sentezlenerek RT RT-PCR testinin uygulanmasında negatif kontrol olarak kullanılan PCR grade saf su (Zymo, Research) yanı sıra negatif kontroller olarak kullanıldı:

1) *E. coli* ve *S. aureus* standart suşlarının subkültürü %7 at kanlı Columbia Blood agar besiyeri kullanılarak yapıldı ve 37°C'de 24 saat enkübe edildi. *C. jejuni* klinik izolatının subkültürü ise %7 at kanı ve *H. pylori* selektif suplement (DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyerinde yapıldı. GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 72 saat enkübe edildi.

2) *E. coli*, *S. aureus* ve *C. jejuni* subkültürlerinde üreyen kolonilerden alınıp 2 ml DNase/RNase free PBS (Biochrom AG) (pH=7.2) kullanılarak 10 ml'lik steril burgulu kapaklı (Isolab) tüplerde her biri için ayrı ayrı bakteri süspansiyonları hazırlandı. Bakteri süspansiyonunun bulanıklığı spektrofotometre cihazı (Densimat, BioMerieux, Italy) ile McFarland 1 (~3X10^8CFU/ml)'e ayarlandı. Bakteri süspansiyonundan 100 µl alınıp PBS ile hacmi 1 ml'ye tamamlandı ve 1.5 ml'lik steril ependorf tüplere konuldu. Soğutmalı santrifüj cihazı (MICRO 200R Hettich, Germany) kullanılarak 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelletin üzerine 200 µl PBS eklendi, çözüldü. PBS ile hazırlanan 10^7 CFU/ml bakteri süspansiyonu kryotüp içinde bakteriyal RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi yapılıncaya kadar –80°C'de saklandı. RT RT-PCR testi sadece *H. pylori* 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerine uygulandı.

**Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşları, ayrıca *Campylobacter jejuni* klinik izolatı Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, o dönem Bakteriyoloji laboratuvarı sorumlusunun izinleri ile temin edilmiştir.

3.6.8.3.3. ***Bakteriyal RNA Ekstraksiyonu***

Bakteriyal RNA ekstraksiyonu için yukarıda belirtilen aşamalarla hazırlanan *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (H.p suş 1-5) ve yukarıda belirtilen diğer üç bakteri süspansiyonları –80°C'den çıkartılıp çözündürüldü.

Her bir bakteri süspansiyonundan *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (H.p suş 1-5) stok suşların subkültürlerinden hazırlanan bakteriyal süspansiyonundan 10^8 CFU/ml bakteri sayısı ile bakteriyal RNA ekstraksiyonu yapıldı. *E. coli*, *S. aureus* ve *C. jejuni* negatif kontroller için 10^7 CFU/ml bakteri sayısı ile bakteriyal RNA ekstraksiyonu yapıldı. Uygulanan protokole göre basamak basamak aşağıda açıklanmıştır:

1) 1 ml TriPure İzolasyon reajini, seramik "beads" (MagNA Lyser Green Beads, Cat. No. 03358941001, Version 4.0, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) içeren 2 ml'lik tüpe konuldu.
2) Bakteri süspansiyonları –80°C'den çıkartılıp eritildi, PBS ile hazırlanan 200 µl her bir bakteri süspansiyonundan alınıp hemen TriPure ve seramik "beads" içeren tüpe eklendi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi.

3) Tüpler Homojenizatör cihazına (MagNA Lyser, Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) yerleştirilip 4.500 rpm'de 45 saniye homojenizasyon yapıldı. Sonra +4˚C soğuk bloğun üzerine konulup birkaç dakika soğutulduktan sonra tekrar 4.500 rpm'de 45 saniye homojenize edildi. Böylece hücre duvarı parçalanıp bakteriyal RNA'lar açığa çıktı.
4) Homojenize edilmiş bakteriyal süspansiyonları oda ısısında 10 dakika ışıktan korunarak karanlıkta bekletildi.
5) Her bir tüpe 200 µl kloroform (Merck) eklendi, 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 15 dakika enkübe edildi.
6) Soğutmalı santrifüj cihazı (MICRO 200R Hettich, Germany) kullanılarak 12.000 x g'de (+4˚C) 25 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda solüsyonumuzda üç faz oluştu: en altta kırmızı renkte protein, ortada beyaz mat DNA ve en üstte şeffaf RNA fazı.
7) Pipet ile üstteki şeffaf tabaka (1. renksiz faz) 450-500 µl arası bakteriyal RNA toplandı, 1.5 ml'lik DNase/RNase free steril ependorf tüplere aktarıldı ve her birinin üzerine 500 µl izopropanol (Sigma-Aldrich) eklendi, yavaşça alt üst edilerek oda ısısında 10 dakika rotatörde bekletildi. Böylece proteinler uzaklaştırıldı ve bakteriyal RNA'lar çöktü. Bakteriyal RNA'ların verimliliğini arttırmak amacıyla –80˚C'de bir gece bekletildi.
8) 12.000 x g'de (+4˚C) 12 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant pipetle atıldı. Sonra bakteriyal RNA'ları çöktürmek için pelletin üzerine 1 ml %75 etanol (Merck) eklendi. Kısaca 1-2 saniye vortekslendi (Bio Vortex V1 HDV Life Sciences) ve 7.500 x g'de 6 dakika santrifüj edildi.
9) Pelleti çözmeden supernatant (etanol) pipetle toplandı ve atıldı (önce büyük sonra küçük pipet ucu kullanılarak). Pelleti içeren ependorf tüplerin kapağı açık bırakılarak ~45 dakika kuru ısı bloğu cihazında (TS-100 Thermo-shaker, Biosan, Latvia) 57˚C'de kurutuldu. Pelletin çözülmesi zor olmasın diye fazla kurutulmaması dikkate alındı.
10) Elde edilen bakteriyal RNA'lar 50 µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklenerek çözüldü. Birkaç yanda kalan damlaların çökmesi için santrifüjlendi, elde edilen bakteriyal RNA miktarları spektrofotometre cihazı (NanoDrop 2000 Thermo Scientific, USA) ile ölçüldü ve –80°C'ye kaldırıldı (141).

3.6.8.3.4. ***Transcriptor First Strand cDNA Sentezi (Reverse Transcription)***

Her bir bakteri süspansiyonundan *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (H.p suş 1-5) stok suşlarının subkültürlerinden hazırlanan bakteriyal süspansiyonundan 10^8 CFU/ml bakteri sayısı ile bakteriyal RNA ekstraksiyonu yapıldı. *E. coli*, *S. aureus* ve *C. jejuni* negatif kontrolleri için 10^7 CFU/ml bakteri sayısı ile bakteriyal RNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra bakteriyal cDNA sentezi kit protokolünde belirtilen prosedüre göre aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

Bakteri süspansiyonundan ekstrakte ettiğimiz bakteriyal RNA'ları cDNA'ya çevirmek için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" kiti (Roche Applied Science) kullanıldı. Tüm reaktifler –80˚C'den çıkartılıp eritildi ve uygulamaya başlamadan önce öncelikle 5 dakika spin yapıldı. Tüm reaktifler soğuk bloğun içine konularak blokların içinde steril, nükleaz-free, ince duvarlı PCR tüplerine aşağıdaki gibi 20 µl'lik bir reaksiyon için "template-primer" karışımı hazırlanıp eklendi:

1) 200 µl'lik ince duvarlı her bir PCR tüpüne 2 µl random hekzamer primerleri eklendi.
2) Daha önce hazırlanan ve soğuk bloğun içinde tutulan RNA örneklerinden alınıp her bir tüpe 11 µl eklendi (toplam hacim 13 µl).
3) PCR tüpleri termal cycler (TC-4000 Techne, England)'a yerleştirilip SINcDNA1 programı seçilerek 10 dakika 65°C'de ısıtılarak "template-primer" karışımı denaturasyonu yapıldı. Bakteriyal RNA'lar tekrar birbirinin üzerine katlanmasın diye hemen buz içine konularak soğutuldu. "Template-primer" karışımını içeren PCR tüpünde 20 µl'lik bir reaksiyon olacağından dolayı her bir tüpe 7 µl RT master miks aşağıdaki gibi hazırlanıp eklendi:

		1X	**10X**
a)	Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)	0.5 µl	5 µl
b)	Transcriptor Reverse Transcriptase Reaksiyon Bufferi (5X)	4 µl	40 µl
c)	Deoksinükleotit Miks (her biri 10 mM)	2 µl	20 µl
d)	Koruyucu RNase inhibitörü (40 U/µl)	0.5 µl	5 µl
	Toplam hacim →	7 µl	70 µl

Beş pozitif ve üç negatif kontrol uygulamaları için 10 bakteriyal RNA örneği göz önüne alınarak 10X RT master miks hazırlandı ve her bir tüpe 7 µl dağıtıldı. Her tüpte daha önceki 2 µl random hekzamer ve 11 µl RNA (toplaml hacim 13 µl) karışımına 7 µl RT master miks de

eklendiği için son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde sağlandı. 0.2 ml'lik PCR tüpleri termal cycler (TC-4000 Techne, England)'a yerleştirilmeden önce 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (spin) edildi.

4) Random hekzamer primerlerin kullanıldığından dolayı ve bakteriyal hedef RNA 4 kb'dan büyük olduğu için termal cycler'da SINcDNA2 programı kullanılarak amplifikasyon aşaması aşağıdaki gibi ayarlandı:
   - 25° C'de 10 dakika
   - 55° C'de 60 dakika
   - 85° C'de 5 dakika (85° C'de 5 dakika ısıtmakla, reverse taranscription reaksiyonu inaktive oldu). Tüpler termal cycler içerisinde +4˚C'ye kadar soğutulduğunda reaksiyon sonlandı.

PCR tüpleri parafilm ile iyice kapatılarak bakteriyal cDNA örnekleri RT RT-PCR uygulanana kadar –20˚C'de saklandı (142).

E. coli, *S. aureus* ve *C. jejuni* standart suşlarının cDNA'ları negatif kontrol olarak RT RT-PCR çalışmasında yer alan protokollere göre sadece *H. pylori* 16S rRNA ve *ureaA* house-keeping genleri ile ilgili prob ve primerler kullanılarak herhangi bir çapraz reaksiyon olup olmadığı yönünden uygulandı ve değerlendirildi.

3.6.8.4. Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinin Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Çalışması

3.6.8.4.1. *Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinden Total RNA Ekstraksiyonu*

Daha önceden –80°C'de saklanan antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin total RNA'larını elde etmek için TriPure İzolasyon Reajin kiti (Roche Applied Science, Version June 2008, Germany) kullanılarak total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Çalıştığımız süre içerisinde pudrasız eldiven kullanıldı ve çalışılan bençin üzeri %70'lik etanol ile temizlendi.

İlk alınan hastalarda 10 hastadan tek bir antrum veya korpus gastrik biyopsi örneğinden total RNA ekstraksiyonu yapıldığında pelletin oluşmadığı ve NanoDrop ile ölçüldüğünde yeterli miktarda total RNA elde edilemediği belirlendiğinden dolayı, ilk alınan hastalarda alınmış olan tek bir antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri birleştirilerek total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Bu nedenle daha sonra alınan hastalar için iki antrum, iki korpus gastrik biyopsi örnekleri alındı ve bu biyopsi örneklerinden ayrı ayrı total RNA ekstraksiyonu

yapıldı. Total RNA ekstraksiyon kit prosedüründe belirtilen protokole göre her bir basamak aşağıda açıklandığı şekilde uygulandı:

1) İlk alınan hastalarda, sadece bir antrum ve bir korpus birleştirilerek, daha sonraki hastalarda iki antrum ve iki korpus biyopsi örneği için 1 ml TriPure İzolasyon reajini, seramik "beads" (MagNA Lyser Green Beads, Cat. No. 03358941001,Version 4.0, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) içeren 2 ml'lik tüpe konuldu.
2) Antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri kryotüpten çıkartılıp TriPure ve seramik "beads" içeren tüpe alındı ve oda ısısında 10 dakika bekletildi.
3) Tüpler Homojenizatör cihazına (MagNA Lyser, Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) yerleştirilip 4.500 rpm'de 45 saniye homojenizasyonu yapıldı. Sonra +4˚C soğuk bloğun üzerine konulup birkaç dakika soğutulduktan sonra tekrar 4.500 rpm'de 45 saniye homojenize edildi. Böylece hücre duvarı parçalanıp total RNA'lar açığa çıktı. Bazı durumlarda antrum veya korpus gastrik biyopsi örneğinin tam homojenize haline gelmesi için bu işlem dört kez tekrarlandı.
4) Homojenize edilmiş gastrik biyopsi örnekleri oda ısısında 10 dakika ışıktan korunarak karanlıkta bekletildi.
5) Her bir tüpe 200 µl kloroform (Merck) eklendi, 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 15 dakika enkübe edildi.
6) Soğutmalı santrifüj cihazı (MICRO 200R Hettich, Germany) kullanılarak 12.000 x g'de, +4˚C de, 25 dakika santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda solüsyonumuzda üç faz oluştu: en altta kırmızı renkte protein, ortada beyaz mat DNA ve en üstte şeffaf total RNA fazı. Kloroform homojen hale gelen dokuda faz oluşumunu sağlar. Böylece RNA, DNA ve protein elde edilir.
7) Pipet ile üstteki şeffaf tabaka (1. renksiz faz) 450-500 µl arası total RNA toplandı, 1.5 ml'lik DNase/RNase free steril ependorf tüplere aktarıldı ve her birinin üzerine 500 µl izopropanol (Sigma-Aldrich) eklendi, yavaşça alt üst edilerek oda ısısında 10 dakika rotatörde bekletildi. Böylece proteinler uzaklaştırıldı ve total RNA'lar çöktü. İlk alınan hastaların gastrik biyopsiörnekleri için önce –20˚C'de 30 dakika, sonra –80˚C'de 1 saat ve daha sonra alınan hastaların gastrik biyopsi örnekleri için total RNA'ların verimliliğini arttırmak amacı ile –80˚C'de bir gece bekletildi.
8) İlk alınan hastaların çalışmasında tüpler 14.000 x g'de, +4˚C de, 25 dakika ve daha sonra alınan hastaların çalışmasında tüpler 12.000 x g'de, +4˚C de, 12 dakika santrifüj

edildikten sonra süpernatant pipetle atıldı. Sonra total RNA'ları çöktürmek için pelletin üzerine 1 ml %75 etanol (Merck) eklendi. Kısaca 1-2 saniye vortekslendi (Bio Vortex V1 HDV Life Sciences, USA), oluşan beyaz pelletin üzerine etanol (Merck) eklenerek pipet ile çözmeden sadece yıkanıp tekrar ilk çalışmada tüpler 14.000 x g 'de, +4˚C de, 25 dakika, ikinci çalışmada ise tüpler 7.500 x g'de, +4˚C de, 6 dakika santrifüj edildi.

9) Pelleti çözmeden süpernatant (etanol) pipetle toplandı ve atıldı (önce büyük sonra küçük pipet ucu kullanılarak). Pelleti içeren ependorf tüplerin kapağı açık bırakılarak ~45 dakika kuru ısı bloğu cihazında (TS-100 Thermo-shaker, Biosan, Latvia) 57˚C'de kurutuldu. Pelletin çözülmesi zor olmasın diye fazla kurutulmaması dikkate alındı.
10) Elde edilen total RNA'lar 50 µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklenerek çözüldü. Birkaç yanda kalan damlaların çökmesi için santrifüjlendi, elde edilen total RNA miktarları ölçüldü (NanoDrop 2000 Thermo Scientific, USA) ve –80°C'ye kaldırıldı (141).

3.6.8.4.2. ***Elde Edilen Total RNA'ların Ölçümünün Yapılması***

Elde edilen total RNA'ların ölçümü NanoDrop spektrofotometre cihazı (2000 Thermo Scientific, USA) ile yapıldı. Özel pipet ucu kullanılarak pipetör ile 2 µl total RNA'dan alınıp cihaza yerleştirildi. Cihazın modu RNA ölçümüne ayarlandı ve bakıldı. İşlem sırasında total RNA'lar buz içinde tutuldu. Total RNA'ların A260/A280 absorbans değerleri ile ilgili veriler bilgisayar ortamına kaydedildi ve her bir hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri birlikte, diğer alınan hastaların antrum ve korpusu için ayrı ayrı değerlendirildi. Her bir örnekteki sonuçların oluşturduğu absorbans değerleri birinci ve ikinci örnekte 2.3, diğer tüm örneklerde 1.8-2.0 arasında bulundu. Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi yapılmak üzere total RNA örneklerini içeren mikrotüpler parafilm ile iyice kapatılarak –80˚C'de saklandı. Total RNA örneklerinin kalitesi değişmeden 3 ay-3 yıla kadar saklanabilir (140,141). Total RNA örneklerinin konsantrasyonu ile ilgili herhangi bir işlem veya eşitleme yapılmadı.

3.6.8.4.3.***Transcriptor First Strand cDNA Sentezi (Reverse Transcription)***

Antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden ekstrakte ettiğimiz total RNA'ları cDNA'ya çevirmek için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" kiti (Roche Applied

Science) kullanıldı. Tüm reaktifler –80˚C'den çıkartılıp eritildi ve uygulamaya başlamadan önce öncelikle 5 dakika spin yapıldı. Tüm reaktifler soğuk bloğun içine konularak blokların içinde steril, nükleaz-free, ince duvarlı PCR tüplerine aşağıdaki gibi 20 µl'lik bir reaksiyon için "template-primer" karışımı hazırlanıp eklendi:

1) 200 µl'lik ince duvarlı her bir PCR tüpüne 2 µl random hekzamer primerleri eklendi.
2) Daha önce hazırlanan ve soğuk bloğun içinde tutulan total RNA örneklerinden alınıp her bir tüpe 11 µl eklendi (toplam hacim 13 µl).
3) PCR tüpleri termal cycler (TC-4000 Techne, England)'a yerleştirilip SINcDNA1 programı seçilerek 10 dakika 65°C'de ısıtılarak "template-primer" karışımı denatürasyonu yapıldı ve total RNA'lar tekrar birbirinin üzerine katlanmasın diye hemen buz içine konularak soğutuldu. "Template-primer" karışımını içeren her bir PCR tüpünde 20 µl'lik bir reaksiyon olacağından dolayı her bir tüpe 7 µl RT master miks aşağıdaki gibi hazırlanıp eklendi:

	1X	**20X**
a) Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)	0.5 µl	10 µl
b) Transcriptor Reverse Transcriptase Reaksiyon Buffer (5X)	4 µl	80 µl
c) Deoksinükleotit Miks (her biri 10 mM)	2 µl	40 µl
d) Koruyucu RNase inhibitörü (40 U/µl)	0.5 µl	10 µl
Toplam hacim →	7 µl	140 µl

RT master miks hasta örnek sayısı kadar hazırlandı ve her bir tüpe 7 µl dağıtıldı. Her tüpte daha önceki 2 µl random hekzamer ve 11 µl total RNA (toplam hacim 13 µl) karışımına RT master miks deeklendiği için son reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde sağlandı. 0.2 ml'lik PCR tüpleri termal cycle (TC-4000 Techne, England)'a yerleştirilmeden önce 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (spin) edildi.

4) Random hekzamer primerlerin kullanıldığından dolayı ve total hedef RNA 4 kb'dan büyük olduğu için termal cycler'da SINcDNA2 programı kullanılarak amplifikasyon aşaması aşağıdaki gibi ayarlandı:
   - 25°C'de 10 dakika
   - 55°C'de 60 dakika
   - 85°C'de 5 dakika (85°C'de 5 dakika ısıtmakla, reverse transcription reaksiyonu inaktive oldu). Tüpler +4˚C'ye kadar soğutulduğunda reaksiyon sonlandı.

PCR tüpleri parafilm ile iyice kapatılarak cDNA örnekleri RT RT-PCR uygulanana kadar –20˚C'de saklandı (142).

3.6.8.5. Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Deneyleri

3.6.8.5.1. *Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Formatının Tasarlanması*

Doksan altı kuyucuklu bir pleyt formatı tasarlanarak LightCycler 480 II/96 cihazı (Roche Applied Science Ltd., Rotkreuz, Switzerland) ile hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden ayrıca pozitif ve negatif kontrol bakterilerden elde edilen cDNA'ları kullanılarak *H. pylori*'nin *cagA*, OMPs ile ilgili *omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* hedef genleri ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping gen dizilerini spesifik olarak çoğaltıp eşik döngüsü (Cycle threshold, Ct) değerleri belirlenerek normalize edilmiş ΔCt değerleri (gen ekspresyon düzeyleri) elde edildi. Kullanılan primerlerin erime sıcaklığı aynı olduğu için (59-60˚C) RT RT-PCR gen ekspresyon deneyi tüm genler için aynı "run"'da çalışıldı (140).

i. Pozitif/Negatif Bakteriyal Kontrollerde RT-PCR Reaktiflerinin Hazırlanması

Pleytin her bir kuyucuğunda 20 µl'lik bir RT RT-PCR reaksiyonu yapılacağı için tüm prob master (HotStart Taq DNA polimeraz enzimi, Roche Applied Science), primerler ve probların konsantrasyonu ve kullanılacak miktarları aşağıdaki gibi hazırlandı:

Konsantrasyon	Ana stok	Ara stok	Son	X hacim
Prob master (HotStart Taq DNA polimeraz enzimi)	2X	–	X	10 µl
Primer left	20 µM	5 µM	0.5 µM	2 µl
Primer right	20 µM	5 µM	0.5 µM	2 µl
Prob	10 µM	2 µM	0.2 µM	2 µl
PCR grade saf su	–	–	–	2 µl
Bakteriyal cDNA	–	–	–	2 µl
			Son hacim →	20 µl

1) HotStart Taq DNA polimeraz enzimi ana stoğu –20˚C'den çıkartılıp oda ısısında çözündürüldü. Bu enzimin ana stoğu direkt olarak pleytin her bir kuyucuğuna 10 µl ekleneceği için ara stoğu hazırlanmadı. Ana stok tekrar kullanılıncaya dek –20˚C'de saklandı.

HotStart Taq DNA polimeraz enzim solüsyonu magnezyum (Mg) iyonu içerdiği için bu iyonun eklenmesine gerek kalmadı.

2) Liyofilize halinde olan ve +4˚C'de saklanan primerler (TIB Molbiol) sulandırıldı. Primerler sulandırılmadan önce 1.500 rpm'de 1 dakika santrifüj (spin) edildi. Her vialın içerdiği primer konsantrasyonu farklı olduğu için belirlenen miktarda PCR grade saf su (Zymo Research) eklenerek sulandırıldı. Böylece primerlerin konsantrasyonu 20 µM olacak şekilde ana stokları elde edildi:

a) *cagA* left primer için 216 µl ve right primer için 195 µl PCR grade saf su eklendi.
b) *omp6* left primer için 239 µl ve right primer için 206 µl PCR grade saf su eklendi.
c) *omp13* left primer için 192 µl ve right primer için 214 µl PCR grade saf su eklendi.
d) *omp18* left primer için 180 µl ve right primer için 232 µl PCR grade saf su eklendi.
e) *omp20* left primer için 206 µl ve right primer için 211 µl PCR grade saf su eklendi.
f) 16S rRNA left primer için188 µl ve right primer için 222 µl PCR grade saf sueklendi.
g) *ureA* left primer için 236 µl ve right primer için 208 µl PCR grade saf su eklendi.

3) Primer ve probların ana stoklarından ara stoğunu hazırlamak için beş pozitif, üç negatif kontrol suşları ayrıca PCR grade saf su uygulamalarında 10 cDNA örneği göz önüne alınarak kullanılacak miktarları M1.V1=M2.V2 formül ile hesaplandı. Problar işığa karşı hassas olduğu için işıktan korunarak karanlıkta bekletildi (140).

ii. Pozitif/Negatif Bakteriyal Kontrollerde RT-PCR Master Miksin Hazırlanması

Beş pozitif, üç negatif bakteriyal kontrollerin, ayrıca PCR grade saf su negatif kontrol olarak uygulamaları göz önüne alınarak 7 gen için toplam 7 adet 10X master miks (kokteyl) aşağıdaki gibi hazırlandı (140).

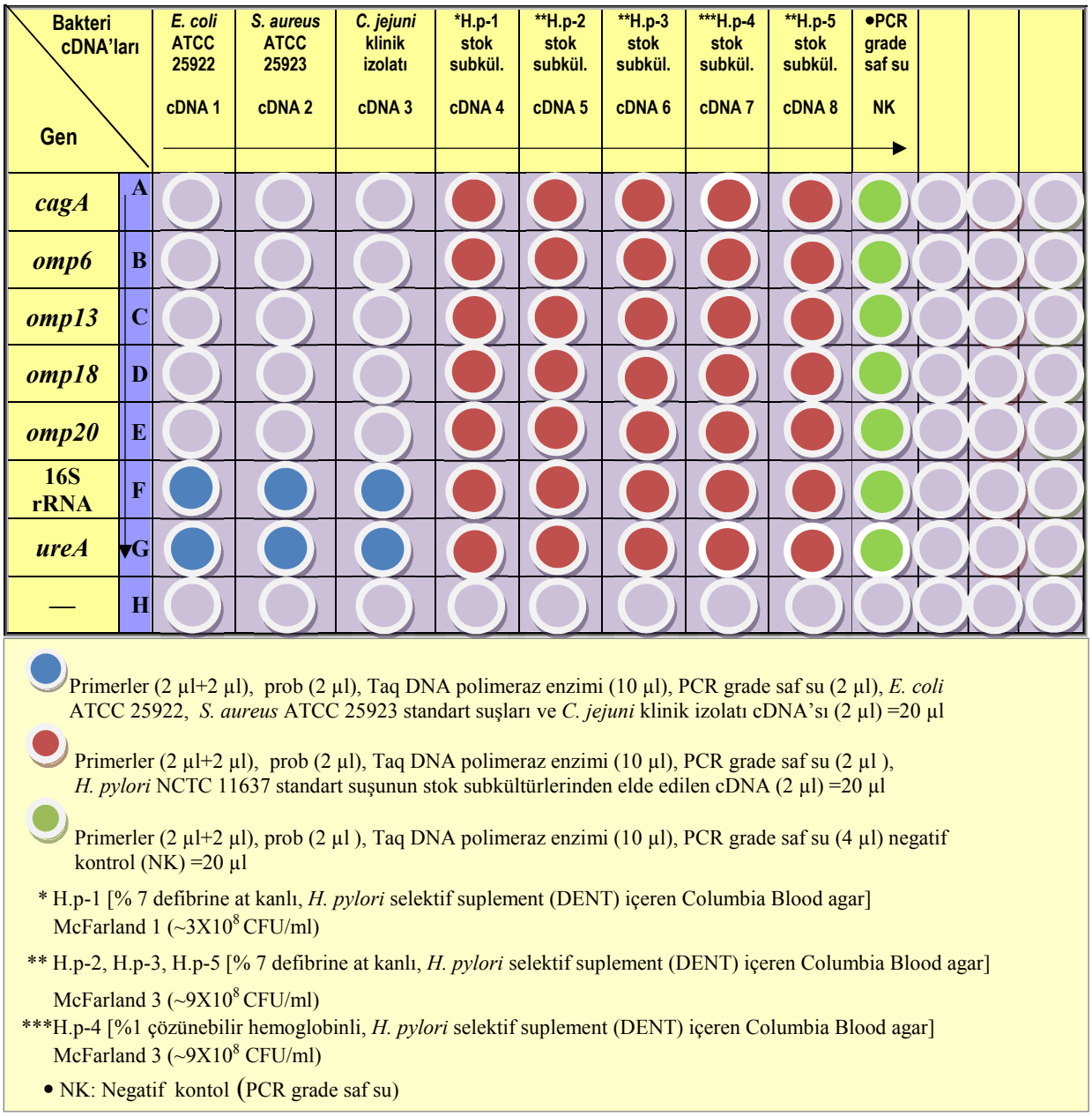
	1X	**10X**
Prob master (HotStart Taq DNA polimeraz)	10 µl	100 µl
TaqMan Prob	2 µl	20 µl
Primer (left)	2 µl	20 µl
Primer (right)	2 µl	20 µl
PCR grade saf su	2 µl	20 µl
----------	----------	--------
Master Miks	18 µl	180 µl
Bakteriyal cDNA	+ 2 µl	
Pleytin her bir kuyucuğunda son reaksiyon hacmi →	20 µl	

3.6.8.5.2. ***Pozitif ve Negatif Kontrol Suşlarının cDNA Örneklerine Real-time RT-PCR Testinin Uygulanması (Standart suşların çalışılması)***

RT RT-PCR testinin standardizasyonunda 96 kuyucuklu pleytte (Roche Applied Science) yer alan A, B, C, D, E, F, G ve H olmak üzere her bir sırada çalışılacak her bir gen için master miks aşağıdaki gibi 1.-9. sıralarda yer alan her bir kuyucuğa 18 µl soldan sağa doğru eklendi.

H. pylori NCTC 11637 standart suşunun beş farklı (H.p suş 1-5) stok suşları pozitif kontrol olarak McFarland 1 (~$3X10^8$ CFU/ml) ve McFarland 3 (~$9X10^8$ CFU/ml); negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 standart suşları ve C. *jejuni* klinik izolatından elde edilen cDNA'ları–20˚C'den çıkartılıp eritildi ve pleytin 1.-3. kuyucuklarına (negatif kontroller) 4.-8. kuyucuklara (pozitif kontroller) yukarıdan aşağıya doğru Şekil 12'de görüldüğü gibi her bir suşun cDNA'sı ikişer µl eklendi.

Pleytin 9. sütunundaki kuyucuklara ise ikişer µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklendi ve negatif kontrol olarak uygulandı. Böylece pleytin her bir kuyucuğunda son RT RT-PCR reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde sağlandı (Şekil 12). Negatif kontrollere sadece *H. pylori* 16S rRNA ve *ureA* primer ve probları uygulandı. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı stoklarının subkültürlerinden elde edilen cDNA'larına *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13 (oipA)*, *omp18*, *omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* primer ve probları eklenerek gen ekspresyon çalışması yapıldı.



Şekil 12. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (beş farklı *H. pylori* H.p 1-5 stok suşları) pozitif kontrol; *E.coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 standart suşları ve *C. jejuni* klinik izolatının negatif kontroller olarak *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13 (oipA)*, *omp18*, *omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* gen ekspresyonunun RT RT-PCR deneyinde 96 kuyucuklu pleyt uygulama düzeni

3.6.8.5.3. ***Real-time RT-PCR Çalışmasında Helicobacter pylori cagA Gen Varlığı ve Ekspresyonunun Araştırılması***

H. pylori NCTC 11637 standart suşunun farklı (H.p-3 suşu) stok suşunda *cagA* geninin varlığı araştırıldı. Bu amaçla %7 defibrine at kanlı, *H. pylori* selektif suplement

(DENT) (Oxoid) içeren Columbia Blood agar besiyerinde H.p-3 subkültüründen spektrofotometre cihazı (Densimat, BioMerieux, Italy) kullanılarak McFarland 3 (~9X10^8 CFU/ml) bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı, bakteri RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi yapıldı. RT RT-PCR deneyinde en iyi sinyal oluşturacağı süspansiyonu araştırmak amacıyla, aynı zamanda bu testin saptayabileceği en düşük cDNA miktarını belirlemek için 10^8 CFU/ml bakteri sayısı ile elde edilen *H. pylori* cDNA örneğinden PCR grade saf su (Zymo Research) ile $1/10^1$-$1/10^5$ seri dilüsyonları hazırlandı, negatif kontrol PCR grade saf su (Zymo Research) ile birlikte *H. pylori cagA* ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin ekspresyonu RT RT-PCR testi ile araştırıldı. "Roche Applied Science" protokolüne göre RT RT-PCR aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirildi (140).

i. Real-time RT-PCR İçin Reaktiflerin Hazırlanması

Pleytin her bir kuyucuğunda son reaksiyon hacmini 20 µl olacak şekilde sağlamak için kullanılacak prob master (HotStart Taq DNA polimeraz enzimi, Roche Applied Science), primerler (TIB Molbiol) ve probların (Roche Applied Science) konsantrasyonları tezin 3.6.8.5.1 (i) bölümünde reaktiflerin hazırlanmasında yer alan protokole göre ayarlandı. Beş cDNA örneği ayrıca negatif kontrol PCR grade saf su uygulamaları göz önüne alınarak reaktifler hazırlandı.

ii. Real-time RT-PCR İçin Master Miksin Hazırlanması

Beş farklı dilüsyonlarda araştıracağımız *cagA*, 16S rRNA ve *ureA* genleri ayrıca negatif kontrol PCR grade saf su uygulamaları göz önüne alınarak 20X master miks (kokteyl) aşağıdaki gibi hazırlandı:

	1X	**20X**
Prob master (HotStart Taq DNA polimeraz)	10 µl	200 µl
TaqMan Prob	2 µl	40 µl
Primer (left)	2 µl	40 µl
Primer (right)	2 µl	40 µl
PCR grade saf su	2 µl	40 µl
----------	----------	--------
Master Miks	18 µl	360 µl
	+	
Bakteriyal cDNA	2 µl	
Pleytin her bir kuyucuğunda son reaksiyon hacmi →	20 µl	

iii. Real-time RT-PCR Testinin 96 Kuyucuklu Pleyt Uygulama Düzeni

Doksan altı kuyucuklu pleytte (Roche Applied Science) yer alan A, B ve C sıraları ile ilgili *cagA*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinin master miksi 1.-6. sıralada yer alan her bir kuyucuğa 18 µl soldan sağa doğru eklendi. *H. pylori* NCTC 11637 suşunun farklı (H.p-3 suşu) stok suşundan McFarland 3 (~$9X10^8$ CFU/ml) ile hazırlanan bakteri süspansiyonundan elde edilen beş cDNA seri dilüsyonları pleytin 1.-5. kuyucuklarına ikişer µl dağıtıldı. Pleytin 6. sütunundaki kuyucuğa ise ikişer µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklendi ve negatif kontrol olarak uygulandı.

Böylece pleytin her bir kuyucuğunda son RT RT-PCR reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde sağlandı. *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı (H.p-3 suşu) stok suşundan elde edilen beş cDNA seri dilüsyonlara *H. pylori cagA*, 16S rRNA ve *ureA* primer ve probları eklenerek RT RT-PCR testi ile farklı cDNA dilüsyonlarda *cagA* geninin varlığı ve ekspresyonu, ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin ekspresyonu yönünden araştırıldı.

3.6.8.5.4. *Antrum ve/veya Korpus Gastrik Biyopsi cDNA Örneklerine Real-time RT-PCR Testinin Uygulanması*

RT RT-PCR deneyimizde 120 hastadan 19'unun antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınamadı. Toplam 120 hastadan ise antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınan 101 hastanın cDNA örnekleri, ayrıca hasta grubumuzdan randomize seçilen 13 antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örnekleri cDNA'ları olmak üzere her bir çalışma run için 50 cDNA'lık RT RT-PCR reaktifleri aşağıda açıklandığı gibi hazırlandı (140).

i. Real-time RT-PCR İçin Reaktiflerin Hazırlanması

Pleytin her bir kuyucuğunda son reaksiyon hacmini 20 µl olacak şekilde sağlamak için kullanılacak prob master (HotStart Taq DNA polimeraz enzimi, Roche Applied Science), primerler (TIB Molbiol) ve probların (Roche Applied Science) konsantrasyonları tezin 3.6.8.5.1 (i) bölümünde reaktiflerin hazırlanmasında yer alan protokole göre aşağıda belirtilen şekilde ayarlandı:

Konsantrasyon	Ana stok	Ara stok	Son	X hacim
Prob master (HotStart enzim)	2X	–	X	10 µl
Primer left	20 µM	5 µM	0.5 µM	2 µl
Primer right	20 µM	5 µM	0.5 µM	2 µl
Prob	10 µM	2 µM	0.2 µM	2 µl
PCR grade saf su	–	–	–	2 µl
Gastrik biyopsi cDNA	–	–	–	2 µl
			Son hacim →	20 µl

1) HotStart Taq DNA polimeraz enzimi ana stoğu –20˚C'den çıkartılıp oda ısısında çözündürüldü. Bu enzimin ana stoğu direkt olarak pleytin her bir kuyucuğuna 10 µl ekleneceği için ara stoğu hazırlanmadı. Ana stok tekrar kullanılıncaya kadar –20˚C'de saklandı. HotStart Taq DNA polimeraz enzim solüsyonu magnezyum (Mg) iyonu içerdiği için bu iyonun eklenmesine gerek kalmadı.

2) Primerlerin konsantrasyonu 20 µM olacak şekilde ana stokları hazırlandı. RT RT-PCR çalışmasında her bir run'da 50 cDNA örneği çalışıldığı için (60 cDNA örneği göz önüne alınarak) her bir kuyucuğa 2 µl primer ekleneceğinden dolayı aşağıdaki formülü kullanarak her bir primerin konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde ara stoğu hazırlandı:

M1.V1=M2.V2

20 µM.V1=5 µM.120 µl

V1=30 µl

0.5 ml'lik ependorf tüpüne 30 µl ana stoktan vortekslendikten sonra alınıp üzerine 90 µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklenerek her bir primer için left ve right olmak üzere 120 µl ara stok hazırlandı.

3) Probların ara stoğunun hazırlanmasında da 60 cDNA örneği göz önüne alınarak her bir kuyucuğa 2 µl prob ekleneceğinden dolayı aşağıdaki formülü kullanarak probların konsantrasyonu 2 µM olacak şekilde ara stoğu hazırlandı:

M1.V1=M2.V2

10 µM.V1=2 µM.120 µl

V1=24 µl

0.5 ml'lik ependorf tüpüne 24 µl ana stoktan santrifüj (spin) edildikten sonra alınıp üzerine 96 µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklenerek probların 120 µl ara stoğu hazırlandı. Problar ışığa hassas olduğu için uygulanana kadar karanlıkta tutuldu. Bu problar deoksinükleotit karışımını (dNTP) içerdiği için bunların eklenmesine gerek kalmadı.

ii. Real-time RT-PCR İçin Master Miksin Hazırlanması

Çalışılacak yedi gen için master miks (kokteyl) aşağıdaki gibi hazırlandı. 50 cDNA örneği için (60 cDNA göz önüne alınarak) her gene özgün primer ve problarla aynı miktarda ve ayrı ayrı olarak 60X (1080 µl) master miks (kokteyl) aşağıdaki gibi hazırlandı:

	1X	**60X**
Prob master (HotStart Taq DNA polimeraz)	10 µl	600 µl
TaqMan Prob	2 µl	120 µl
Primer (left)	2 µl	120 µl
Primer (right)	2 µl	120 µl
PCR grade saf su	2 µl	120 µl
----------	----------	--------
Master miks	18 µl	1080µl
	+	
Gastrik biyopsi cDNA	2 µl	
Pleytin her bir kuyucuğunda son reaksiyon hacmi →	20 µl	

Yedi adet 1.5 ml'lik ependorf tüpü alınıp üzerine ilgili genlerin adı yazıldı. Önce her tüpe 120 µl PCR grade saf su eklendi. Hazırlanan primerlerin ara stokları önce santrifüj edilip sonra spin yapıldı. Her bir primer çiftinden 120 µl (120 µl+120 µl) ilgili tüplere eklendi. Daha sonra hazırlanan probların ara stokları pipetlenip ilgili tüplere 120 µl eklendi. En sonunda her tüpe 600 µl HotStart Taq DNA polimeraz enzimi eklendi ve farklı master miskler için ayrı pipet ucu kullanılarak iyice pipetlendi ve karıştırıldı. Böylece *cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA),* 16S rRNAve *ureA* genleri ile ilgili master miks (kokteyl) hazırlandı.

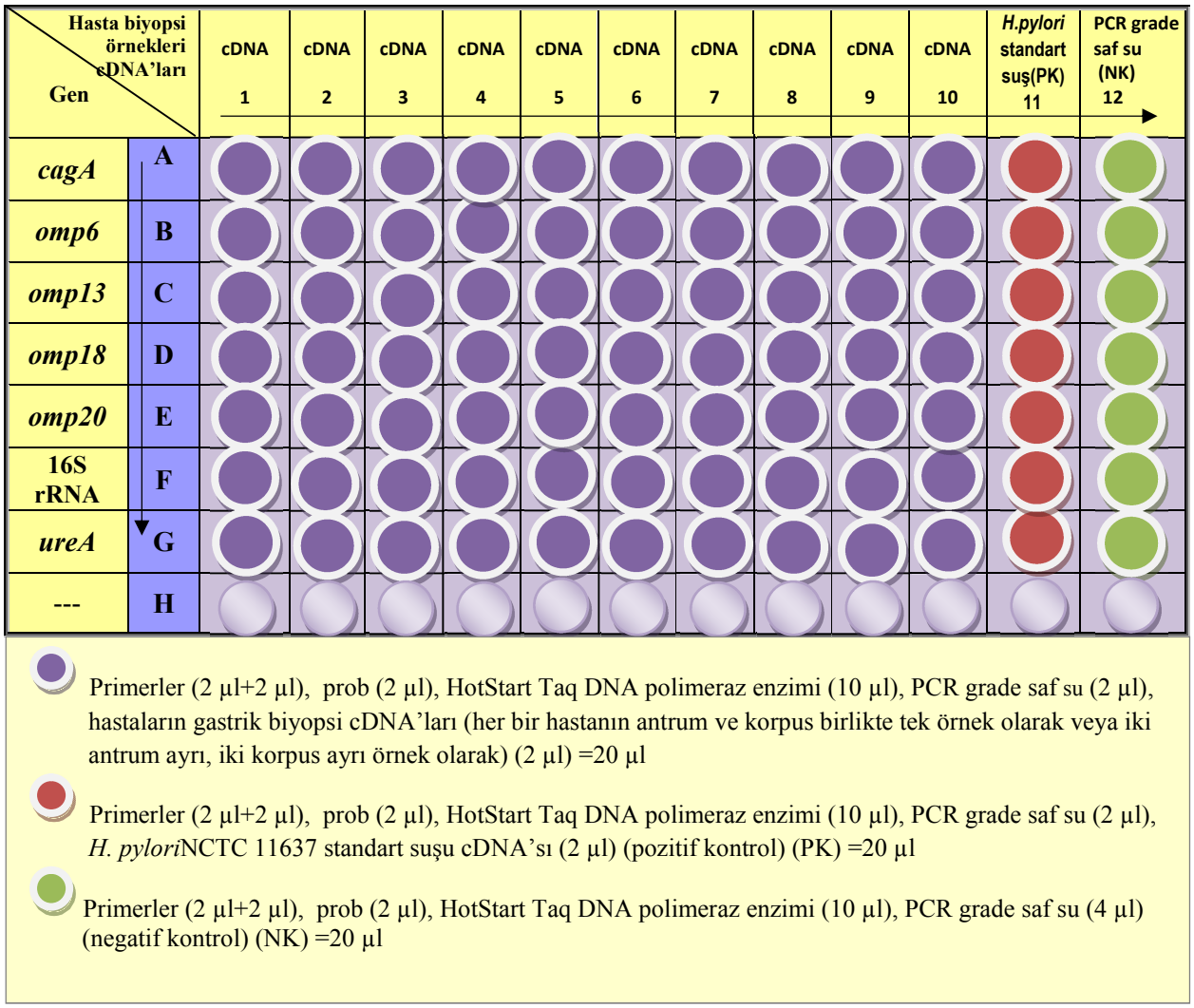
iii. Real-time RT-PCR Testinin 96 Kuyucuklu Pleyt Uygulama Düzeni

Doksan altı kuyucuklu pleytte (Roche Applied Science) yer alan A, B, C, D, E, F, G ve H sıraları ile ilgili genlerin master miksi aşağıdaki gibi her bir kuyucuğa (1.-12.) 18 µl soldan sağa doğru eklendi.

Sonra hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden ayrı ayrı veya birleştirilerek (antrum ve korpus birleştirilip tek bir örnek olarak) elde edilen cDNA'ları –20˚C'den çıkartılıp çözündürüldü ve pleytin 1.-10. sütunlarındaki kuyucuklara yukarıdan aşağıya doğru Şekil 13'de görüldüğü gibi cDNA'ları ikişer µl eklendi.

Her bir çalışmada (run da) pleytin 11. sütunundaki kuyucuklara pozitif kontrol olarak *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (H.p-5) cDNA'sı ikişer µl eklendi.

Pleytin 12. sütunundaki kuyucuklara ise ikişer µl PCR grade saf su (Zymo Research) eklendi ve negatif kontrol olarak kullanıldı. Böylece pleytin her bir kuyucuğunda son RT RT-PCR reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde sağlandı (Şekil 13).



Şekil 13. Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* gen ekspresyonlarının RT RT-PCR deneyinde 96 kuyucuklu pleyt uygulama düzeni

3.6.8.5.5. ***Real-time RT-PCR Amplifikasyon Döngüsü***

Tüm gen ekspresyon deneylerimizde reaktiflerin 96 kuyucuklu pleyte eklenmesinden sonra kuyucuklarda birkaç yanda kalan damlaların çökmesi için pleytin tabanı birkaç kere masa üzerine vuruldu, PCR sürecinde buharlaşmayı engellemek için pleytin üzeri yapışkan plastik ile kapatıldı, santrifüj cihazı (Eppendorf, USA) kullanılarak pleyt 4.500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Pleyt LightCycler 480 II/96 (Roche Applied Science Ltd., Rotkreuz, Switzerland) cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon aşamaları aşağıdaki belirtildiği gibi 50 döngüye programlandı:

a) 95˚C'de 10 dakika ilk denatürasyon (HotStart Taq DNA polimeraz enziminin aktivasyonu)

b) amplifikasyon aşaması	95˚C	10 saniye	}	50 döngü
	55˚C	50 saniye		
	72˚C	1 saniye (tek okuma)		
c) soğutma	40˚C	30 saniye		

LightCycler 480 II/96 cihazına ait özel bilgisayar kullanılarak, pleytteki her bir hastaya ait gastrik biyopsi örneklerinin numaraları ve özellikleri (antrum ve korpus birlikte veya antrum ve korpus ayrı ayrı) ile ilgili bilgiler bilgisayar ortamına kaydedildi. Tüm RT RT-PCR deneylerinde cihaz 50 döngüye programlandığı için her 96 kuyucuklu pleytteki genlerin amplifikasyonu ~1.5 saat sürdü.

PCR amplifikasyonu sonucunda amplikonun spesifik olup olmadığını incelemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır. Bu analizde çift sarmallı cDNA'nın sıcaklığı artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı olarak grafikler oluşturulup primer-dimer'lerden kaynaklanan ve spesifik olmayan sinyaller tespit edilir (61). Ancak RT RT-PCR gen ekspresyon araştırmamızda TaqMan hidroliz probların kullanılmasından, cDNA'lardan bu probların ayrılması nedeni ile erime eğrisi analizi yapılamadı. Her gen için eşik döngüsü (Cycle threshold, Ct) değeri belirlendi. Her genin amplifikasyonu sırasında eşik floresan ışımayı geçen döngü sayısı eşik döngüsü değeri olarak belirlendi. Diğer bir deyişle üründeki ilk anlamlı artışın olduğu nokta eşik döngüsü değeri olarak saptandı. Ne kadar gen ürünü fazlaysa PCR sürecinde biriken ürün hızlı tespit edilip Ct değeri o kadar düşük saptandı.

Hastaların antrum veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde her bir genin Ct değeri saptandığında o genin eksprese edildiği, Ct değeri saptanmadığında o genin eksprese edilmediği belirlendi (61,140,143).

3.6.8.5.6. ***Gen Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi***

RT RT-PCR çalışmamızda *cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* hedef genleri ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin amplifikasyonu aynı run'da yapıldığından tüm hedef genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için "LightCycler 480 Software Release" programı kullanılarak aynı biyopsi örneğinde (antrum ve korpus birleştirilmiş olarak, ya da antrum ayrı, korpus ayrı) araştırılan her bir hedef genin normalizasyonu 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerine göre ayrı ayrı olarak veriler alınarak kaydedildi. Bu genlerin normalizasyonu manuel olarak da aşağıdaki formüllerden hesaplandı:

Önce her bir hedef gen için ΔCt değeri "ΔCt=Ct (araştırılan gen) – Ct (house-keeping gen)" formülünden hesaplandı. Sonra "normalize edilmiş ΔCt değeri=$2^{-\Delta Ct}$" formülü kullanılarak normalize edilmiş ΔCt değerleri (gen ekspresyon düzeyleri) elde edildi. Gen ekspresyonunda artış veya azalma "gene fold change=$2^{-\Delta Ct\ (olgu)}/2^{-\Delta Ct\ (referans)}$" formülü ile belirlendi. Rölatif RT RT-PCR gen ekspresyon yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon düzeylerinin hastaların endoskopi ve histopatoloji bulguları, ayrıca yaş ve cinsiyete göre dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildi (61,140,143).

3.6.8.5.7. ***Real-time RT-PCR Testinin Tekrarlama veya Yinelenebilirliği***

RT RT-PCR çalışmamızda elde edilen Ct değerlerinin kesinliğini ve bu değerlerin varyasyonunu belirlemek için hastaların gastrik biyopsi örneklerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak RT RT-PCR testinin tekrarlanması planlanarak uygulandı. Bu amaçla ilk çalışılan hastalarda her üç testi (HÜT, histopatoloji ve kültür) pozitif bulunan hastalardan randomize olarak sekiz hasta (4-E, 7-E, 10-E, 11-E, 19-E, 27-E, 30-E, 37-E) ve daha sonra alınan hastalardan ve her üç testi (HÜT, histopatoloji ve kültür) pozitif bulunan dört hasta (10-K, 11-A, 12-A ve 12-K), ayrıca HÜT, kültür ve histopatoloji testleri tümü negatif bulunan iki hasta (35-K, 36-A)'nın gastrik biyopsi örneği toplam 14 gastrik biyopsi örneği randomize olarak seçildi, negatif kontrol (PCR grade saf su) ve pozitif kontrol ile birlikte *H. pylori* RT RT-PCR testi tekrar çalışıldı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 6. Araştırma planı ve takvimi

Şubat 2006'da birinci ve Nisan 2008'de ikinci doktora tez projelerinin onaylanması	
Birinci doktora tez projesi kapsamında "*Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi" ile ilgili çalışmalar	
İkinci doktora tez projesi kapsamında "*Helicobacter pylori* enfeksiyonunda bakteriyel dış membran proteinlerinin incelenmesi" ile ilgili çalışmalar	
Araştırmanın evreni ve zaman çizelgesi	**Uygulanan testler ve incelemeler**
Mart 2006, Temmuz-Ekim 2009, Mart-Ağustos 2010	**1)** İlk çalışılan hastalardan antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin alınması **2)** Biyopsi örneklerine HÜT testinin uygulanması **3)** Biyopsi örneklerinin kültürünün yapılması ve *H. pylori*'nin idantifikasyonu **4)** *H. pylori* kültür, indikatör ve stok besiyerlerinin geliştirilmesi **5)** Biyopsi örneklerinin histopatolojik incelenmesi **6)** *H. pylori* antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması
Aralık 2009-Ocak 2010-2011	**1)** Hastaların antrum ve korpus birleştirilmiş gastrik biyopsi örneklerinden total RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezinin yapılması **2)** RT RT-PCR testinin standardizasyon çalışmalarının yapılması **3)** Hastaların antrum ve korpus birleştirilmiş gastrik biyopsi cDNA örneklerine RT RT-PCR testinin uygulanması **4)** *H. pylori* gen ekspresyonunun ve düzeylerinin saptanması
Mart 2012, Mayıs 2012	**1)** Daha sonra bu tarihlerde çalışmaya dahil edilen hastalardan antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin alınması **2)** Biyopsi örneklerine HÜT testinin uygulanması **3)** Biyopsi örneklerinin kültürünün yapılması ve *H. pylori*'nin idantifikasyonu **4)** Biyopsi örneklerinin histopatolojik incelenmesi **5)** *H. pylori* antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması
Mart 2012, Mayıs-Temmuz 2012	**1)** Pozitif ve negatif kontrol bakteri suşlarının RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezinin yapılması **2)** Pozitif ve negatif kontrol bakteri suşlarının cDNA örneklerine RT RT-PCR testinin uygulanması **3)** RT RT-PCR testinin standardizasyon çalışmalarının yapılması **4)** Hastaların antrum ayrı, korpus ayrı gastrik biyopsi örneklerinden total RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezinin yapılması **5)** Hastaların antrum ayrı, korpus ayrı gastrik biyopsi cDNA örneklerine RT RT-PCR testinin uygulanması **6)** *H. pylori* gen ekspresyonunun ve düzeylerinin saptanması
Haziran 2012-Haziran 2017	Bilgi toplama işlemlerinin yapılması
Temmuz 2012, Nisan 2017-Temmuz 2019	İstatistiksel veri analizlerinin yapılmasıı
Temmuz 2012-Aralık 2019- Ocak 2020	Tez yazımı
Tez Savunması	Temmuz 2020

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi (İstatistiksel Analizler)

Microsoft Office Excel programı kullanılarak hastaların HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR gen ekspresyon bulguları bilgisayar ortamında kaydedilerek veri tabanı oluşturuldu. Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* pozitifliği ve *H. pylori* enfeksiyonu varlığı araştırılarak değerlendirildi.

a. HÜT ve histopatoloji bulgularının ikisinin birlikte pozitif olduğu hastalar *H. pylori* enfeksiyonu pozitif kabul edildi ve kültür yönteminin başarısı, RT RT-PCR çalışmasında elde edilen bulgular ile de değerlendirildi. Bu test sonuçları ile birlikte dört gözlü tablo oluşturularak karşılaştırıldı, kültür ve RT RT-PCR testinin performansı değerlendirildi.

b. Ayrıca HÜT, histopatoloji ve/veya kültürün en az ikisinin birlikte pozitifliği *H. pylori* enfeksiyonu pozitif kabul edildi. HÜT, histopatoloji ve kültürün tümünün negatif olduğu hastalar ise *H. pylori* enfeksiyonu negatif kabul edildi.

Araştırmamızda SPSS software package version 20.0 programı kullanılarak elde edilen verilerin istatistiksel analizleri yapıldı.

İstatistiksel analizler Sayın Prof. Dr. Hülya Ellidokuz ve Sayın Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu daha sonra Mart 2017 tarihinden Temmuz 2019 tarihine kadar Sayın Prof. Dr. Pembe Keskinoğlu tarafından gerçekleştirilmiştir. Kendilerine ayrı ayrı teşekkür ederiz.

RT RT-PCR testinde gastrik biyopsi örneklerinde bakteriyal 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin her ikisinin de ekspresyonu pozitif saptanan örneklerde *H. pylori* varlığı kabul edildi. *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18* ve *omp20 (alpA)* genlerinin ekspresyonu her bir hastanın antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde saptanıp hasta grupları arasında değerlendirildi.

Ayrıca yaş, cinsiyet, endoskopik ve histopatolojik bulgular her bir hasta için ayrı ayrı incelenerek veriler istatistiksel analiz ile değerlendirildi.

Tanımlayıcı istatistikler: Sayım ile elde edilen veriler sayı ve yüzde ile, ölçümle elde edilen sürekli veriler parametrik koşul sağlanıyorsa ortalama (min) ± sapma "standard deviation" (SD), sağlanmıyorsa "median" ortanca (med) ve minimum-maksimum (min-max) değerler ile gösterildi.

Analitik istatistikler: Sayım ile elde edilen verilerde bağımsız grup karşılaştırılmasında Pearson’s Chi-square testi, gruplar bağımlı ise McNemar’s Chi-square testi ile analizler yapıldı. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında parametrik koşullar sağlanmadığı için bağımsız iki grup Mann-Whitney U testi, bağımlı iki grup karşılaştırılmasında Wilcoxon

işaretli sıralar testi kullanıldı. Üç ve üzeri bağımsız hasta grupları arasında karşılaştırmada, incelenen değişkenlerin verileri parametrik dağılım göstermediği için Kruskal-Wallis varyans analizi ile analizler yapıldı. Değişkenler arası korelasyonu değerlendirmede non parametrik Spearman's korelasyon analizi uygulandı. Tüm istatistik karşılaştırmalarda $p<0.05$ istatistik anlamlılık sınır değeri olarak kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Tez projesi kapsamında *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 (alpA)* virülans genlerin ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping gen ekspresyonlarının saptanmasına yönelik yapılan araştırmamızda daha önce klasik PCR yönteminin uygulanması planlanmıştır. Ancak "Roche Applied Science" firması tarafından ökaryotlarda hücre gen ekspresyonunu araştırmak amacı ile geliştirilmiş olan ve daha az DNA kontaminasyon riski bildirilen real-time reverse transcription PCR (RT RT-PCR) yöntemi ile bakterilerde düşük düzeyde, özellikle geç ve zor üreyen *H. pylori* suşları tarafından eksprese edilen gen transkriptlerinin saptanıp saptanamayacağını araştırmak amacı ile çalışmamızda *H. pylori* gen ekspresyon deneylerinin Roche LightCycler 480 II/96 cihazı ile yapılmasına karar verildi. Çalışmamızda kısa amplikonlar (60-93 nükleotit) elde edildiğinden, tekrar DNA elde edilemediğinden dolayı genlerin sekans analizleri yapılamadı.

Ayrıca klasik PCR yöntemi ile çok uzun sürede ve duyarlılığı düşük olmasının yanı sıra multipleks PCR düşünüldü ancak gen ekspresyon düzeylerini saptayamayacağımız için, ayrıca izole ettiğimiz *H. pylori* suşlarından değil direkt gastrik biyopsi örneklerinden çalışılacağından, kitlerin prosedüründe belirtilen DNA ekstrakte edildiği halde, tekrar DNA elde edilemediğinden bunun yapılamayacak olduğu belirtildi. Daha sonra yurtdışında yetkilinin bunun yapılabileceğini yazmış olsa bile DNA üzerinde çalışmalarımız ve virülans genotiplendirme mümkün olmadı.

RT RT-PCR testini doğrulamak için hastaların gastik biyopsi örnekleri ile birlikte pozitif kontrol olarak *H. pylori* NCTC 11637 (*cagA, vacA, oipA* ve *babA* pozitif) standart suşu ayrıca negatif kontroller olarak *E. coli*, *S. aureus* ve *C. jejuni* bakteri suşları kullanılarak RT RT-PCR testinin standardizasyon çalışımaları yapıldı.

RT RT-PCR çalışmasında ilk alınan hastaların tek bir antrum veya korpus gastrik biyopsi örneğinden yeterli miktarda total RNA elde edilemediğinden dolayı antrum ve korpus biyopsi örneklerinden birleştirilmiş tek örnek olarak total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Daha

sonra alınan hastalardan bir antrum ve bir korpus gastrik biyopsi örneği daha fazla alındığı için çift (iki antrum ve iki korpus) gastrik biyopsi örneklerinden antrum ayrı, korpus ayrı klinik örnekler olarak total RNA ekstraksiyonu yapıldı.

Endoskopi endikasyonu konulan hastalardan gastrik biyopsi örneklerinin hem atrum hem korpustan alınması Etik Kurul onayı ile belirtilmiş olmasına rağmen çalışmamızda hasta seçiminin poliklinikte değil endoskopi ünitesinde yapılmasından dolayı, Uzman Endoskopistin rutin olarak uyguladığı ve gerekli gördüğü takdirde biyopsi alınması nedeni ile, ayrıca bazı hastaların yaş ve klinik durumuna (anesteziye tolere edememesi, kanama başlaması, vb) bağlı olarak hastaların tümünden hem antrum hem korpus gastrik biyopsi örneklerinin alımı uygun görülmediğinden alınamadı. Bu nedenlerle bazı hastaların antrum veya korpus biyopsi örnrklerine HÜT, histopatoloji ve/veya kültür yöntemlerinin birlikte uygulanmadığı için söz konusu hastaların hem antrum hem de korpus biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının incelenmesi mümkün olmamıştır. Hasta bazlı sonuçlarda HÜT ve histopatoloji ayrıca HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif bulgulara göre *H. pylori* enfeksiyonu değerlendirilerek RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmasına alınan hastalarda bu kriterlere göre istatistiksel veri analizleri yapıldı.

3.10. Etik Kurul Onayı

"*Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi" başlıklı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne 25.09.2006 tarihli başvuru formunda belirtilen doktora tez konusu; 122/2005 protokol numaralı 06.09.2005/199 tarih ve sayılı etik kurul onaylı devam etmekte olan münferit araştırma projesinde Türkiye'de *H. pylori* suşlarının saptanmsı ve antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının değerlendirilmesi konusunda projenin önemli bir kısmını teşkil edecek olan kültür ve antimikrobiyal duyarlılık test ynteminin eklenmesi nedeni ile yapılan değişiklikler etik kurul tarafından 02 Şubat 2006 tarih ve 01/01706 nolu etik kurul toplantısında 03.02.2006/1 tarih ve sayı ile onaylanmış olup, belirtilen zamanda tez çalışmaları başlatılmıştır.

Doktora tez konusu bir yıl sonra SBE Müdürlüğü'nde, Rektörlük öğrenci işleri, Rektörlük Hukuk Müşavirliği ve Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) resmi yazıları içerisinde yer alan nedenler ile değiştirilmiş olup Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunun 24 Nisan 2008 tarih ve 10/09/2008 No'lu toplantısında 123/2008 protokol numaralı "*Helicobacter pylori* enfeksiyonunda bakteriyel dış

membran proteinlerinin incelenmesi" başlıklı ikinci doktora tezi araştırma projesinin uygulanması onayı Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu (BOF)'nda yer alan 1-c, 3. ve 7. maddeleri ile ilgili eksikliklerin tamamlanması şartı ile uygulanması onayı 25.04.2008 tarih ve 148 sayılı yazı ile alınmıştır (EK 8.1). 25.04.2008 tarih ve 148 sayılı yazıda belirtilen şartların 06.05.2008 tarihli araştırıcı tarafından yerine getirildiği Etik Kurulunun 120/2008 protokol numarası ile bildirilmiş ve Etik kurul ek onayı alınmıştır. Bu eksikliklerin araştırıcı tarafından yerine getirilmiş olduğu Etik Kurulunun 02.04.2015 tarih ve 120/2008 protokol numaralı 2015/10-40 karar numarası ile daha önceden elde olmayan resmi belgenin doktora tez içeriğinde yer alması gerekliliği nedeni ile tekrar istenerek bu resmi onaylı yazı teze eklenmiştir (EK 8.2).

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik Bulguları

Temmuz-Ekim 2009, Mart-Eylül 2010 ayrıca Mart-Temmuz 2011 ve de Mart-Mayıs 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Gündüz Hastanesi, Endoskopi Ünitesinde randevusu olan dispeptik yakınması nedeni ile endoskopi endikasyonu konulan hastalardan antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örnekleri alındı.

Aşağıda belirtilen iki ayrı doktora tez projesi konusu kapsamında iki etik kurul onaylı araştırmalarda toplam 179 hasta çalışmaya alınmıştır:

"*Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi" başlıklı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne 25.09.2006 tarihinde başvuru formunda belirtilen doktora tez konusu; 122/2005 protokol numaralı 06.09.2005/199 tarih ve sayılı etik kurul onaylı devam etmekte olan münferit araştırma projesinde Türkiye'de *H. pylori* suşlarının saptanmsı ve antimikrobiyal duyarlılık test sonuçlarının değerlendirilmesi konusunda projenin önemli bir kısmını teşkil edecek olan kültür ve antimikrobiyal duyarlılık test yönteminin eklenmesi nedeni ile yapılan değişiklğin bildirilmesi sonucunda etik kurul tarafından 02 Şubat 2006 tarih ve 01/01706 nolu etik kurul toplantısında 03.02.2006/1 tarih ve sayı ile kabul edilmiş olan doktora tez projesi kapsamında toplam 59 hasta çalışmaya alınmıştır. Ancak yaş ve cinsiyet yönünden demografik bulgular eklenememiş, bulgularımız başlığı altında açıklandığı gibi sadece farklı kültür besiyerlerinin geliştirilmesi ve *H. pylori* standart suşunun yanı sıra klinik suşlarının daha etkin izolasyonu konusundaki bulgular yer almıştır.

Tez konusu bir yıl sonra SBE Müdürlüğünde, Rektörlük Öğrenci İşleri, Rektörlük Hukuk Müşavirliği ve Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) resmi yazılar içerisinde yer alan nedenlerle değiştirilmiş olup "*Helicobacter pylori* enfeksiyonunda bakteriyel dış membran proteinlerinin incelenmesi" başlıklı ikinci doktora tez projesi kapsamında toplam 120 hasta çalışmaya alınmıştır. Aşağıdaki paragrafta sadece bu çalışma grubu hastalarının demografik verileri değerlendirilmeye alınmıştır.

Yüz yirmi hastanın cinsiyete göre dağılımı, kadın 71 (%59.2), ortalama yaş 48.65 ± 14.71; erkek 49 (%40.8), ortalama yaş 53.38 ± 13.64 ve tüm hastaların ortalama yaşı 50.58 ± 14.34, yaş aralığı 20-83 saptandı (Tablo 7).

Tablo 7. Yüz yirmi hastanın yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	n (%)	Ortalama yaş ±*SD	Yaş aralığı
Kadın	71 (%59.2)	48.65 ± 14.71	20-83
Erkek	49 (%40.8)	53.3 ± 13.64	21-78
Toplam	120 (%100.0)	50.58 ± 14.42	20-83

*Standart sapma

4.2. Endoskopik Bulgular

Yüz yirmi hastanın endoskopik incelemelerinde mide veya bulbusta hasar bulunup bulunmadığı kriterine göre hastaların endoskopik bulguları Sayın Prof. Dr. Hale Akpınar tarafından incelenerek hastalar gastrik ülser/erozyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E), eroziv gastrit (EG), non-eroziv gastrit (NEG), non-eroziv bulbit (NEB), normal mukoza (NM) ve gastrik kanser (GK) hasta gruplarında yer aldı.

Toplam 120 hastanın cinsiyete göre endoskopik bulgularının dağılımı, kadınlarda gastrik ülser/erozyon yedi (%9.9), duodenal ülser/erozyon beş (%7.0), eroziv gastrit 19 (%26.7), non-eroziv gastrit 38 (%53.5), non-eroziv bulbit 0 (%0.0), normal mukoza iki (%2.8), gastrik kanser 0 (%0.0) toplam 71 (%59) hasta; erkeklerde sırasıyla dört (%8.2), beş (%10.2), dokuz (%18.4), 28 (%57.1), 0 (%0.0), bir (%2.1) ve iki (%4.1) toplam 49 (%40.8) hasta saptandı (Tablo 8).

Tablo 8. Yüz yirmi hastanın cinsiyete göre endoskopik bulgularının dağılımı

Cinsiyet	GÜ/E	DÜ/E	EG	NEG	NEB	NM	GK	Toplam n (%)
Kadın n (%)	7 (%9.9)	5 (%7.0)	19 (%26.7)	38 (%53.5)	0 (%0.0)	2 (%2.8)	0 (%0.0)	71 (%59.2)
Erkek n (%)	4 (%8.2)	5 (%10.2)	9 (%18.4)	28 (%57.1)	0 (%0.0)	1 (%2.1)	2 (%4.1)	49 (%40.8)
Toplam n (%)	11 (%9.2)	10 (%8.3)	28 (%23.3)	66 (%55.0)	0 (%0.0)	3 (%2.5)	2 (%1.7)	120 (%100.0)

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; NEB: Non-eroziv bulbit; NM: Normal mukoza; GK: Gastrik kanser

Dışlama kriterleri içerisinde gastrik kanserli hasta yazılmasına rağmen Uzman Endoskopist tarafından bu çalışma kapsamında bir hastadan HÜT için sadece antrum gastrik biyopsi örneği alınmış ve antrum HÜT pozitif, korpustan gastrik biyopsi örneği alınmamış; histopatoloji için antrum ve korpustan ikisinden de gastrik biyopsi örneği alınmamış; kültür için hem antrum hem de korpus alınmış, antrum kültür negatif, korpusta ise kontaminasyon varlığından hasta kültür negatif olarak değerlendirilmiş. Ancak bu hastadan RT RT-PCR için hem antrum hem de korpus gastrik biyopsi örnekleri alınmış, çalışılmış ve her ikisi de pozitif saptanmıştır.

Diğer gastrik kanser tanılı olarak belirtilen hastadan ise HÜT için sadece antrum gastrik biyopsi örneği alınmış ve HÜT antrum negatif, korpustan gastrik biyopsi örneği alınmamış; histopatoloji antrum pozitif, korpustan gastrik biyopsi örneği alınmamış; kültür için ise antrum ve korpustan her ikisinden de gastrik biyopsi örnekleri alınmamış, ancak RT RT-PCR için ise antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınmış ve her ikisi de pozitif saptanmıştır. Sonuçta çalışıma grubu toplam 120 hastanın içinde yer almalarına karşın gastrik kanser tanısı nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmamışlardır.

Tüm hastalarımızın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin endoskopi bulgularının ayrı ayrı istatistik analizleri için gruplandırılması ve değerlendirilmesinde Sayın Prof. Dr. Hale Akpınar'a teşekkür ederiz.

4.3. Hızlı Üreaz Test Bulguları

Yüz yirmi hastanın 120 (%100.0)'sinden de antrum gastrik biyopsi örnekleri, sadece 39 (%32.5)'undan ise korpus gastrik biyopsi örnekleri alınmıştır. Ancak etik kurul onayında da bulunmasına rağmen, 120 hastanın 81 (%67.5)'inden korpus gastrik biyopsi örneği Uzman Endoskopist tarafından HÜT uygulanması gerekli görülmediği için alınmamıştır.

Hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinin alınıp alınmadığı; veya birlikte alındığı; veya antrum veya korpustan birinin HÜT sonucu pozitif diğeri negatif saptandığında bile hasta için pozitif bir sonuç olarak kabul edilerek her bir hasta sonucu değerlendirildi. Böylece antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerine HÜT uygulanan 120 hastanın 79 (%65.8)'u HÜT pozitif; 41 (%34.2)'i HÜT negatif saptandı. HÜT uygulanan 120 hastanın 76 (%63.3)'sı antrum HÜT pozitif; 44 (%36.7)'ü antrum HÜT negatif saptandı. Korpus biyopsi örneklerine HÜT uygulanan 39 hastanın 21 (%53.8)'i korpus HÜT pozitif; 18 (%46.2)'i korpus HÜT negatif saptandı. Sadece antrum gastrik biyopsi örneği alınan 81

hastanın 49 (%60.5)'u antrum HÜT pozitif; 32 (%39.5)'si antrum HÜT negatif saptandı (Tablo 9).

HÜT uygulanan 120 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri birlikte değerlendirildiğinde, hem antrum hem de korpus gastrik biyopsi örnekleri alınan 39 hastanın 18 (%46.2)'i antrum ve korpus HÜT pozitif; dokuz (%23.0)'u antrum HÜT pozitif ve korpus HÜT negatif; üç (%7.7)'ü antrum HÜT negatif ve korpus HÜT pozitif; dokuz (%23.0)'u antrum ve korpus HÜT negatif saptandı.

Tablo 9. Yüz yirmi hastanın hızlı üreaz test (HÜT) bulguları

H. pylori **Hızlı üreaz Testi (HÜT)**	**Antrum n (%)**	**Korpus n (%)**	**Antrum+Korpus/Hasta n (%)**
HÜT pozitif	76 (%63.3)	21 (%53.8)	79 (%65.8)
HÜT negatif	44 (%36.7)	18 (%46.2)	41 (%34.2)
Biyopsi alınamadı	—	81/120	—
Toplam	120 (%100.0)	39 (%100.0)	120 (%100.0)

HÜT: Hızlı üreaz testi

4.4. Histopatolojik Bulgular

Yüz yirmi hastadan, 88 (%73.3) hastanın 67 antrum ve 63 korpus gastrik biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi Patoloji Anabilim Dalı'nda Gastrointestinal Patoloji Uzmanı tarafından hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde HLO varlığı ve düzeyi, lamina propria'da ve pitlerde enflamasyon şiddeti (0-3 arası skorlama) ayrıca intestinal metaplazi varlığı Güncelleştirilmiş Sydney Sistemine göre değerlendirildi (139). Yüz yirmi hastadan 32 (%26.7)'sinin antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri etik kurul onayında bulunmasına rağmen Uzman Endoskopist tarafından histopatolojik incelenmesi gerekli görülmediği için alınmamıştır.

Hasta bazlı sonuçlarda histopatolojik incelemesi yapılan 88 hastanın 63 (%71.6)'ü HLO pozitif; 25 (%28.4)'i HLO negatif saptandı.

Yüz yirmi hasta içerisinde, 45 (%51.2)'i antrum HLO pozitif; 42 (%47.8)'si korpus HLO pozitif hasta saptandı. Histopatolojik incelemesi yapılan 88 hastanın antrum ve korpus örnekleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, hem antrum hem de korpustan alınan gastrik biyopsi örneklerinde 42 hastanın 24 (%57.1)'ü antrum ve korpus HLO pozitif; üç (%7.1)'ü antrum HLO pozitif ve korpus HLO negatif; bir (%2.4)'i antrum HLO negatif ve korpus HLO pozitif; 14 (%33.4)'ü antrum ve korpus HLO negatif saptandı.

Sadece antrum gastrik biyopsi örneği alınan 25 hastanın 18 (%72.0)'i antrum HLO pozitif; yedi (%28.0)'si antrum HLO negatif saptandı. Sadece korpus gastrik biyopsi örneği alınan 21 hastanın 17 (%81.0)'si korpus HLO pozitif; dörd (%19.0)'ü korpus HLO negatif saptandı (Tablo 10).

Tablo 10. Yüz yirmi hastanın histopatolojik (HLO) bulguları

H. pylori **Histopatoloji**	**Antrum n (%)**	**Korpus n (%)**	**Antrum+Korpus/Hasta n (%)**
HLO pozitif	45 (%67.2)	42 (%67.7)	63 (%71.6)
HLO negatif	22 (%32.8)	21 (%33.3)	25 (%28.4)
Biyopsi alınamadı	53/120	57/120	32/120
Toplam	67 (%100.0)	63 (%100.0)	88 (%100.0)

HLO: Helicobacter benzeri organizma

Tüm hastalarımızın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin histopatoloji bulgularının ayrı ayrı istatistik analizleri için gruplandırılması ve değerlendirilmesinde Sayın Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'na teşekkür ederiz.

4.5. Kültür Bulguları

Yüz yirmi hastanın 103 (%85.8)'ünün antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü yapılırken 104 (%86.7) hastanın antrum ve 98 (%81.7) hastanın korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü yapılmıştır. Yüz yirmi hastanın 16 (%13.3)'sının kültür için antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınamadığından kültürü yapılamamıştır. Kültür sonuçlarının

pozitif olduğu 50 (%58.8) hastada *H. pylori* kültür pozitif, 35 (%41.2) hastada ise *H. pylori* kültür negatif kabul edildi. On dokuz hastadan alınan gastrik biyopsi örneklerinin kültüründe kontaminasyon varlığı nedeni ile *H. pylori* kültürü pozitif veya negatif olarak değerlendirilemedi ve kültür sonuçları kontaminasyon olarak bildirilerek tabloda yer almıştır. Etik kurul onayında belirtildiği halde 16 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri Uzman Endoskopist tarafından kültür uygulanması gerekli görülmediği için alınmamıştır.

Kültüre alınan 104 hastanın 98 (%94.2)'inin antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinden kültürü yapılırken, dörd (%3.9)'ünün sadece antrum ve iki (%1.9)'sinin sadece korpus gastrik biyopsi örneğinden *H. pylori* kültürü yapılmıştır. Antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri birlikte değerlendirildiğinde, kültürü yapılan 104 hastanın 50 (%48.1)'sinin antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde kültürde *H. pylori* üremesi saptandı. Elli kültür pozitif hastada, 28 (%56.0) hastanın hem antrum hem de korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* üremesi saptanırken, 19 (%38.0)'unda sadece antrum ve üç (%6.0)'ünde sadece korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* üremesi saptandı.

Kültürü yapılan 104 hastanın 35'inde kültürde üreme saptanmadığından *H. pylori* kültür negatif olarak değerlendirildi, 19'unda ise kültürde kontaminasyon nedeni ile değerlendirilemedi (Tablo 11).

Tablo 11. Yüz yirmi hastanın kültür bulguları

H. pylori **Kültür**	**Antrum** **n** **(%)**	**Korpus** **n** **(%)**	**Antrum+Korpus/Hasta** **n** **(%)**
Kültür pozitif	47 (%45.2)	31 (%31.6)	50 (%58.8)
Kültür negatif	35 (%33.7)	46 (%46.9)	35 (%41.2)
Kontaminasyon	22 (%21.1)	21 (%21.5)	19 değerlendirilemedi
Biyopsi alınamadı	16/120	22/120	16/120
Toplam	104 (%100.0)	98 (%100.0)	104 (%100.0)

Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleinde HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları birlikte verilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleinde HÜT, histopatoloji (HLO) ve kültür bulguları

H. pylori	**HÜT n (%)**		**Histopatoloji n (%)**		**Kültür n (%)**	
	Antrum	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**
Pozitif	76 (%63.3)	21 (%53.8)	45 (%67.2)	42 (%67.7)	47 (%45.2)	31 (%31.6)
Negatif	44 (%36.7)	18 (%46.2)	22 (%32.8)	21 (%33.3)	35 (%33.7)	46 (%46.9)
Kontaminasyon	—	—	—	—	22 (%21.1)	21 (%21.5)
Biyopsi alınamadı	—	81/120	53/120	57/120	16/120	22/120
Toplam	120 (%100.0)	39 (%100.0)	67 (%100.0)	63 (%100.0)	104 (%100.0)	98 (%100.0)

4.5.1. *Helicobacter pylori Tanısında KültürYönteminin Geçerliliği*

Yüz yirmi hastada HÜT ve histopatoloji sonuçlarının ikisinin birlikte pozitif olduğu 48 hastanın 30 (%85.7)'u *H. pylori* kültür pozitif; beş (%14.3)'i negatif saptandı. Yüz yirmi hastanın 16'sından kültür için antrum ve korpus gastrik biyopsi örneği alınamadı, 19 hastanın ise kültüründe kontaminasyon saptandığı için değerlendirilemedi.

Yüz yirmi hastanın HÜT ve histopatoloji bulgularının ikisinin birlikte pozitif olduğu 48 hastada *H. pylori* kültür yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %86.0 ve %90.0 saptandı. Toplam başarım oranı (accuracy) %87.0 elde edildi (Tablo 13).

Antrum ve korpus sonuçları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, kültür yönteminin duyarlılığı antrum ve korpus için %82.0; özgüllüğü antrum için %90.0, korpus için ise %100.0 saptandı. Toplam başarım oranı antrum ve korpus için sırasıyla %84.0 ve %87.0 elde edildi (Tablo 13).

Tablo 13. Kültür yönteminin tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü

		ALTIN STANDART	
		POZİTİF	**NEGATİF**
TANI TESTİ	**POZİTİF**	**GP**	**YP (Tip 1 hata)**
	NEGATİF	**YN (Tip 2 hata)**	**GN**

YP: Yalancı pozitif GP: Geçek pozitif
YN: Yalancı negatif GN: Gerçek negatif
Duyarlılık=GP/P= GP/(GP+YN)×100
Özgüllük=GN/N=GN/(GN+YP)×100

HÜT+Histo. (hasta bazlı)

Kültür	+	–		
+	30	1	31	Duyarlılık= %86.0
–	5	10	15	Özgüllük= %90.0
	35	11	46	n=46

Toplam başarım oranı=30+10/46×100=%87.0

HÜT+Histo (antrum)

Kültür	+	–		
+	18	1	19	Duyarlılık= %82.0
–	4	9	13	Özgüllük= %90.0
	22	10	32	n=32

Toplam başarım oranı=18+19/32×100=%84.0

HÜT+Histo (korpus)

Kültür	+	–		
+	9	0	9	Duyarlılık= %82.0
–	2	5	7	Özgüllük= %100.0
	11	5	16	n=16

Toplam başarım oranı=9+5/16×100=%87.0

Yüz yirmi hastada, HÜT pozitif saptanan 79 hastanın 48 (%84.2)'i *H. pylori* kültür pozitif saptanırken histopatoloji sonucunun pozitif olduğu 63 hastanın 30 (%47.6)'u *H. pylori* kültür pozitif saptandı.

4.5.2. *Helicobacter pylori Kültür Besiyeri Geliştirilmesiyle İlgili Bulgular*

Araştırmamızda *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneklerinden kültür ve izolasyonu için %7 defibrine at kanı ve *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerinin yanında, kan yerine diğer suplementlerin kullanılabileceğini araştırmak için kültür besiyeri hazırlığında beş farklı içerikli kültür besiyeri de hazırlandı. Bu besiyerlerinin etkinliğini araştırmadan önce *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Birinci besiyeri çalışmamızda 10 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri HÜT, histopatoloji ve kültür ile incelenmiş, gastrik biyopsi örneklerinin kültürü için *H. pylori* selektif suplement (DENT), %7 defibrine at kanlı Columbia Blood agar besiyerinin yanında *H. pylori* selektif suplement (DENT), %10 taze insan serumlu Columbia Blood agar besiyeri de kullanıldı. Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü iki farklı içerikli besiyerinde incelendi, HÜT ve histopatoloji pozitif sonuçlarına göre dokuz (%90.0) hastada *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olarak değerlendirilerek her iki kültür besiyeri ile altı (%66.7) hasta kültür pozitif, üç (%33.3) hasta kültür negatif saptandı. *H. pylori'*nin kültürü için taze insan serumu, at veya koyun kanı gibi suplementlere göre daha ucuz olduğu ve kolaylıkla bulunduğundan alternatif bir suplement olarak *H. pylori* kültür besiyerinde kullanılabileceği gösterildi (144).

İkinci ve üçüncü çalışmamızda 49 hastanın antrum ve korpus gastik biyopsi örnekleri HÜT, histopatoloji, kültür ile incelenmiş, gastrik biyopsi örneklerinin kültürü için %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür ve *H. pylori* selektif suplement **(**DENT**)** içeren Columbia Blood agar besiyeri, aynı zamanda kültürde *H. pylori* kolonilerinin görülebilmesini kolaylaştırmak amacıyla %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür ve *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerine %0.004 oranında (40 mg/L) "triphenyl tetrazolium chloride" (TTC) eklenerek (indikatör besiyeri) iki farklı içerikli besiyerinde *H. pylori*'nin kültürü yapılmıştır. Kırk dokuz hastadan HÜT ve histopatoloji pozitif sonuçlarına göre *H. pylori* enfeksiyonu saptanan 35 (%71.4) hastanın 24 (%68.6)'ü *H. pylori* kültür pozitif saptandı. Kültür sonuçları ile HÜT, histopatoloji sonuçları arasında uyumluluk sırasıyla %81.4 ve %64.7 saptandı. TTC'siz besiyerinde *H. pylori* kolonileri şeffaf ve gri renkte görülürken, TTC'li besiyerinde az veya çok miktarda pigment oluşumu ile altın renkli *H. pylori* kolonileri görüldü ve saptandı. %1 çözünebilir hemoglobin suplementli Columbia Blood agar besiyerinde %10 taze insan serumlu Columbia Blood agar besiyerine göre üreyen kolonilerden hazırlanan preparatlarda *H. pylori*'nin daha tipik spiral morfolojisi görüldü (Şekil 14,Şekil 15) (145,146).

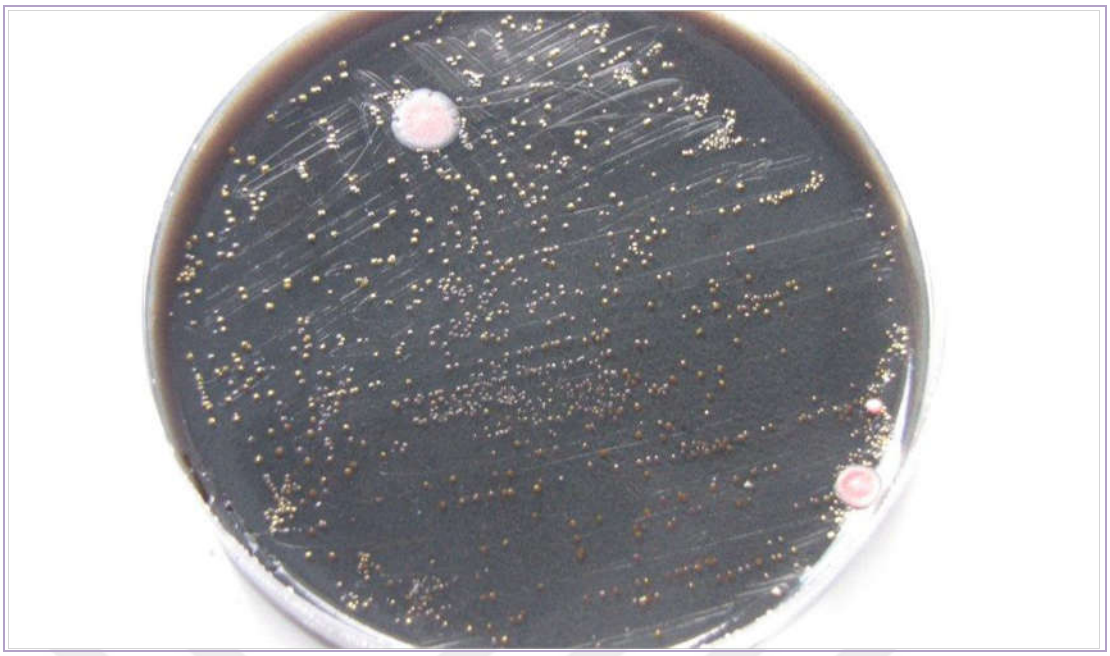
Dördüncü çalışmamızda yukarıdaki 49 hastadan, 44 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü için %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür ve *H. pylori* selektif suplementli (DENT) besiyerinin yanında %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür ve *H. pylori* selektif suplementsiz **(**DENT) Columbia Blood agar besiyeri de kullanılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. HÜT ve histopatoloji pozitif sonuçlarına göre *H. pylori* enfeksiyonu saptanan 30 (%68.2) hastanın 20 (%66.7)'si *H. pylori* kültür pozitif (20 antrum ve 12 korpus pozitif) saptandı. *H. pylori* selektif suplementli (DENT) besiyerinde *H.*

pylori'nin izolasyon oranı antrum ve korpus için sırasıyla %75.0 ve %66.6 saptanırken bu oranlar *H. pylori* selektif suplement (DENT) içermeyen besiyerinde sırasıyla %90 ve %100 saptandı. *H. pylori* selektif suplement (DENT) içermeyen besiyerinde daha yüksek oranda *H. pylori*'nin izole edilmesine rağmen kültürde kontaminasyon daha fazla görüldü (147).

Stok besiyeri geliştirmesi ile ilgili çalışmamızda *H. pylori* suşlarının daha uzun süre canlılığını sağlayan stok besiyerlerini araştırmak amacıyla %20 gliserol içeren stok besiyeri dışında %5 Dimetil Sulfoksit (DMSO); %5 Polietilen Glikol (PEG); 0.3 M sakkaroz ve %10 taze insan serumu gibi kriyoprezervatifler kullanılarak farklı içerikli stok besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerin etkinliğini araştırmak için *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu iki farklı koşulda (–20°C ve –80°C'de) stoklanarak değerlendirildi:

–20°C'de bir ay saklanan stok besiyerlerinde *H. pylori*'nin canlandırma oranı DMSO, PEG, gliserol, gliserol+sakkaroz, sadece taze insan serumu içeren veya içermeyen kontrol besiyerleri için sırasıyla 7.13, 6.97, 7.93, 7.99, 6.95 ve 0.0 log CFU/ml saptanırken, –80°C'de saklanan stok besiyerlerinde bu değerler sırasıyla 8.55, 8.24, 8.59, 8.66, 8.01 ve 0.0 log CFU/ml saptandı. Ortalama log CFU/ml değerleri elde edilerek stok besiyerlerinde toplam stoklanan 120 suş içeren çalışma grupları arasında *H. pylori*'nin canlandırma oranları Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

H. pylori'nin canlandırma oranı –80°C'de saklanan stok besiyerlerinde, –20°C'de saklanan stok besiyerlerine göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. BHI+gliserol+sakkaroz+taze insan serumu ve BHI+gliserol+taze insan serumu içeren stok besiyerlerinde *H. pylori*'nin canlandırma oranı –20°C'de 7.99 ve 7.93 log CFU/ml; –80°C'de 8.66 ve 8.59 log CFU/ml bulundu ve anlamlı düzeyde diğer stok besiyerlerine göre daha yüksek saptandı (127).

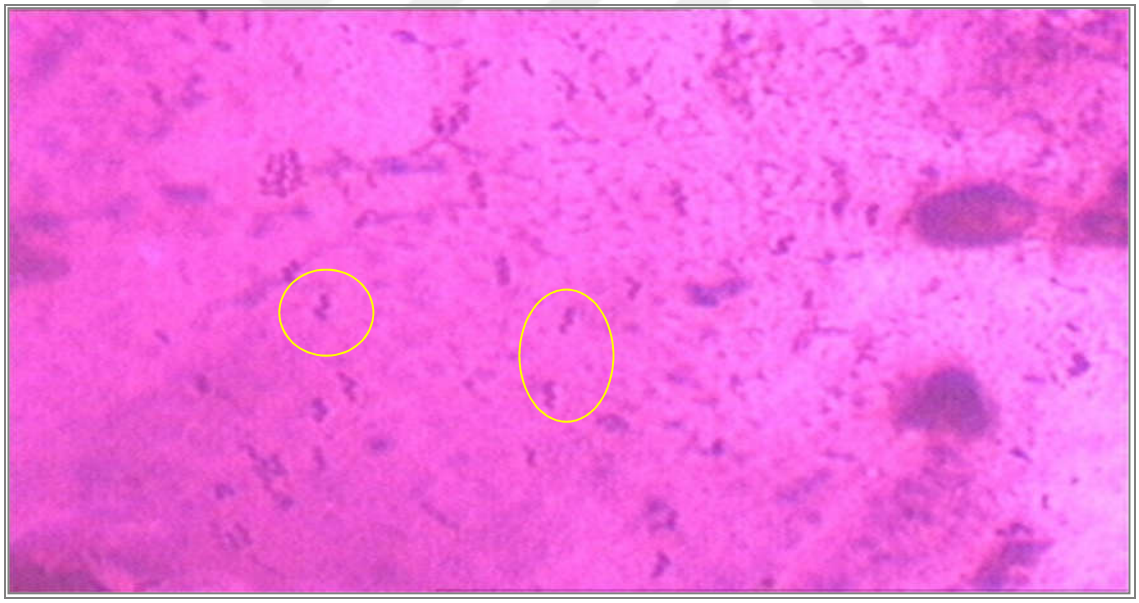


Şekil 14. %1 hemoglobin, %0.004 TTC içeren Columbia Blood agar besiyerinde gastrik biyopsi örneğinden izole edilen altın renkte *H. pylori* kolonilerinin görünümü

Şekil 15. %7 defibrine at kanı ve %0.3 aktif kömür içeren Columbia Blood agar besiyerinde gastrik biyopsi örneğinden izole edilen *H. pylori* kolonilerinin görünümü

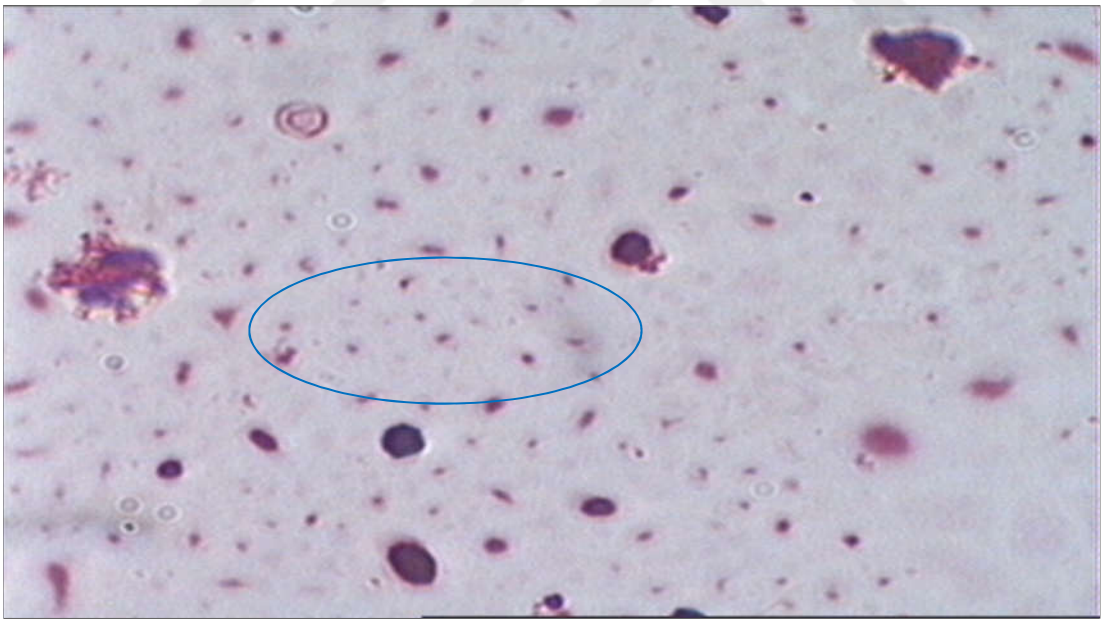
Kültür esnasında hastaların gastrik biyopsi örneklerinden direkt preparat hazırlanarak metilen mavisi, Gram boyama ve Modifiye Gram boyama yöntemleri ile boyandığında ışık mikroskobunda gastrik epitel hücreleri ve *H. pylori*'nin tipik "martı kanadı" spiral morfolojisi görüldü (Şekil 16,Şekil 17,Şekil 18). Eski kültürde *H. pylori*'nin spiral formunun kaybı ve kokoid forma dönüştüğü dikkati çekti (Şekil 19).

Şekil 16. Hastaların gastrik biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatta *H. pylori*'nin "martı kanadı" morfolojisinin görünümü (metilen mavisi boyama,100X)



Şekil 17. Hastaların gastrik biyopsi örneklerinden hazırlanan preparatta *H. pylori*'nin spiral morfolojisinin görünümü (Gram boyama,100X)

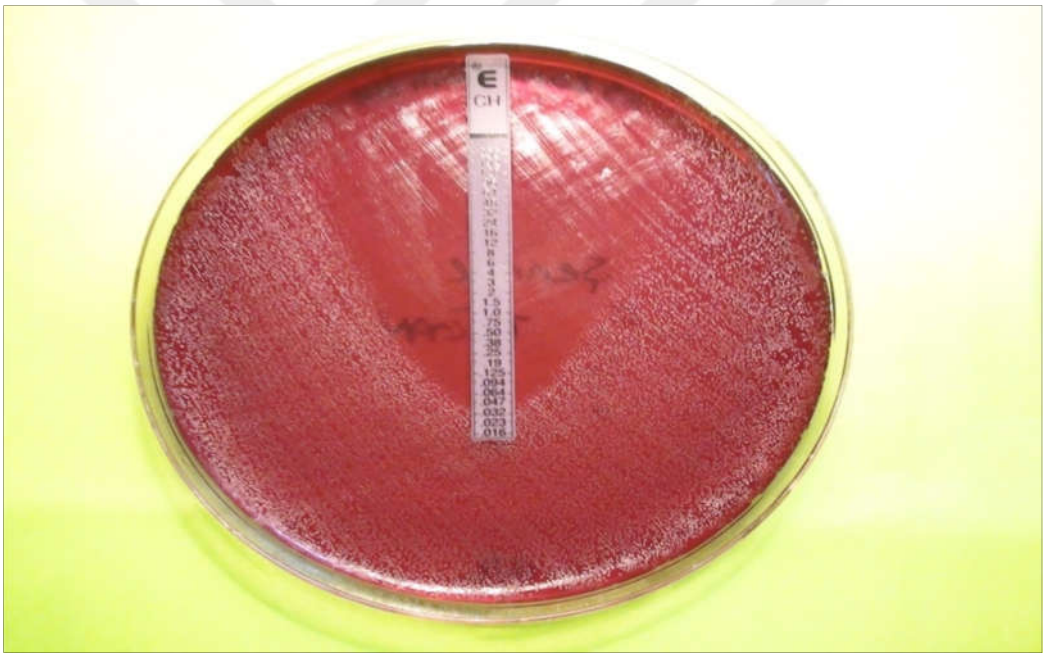
Şekil 18. Kültür besiyerinde üreyen kolonilerden hazırlanan preparatta *H. pylori*'nin spiral morfolojisinin görünümü (Modifiye Gram boyama,100X)



Şekil 19. Eski kültürde üreyen kolonilerden hazırlanan preparatta *H. pylori* kokoid formunun görünümü (Modifiye Gram boyama,100X)

4.6. Klaritromisin Gradiyent Diffüzyon Test (E-test) Bulguları

Araştırmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen 35 *H. pylori* suşlarına klaritromisin antibiyotik duyarlılık testi gradiyent diffüzyon yöntemi (E-testi) uygulanarak yapılmıştır, ancak duyarlı, dirençli ve MİK değerleri bulgulara kaydedilmediği için tez içeriğinde almamıştır, bu nedenle bulgularda sunulamamıştır. %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyerinde gradiyent diffüzyon yöntemi (E-testi) ile antibiyotik duyarlılık testi sonucu örneklem olarak aşağıda yer almıştır ve gastrik biyopsi örneklerimizden (antrum ve/veya korpus) izole ettiğimiz klaritromisine duyarlı bir *H. pylori* suşunda inhibisyon zonu ile stripin kesiştiği nokta MİK değeri (0.032 mg/L) (MİK ≥2 mg/L dirençli, MİK ≤1 mg/L duyarlı) olarak saptanmıştır (Şekil 20).



Şekil 20. Klaritromisin duyarlı *H. pylori* suşunun %5 defibrine koyun kanlı Mueller-Hinton agar besiyerinde E-test sonucu (MİK değer 0.032 mg/L) (MİK ≥2 mg/L dirençli, MİK ≤1 mg/L duyarlı)

4.7. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonunun Değerlendirilmesi

a. HÜT ve histopatoloji bulgularının ikisinin birlikte pozitif olduğu 48 (%40.0) hasta *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; 72 (%60.0) hasta ise *H. pylori* enfeksiyonu negatif kabul edildi.

Yetmiş iki negatif hasta içerisinde ise: HÜT ve histopatolojik incelemeden ikisininde negatif olduğu 17 (%23.6) hasta, HÜT veya histopatolojik incelemeden sadece birinin pozitif olduğu 23 (%32.0) hasta klinik yönden *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olarak değerlendirilmesine rağmen çalışmamızda negatif olarak kabul edildi ve istatistiksel analizlere dahil edilmedi. Otuz iki (%44.4) hastanın gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için *H. pylori* enfeksiyonu değerlendirilemedi.

b. Ayrıca, HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının en az ikisinin birlikte pozitif olduğu 66 (%55.0) hasta *H. pylori* enfeksiyonu pozitif; 54 (%45.0) hasta ise *H. pylori* enfeksiyonu negatif kabul edildi.

Elli dört negatif hasta içerisinde ise: her üç testin negatif olduğu 10 (%18.5) hasta negatif; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür sonuçlarından birinin pozitif olduğu 19 (%35.2) hasta klinik yönden *H. pylori* enfeksiyonu pozitif olarak değerlendirilmesine rağmen çalışmamızda değerlendirmeye alınmadı ve istatistiksel analizlere dahil edilmedi. Yirmi beş (%46.3) hastanın gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için *H. pylori* enfeksiyonu değerlendirilemedi.

4.8. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu Bulguları

Yüz yirmi hastada **a.** HÜT ve histopatoloji bulgularının ikisinin birlikte pozitifliği ayrıca **b.** HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının en az ikisinin birlikte pozitifliğine göre *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile hastaların cinsiyet ve yaş arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kadın ve erkek hastalarda *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ve dağılımı Pearson's Chi-Square test ile değerlendirildiğinde: **a.** HÜT ve histopatoloji, **b.** HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularına göre kadın ve erkek hastalar arasında *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.324, p=0.444) (Tablo 14).

H. pylori enfeksiyonu görülme sıklığı ile hastaların ortalama yaşı arasındaki ilişki incelendi, **a.** HÜT ve histopatoloji pozitif saptanan 48 hastada ortalama yaş 49.6±13.0; negatiflerde 51.3±15.3 saptandı, **b.** HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif saptanan 66 hastada ortalama yaş 49.9±13.8; negatiflerde 51.3±15.2 saptandı. Sonuçlar t-test ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0.529, p=0.617).

Tablo 14. Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığının cinsiyete göre dağılımı

Cinsiyet	HÜT ve histopatoloji (ikisinin birlikte pozitifliği)		HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik)	
	(+) n (%)	(–) n (%)	(+) n (%)	(–) n (%)
Kadın	31 (%43.7)	40 (%56.3)	37 (%52.1)	34 (%47.9)
Erkek	17 (%34.7)	32 (%65.3)	29 (%59.2)	20 (%40.8)
Toplam	48 (%40.0)	72 (%60.0)	66 (%55.0)	54 (%45.0)
	n=120		n=120	
***p**	p=0.324		p=0.444	

*Gözlenen ve beklenen değerlerar asında karşılaştırma testi (Pearson's Chi-Square) p değeri

4.9. Real-time RT-PCR Bulguları

4.9.1. *Real-time RT-PCR Testinin Standardizasyonu ve Pozitif Kontrol Bulguları*

RT RT-PCR testi hastaların gastrik biyopsi örneklerine uygulanmadan önce *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanılarak standarizasyon çalışmaları yapıldı. RT RT-PCR testinin standardizasyonu için *H. pylori* NCTC 11637 (*cagA, vacA, oipA* ve *babA* pozitif) standart suşunun H.p-1, H.p-2, H.p-3 ve H.p-5 stokları, %7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar ve H.p-4 stok suşunun %1 çözünebilir hemoglobinli, *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerlerinde subkültürleri yapıldı, bakteri süspansiyonları [H.p-1 için McFarland 1 (~$3X10^8$ CFU/ml); H.p-2, H.p-3, H.p-4 ve H.p-5 için McFarland 3 (~$9X10^8$ CFU/ml)] hazırlandı. Hazırlanan bu her bir bakteri süspansiyonlarından bakteri RNA ekstraksiyonu yapılarak elde edilen cDNA'lar RT RT-PCR testinde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, 16S rRNA ve *ureA* genlerinin ekspresyonu pozitif saptandı ve 18.27-31.32 arasında Ct değerleri elde edildi, fakat *omp20 (alpA)* geni için herhangi bir Ct değeri elde edilmedi ve ekspresyonu saptanmadı. %1

çözünebilir hemoglobinli *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerinde subkültürü yapılan H.p-4 stok suşunda saptanan Ct değerleri, %7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerinde subkültüleri yapılan H.p-1, H.p-2 ve H.p-5 stok suşlarının Ct değerlerine göre daha düşük saptandı. En düşük Ct değerler %7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerinde subkültürü yapılan H.p-3 stok suşunda saptandı. *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18*, 16S rRNA ve *ureA* genleri için ortalama Ct değerleri sırasıyla 22.34, 28.96, 28.14, 26.35, 28.70, 23.80 saptandı (Tablo 15).

Tablo 15. Real-time RT-PCR gen spresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı stok suşlarından elde edilen gen ekspresyon Ct değerleri

H. pylori **Subkültür**	***cagA*** **Ct değer**	***omp6*** **Ct değer**	***omp13*** **Ct değer**	***omp18*** **Ct değer**	***omp20*** **Ct değer**	**16S rRNA** **Ct değer**	***ureA*** **Ct değer**
*H.p-1	21.27	29.10	27.97	25.86	_	27.78	22.97
**H.p-2	26.01	30.98	30.71	27.62	_	31.32	24.48
** H.p-3	18.27	26.22	25.81	24.26	_	27.55	21.15
***H.p-4	21.71	27.34	25.93	25.37	–	25.77	22.84
**H.p-5	24.47	31.16	30.29	28.68	–	31.10	27.57
Ortalama Ct değer	22.34	28.96	28.14	26.35	–	28.70	23.80

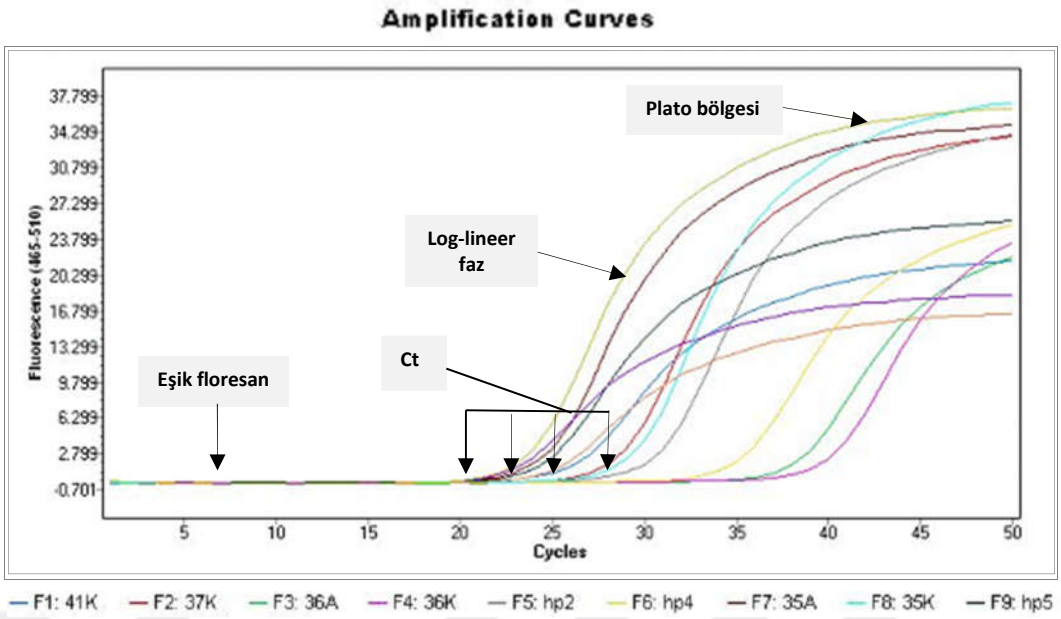
*H.p-1 (%7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar) McFarland 1 (~3X10^8 CFU/ml)

**H.p-2, H.p-3, H.p-5 (%7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar) McFarland 3 (~9X10^8 CFU/ml)

***H.p-4 (%1 çözünebilir hemogloninli *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar) McFarland 3 (~9X10^8 CFU/ml)

Ct: Eşik döngüsü

RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı stok suşlarında *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18,* 16S rRNA ve *ureA* genlerinin amplifikasyon eğrileri verilmiştir. *omp20 (alpA)* geni için herhangi bir Ct değeri elde edilmedi ve ekspresyonu saptanmadığı için amplifikasyon eğrisi verilmemiştir (Şekil 21).



Şekil 21. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun farklı stok subkültürlerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18,* 16S rRNA ve *ureA* genlerinin amplifikasyon eğrileri

4.9.2. *Real-time RT-PCR Testinin Standardizasyonu ve Negatif Kontrol Bulguları*

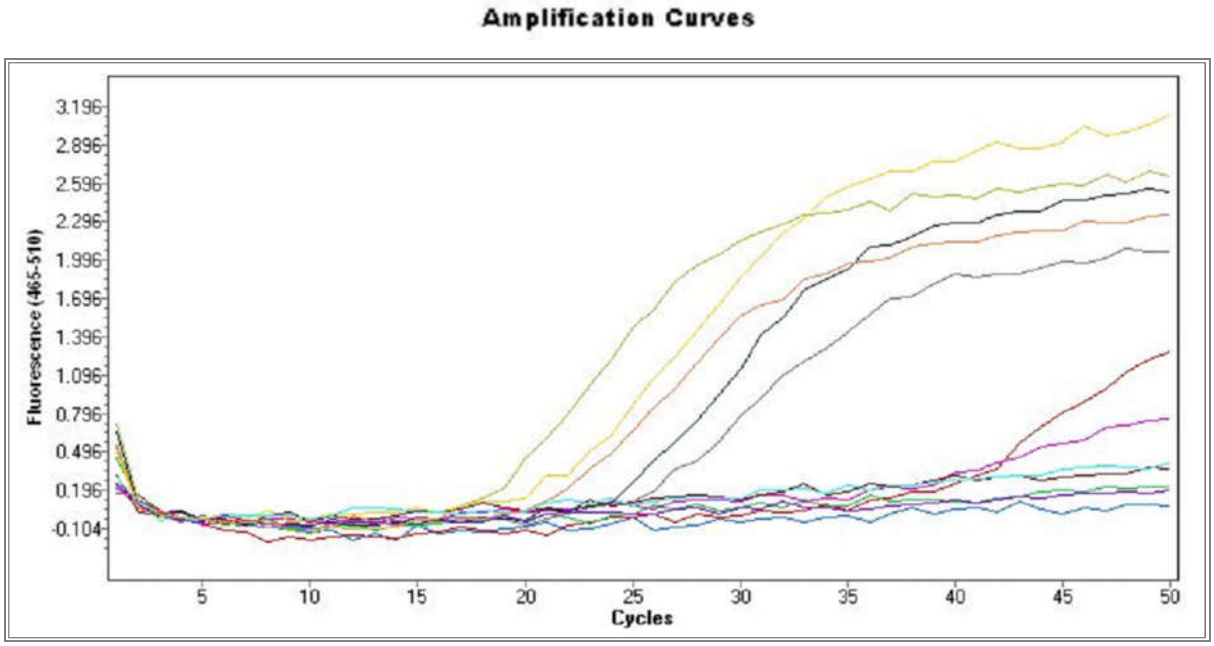
RT RT-PCR çalışmamızda kullanılan primerlerin *H. pylori* genlerine özgül olup olmadığını araştırmak için negatif kontroller olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşları ayrıca *Campylobacter jejuni* klinik izolatı subkültürlerinden hazırlanan bakteri süspansiyonlarından (10^7 CFU/ml) bakteri RNA ekstraksiyonu yapıldı, sentezlenen cDNA'lar RT RT-PCR deneyinde kullanılarak *H. pylori* 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin prob ve primerleri ile çapraz reaksyona girip girmediği araştırıldı.

Sonuçta RT RT-PCR amplifikasyonunda herhangi bir sinyal gözlenmediği ve negatif kontrol bakterilerinin *H. pylori* 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin prob veya primerleri ile çapraz reaksyon göstermediği saptandı.

4.9.3. *Helicobacter pylori cagA Gen Ekspresyon Bulguları*

H. pylori NCTC 11637 standart suşunun (H.p-3 stok suşu) subkültüründen bakteri süspansiyonu (10^8 CFU/ml) hazırlandı, bakteri RNA'sı ekstrakte edildi. Bakteri RNA'sından elde edilen cDNA'dan $1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$ ve $1/10^5$ seri dilüsyonlar yapılarak RT RT-PCR ile araştırıldı. Her beş seri dilüsyonlarda *H. pylori cagA* geninin ekspresyonu ve varlığı

saptandı. $1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$ ve $1/10^5$ dilüsyonlarda *cagA* geni için Ct değerleri sırasıyla 18.27, 21.27, 21.71, 24.47 ve 26.01 saptandı. Elde edilen Ct değerlerinin cDNA dilüsyonları birbiriyle karşılaştırıldı. $1/10^1$ dilüsyonundaki *cagA* Ct değeri $1/10^5$ dilüsyonundaki Ct değerine göre daha düşük (*cagA* mRNA transkriptleri daha fazla) saptandı. İlk RT RT-PCR çalışmamızda ise kullanılan aynı standart *H. pylori* suşunun farklı stoğundan subkültürü yapılan, bakteri RNA'sı izole edilen ve cDNA'sı elde edilen bu suşun *cagA* geni negatif bulunmuştur. Bu nedenle ikinci çalışmamızda yukarıda belirtilen farklı stok besiyerlerinde aynı *H. pylori* standart suşu çalışılmış ve *cagA* geni pozitif saptanmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun (H.p-3 stok suşu) beş farklı cDNA dilüsyonlarında *H. pylori cagA* geninin amplifikasyon eğrileri

4.9.4. *Hastaların Gastrik Biyopsi Örneklerinde Helicobacter pylori Real-time RT-PCR Bulguları*

Çalışmamızda 101 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerine uygulanan RT RT-PCR testinde, 77 (%76.2) hastada *H. pylori* 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlerinin her ikisinin de Ct değeri saptandı ve RT RT-PCR testi sonucunda eksprese olan genlerin her bir gastrik biyopsi örneklerinin gen ekspresyon pozitifliğinde *H. pylori* varlığı değerlendirildi. *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinin ekspresyonu pozitif saptanan hastalarda 18.99-45.00 arasında Ct değerleri saptandı. Ortalama Ct değerleri sırasıyla 28.82, 33.53, 32.57, 28.86, 25.63, 30.31, 24.63 elde edildi.

House-keeping genlerinin her ikisinin de Ct değeri saptanmadığı 20 (%19.8) hasta ayrıca bu genlerin antrum veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden birisinin Ct değeri saptanmadığı dört (%4.0) hasta toplam 24 (%23.8) hasta RT RT-PCR testi negatif olarak değerlendirildi. On dokuz hastanın gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için RT RT-PCR testi yapılamamıştır (Tablo 16).

Tablo 16. Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulguları

H. pylori	**HÜT n (%)**	**Histopatoloji n (%)**	**Kültür n (%)**	**RT RT-PCR n (%)**
	Antrum +Korpus/Hasta	**Antrum +Korpus/Hasta**	**Antrum +Korpus/Hasta**	**Antrum +Korpus/Hasta**
Pozitif	79 (%65.8)	63 (%71.6)	50 (%58.8)	77 (%76.2)
Negatif	41 (%34.2)	25 (%28.4)	35 (%41.2)	24 (%23.8)
Kontaminasyon	—	—	19 değerlendirilemedi	—
Biyopsi alınamadı	—	32	16	19
Toplam	120 (%100.0)	88 (%100.0)	104 (%100.0)	101 (%100.0)

RT RT-PCR sonuçları HÜT, histopatoloji ve kültür sonuçları ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi:

RT RT-PCR testi pozitif ve negatif bulunan 101 hastada, HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastanın 45 (%93.8)'i RT RT-PCR pozitif, üç (%6.2)'ü negatif saptandı. HÜT ve histopatoloji bulgularının negatif olduğu 72 hastanın 32 (%60.4)'si RT RT-PCR pozitif, 21 (%39.6)'i RT RT-PCR negatif saptandı. HÜT ve histopatoloji bulgularının negatif olduğu 72 hastada 19 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için RT RT-PCR testi yapılamamıştır. RT RT-PCR bulguları ile HÜT ve histopatoloji bulguları arasında uyumluluk "consistency" McNemar's Chi-Square test ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (**$p<0.001$**).

Aynı 101 hastada, HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının en az ikisinin birlikte pozitif olduğu 66 hastanın 60 (%92.3)'ı RT RT-PCR pozitif, beş (%7.7)'i negatif saptandı. On dokuz hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için RT RT-PCR testi yapılamamıştır. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının negatif olduğu

54 hastanın 17 (%47.2)'si RT RT-PCR pozitif, 19 (%52.8)'u negatif saptandı. RT RT-PCR bulguları ile HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulguları arasında uyumluluk McNemar's Chi-Square test ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (**p=0.017**).

RT RT-PCR testi pozitif veya negatif bulunan 73 hastada, kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastanın 45 (%93.8)'i RT RT-PCR pozitif; üç (%6.3)'ü negatif saptandı. İki hastadan gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için RT RT-PCR testi yapılamamıştır. *H. pylori* kültür sonucunun negatif olduğu 25 hastanın 10 (%40.0)'u RT RT-PCR pozitif; 15 (%60.0)'i negatif saptandı. On hastadan gastrik biyopsi örnekleri alınamadığı için RT RT-PCR testi yapılamamıştır. RT RT-PCR sonuçları ile kültür sonuçları arasında uyumluluk McNemar's Chi-Square test ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (p=0.092). RT RT-PCR ve kültür sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu tespit edildi.

RT RT-PCR çalışmamızda elde edilen sonuçlar HÜT, histopatoloj ve kültür sonuçları ile dört gözlü bir tablo oluşturularak karşılaştırıldı. RT RT-PCR testinin performansı değerlendirildi. Yüz bir hastada HÜT ve histopatoloji sonuçlarına göre RT RT-PCR testinin duyarlılığı %94.0 ve özgüllüğü %40.0 saptandı. Aynı 101 hastada, HÜT, histopatoloji ve/veya kültür sonuçlarına göre RT RT-PCR testinin duyarlılığı %92.0 ve özgüllüğü %53.0 saptandı. Ayrıca 73 hastada RT RT-PCR sonuçları kültür sonuçları ile karşılaştırıldığında, duyarlılığı %94.0 ve özgüllüğü %60.0 saptandı. Toplam başarım oranları sırasıyla %65.3, %78.0 ve %82.0 elde edildi (Tablo17).

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada kültür pozitif saptanan 30 hasta sonucu ile RT RT-PCR sonuçları birlikte dört gözlü bir tablo oluşturularak karşılaştırıldı. RT RT-PCR testinin duyarlılığı %100.0 ve özgüllüğü %40.0 saptandı. Toplam başarım oranı %91.0 elde edildi (Tablo 18).

Tablo 17. *H. pylori* RT RT-PCR testinin tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü

		ALTIN STANDART	
		POZİTİF	**NEGATİF**
TANI TESTİ	**POZİTİF**	**GP**	**YP (Tip 1 hata)**
	NEGATİF	**YN (Tip 2 hata)**	**GN**

YP: Yalancı pozitif GP: Gerçek pozitif
YN: Yalancı negatif GN: Gerçek negatif
Duyarlılık=GP/P=GP/(GP+YN)×100
Özgüllük=GN/N=GN/(GN+YP)×100

HÜT+Histo.

		+	–		
RT RT-PCR	+	45	32	77	Duyarlılık= %94.0
	–	3	21	24	Özgüllük= %40.0
		48	53	101	n=101

Toplam başarım oranı=45+21/101×100=%65.3

HÜT+Histo.ve/veya Kültür

		+	–		
RT RT-PCR	+	60	17	77	Duyarlılık= %92.0
	–	5	19	24	Özgüllük= %53.0
		65	36	101	n=101

Toplam başarım oranı=60+19/101×100=%78.0

Kültür

		+	–		
RT RT-PCR	+	45	10	55	Duyarlılık= %94.0
	–	3	15	8	Özgüllük= %60.0
		48	25	73	n=73

Toplam başarım oranı=45+15/73×100=%82.0

Tablo 18. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada 35 hastanın *H. pylori* RT RT-PCR ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

		ALTIN STANDART	
		POZİTİF	**NEGATİF**
TANI TESTİ	**POZİTİF**	**GP**	**YP (Tip 1 hata)**
	NEGATİF	**YN (Tip 2 hata)**	**GN**

YP: Yalancı pozitif
YN: Yalancı negatif
Duyarlılık=GP/P=GP/(GP+YN)×100
Özgüllük=GN/N=GN/(GN+YP)×100

Kültür

		+	–		
RT RT-PCR	+	30	3	33	Duyarlılık= %100.0
	–	0	2	2	Özgüllük= %40.0
		30	5	35	n=35

Toplam başarım oranı=30+2/35×100=%91.0

Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları ile hastaların demografik, endoskopik ve RT RT-PCR bulguları verilmiştir (Tablo 19).

Hastaların HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre (HÜT ve histopatoloji pozitif; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif; kültür pozitif) RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri verilmiştir (Tablo 20,Tablo 21,Tablo 22).

Tablo 19. Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları ile hastaların demografik, endoskopik ve RT RT-PCR bulguları

Hasta No.	Cins	Endos-kopik bulgu	Antrum H.p HÜT	Korpus H.p HÜT	Antrum +Korpus H.p HÜT	Antrum H.p histo-patoloji	Korpus H.p histo-patoloji	Antrum +Korpus H.p histo-patoloji	Antrum H.p kültür	Korpus H.p kültür	Antrum +Korpus H.p kültür	H.p HÜT ve histo-Patoloji poz.	H.p HÜT, histo-patoloji ve/veya kültür poz.	H.p kültür poz.	RT RT-PCR Antrum +Korpus *16S rRNA poz.	RT RT-PCR Antrum +Korpus •*ureA* poz.	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte poz.
No.1	K	GÜ/E	+	BA	+	+	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+
No.2	E	NEG	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.3	K	DÜ/E	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.4	E	EG	+	BA	+	+	BA	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+
No.5	K	EG	+	BA	+	+	BA	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+
No.6	E	NEG	+	BA	+	+	BA	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+
No.7	K	NEG	+	BA	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.8	K	EG	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9	E	NEG	+	BA	+	+	BA	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.10	K	NEG	+	BA	+	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.11	E	EG	+	+	+	BA	+	+	+	KON	+	+	+	+	+	+	+
No.12	K	EG	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.13	E	DÜ/E	+	+	+	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.14	K	GÜ/E	+	BA	+	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.15	K	DÜ/E	+	BA	+	+	BA	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.16	K	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	+	–	+	–	+	+	+	+	+
No.17	K	NM	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.18	E	EG	+	BA	+	BA	BA	BA	+	KON	+	–	+	+	+	+	+
No.19	E	GÜ/E	+	BA	+	–	BA	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.20	E	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.21	E	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.22	K	DÜ/E	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.23	K	DÜ/E	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.24	E	NM	+	+	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.25	E	NEG	+	+	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.26	E	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.27	K	NEG	+	BA	+	–	BA	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.28	E	DÜ/E	+	BA	+	BA	BA	BA	+	–	+	–	+	+	+	+	+
No.29	E	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	KON	+	+	–	+	+	+	+	+
No.30	E	NEG	+	BA	+	BA	–	–	+	–	+	–	+	+	–	–	–
No.31	K	NEG	+	BA	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	–
No.32	K	NEG	+	BA	+	BA	+	+	BA	BA	BA	+	+	BA	+	+	+
No.33	E	GÜ/E	+	BA	+	BA	+	+	KON	KON	KON	+	+	KON	+	+	+
No.34	E	NEG	+	BA	+	+	+	+	KON	BA	KON	+	+	BA	+	+	+
No.35	E	EG	+	BA	+	BA	+	+	KON	KON	KON	+	+	KON	+	+	+
No.36	K	NEG	+	BA	+	+	BA	+	KON	KON	KON	+	+	KON	+	+	+
No.37	K	EG	+	BA	+	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	BA	–	–	–
No.38	K	EG	+	BA	+	BA	+	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–
No.39	K	NEG	+	BA	+	+	BA	+	–	–	–	+	+	–	+	–	–

Tablo 19. Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları ile hastaların demografik, endoskopik ve RT RT-PCR bulguları (devamı)

No.40	K	EG	+	BA	+	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	BA	+	+	+
No.41	E	NEG	–	BA	–	BA	BA	BA	+	–	+	–	–	+	–	+	–
No.42	E	NEG	–	BA	–	–	–	–	+	–	+	–	–	+	BA	BA	BA
No.43	E	NEG	–	BA	–	+	+	+	KON	KON	KON	–	–	KON	+	+	+
No.44	E	GK	–	BA	–	+	BA	+	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.45	K	EG	–	BA	–	+	BA	+	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.46	E	NEG	–	BA	–	BA	+	+	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.47	E	NEG	–	–	–	BA	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.48	K	EG	–	BA	–	BA	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.49	E	EG	–	BA	–	+	BA	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.50	K	NEG	–	BA	–	+	BA	+	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.51	E	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.52	E	EG	+	BA	+	BA	BA	BA	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.53	E	GK	+	BA	+	BA	BA	BA	–	KON	–	–	–	–	+	+	+
No.54	K	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.55	E	EG	+	+	+	BA	BA	BA	KON	KON	KON	–	–	KON	+	+	+
No.56	K	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	KON	KON	KON	–	–	KON	+	+	+
No.57	K	EG	–	+	+	BA	BA	BA	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.58	K	NEG	+	BA	+	–	–	–	KON	KON	KON	–	–	KON	BA	BA	BA
No.59	K	NEG	+	BA	+	BA	–	–	KON	KON	KON	–	–	KON	BA	BA	BA
No.60	K	NEG	+	BA	+	BA	BA	BA	BA	BA	BA	–	–	BA	+	+	+
No.61	K	NEG	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
No.62	E	NEG	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.63	K	NEG	–	BA	–	–		–	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.64	K	NEG	–	BA	–	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.65	K	EG	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.66	K	NEG	–	BA	–	–	BA	–	KON	KON	KON	–	–	KON	BA	BA	BA
No.67	K	NEG	–	BA	–	BA	BA	BA	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.68	K	NM	–	BA	–	BA	BA	BA	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.69	K	NEG	–	BA	–	BA	BA	BA	KON	KON	KON	–	–	KON	BA	BA	BA
No.70	K	NEG	–	BA	–	–	–	–	KON	KON	KON	–	–	KON	BA	BA	BA
No.71	E	NEG	–	BA	–	BA	BA	BA	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.72	K	EG	–	BA	–	–	–	–	KON	KON	KON	–	–	KON	BA	BA	BA
No.73	E	NEG	–	BA	–	–	–	–	KON	KON	KON	–	–	KON	–	+	–
No.74	E	EG	–	BA	–	BA	BA	BA	BA	BA	BA	–	–	BA	–	–	–
No.75	K	EG	–	BA	–	BA	BA	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.76	E	GÜ/E	–	BA	–	BA	BA	BA	BA	BA	BA	–	–	BA	–	–	–
No.77	E	NEG	–	+	+	BA	BA	BA	–	+	+	–	+	+	BA	BA	BA
No.78	E	DÜ/E	+	BA	+	BA	BA	BA	KON	KON	KON	–	–	KON	–	–	–
No.79	K	GÜ/E	–	BA	–	–	BA	–	BA	BA	BA	–	–	BA	Antrum BA	Korpus BA	BA
No.80	K	NEG	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
No.81	E	EG	–	BA	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+
No.82	E	NEG	+	BA	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.83	K	NEG	+	BA	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 19. Yüz yirmi hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları ile hastaların demografik, endoskopik ve RT RT-PCR bulguları (devamı)

No.84	K	EG	–	BA	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+
No.85	K	GÜ/E	–	BA	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.86	K	NEG	+	–	+	+	+	+	KON	+	+	+	+	+	+	+	+
No.87	K	EG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.88	K	NEG	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.89	K	NEG	–	–	–	BA	BA	BA	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.90	K	NEG	+	–	+	–	BA	–	KON	–	–	–	–	–	+	+	+
No.91	K	NEG	+	–	+	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.92	K	NEG	–	–	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.93	K	EG	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+
No.94	K	DÜ/E	+	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.95	K	NEG	+	+	+	+	+	+	KON	KON	KON	+	+	KON	+	+	+
No.96	K	GÜ/E	–	BA	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.97	K	NEG	+	BA	+	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	BA	+	+	+
No.98	K	NEG	+	–	+	+	+	+	BA	BA	BA	+	+	BA	+	+	+
No.99	K	GÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.100	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.101	E	NEG	+	–	+	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.102	E	GÜ/E	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.103	K	GÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.104	E	DÜ/E	+	–	+	+	+	+	KON	KON	KON	+	+	KON	+	+	+
No.105	E	NEG	+	–	+	+	+	+	+	KON	+	+	+	+	+	+	+
No.106	E	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.107	E	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.108	K	NEG	–	–	–	BA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.109	E	NEG	+	+	+	BA	BA	BA	+	+	+	–	+	+	+	+	+
No.110	E	NEG	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	BA	BA	BA
No.111	K	EG	–	BA	–	+	BA	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–
No.112	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.113	K	EG	–	–	–	–	–	–	KON	KON	KON	–	–	KON	–	–	–
No.114	K	EG	+	BA	+	+	BA	+	–	–	–	+	+	–	+	+	+
No.115	K	EG	+	+	+	+	BA	+	BA	BA	BA	+	+	BA	+	+	+
No.116	K	NEG	–	+	+	+	BA	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+
No.117	E	NEG	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	+	–	+	+	+
No.118	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.119	E	NEG	+	BA	+	+	+	+	KON	BA	KON	+	+	KON	+	+	+
No.120	K	NEG	+	–	+	+	–	+	–	–	–	+	+	–	+	+	+

H.p: *Helicobacter pylori*

BA: Biyopsi alınamadı; KON: Kontaminasyon; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; GK: Gastrik kanser; NM: Normal mukoza; K: Kadın; E: Erkek

1-78 nolu hastalarda antrum ve korpus birleştirilmiş tek örnek olarak, 79-120 nolu hastalarda antrum ayrı, korpus ayrı örnek olarak RT RT-PCR testi çalışılmıştır.

*****_H. pylori_ 16S rRNA house-keeping gen

•_H. pylori ureA_ house-keeping gen

Tablo 20. HÜT ve histopatoloji pozitif 48 hastada 45 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri

Hasta No.	Endos-kopik bulgu	A+K H.p HÜT	A+K H.p histo-patoloji	H.p HÜT ve histo-patoloji poz.	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte poz.	A+K *cagA*	A+K *omp6*	A+K *omp13*	A+K *omp18*	A+K *omp20*	A+K ΔCt *cagA* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp6* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp13* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp18* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp20* *16S rRNA	A+K ΔCt *cagA* •*ureA*	A+K ΔCt *omp6* •*ureA*	A+K ΔCt *omp13* •*ureA*	A+K ΔCt *omp18* •*ureA*	A+K ΔCt *omp20* •*ureA*
No.1	GÜ/E	+	+	+	+	+	–	–	+	–	5,657			6,233		0,055			0,061	
No.2	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,085	0,154	7,151	13,40		0,001	0,002	0,073	0,137
No.3	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	+	+	63,445	0,187		0,842	0,004	1,557	0,005		0,021	0,000
No.4	EG	+	+	+	+	+	–	+	+	+	0,090		0,003	0,696	6,012	0,002		0,000	0,016	0,140
No.5	EG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14,583	0,494	0,975	2,206	24,65	0,242	0,008	0,016	0,037	0,409
No.6	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	29,726	0,032	0,753	3,011	49,07	0,246	0,000	0,006	0,025	0,407
No.7	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	–	18,320	0,012	1,499	3,583		0,175	0,000	0,014	0,034	
No.8	EG	+	+	+	+	+	+	+	+	–	3,526	0,003	0,100	2,260		0,256	0,000	0,007	0,164	
No.9	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	77,488	0,001	1,545	8,077	57,89	0,281	0,000	0,006	0,029	0,210
No.10	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,038	0,001	0,254	1,150	13,82	0,129	0,000	0,008	0,037	0,442
No.11	EG	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,202	0,140	1,444	23,65		0,009	0,006	0,065	1,061
No.12	EG	+	+	+	+	+	–	–	+	+	0,000			4,821	51,43	0,000			0,096	1,024
No.13	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,134	0,000	1,474	1,986	19,83	0,191	0,000	0,055	0,074	0,737
No.14	GÜ/E	+	+	+	+	–	–	+	+	+			0,463	0,068	41,93			0,013	0,002	1,156
No.15	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	+	+	0,642	0,060		0,578	13,92	0,042	0,004		0,038	0,910
No.32	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,000	1,339	0,778	1,986		0,000	3,187	1,852	4,726
No.33	GÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,036	0,543	0,006	3,506	34,53	0,000	0,005	0,000	0,030	0,297
No.34	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	–	3,167	0,006	0,000	1,533		0,109	0,000	0,000	0,053	
No.35	EG	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,374	0,064	2,317	7,364		0,023	0,004	0,141	0,448
No.36	NEG	+	+	+	+	+	+	–	+	+	0,000	1,531		2,145	64,38	0,000	0,034		0,048	1,439
No.37	EG	+	+	+	–															
No.38	EG	+	+	+	–															
No.39	NEG	+	+	+	–															
No.40	EG	+	+	+	+	–	–	–	+	+				0,083	0,204					
No.82	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,047	0,466	0,549	0,021	11,06	0,184	0,010	0,013	0,000	0,290
No.83	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,398	0,239	0,823	18,53		0,009	0,005	0,015	0,444
No.86	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,305	0,001	0,640	0,676	26,22	0,186	0,000	0,014	0,015	0,588
No.91	NEG	+	+	+	+	+	–	+	+	–	0,590		0,578	0,498		0,603		4,799	0,375	
No.94	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	72,675	1,036	0,405	1,002	9,256	3,405	0,045	0,017	0,043	0,405
No.95	NEG	+	+	+	+	–	–	+	+	+			0,000	2,951	55,96			0,000	0,012	0,232
No.97	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,154	0,008	0,307	0,209	1,986	0,633	0,008	0,349	0,322	5,119

Tablo 20. HÜT ve histopatoloji pozitif 48 hastada 45 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri (devamı)

No.98	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,949	0,396	0,102	0,715	5,283	0,191	0,673	0,229	0,158	2,691
No.99	GÜ/E	+	+	+	+	−	+	+	+	+		0,064	0,013	2,857	26,23		0,001	0,000	0,040	0,374
No.100	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,526	0,001	0,288	1,449	3,723	0,457	0,000	0,043	0,113	0,129
No.102	GÜ/E	+	+	+	+	−	−	+	+	+			0,029	0,746	9,119			0,001	0,060	1,170
No.103	GÜ/E	+	+	+	+	−	+	+	+	+		0,001	0,033	1,061	61,89		0,000	0,001	0,041	2,425
No.104	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,161	0,361	0,460	0,342	2,099	1,333	0,877	1,117	0,253	5,098
No.105	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10,139	0,386	0,241	4,542	27,79	0,075	0,004	0,000	0,042	0,343
No.106	NEG	+	+	+	+	+	+	−	+	+	3,060	0,801		0,539	14,75	0,343	0,092		0,061	1,617
No.107	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	−	4,535	0,485	0,059	1,101		0,136	0,027	0,002	0,048	
No.112	NEG	+	+	+	+	−	+	+	+	+		0,367	0,055	1,032	21,77		0,020	0,003	0,056	1,196
No.114	EG	+	+	+	+	+	+	+	+	−	0,011	0,001	0,277	1,731		0,000	0,000	0,002	0,014	
No.115	EG	+	+	+	+	−	−	−	+	−				0,463					0,952	
No.116	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,262	0,371	0,612	0,739	36,98	0,169	0,019	0,031	0,037	1,850
No.117	NEG	+	+	+	+	−	+	+	+	+		0,545	0,476	1,184	32,12		0,017	0,011	0,031	0,880
No.118	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	53,926	1,403	0,695	3,938	99,13	0,410	0,021	0,006	0,030	0,912
No.119	NEG	+	+	+	+	+	−	+	+	+	0,005		0,177	2,415	34,42	0,000		0,003	0,046	0,725
No.120	NEG	+	+	+	+	−	+	+	+	+		0,384	0,790	1,017	0,463		0,013	0,026	0,680	2,346

H.p: *Helicobacter pylori*; A: Antrum; K: Korpus; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit,; NEG: Non-eroziv gastrit; Ct: Eşik döngü sayısı; ΔCt: Normalize Ct değeri

*Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.

•Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu *ureA* house-keeping gene göre yapılmıştır.

Tablo 21. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif 66 hastada 60 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri

Hasta No.	Endos-kopik bulgu	A+K H.p HÜT	A+K H.p histo-patoloji	A+K H.p kültür	H.p HÜT,histo-patoloji ve/veya kültür poz.	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte poz.	A+K *cagA*	A+K *omp6*	A+K *omp13*	A+K *omp18*	A+K *omp20*	A+K ΔCt *cagA* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp6* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp13* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp18* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp20* *16S rRNA	A+K ΔCt *cagA* •*ureA*	A+K ΔCt *omp6* •*ureA*	A+K ΔCt *omp13* •*ureA*	A+K ΔCt *omp18* •*ureA*	A+K ΔCt *omp20* •*ureA*
No.1	GÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	5,657			6,233		0,055			0,061	
No.2	NEG	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,085	0,154	7,151	13,403		0,001	0,002	0,073	0,137
No.3	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	63,445	0,187		0,842	0,004	1,557	0,005		0,021	0,000
No.4	EG	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	0,090		0,003	0,696	6,012	0,002		0,000	0,016	0,140
No.5	EG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14,583	0,494	0,975	2,206	24,657	0,242	0,008	0,016	0,037	0,409
No.6	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	29,726	0,032	0,753	3,011	49,070	0,246	0,000	0,006	0,025	0,407
No.7	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	18,320	0,012	1,499	3,583		0,175	0,000	0,014	0,034	
No.8	EG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	3,526	0,003	0,100	2,260		0,256	0,000	0,007	0,164	
No.9	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	77,488	0,001	1,545	8,077	57,891	0,281	0,000	0,006	0,029	0,210
No.10	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,038	0,001	0,254	1,150	13,823	0,129	0,000	0,008	0,037	0,442
No.11	EG	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,202	0,140	1,444	23,659		0,009	0,006	0,065	1,061
No.12	EG	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	0,000			4,821	51,438	0,000			0,096	1,024
No.13	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,134	0,000	1,474	1,986	19,835	0,191	0,000	0,055	0,074	0,737
No.14	GÜ/E	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+			0,463	0,068	41,933			0,013	0,002	1,156
No.15	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	0,642	0,060		0,578	13,929	0,042	0,004		0,038	0,910
No.16	NEG	+	BA	+	+	+	–	+	+	+	+		0,352	0,610	2,113	19,888		0,016	0,027	0,094	0,886
No.17	NM	+	BA	+	+	+	+	–	+	+	+	15,704		0,694	4,299	33,707	0,120		0,005	0,033	0,258
No.18	EG	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	0,943	0,484	0,721	3,541	52,076	0,003	0,002	0,002	0,011	0,162
No.19	GÜ/E	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+		5,979	6,543	22,00	312,99		0,010	0,010	0,036	0,516
No.20	NEG	+	BA	+	+	+	+	+	–	+	+	49,352	0,028		5,826	32,891	0,214	0,000		0,025	0,143
No.21	NEG	+	BA	+	+	+	+	–	–	+	+	29,344			6,815	98,621	0,509			0,118	1,712
No.22	DÜ/E	+	BA	+	+	+	–	+	–	+	+		0,160		0,853	12,042		0,004		0,019	0,270
No.23	DÜ/E	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	5,696	0,002	0,511	3,340	61,820	0,097	0,000	0,009	0,057	1,047
No.24	NM	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	–	76,867	0,235	0,967	0,960		0,911	0,003	0,011	0,011	
No.25	NEG	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	–	3,739	0,152	0,798	3,730		0,049	0,002	0,010	0,049	
No.26	NEG	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	–	7,770	0,707	0,001	1,365		0,616	0,056	0,000	0,108	
No.27	NEG	+	–	+	+	+	–	+	+	+	–		0,628	0,000	4,021			0,005	0,000	0,032	
No.28	DÜ/E	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	30,423	0,239	0,418	2,830	54,911	1,178	0,009	0,016	0,110	2,126
No.29	NEG	+	BA	+	+	+	–	+	+	+	–		2,312	0,002	3,471			0,087	0,000	0,131	
No.30	NEG	+	–	+	+	–															
No.31	NEG	+	–	+	+	–															

Tablo 21. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif 66 hastada 60 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri (devamı)

No.32	NEG	+	+	BA	+	+	–	+	+	+	+		0,000	1,339	0,778	1,986		0,000	3,187	1,852	4,726
No.33	GÜ/E	+	+	KON	+	+	+	+	+	+	+	0,036	0,543	0,006	3,506	34,535	0,000	0,005	0,000	0,030	0,297
No.34	NEG	+	+	KON	+	+	+	+	+	+	–	3,167	0,006	0,000	1,533		0,109	0,000	0,000	0,053	
No.35	EG	+	+	KON	+	+	–	+	+	+	+		0,374	0,064	2,317	7,364		0,023	0,004	0,141	0,448
No.36	NEG	+	+	KON	+	+	+	+	–	+	+	0,000	1,531		2,145	64,386	0,000	0,034		0,048	1,439
No.37	EG	+	+	BA	+	–															
No.38	EG	+	+	–	+	–															
No.39	NEG	+	+	–	+	–															
No.40	EG	+	+	BA	+	+	–	–	–	+	+				0,083	0,204					
No.77	NEG	+	BA	+	+	BA															
No.82	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,047	0,466	0,549	0,021	11,061	0,184	0,010	0,013	0,000	0,290
No.83	NEG	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,398	0,239	0,823	18,539		0,009	0,005	0,015	0,444
No.86	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,305	0,001	0,640	0,676	26,227	0,186	0,000	0,014	0,015	0,588
No.91	NEG	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	0,590		0,578	0,498		0,603		4,799	0,375	
No.94	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	72,675	1,036	0,405	1,002	9,256	3,405	0,045	0,017	0,043	0,405
No.95	NEG	+	+	KON	+	+	–	–	+	+	+			0,000	2,951	55,965			0,000	0,012	0,232
No.97	NEG	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	0,154	0,008	0,307	0,209	1,986	0,633	0,008	0,349	0,322	5,119
No.98	NEG	+	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	2,949	0,396	0,102	0,715	5,283	0,191	0,673	0,229	0,158	2,691
No.99	GÜ/E	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,064	0,013	2,857	26,236		0,001	0,000	0,040	0,374
No.100	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,526	0,001	0,288	1,449	3,723	0,457	0,000	0,043	0,113	0,129
No.102	GÜ/E	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+			0,029	0,746	9,119			0,001	0,060	1,170
No.103	GÜ/E	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,001	0,033	1,061	61,893		0,000	0,001	0,041	2,425
No.104	DÜ/E	+	+	KON	+	+	+	+	+	+	+	3,161	0,361	0,460	0,342	2,099	1,333	0,877	1,117	0,253	5,098
No.105	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10,139	0,386	0,241	4,542	27,799	0,075	0,004	0,000	0,042	0,343
No.106	NEG	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	3,060	0,801		0,539	14,758	0,343	0,092		0,061	1,617
No.107	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	4,535	0,485	0,059	1,101		0,136	0,027	0,002	0,048	
No.109	NEG	+	BA	+	+	+	+	+	+	+	+	749,61	0,065	0,357	0,594	23,497	28,246	0,006	0,032	0,046	2,187
No.112	NEG	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,367	0,055	1,032	21,778		0,020	0,003	0,056	1,196
No.114	EG	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	0,011	0,001	0,277	1,731		0,000	0,000	0,002	0,014	
No.115	EG	+	+	BA	+	+	–	–	–	+	–				0,463					0,952	
No.116	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,262	0,371	0,612	0,739	36,984	0,169	0,019	0,031	0,037	1,850
No.117	NEG	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+		0,545	0,476	1,184	32,121		0,017	0,011	0,031	0,880
No.118	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	53,926	1,403	0,695	3,938	99,134	0,410	0,021	0,006	0,030	0,912
No.119	NEG	+	+	KON	+	+	+	–	+	+	+	0,005		0,177	2,415	34,422	0,000		0,003	0,046	0,725
No.120	NEG	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+		0,384	0,790	1,017	0,463		0,013	0,026	0,680	2,346

H.p: *Helicobacter pylori*; A: Antrum; K: Korpus; BA: Biyopsi alınamadı; KON: Kontaminasyon: GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; NM: Normal mukoza; Ct: Eşik döngü sayısı; ΔCt: Normalize Ct değeri *Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır; •Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu *ureA* house-keeping gene göre yapılmıştır.

Tablo 22. Kültür sonucu pozitif saptanan 50 hastada 45 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri

Hasta No.	Endos-kopik bulgu	H.p pozitifliği kültür	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte poz.	A+K *cagA*	A+K *omp6*	A+K *omp13*	A+K *omp18*	A+K *omp20*	A+K ΔCt *cagA* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp6* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp13* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp18* *16S rRNA	A+K ΔCt *omp20* *16S rRNA	A+K ΔCt *cagA* •*ureA*	A+K ΔCt *omp6* •*ureA*	A+K ΔCt *omp13* •*ureA*	A+K ΔCt *omp18* •*ureA*	A+K ΔCt *omp20* •*ureA*
No.1	GÜ/E	+	+	+	–	–	+	–	5,657			6,233		0,055			0,061	
No.2	NEG	+	+	–	+	+	+	+		0,085	0,154	7,151	13,403		0,001	0,002	0,073	0,137
No.3	DÜ/E	+	+	+	+	–	+	+	63,445	0,187		0,842	0,004	1,557	0,005		0,021	0,000
No.4	EG	+	+	+	–	+	+	+	0,090		0,003	0,696	6,012	0,002		0,000	0,016	0,140
No.5	EG	+	+	+	+	+	+	+	14,583	0,494	0,975	2,206	24,657	0,242	0,008	0,016	0,037	0,409
No.6	NEG	+	+	+	+	+	+	+	29,726	0,032	0,753	3,011	49,070	0,246	0,000	0,006	0,025	0,407
No.7	NEG	+	+	+	+	+	+	–	18,320	0,012	1,499	3,583		0,175	0,000	0,014	0,034	
No.8	EG	+	+	+	+	+	+	–	3,526	0,003	0,100	2,260		0,256	0,000	0,007	0,164	
No.9	NEG	+	+	+	+	+	+	+	77,488	0,001	1,545	8,077	57,891	0,281	0,000	0,006	0,029	0,210
No.10	NEG	+	+	+	+	+	+	+	4,038	0,001	0,254	1,150	13,823	0,129	0,000	0,008	0,037	0,442
No.11	EG	+	+	–	+	+	+	+		0,202	0,140	1,444	23,659		0,009	0,006	0,065	1,061
No.12	EG	+	+	+	–	–	+	+	0,000			4,821	51,438	0,000			0,096	1,024
No.13	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	5,134	0,000	1,474	1,986	19,835	0,191	0,000	0,055	0,074	0,737
No.14	GÜ/E	+	+	–	–	+	+	+			0,463	0,068	41,933			0,013	0,002	1,156
No.15	DÜ/E	+	+	+	+	–	+	+	0,642	0,060		0,578	13,929	0,042	0,004		0,038	0,910
No.16	NEG	+	+	–	+	+	+	+		0,352	0,610	2,113	19,888		0,016	0,027	0,094	0,886
No.17	NM	+	+	+	–	+	+	+	15,704		0,694	4,299	33,707	0,120		0,005	0,033	0,258
No.18	EG	+	+	+	+	+	+	+	0,943	0,484	0,721	3,541	52,076	0,003	0,002	0,002	0,011	0,162
No.19	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+		5,979	6,543	22,009	312,99		0,010	0,010	0,036	0,516
No.20	NEG	+	+	+	+	–	+	+	49,352	0,028		5,826	32,891	0,214	0,000		0,025	0,143
No.21	NEG	+	+	+	–	–	+	+	29,344			6,815	98,621	0,509			0,118	1,712
No.22	DÜ/E	+	+	–	+	–	+	+		0,160		0,853	12,042		0,004		0,019	0,270
No.23	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	5,696	0,002	0,511	3,340	61,820	0,097	0,000	0,009	0,057	1,047
No.24	NM	+	+	+	+	+	+	–	76,867	0,235	0,967	0,960		0,911	0,003	0,011	0,011	
No.25	NEG	+	+	+	+	+	+	–	3,739	0,152	0,798	3,730		0,049	0,002	0,010	0,049	
No.26	NEG	+	+	+	+	+	+	–	7,770	0,707	0,001	1,365		0,616	0,056	0,000	0,108	
No.27	NEG	+	+	–	+	+	+	–		0,628	0,000	4,021			0,005	0,000	0,032	
No.28	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	30,423	0,239	0,418	2,830	54,911	1,178	0,009	0,016	0,110	2,126
No.29	NEG	+	+	–	+	+	+	–		2,312	0,002	3,471			0,087	0,000	0,131	
No.30	NEG	+	–															
No.31	NEG	+	–															
No.41	NEG	+	–															
No.42	NEG	+	BA															

Tablo 22. Kültür sonucu pozitif saptanan 50 hastada 45 hastanın RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri (devamı)

No.77	NEG	+	BA															
No.82	NEG	+	+	+	+	+	+	+	8,047	0,466	0,549	0,021	11,061	0,184	0,010	0,013	0,000	0,290
No.83	NEG	+	+	–	+	+	+	+		0,398	0,239	0,823	18,539		0,009	0,005	0,015	0,444
No.86	NEG	+	+	+	+	+	+	+	8,305	0,001	0,640	0,676	26,227	0,186	0,000	0,014	0,015	0,588
No.91	NEG	+	+	+	–	+	+	–	0,590		0,578	0,498		0,603		4,799	0,375	
No.94	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	72,675	1,036	0,405	1,002	9,256	3,405	0,045	0,017	0,043	0,405
No.99	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+		0,064	0,013	2,857	26,236		0,001	0,000	0,040	0,374
No.100	NEG	+	+	+	+	+	+	+	1,526	0,001	0,288	1,449	3,723	0,457	0,000	0,043	0,113	0,129
No.102	GÜ/E	+	+	–	–	+	+	+			0,029	0,746	9,119			0,001	0,060	1,170
No.103	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+		0,001	0,033	1,061	61,893		0,000	0,001	0,041	2,425
No.105	NEG	+	+	+	+	+	+	+	10,139	0,386	0,241	4,542	27,799	0,075	0,004	0,000	0,042	0,343
No.106	NEG	+	+	+	+	–	+	+	3,060	0,801		0,539	14,758	0,343	0,092		0,061	1,617
No.107	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	4,535	0,485	0,059	1,101		0,136	0,027	0,002	0,048	
No.109	NEG	+	+	+	+	+	+	+	749,612	0,065	0,357	0,594	23,497	28,246	0,006	0,032	0,046	2,187
No.112	NEG	+	+	–	+	+	+	+		0,367	0,055	1,032	21,778		0,020	0,003	0,056	1,196
No.116	NEG	+	+	+	+	+	+	+	3,262	0,371	0,612	0,739	36,984	0,169	0,019	0,031	0,037	1,850
No.118	NEG	+	+	+	+	+	+	+	53,926	1,403	0,695	3,938	99,134	0,410	0,021	0,006	0,030	0,912

H.p: *Helicobacter pylori*; A: Antrum; K: Korpus; BA: Biyopsi alınamadı; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit,; NEG: Non-eroziv gastrit; NM: Normal mukoza;Ct: Eşik döngü sayısı; ΔCt: Normalize Ct değeri

***** Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.

•Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu *ureA* house-keeping gene göre yapılmıştır.

4.9.5. *Hastaların Gastrik Biyopsi Örneklerinde Helicobacter pylori Real-time RT-PCR Gen Ekspresyon Bulguları*

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48/120 hastada *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliğine göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA*, *omp6, omp13, omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı sırasıyla 30 (%66.7), 35 (%77.8), 37 (%82.2), 45 (%100.0) ve 37 (%82.2) saptandı. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada kültür pozitif saptanan 30 hastada *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı sırasıyla 22 (%73.3), 24 (%80.0), 25 (%83.3), 30 (%100.0), 25 (%83.3) saptandı.

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66/120 hastada *H. pylori* enfeksiyonu pozitifliğine göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı sırasıyla 40 (%66.7), 48 (%80.0), 49 (%81.7), 60 (%100.0) ve 47 (%78.3) saptandı.

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50/120 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı sırasıyla 32 (%71.1), 37 (%82.2), 37 (%82.2), 45 (%100.0) ve 35 (%77.8) saptandı (Tablo 23).

Tablo 23. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif hasta bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

		cagA **n (%)**		***omp6*** **n (%)**		***omp13*** **n (%)**		***omp18*** **n (%)**		***omp20*** **n (%)**	
		(+)	**(–)**	**(+)**	**(–)**	**(+)**	**(–)**	**(+)**	**(–)**	**(+)**	**(–)**
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	**RT RT-PCR (+)** n=45	**30** (%66.7)	15 (%33.3)	**35** (%77.8)	10 (%22.2)	**37** (%82.2)	8 (%17.8)	**45** (%100.0)	0 (%0.0)	**37** (%82.2)	8 (%17.8)
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	**RT RT-PCR (+)** n=60	**40** (%66.7)	20 (%33.3)	**48** (%80.0)	12 (%20.0)	**49** (%81.7)	11 (%8.3)	**60** (%100.0)	0 (%0.0)	**47** (%78.3)	13 (%21.7)
Kültür (+) n=50	**RT RT-PCR (+)** n=45	**32** (%71.1)	13 (%28.9)	**37** (%82.2)	8 (%17.8)	**37** (%82.2)	8 (%17.8)	**45** (%100.0)	0 (%0.0)	**35** (%77.8)	10 (%22.2)

4.9.6. *Hastaların Endoskopik Bulgularına Göre Helicobacter pylori Gen Ekspresyon Bulguları*

4.9.6.1. Endoskopik Hasta Gruplarında *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları

Yüz yirmi hastanın endoskopik incelemelerinde mide veya bulbusta hasar bulunup bulunmadığı kriterine göre hastalar gastrik ülser/erozyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E), eroziv gastrit (EG) ve non-eroziv gastrit (NEG) gruplarında istatistiksel analizlere alınmıştır, normal mukoza (NM), non-eroziv bulbit (NEB) ve gastrik kanser (GK) hastalar sadece hasta gruplarında yer almıştır.

Gastrik ülser/erozyon (GÜ/E); duodenal ülser/erozyon (DÜ/E); eroziv gastrit (EG) ve non-eroziv gastrit (NEG) hasta gruplarında, her grubun kendi içinde *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı tek örneklem Pearson's Chi-Square test ile değerlendirildi. *omp18* geni tüm hastalarda eksprese edildiği saptandı.Tüm

hasta gruplarında da ekspresyonu saptandığı için *omp18* geni ile ilgili istatistiksel analizler yapılamamıştır. Ayrıca normal mukozal (NM) endoskopik bulgusu/görünümü olan hasta sayısı (n=2) az olduğu için istatistiksel analizler yapılamamıştır:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre NEG hastalarda *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı anlamlı düzeyde yüksek bulundu (**p=0.041**, **p<0.001**, **p<0.001, p<0.001**). GÜ/E, DÜ/E ve EG hastalarda gen ekspresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 24).

Tablo 24. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

Endoskopik bulgu	***cagA*** **n (+) (%)**	***omp6*** **n (+) (%)**	***omp13*** **n (+) (%)**	****omp18*** **n (+) (%)**	***omp20*** **n (+) (%)**
GÜ/E n=6	2 (%33.3)	3 (%50.0)	5 (%83.3)	**6 (%100.0)	5 (%83.3)
*p	p=0.414	p=1.000	p=0.102	—	p=0.102
DÜ/E n=6	**6 (%100.0)	**6 (%100.0)	4 (%66.7)	**6 (%100.0)	5 (%83.3)
*p	—	—	p=0.414	—	p=0.102
EG n=9	5 (%55.6)	5 (%55.6)	6 (%66.7)	**9 (%100.0)	6 (%66.7)
*p	p=0.739	p=0.739	p=0.317	—	p=0.317
NEG n=24	17 (%70.8)	21 (%87.5)	22 (%91.7)	**24 (%100.0)	21 (%87.5)
*p	**p=0.041**	**P<0.001**	**P<0.001**	—	**P<0.001**

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit
*Her grubun içinde gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (Pearson's Chi-Square) p değeri
**Gen ekspresyon görülme sıklık olasılığı (gözlenen ve beklenen sıklıklar) olmadığı için Pearson's Chi-Square testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre DÜ/E hastalarda *H. pylori cagA* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı (**p=0.020, p=0.020**), ayrıca NEG hastalarda *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı anlamlı düzeyde yüksek bulundu (**p=0.034**, **p<0.001**, **p<0.001**, **p<0.001**). *omp18* geni ise tüm hastalarda eksprese edildiği için herhangi bir istatistiksel analiz yapılamadı. GÜ/E ve EG hastalarda gen ekpresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 25).

Tablo 25. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

Endoskopik bulgu	***cagA*** **n (+) (%)**	***omp6*** **n (+) (%)**	***omp13*** **n (+) (%)**	****omp18*** **n (+) (%)**	***omp20*** **n (+) (%)**
GÜ/E n=7	2 (%28.6)	4 (%57.1)	6 (%85.7)	**7 (%100.0)	6 (%85.7)
*p	p=0.257	p=0.705	p=0.059	—	p=0.059
DÜ/E n=9	8 (%88.9)	**9 (%100.0)	6 (%66.7)	**9 (%100.0)	8 (%88.9)
*p	**p=0.020**	—	p=0.317	—	**p=0.020**
EG n=10	6 (%60.9)	6 (%60.0)	7 (%70.0)	**10 (%100.0)	7 (%70.0)
*p	p=0.527	p=0.527	p=0.206	—	p=0.206
NEG n=32	22 (%68.8)	28 (%87.5)	28 (%87.5)	**32 (%100.0)	25 (%78.1)
*p	**p=0.034**	**P<0.001**	**P<0.001**	—	**P<0.001**

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit
*Her grubun içinde gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (Pearson's Chi-Square) p değeri
**Gen ekspresyon görülme sıklık olasılığı (gözlenen ve beklenen sıklıklar) olmadığı için Pearson's Chi-Square testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre DÜ/E hastalarda *H. pylori cagA* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı (**p=0.034**, **p=0.034**), ayrıca NEG hastalarda *H. pylori cagA*, *omp6, omp13* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı anlamlı düzeyde yüksek bulundu (**p=0.022**, **p<0.001**, **p<0.001**, **p=0.022**). *omp18* geni ise tüm hastalarda eksprese edildiği için herhangi bir istatistiksel analiz yapılamadı. GÜ/E ve EG hastalarda araştırılan genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 26).

Tablo 26. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

Endoskopik bulgu	***cagA*** **n (+) (%)**	***omp6*** **n (+) (%)**	***omp13*** **n (+) (%)**	****omp18*** **n (+) (%)**	***omp20*** **n (+) (%)**
GÜ/E n=6	1 (%16.7)	3 (%50.0)	5 (%83.3)	**6 (%100.0)	5 (%83.3)
*p	p=0.102	p=1.000	p=0.102	—	p=0.102
DÜ/E n=8	7 (%87.5)	**8 (%100.0)	5 (%62.5)	**8 (%100.0)	7 (%87.5)
*p	**p=0.034**	—	p=0.480	—	**p=0.034**
EG n=6	5 (%83.3)	4 (%66.7)	5 (%83.3)	**6 (%100.0)	5 (%83.3)
*p	p=0.102	p=0.414	p=0.102	—	p=0.102
NEG n=23	17 (%73.9)	21 (%91.3)	20 (%87.0)	**23 (%100.0)	17 (%73.9)
*p	**p=0.022**	**P<0.001**	**P<0.001**	—	**p=0.022**

GÜ/E: Gastrikülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit
*Her grubun içinde gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (Pearson's Chi-Square) p değeri
**Gen ekspresyon görülme sıklık olasılığı (gözlenen ve beklenen sıklıklar) olmadığı için Pearson's Chi-Square testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

4.9.6.2. Endoskopik Hasta Grupları arasında *Helicobacter pylori* Gen Ekspresyon Bulguları

H. pylori cagA, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı ile hastaların endoskopik bulguları arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını araştırmak için gastrik ülser/erozyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E) ve eroziv gastritli (EG) hastalar non-eroziv gastrit+normal mukoza (NEG+NM) hasta grubu ile tek tek karşılaştırılarak ikili gruplar arasında *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı Pearson's Chi-Square veya Fisher Exact test ile değerlendirildi. *omp18* geni tüm endoskopik hasta gruplarında eksprese edildiği için istatistiksel analiz yapılamadı:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı açısından GÜ/E, DÜ/E ve EG hasta grupları ile NEG+NM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 27).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon

görülme sıklığı açısından GÜ/E, DÜ/E ve EG hasta grupları ile NEG+NM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 27).

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı açısından DÜ/E ve EG hasta grupları ile NEG+NM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05). Fakat *cagA* gen ekspresyon görülme sıklığı GÜ/E hastalarda NEG+NM hastalara göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu saptandı (**p=0.013**). Araştırılan diğer genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 27).

Tablo 27. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif hastalarda RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

		Endoskopik bulgu	***cagA***		***omp6***		***omp13***		******omp18***		***omp20***	
			(+)	(–)	(+)	(–)	(+)	(–)	(+)	(–)	(+)	(–)
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	**RT RT-PCR (+)** n=45	**GÜ/E**	2	4	3	3	5	1	6	0	5	1
		NEG+NM	17	7	21	3	22	2	24	0	21	3
		n=30	**p=0.156		**p=0.075		** p=0.501		---		** p=1.000	
		DÜ/E	6	0	6	0	4	2	6	0	5	1
		NEG+NM	17	7	21	3	22	2	24	0	21	3
		n=30	**p=0.290		**p=1.000		**p=0.169		---		** p=1.000	
		EG	5	4	5	4	6	3	9	0	6	3
		NEG+NM	17	7	21	3	22	2	24	0	21	3
		n=33	*p=0.678		*p=0.128		**p=0.111		---		**p=0.309	
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	**RT RT-PCR (+)** n=60	**GÜ/E**	2	5	4	3	6	1	7	0	6	1
		NEG+NM	24	10	29	5	30	4	34	0	26	8
		n=41	**p=0.079		*p=0.235		**p=1.000		---		*p=0.971	
		DÜ/E	8	1	9	0	6	3	9	0	8	1
		NEG+NM	24	10	29	5	30	4	34	34	26	8
		n=43	*p=0.491		**p=0.566		*p=0.293		---		*p=0.724	
		EG	6	4	6	4	7	3	10	0	7	3
		NEG+NM	24	10	29	5	30	4	34	0	26	8
		n=44	*p=0.806		*p=0.195		*p=0.371		---		*p=1.000	
Kültür (+) n=50	**RT RT-PCR (+)** n=45	**GÜ/E**	1	5	3	3	5	1	6	0	5	1
		NEG+NM	19	6	22	3	22	3	25	0	18	7
		n=31	****p=0.013**		**p=0.069		**p=1.000		---		**p=1.000	
		DÜ/E	7	1	8	0	5	3	8	0	7	1
		NEG+NM	19	6	22	3	22	3	25	0	18	7
		n=33	*p=0.845		**p=0.560		**p=0.137		---		*p=0.677	
		EG	5	1	4	2	5	1	6	0	5	1
		NEG+NM	19	6	22	3	22	3	25	0	18	7
		n=31	**p=1.000		**p=0.241		**p=1.000		---		** p=1.000	

*Gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (Pearson's Chi-Square) p değeri; **Gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (Fisher Exact) p değeri

***Gen ekspresyon görülme sıklık olasılığı (gözlenen ve beklenen sıklıklar) olmadığı için Pearson's Chi-Square veya Fisher Exact testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

H. pylori cagA, *omp6*, *omp13*,*omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeyleri (16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlere göre normalize ΔCt değerleri) ile hastaların endoskopik bulguları arasındaki ilişki araştırıldı. *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerin direkt ölçümlerinin karşılaştırılması için önce Kolmogorov-Smirnov test ile endoskopik bulgularının normal dağılım kontrolü yapıldı. Tüm gen ekspresyon düzeyleri normal dağılıma uymadığı için gastrik ülser/erozyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E) ve eroziv gastritli (EG) hastalar non-eroziv gastrit+normal mukoza (NEG+NM) hasta grubu ile tek tek karşılaştırılarak bağımsız ikili gruplar arasında "median" ortanca değerler üzerinden *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada sadece *H. pylori omp13* gen ekspresyon düzeyi (16S rRNA house-keeping gene göre normalize ΔCt değerleri) açısından GÜ/E ve NEG+NM hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (**p=0.005**). *H. pylori omp13* gen ekspresyon düzeyi GÜ/E hastalarda NEG+NM hastalara göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu saptandı. *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping genlere göre normalize ΔCt değerleri) GÜ/E, DÜ/E, EG ile NEG+NM hasta grupları arasında dağılımı değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 28-A,Tablo 28-B).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada sadece *H. pylori omp13* gen ekspresyon düzeyi (*ureA* house-keeping gene göre normalize ΔCt değerleri) açısından EG ve NEG+NM hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (**p=0.045**). *H. pylori omp13* gen ekspresyon düzeyi EG hastalarda NEG+NM hastalara göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu saptandı. *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*,*omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping genlere göre normalize ΔCt değerleri) GÜ/E, DÜ/E, EG ile NEG+NM hasta grupları arasında dağılımı değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 29-A,Tablo 29-B).

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlere göre normalize ΔCt değerleri) GÜ/E, DÜ/E, EG ile NEG+NM hasta grupları arasında dağılımı değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05) (Tablo 30-A,Tablo 30-B).

Tablo 28-A. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
			**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	RT RT-PCR (+) n=45	GÜ/E	2.85	0.04-5.66	0.06	0.00-0.54	0.03	0.01-0.46	1.96	0.07-6.23	34.54	9.12-61.89
		NEG+NM	3.65	0.01-77.49	0.37	0.00-1.53	0.51	0.06-1.55	1.17	0.02-8.08	21.78	0.46-99.13
		*p	n=19	p=0.399	n=24	p=0.714	n=27	**p=0.005**	n=30	p=0.795	n=26	p=0.345
		DÜ/E	4.83	0.64- 72.68	0.36	0.06-1.04	0.43	0.06-1.47	0.92	0.34-1.99	9.26	0.00-19.84
		NEG+NM	3.65	0.01-77.49	0.37	0.00-1.53	0.51	0.06-1.55	1.17	0.02-8.08	21.78	0.46-99.13
		*p	n= 23	p=0.507	n=27	p=0.496	n=26	p=0.816	n=30	p=0.254	n=26	p=0.085
		EG	1.81	0.01-14.58	0.20	0.00-0.49	0.12	0.00-0.98	1.73	0.08-4.82	15.51	0.20-51.44
		NEG+NM	3.65	0.01-77.49	0.37	0.00-1.53	0.51	0.06-1.55	1.17	0.02-8.08	21.78	0.46-99.13
		*p	n=22	p=0.345	n=26	p=0.585	n=28	p=0.051	n=33	p=0.936	n=27	p=0.414

Tablo 28-B. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
			**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	RT RT-PCR (+) n=45	GÜ/E	0.06	0.06-0.06	0.00	0.00-0.01	0.00	0.00-0.01	0.04	0.00-0.07	1.16	0.30-2.43
		NEG+NM	0.19	0.08-0.63	0.02	0.00-0.68	0.01	0.00-4.80	0.05	0.01-1.85	0.73	0.13-5.12
		*p	n=19	p=0.104	n=24	p=0.074	n=27	p=0.068	n=30	p=0.484	n=26	p=0.871
		DÜ/E	0.76	0.04-3.41	0.03	0.00-0.88	0.04	0.00-1.12	0.46	0.02-0.25	0.82	0.41-5.10
		NEG+NM	0.19	0.08-0.63	0.02	0.00-0.68	0.01	0.00-4.80	0.05	0.01-1.85	0.73	0.13-5.12
		*p	n=23	p=0.414	n=27	p=0.622	n=26	p=0.597	n=30	p=0.850	n=26	p=0.604
		EG	0.24	0.00-0.26	0.01	0.01-0.02	0.01	0.00-0.02	0.08	0.01-0.96	0.45	0.14-1.10
		NEG+NM	0.19	0.08-0.63	0.02	0.00-0.68	0.01	0.00-4.80	0.05	0.01-1.85	0.73	0.13-5.12
		*p	n=22	p=0.515	n=26	p=0.637	n=28	p=0.165	n=33	p=0.557	n=27	p=0.580

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; NM: Normal mukoza

*Bağımsız iki grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Mann-Whitney U) p değeri

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

Tablo 29-A. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
			**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	RT RT-PCR (+) n=60	GÜ/E	2.85	0.04-5.66	0.30	0.00-5.98	0.03	0.01-6.54	2.86	0.07-22.01	38.23	9.12-312.99
		NEG+NM	8.05	0.01-749.61	0.36	0.00-2.31	0.51	0.00-1.55	1.49	0.02-8.08	24.86	0.46-99.13
		*p	n=26	p=0.229	n=33	p=0.819	n=36	p=0.161	n=41	p=0.652	n=32	p=0.161
		DÜ/E	5.41	0.64-72.68	0.21	0.00-1.04	0.44	0.06-1.47	1.00	0.34-3.34	12.99	0.00-61.82
		NEG+NM	8.05	0.01-749.61	0.36	0.00-2.31	0.51	0.00-1.55	1.49	0.02-8.08	24.86	0.46-99.13
		*p	n=32	p=0.821	n=38	p=0.939	n=36	p=0.964	n=43	p=0.221	n=34	p=0.256
		EG	0.94	0.01-14.58	0.29	0.00-0.49	0.14	0.00-0.98	1.97	0.08-4.82	23.66	0.20-52.08
		NEG+NM	8.05	0.01-749.61	0.36	0.00-2.31	0.51	0.00-1.55	1.49	0.02-8.08	24.86	0.46-99.13
		*p	n=30	p=0.067	n=35	p=0.717	n=37	p=0.284	n=44	p=0.716	n=33	p=0.567

Tablo 29-B. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
			**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	RT RT-PCR (+) n=60	GÜ/E	0.06	0.06-0.06	0.01	0.00-0.01	0.01	0.00-0.01	0.04	0.00-0.10	0.84	0.30-2.43
		NEG+NM	0.23	0.05-28.25	0.01	0.00-0.67	0.01	0.00-4.80	0.05	0.01-1.90	0.80	0.13-5.12
		*p	n=26	p=0.132	n=33	p=0.132	n=36	p=0.087	n=41	p=0.364	n=32	p=0.885
		DÜ/E	0.68	0.04-3.41	0.01	0.00-0.88	0.02	0.00-1.11	0.05	0.02-0.25	0.91	0.27-5.10
		NEG+NM	0.23	0.05-28.25	0.01	0.00-0.67	0.01	0.00-4.80	0.05	0.01-1.90	0.80	0.13-5.12
		*p	n=32	p=0.558	n=38	p=1.000	n=36	p=0.622	n=43	p=0.902	n=34	p=0.567
		EG	0.12	0.00-0.26	0.01	0.00-0.02	0.01	0.00-0.02	0.07	0.01-0.96	0.43	0.14-1.10
		NEG+NM	0.23	0.05-28.25	0.01	0.00-0.67	0.01	0.00-4.80	0.05	0.01-1.90	0.80	0.13-5.12
		*p	n=30	p=0.136	n=35	p=0.462	n=37	**p=0.045**	n=44	p=0.854	n=33	p=0.311

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; NM: Normal mukoza

*Bağımsız iki grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Mann-Whitney U) p değeri

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

Tablo 30-A. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
			**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max
Kültür (+) n=50	RT RT-PCR (+) n=45	GÜ/E	5.66	5.657-5.657	0.06	0.00-5.98	0.03	0.01-6.54	1.959	0.07-22.01	41.93	9.12-312.99
		NEG+NM	10.14	0.59-749.61	0.29	0.00-2.31	0.56	0.00-1.55	2.113	0.02-8.08	24.86	3.72-99.13
		*p	n=20	p=0.544	n=25	p=0.867	n=27	p=0.382	n=31	p=0.960	n=23	p=0.297
		DÜ/E	5.70	0.64-72.68	0.19	0.00-1.04	0.42	0.06-1.47	1.051	0.58-3.34	13.93	0.00-61.82
		NEG+NM	10.14	0.59-749.61	0.29	0.00-2.31	0.56	0.00-1.55	2.113	0.02-8.08	24.86	3.72-99.13
		*p	n=26	p=0.931	n=30	p=0.919	n=27	p=0.970	n=33	p=0.257	n=25	p=0.250
		EG	2.23	0.09-14.58	0.34	0.00-0.49	0.14	0.00-0.98	2.233	0.60-4.82	24.66	6.01-52.08
		NEG+NM	10.14	0.59-749.61	0.293	0.00-2.31	0.56	0.00-1.55	2.113	0.02-8.08	24.86	3.72-99.13
		*p	n=24	p=0.062	n=26	p=0.776	n=27	p=0.662	n=31	p=0.881	n=23	p=0.766

Tablo 30-B. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
			**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max	**Med	**Min-Max
Kültür (+) n=50	RT RT-PCR (+) n=45	GÜ/E	0.06	0.06-0.06	0.01	0.00-0.01	0.01	0.00-0.01	0.04	0.00-0.07	1.16	0.38-2.43
		NEG+NM	0.25	0.05-28.25	0.01	0.00-0.10	0.01	0.00-4.80	0.04	0.01-0.38	0.44	0.13-2.19
		*p	n=20	p=0.140	n=25	p=0.296	n=27	p=0.147	n=31	p=0.775	n=23	p=0.233
		DÜ/E	0.19	0.04-3.41	0.01	0.00-0.01	0.02	0.00-0.06	0.05	0.02-0.11	0.82	0.27-2.13
		NEG+NM	0.25	0.05-28.25	0.01	0.00-0.10	0.01	0.00-4.80	0.04	0.01-0.38	0.44	0.13-2.19
		*p	n=26	p=0.931	n=30	p=0.815	n=27	p=0.627	n=33	p=0.896	n=25	p=0.463
		EG	0.12	0.00-0.26	0.01	0.00-0.01	0.01	0.00-0.02	0.05	0.01-0.16	0.41	0.14-1.10
		NEG+NM	0.25	0.05-28.25	0.01	0.00-0.10	0.01	0.00-4.80	0.04	0.01-0.38	0.44	0.13-2.19
		*p	n=24	p=0.123	n=26	p=0.313	n=27	p=0.393	n=31	p=0.938	n=23	p=0.655

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; NM: Normal mukoza

*Bağımsız iki grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Mann-Whitney U) p değeri

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

İstatistiksel analizlerimizde gastrik ülser/erozyon (GÜ/E) ve duodenal ülser/erozyon (DÜ/E) hasta grupları birleştirilerek peptik ülser (PÜ/E) hasta grubu olarak gruplandırıldı, bu grup ile non-eroziv gastrit+normal mukoza (NEG+NM) hasta grubu arasında *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı Pearson's Chi-Square veya Fisher Exact test ile, ayrıca gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi. *omp18* geni tüm endoskopik hasta gruplarında eksprese edildiği için gen ekspresyon görülme sıklığı yönünden istatistiksel analiz yapılamadı:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada ve sadece kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı açısından PÜ/E hasta grubu ile NEG+NM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

H. pylori cagA, *omp6*, *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin (normalize ΔCt değerleri) dağılımı PÜ/E hasta grubu ile NEG+NM hasta grubu arasında karşılaştırıldığında, HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada sadece *H. pylori omp13* gen ekspresyon düzeyi (16S rRNA house-keeping gene göre normalize ΔCt değerleri) açısından PÜ/E ve NEG+NM hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (**p=0.038)**. *H. pylori omp13* gen ekspresyon düzeyi PÜ/E hastalarda NEG+NM hastalara göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu saptandı. Araştırdığımız diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Gastrik ülser/erozyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E), eroziv gastrit (EG) ve non-eroziv gastrit (NEG) hasta grupları arasında *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeyleri (16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlere göre normalize ΔCt değerleri) karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Normal mukozal (NM) endoskopik bulgusu/görünümü olan hasta sayısı (n=2) az olduğu için istatistiksel analiz yapılamamıştır. *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerin direkt ölçümlerinin karşılaştırılması için önce Kolmogorov-Smirnov test ile endoskopik bulgularının normal dağılım kontrolü yapıldı. Tüm gen ekspresyon düzeyleri normal dağılıma uymadığı için üç ve üzeri bağımsız hasta grupları arasında ortanca "median" değerler üzerinden *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre araştırılan genlerin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 31-A,Tablo 31-B).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre araştırılan genlerin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 32-A,Tablo 32-B).

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre araştırılan genlerin ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 33-A,Tablo 33-B).

Tablo 31-A. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p
GÜ/E n=6	2.8465 (0.036-5.657)	p=0.365	0.064 (0.001-0.543)	p=0. 983	0.029 (0.006-0.463)	p=0.079	1.959 (0.068-6.233)	p=0.635	34.535 (9.119-61.893)	p=0.141
DÜ/E n=6	4.83 (0.642-72.675)		0.274 (0.000-1.036)		0.432 (0.059-1.474)		0.922 (0.342-1.986)		9.256 (0.004-19.835)	
EG n=9	0.090 (0.000-14.583)		0.202 (0.001-0.494)		0.120 (0.003-0.975)		1.731 (0.083-4.821)		15.511 (0.204-51.438)	
NEG n=24	3.262 (0.000-77.488)		0.367 (0.000-1.531)		0.391 (0.000-1.545)		1.167 (0.021-8.077)		21.778 (0.463-99.134)	

Tablo 31-B. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

Endoskopik bulgu	*cagA*		*omp6*		*omp13*		*omp18*		*omp20*	
	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p	**Median (Min-Max)	*p
GÜ/E n=6	0.03 (0.00-0.06)	p=0.091	0.00 (0.00-0.01)	p=0.502	0.00 (0.00-0.01)	p=0.060	0.04 (0.00-0.06)	p=0.704	1.16 (0.30-2.43)	p=0.918
DÜ/E n=6	0.76 (0.04-3.41)		0.02 (0.00-0.98)		0.04 (0.00-1.12)		0.05 (0.02-0.25)		0.74 (0.00-5.10)	
EG n=9	0.00 (0.00-0.26)		0.01 (0.00-0.02)		0.01 (0.00-0.02)		0.08 (0.01-0.95)		0.45 (0.14-1.06)	
NEG n=24	0.19 (0.00-0.63)		0.01 (0.00-0.67)		0.01 (0.00-4.80)		0.044 (0.00-1.85)		0.73 (0.13-5.12)	

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit

*Üç ve üzeri grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Kruskal-Wallis) p değeri

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

Tablo 32-A. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

Endoskopik Bulgu	***cagA***		***omp6***		***omp13***		***omp18***		***omp20***	
	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**
GÜ/E n=7	2.85 (0.04-5.66)	p=0.089	0.30 (0.00-5.98)	p=0.898	0.03 (0.01-6.54)	p=0.674	2.86 (0.07-22.01)	p=0.499	38.23 (9.12-312.10)	p=0.551
DÜ/E n=9	5.42 (0.64-72.68)		0.19 (0.00-1.04)		0.44 (0.06-1.47)		1.00 (0.34-3.34)		12.99 (0.00-61.82)	
EG n=10	0.52 (0.00-14.58)		0.29 (0.00-0.49)		0.14 (0.00-0.98)		1.97 (0.08-4.82)		23.659 (0.20-52.08)	
NEG n=32	5.90 (0.00-749.61)		0.36 (0.00-2.31)		0.33 (0.00-1.55)		1.49 (0.02-8.08)		23.50 (0.46-99.13)	

Tablo 32-B. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

Endoskopik bulgu	***cagA***		***omp6***		***omp13***		***omp18***		***omp20***	
	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**	****Median (Min-Max)**	***p**
GÜ/E n=7	0.03 (0.00-0.06)	p=0.068	0.00 (0.00-0.01)	p=0.768	0.00 (0.00-0.01)	p=0.155	0.04 (0.00-0.06)	p=0.991	0.84 (0.30-2.43)	p=0.568
DÜ/E n=9	0.68 (0.04-3.41)		0.005 (0.00-0.88)		0.02 (0.00-1.12)		0.05 (0.02-0.25)		0.82 (0.00-5.10)	
EG n=10	0.00 (0.00-0.26)		0.005 (0.00-0.02)		0.00 (0.00-0.02)		0.07 (0.01-0.95)		0.43 (0.14-1.06)	
NEG n=32	0.20 (0.00-28.25)		0.01 (0.00-0.67)		0.01 (0.00-4.80)		0.05 (0.00-1.85)		0.88 (0.13-5.12)	

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit

*Üç ve üzeri grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Kruskal-Wallis) p değeri

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

Tablo 33-A. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

Endoskopik bulgu	***cagA***		***omp6***		***omp13***		***omp18***		***omp20***	
	****Median (Min-Max)**	*P	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p
GÜ/E n=6	5.66 (5.66-5.66)	p=0.156	0.06 (0.00-5.98)	p=0.945	0.03 (0.01-6.54)	p=0.833	1.96 (0.07-22.01)	p=0.691	41.93 (9.12-313.00)	p=0.474
DÜ/E n=8	5.70 (0.64-72.68)		0.17 (0.00-1.04)		0.42 (0.09-1.47)		1.05 (0.58-3.34)		13.93 (0.00-61.82)	
EG n=6	0.94 (0.00-14.58)		0.34 (0.00-0.49)		0.14 (0.00-0.98)		2.23 (0.70-4.82)		24.66 (6.01-52.08)	
NEG n=23	8.31 (0.59-75.61)		0.35 (0.00-2.31)		0.45 (0.00-1.55)		2.11 (0.02-8.08)		23.49 (3.72-99.13)	

Tablo 33-B. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın endoskopik bulgularına göre *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

Endoskopik bulgu	***cagA***		***omp6***		***omp13***		***omp18***		***omp20***	
	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p	****Median (Min-Max)**	*p
GÜ/E n=6	0.06 (0.06-0.06)	p=0.138	0.00 (0.00-0.01)	p=0.901	0.00 (0.00-0.01)	p=0.301	0.04 (0.00-0.06)	p=0.965	1.16 (0.37-2.43)	p=0.556
DÜ/E n=8	0.19 (0.04-3.41)		0.00 (0.00-0.05)		0.02 (0.00-0.06)		0.05 (0.02-0.11)		0.74 (0.00-2.13)	
EG n=6	0.00 (0.00-0.26)		0.01 (0.00-0.01)		0.01 (0.00-0.02)		0.05 (0.01-0.16)		0.41 (0.14-1.06)	
NEG n=23	0.25 (0.05-28.25)		0.01 (0.00-0.09)		0.01 (0.00-4.80)		0.04 (0.00-0.38)		0.44 (0.13-2.19)	

GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit .

*Üç ve üzeri grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Kruskal-Wallis) p değeri

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

Endoskopik mukozal hasarı olan (GÜ/E, DÜ/E, EG) ve hasarı olmayan (NEG/NM) iki hasta grubu arasında *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyonları birbiriyle karşılaştırıldı, gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı Pearson's Chi-Square test ile değerlendirildi. *omp18* geni tüm hastalarda eksprese edildiği için istatistiksel analiz yapılamadı:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada iki gruptaki hastalar arasında *H. pylori cagA, omp6, omp13* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu genler için p değerleri sırasıyla p=0.531, p=0.391, p=0.279, p=0.482 saptandı.

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada iki gruptaki hastalar arasında *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı incelendiğinde, araştırılan genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. *H. pylori cagA, omp6, omp13* ve *omp20* genleri için p değerleri sırasıyla p=0.461, p=0.241, p=0.133, p=0.689 saptandı.

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada iki gruptaki hastalar arasında *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları incelendiğinde, araştırılan genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. *H. pylori cagA, omp6, omp13* ve *omp20* genleri için p değerleri sırasıyla p=0.419, p=0.257, p=0.257, p=0.297 saptandı.

Endoskopik mukozal hasarı olan (GÜ/E, DÜ/E, EG) ve hasarı olmayan (NEG/NM) iki hasta grubu arasında *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm gen ekspresyon düzeyleri normal dağılıma uymadığı için bağımsız iki hasta grubu arasında ortanca "median" değerler üzerinden *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji sonuçlarının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada endoskopik mukozal hasarı olan ve olmayan hasta grubu arasında *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Araştırılan genlerin 16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonunda p değerleri sırasıyla p=0.706, p=0.853, p=0.059, p=0.666, p=0.425; *ureA* house-keeping gene göre normalizasyonunda p değerleri sırasıyla p=0.529, p=0.864, p=0.187, p=0.750, p=0.760 saptandı.

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada endoskopik mukozal hasarı olan ve olmayan hasta grubu arasında *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Araştırılan genler için p değerleri sırasıyla p=0.233, p=0.833, p=0.525, p=0.205, p=0.069; p=0.113, p=0.203, p=0.155, p=0.745, p=0.801 saptandı.

Endoskopik hasta grupları (GÜ/E, DÜ/E, EG, NEG) içerisinde bulunan pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin dağılımı araştırıldı. Bu hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları Tablo 34'te yer almaktadır.

HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür ve sadece kültür bulgularının pozitif olduğu hastalarda RT RT-PCR testi pozitif çıkan pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı Pearson's Chi-Square test ile değerlendirildiğinde, araştırdığımız genlerin ekspresyon görülme sıklığı pan-gastritli hastalarda, antral gastritli hastalara göre daha yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 35).

Tablo 34.Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları

Hasta No.	Cins	Endos-kopik bulgu	Pan-gastrit=0 Antral gastrit=1 Korporal gastrit=2	H.p HÜT ve histopatoloji pozitifliği	H.p HÜT, histo-patoloji ve/veya kültür pozitifliği	H.p kültür pozitifliği	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte pozitifliği	Antrum +Korpus *cagA*	Antrum +Korpus *omp6*	Antrum +Korpus *omp13*	Antrum +Korpus *omp18*	Antrum +Korpus *omp20*
No.1	K	GÜ/E	1	+	+	+	+	+	–	–	+	–
No.2	E	NEG	1	+	+	+	+	–	+	+	+	+
No.3	K	DÜ/E	1	+	+	+	+	+	+	–	+	+
No.4	E	EG	0	+	+	+	+	+	–	+	+	+
No.5	K	EG	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.6	E	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.7	K	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	–
No.8	K	EG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	–
No.9	E	NEG	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.10	K	NEG	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.11	E	EG	0	+	+	+	+	–	+	+	+	+
No.12	K	EG	0	+	+	+	+	+	–	–	+	+
No.13	E	DÜ/E	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.14	K	GÜ/E	1	+	+	+	+	–	–	+	+	+
No.15	K	DÜ/E	0	+	+	+	+	+	+	–	+	+
No.16	K	NEG	0	–	+	+	+	–	+	+	+	+
No.17	K	NM		–	+	+	+	+	–	+	+	+
No.18	E	EG	0	–	+	+	+	+	+	+	+	+
No.19	E	GÜ/E	1	–	+	+	+	–	+	+	+	+
No.20	E	NEG	1	–	+	+	+	+	+	–	+	+
No.21	E	NEG	1	–	+	+	+	+	–	–	+	+
No.22	K	DÜ/E	0	–	+	+	+	–	+	–	+	+
No.23	K	DÜ/E	0	–	+	+	+	+	+	+	+	+
No.24	E	NM		–	+	+	+	+	+	+	+	–
No.25	E	NEG	0	–	+	+	+	+	+	+	+	–
No.26	E	NEG	0	–	+	+	+	+	+	+	+	–
No.27	K	NEG	0	–	+	+	+	–	+	+	+	–
No.28	E	DÜ/E		–	+	+	+	+	+	+	+	+
No.29	E	NEG	0	–	+	+	+	–	+	+	+	–
No.30	E	NEG	0	–	+	+	–					
No.31	K	NEG	1	–	+	+	–					
No.32	K	NEG	0	+	+	BA	+	–	+	+	+	+
No.33	E	GÜ/E	0	+	+	KON	+	+	+	+	+	+
No.34	E	NEG	0	+	+	KON	+	+	+	+	+	–
No.35	E	EG	0	+	+	KON	+	–	+	+	+	+
No.36	K	NEG	1	+	+	KON	+	+	+	–	+	+
No.37	K	EG	1	+	+	BA	–					
No.38	K	EG	1	+	+	–	–					

Tablo 34.Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları (devamı)

No.39	K	NEG	1	+	+	–	–					
No.40	K	EG	1	+	+	BA	+	–	–	–	+	+
No.41	E	NEG	0	–	–	+	–					
No.42	E	NEG	1	–	–	+	BA					
No.43	E	NEG	0	–	–	KON	+	–	–	–	+	+
No.44	E	GK		–	–	BA	+	–	+	+	+	+
No.45	K	EG	1	–	–	BA	+	+	–	+	+	+
No.46	E	NEG	0	–	–	BA	+	+	+	+	+	+
No.47	E	NEG	1	–	–	–	–					
No.48	K	EG	1	–	–	–	–					
No.49	E	EG	0	–	–	–	–					
No.50	K	NEG	1	–	–	–	BA					
No.51	E	NEG	1	–	–	BA	+	+	+	+	+	+
No.52	E	EG	0	–	–	BA	+	+	+	+	+	+
No.53	E	GK		–	–	–	+	+	+	+	+	+
No.54	K	NEG	1	–	–	BA	+	–	+	+	+	+
No.55	E	EG	1	–	–	KON	+	–	–	–	+	+
No.56	K	NEG	0	–	–	KON	+	–	–	+	+	+
No.57	K	EG	0	–	–	–	BA					
No.58	K	NEG	1	–	–	KON	BA					
No.59	K	NEG	2	–	–	KON	BA					
No.60	K	NEG	0	–	–	BA	+	–	–	–	+	+
No.61	K	NEG	2	–	–	–	+	+	+	+	+	–
No.62	E	NEG	0	–	–	–	–					
No.63	K	NEG	1	–	–	–	BA					
No.64	K	NEG	1	–	–	–	BA					
No.65	K	EG	0	–	–	–	BA					
No.66	K	NEG	1	–	–	KON	BA					
No.67	K	NEG	1	–	–	–	BA					
No.68	K	NM		–	–	–	BA					
No.69	K	NEG	0	–	–	KON	BA					
No.70	K	NEG	0	–	–	KON	BA					
No.71	E	NEG	1	–	–	–	BA					
No.72	K	EG	0	–	–	KON	BA					
No.73	E	NEG	1	–	–	KON	–					
No.74	E	EG	1	–	–	BA	–					
No.75	K	EG	1	–	–	–	–					
No.76	E	GÜ/E		–	–	BA	–					
No.77	E	NEG	0	–	+	+	BA					
No.78	E	DÜ/E	0	–	–	KON	–					
No.79	K	GÜ/E		–	–	BA	BA					
No.80	K	NEG	0	–	–	–	+	–	–	+	+	+

Tablo 34.Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları (devamı)

No.81	E	EG	1	–	–	–	+	–	+	+	+	+
No.82	E	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.83	K	NEG	1	+	+	+	+	–	+	+	+	+
No.84	K	EG	1	–	–	–	+	–	–	+	+	+
No.85	K	GÜ/E		–	–	–	–					
No.86	K	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.87	K	EG	1	–	–	–	–					
No.88	K	NEG	0	–	–	–	–					
No.89	K	NEG	1	–	–	–	BA					
No.90	K	NEG	0	–	–	–	+	+	+	+	+	+
No.91	K	NEG	2	+	+	+	+	+	–	+	+	–
No.92	K	NEG	1	–	–	–	–					
No.93	K	EG	1	–	–	–	+	+	+	+	+	+
No.94	K	DÜ/E	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.95	K	NEG	0	+	+	KON	+	–	–	+	+	+
No.96	K	GÜ/E		–	–	–	–					
No.97	K	NEG	1	+	+	BA	+	+	+	+	+	+
No.98	K	NEG	1	+	+	BA	+	+	+	+	+	+
No.99	K	GÜ/E		+	+	+	+	–	+	+	+	+
No.100	K	NEG	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.101	E	NEG	1	–	–	–	–					
No.102	E	GÜ/E		+	+	+	+	–	–	+	+	+
No.103	K	GÜ/E		+	+	+	+	–	+	+	+	+
No.104	E	DÜ/E		+	+	KON	+	+	+	+	+	+
No.105	E	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.106	E	NEG	1	+	+	+	+	+	+	–	+	+
No.107	E	DÜ/E		+	+	+	+	+	+	+	+	–
No.108	K	NEG	0	–	–	–	–					
No.109	E	NEG	0	–	+	+	+	+	+	+	+	+
No.110	E	NEG	1	–	–	–	BA					
No.111	K	EG	0	–	–	–	–					
No.112	K	NEG	1	+	+	+	+	–	+	+	+	+
No.113	K	EG	1	–	–	KON	–					
No.114	K	EG	1	+	+	–	+	+	+	+	+	–
No.115	K	EG	0	+	+	BA	+	–	–	–	+	–
No.116	K	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.117	E	NEG	0	+	+	–	+	–	+	+	+	+
No.118	K	NEG	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.119	E	NEG	0	+	+	KON	+	+	–	+	+	+
No.120	K	NEG	0	+	+	–	+	–	+	+	+	+

BA: Biyopsi alınamadı; KON: Kontaminasyon; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; GK: Gastrik kanser; NM: Normal mukoza; K: Kadın; E: Erkek

Tablo 35. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif hasta sonuçlarına göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

		Gastrit tipi		***cagA*** **n (%)**		***omp6*** **n (%)**		***omp13*** **n (%)**		****omp18*** **n (%)**		***omp20*** **n (%)**	
				(+)	**(–)**	**(+)**	**(–)**	**(+)**	**(–)**	**(+)**	**(–)**	**(+)**	**(–)**
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	**RT RT-PCR (+)** n=45	**Pan-gastrit**		16 (%59.3)	7 (%50.0)	18 (%56.3)	5 (%55.6)	20 (%60.6)	3 (%37.5)	**23 (%56.1)	**0 (%0.0)	19 (%54.3)	4 (%66.7)
		Antral gastrit		11 (%40.7)	7 (%50.0)	14 (%43.7)	4 (%44.4)	13 (%39.4)	5 (%62.5)	**18 (%43.9)	**0 (%0.0)	16 (%45.7)	2 (%33.3)
		n=41	*p	p=0.571		p=0.970		p=0.237		—		p=0.572	
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	**RT RT-PCR (+)** n=60	**Pan-gastrit**		21 (%61.8)	11 (%57.9)	27 (%62.8)	5 (%50.0)	28 (%66.7)	4 (%36.4)	**32 (%60.4)	**0 (%0.0)	24 (%55.8)	8 (%80.0)
		Antral gastrit		13 (%38.2)	8 (%42.1)	16 (%37.2)	5 (%50.0)	14 (%33.3)	7 (%63.6)	**21 (%39.6)	**0 (%0.0)	19 (%44.2)	2 (%20.0)
		n=53	*p	p=0.782		p=0.456		p=0.067		—		p=0.159	
Kültür (+) n=50	**RT RT-PCR (+)** n=45	**Pan-gastrit**		18 (%66.7)	5 (%41.7)	21 (%63.6)	2 (%33.3)	20 (%64.5)	3 (%37.5)	**23 (%59.0)	**0 (%0.0)	17 (%53.1)	6 (%85.7)
		Antral gastrit		9 (%33.3)	7 (%58.3)	12 (%36.4)	4 (%66.7)	11 (%35.5)	5 (%62.5)	**16 (%41.0)	**0 (%0.0)	15 (%46.9)	1 (%14.3)
		n=39	*p	p=0.143		p=0.165		p=0.166		—		p=0.112	

*Gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (Pearson's Chi-Square) p değeri

**Gen ekspresyon görülme sıklık olasılığı (gözlenen ve beklenen sıklıklar) olmadığı için Pearson's Chi-Square testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

Pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlere göre normalize ΔCt değerleri) dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm gen ekspresyon düzeyleri normal dağılıma uymadığı için bağımsız iki hasta grubu arasında ortanca "median" değerler üzerinden *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür ve sadece kültür pozitif bulgularına göre sırasıyla RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45, 60 ve 45 hastada *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon düzeyleri pan-gastritli hastalarda, antral gastritli hastalara göre daha yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 36-A,Tablo 36-B) Pan-gastritli ve antral gastritli hastalarda PNL, MNH ve HLO düzeyleri birbiriyle karşılaştırılarak arasındaki farklılık non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildiğinde, iki gruptaki hastalarda PNL, MNH ve HLO ortalama sıra değerleri birbirine çok yakın saptandı. Hem antrum hem de korpusta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 36-A. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif sonuçlara göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Gastrit tipi	*cagA*	*omp6*	*omp13*	*omp18*	*omp20*
			**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	**RT RT-PCR (+)** n=45	**Pan-gastrit**	5.13 (0.01-72.68)	0.37 (0.00-1.40)	0.51 (0.00-1.50)	1.53 (0.02-4.82)	26.23 (0.46-99.13)
		Antral gastrit	3.55 (0.01-77.49)	0.14 (0.00-1.53)	0.25 (0.03-1.55)	1.05 (0.07-8.08)	14.30 (0.00-64.40)
		*p	p=0.824	p=0.327	p=0.280	p=0.401	p=0.312
			n=25	n=30	n=31	n=41	n=35
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	**RT RT-PCR (+)** n=60	**Pan-gastrit**	5.42 (0.01-749.61)	0.37 (0.00-2.31)	0.51 (0.00-1.50)	2.05 (0.02-4.82)	24.94 (0.46-99.13)
		Antral gastrit	4.85 (0.01-77.49)	0.14 (0.00-5.98)	0.27 (0.03-6.54)	1.15 (0.07-22.01)	18.54 (0.00-313.00)
		*p	p=0.907	p=0.315	p=0.501	p=0.799	p=0.651
			n=32	n=41	n=39	n=53	n=43
Kültür (+) n=50	**RT RT-PCR (+)** n=45	**Pan-gastrit**	7.80 (0.10-749.61)	0.28 (0.00-2.31)	0.55 (0.00-1.50)	2.11 (0.02-4.82)	23.66 (6.01-99.13)
		Antral gastrit	14.60 (1.53-77.50)	0.14 (0.00-5.60)	0.25 (0.03-6.54)	1.30 (0.07-22.01)	21.78 (0.00-313.00)
		*p	p=0.500	p=0.391	p=0.651	p=0.568	p=0.835
			n=26	n=32	n=30	n=39	n=32

Tablo 36-B. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik) ve sadece kültür pozitif sonuçlara göre pan-gastrit ve antral gastrit saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		Gastrit tipi	*cagA*	*omp6*	*omp13*	*omp18*	*omp20*
			**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)	**Median (Min-Max)
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	**RT RT-PCR (+)** n=45	**Pan-gastrit**	0.18 (0.00-3.41)	0.01 (0.00-0.05)	0.01 (0.00-3.19)	0.04 (0.01-1.85)	0.73 (0.14-4.73)
		Antral gastrit	0.28 (0.06-1.56)	0.01 (0.00-0.67)	0.01 (0.00-0.35)	0.05 (0.00-0.32)	1.16 (0.13-5.12)
		*p	p=0.907	p=0.315	p=0.501	p=0.799	p=0.651
			n=32	n=41	n=39	n=53	n=43
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) n=66	**RT RT-PCR (+)** n=60	**Pan-gastrit**	0.18 (0.00-28.25)	0.01 (0.00-0.09)	0.12 (0.00-3.19)	0.05 (0.01-1.85)	0.73 (0.14-4.73)
		Antral gastrit	0.28 (0.06-1.56)	0.01 (0.00-0.67)	0.01 (0.00-0.35)	0.04 (0.00-0.32)	1.16 (0.13-5.12)
		*p	p=0.092	p=0.550	p=0.220	p=0.700	p=0.491
			n=29	n=29	n=34	n=51	n=41
Kültür (+) n=50	**RT RT-PCR (+)** n=45	**Pan-gastrit**	0.18 (0.00-28.25)	0.01 (0.00-0.09)	0.01 (0.00-0.06)	0.04 (0.01-0.16)	0.74 (0.14-2.19)
		Antral gastrit	0.28 (0.06-1.56)	0.01 (0.00-0.09)	0.01 (0.00-0.04)	0.04 (0.00-0.12)	0.48 (0.13-2.43)
		*p	p=0.187	p=0.888	p=0.073	p=0.745	p=0.874
			n=26	n=22	n=26	n=38	n=31

**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi (med) ve uç (min ve max) değerleri

4.9.7. *Helicobacter pylori Enfeksiyonu ve Histopatolojik Bulgular*

Yüz yirmi hastanın HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulgularına göre histopatolojik incelemeler Tablo 37'de yer almaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu pozitif ve negatif hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde inflamasyon şiddeti: polimorfonükleer lökosit (PNL), mononükleer hücre (MNH) ve HLO düzeyleri ayrıca intestinal metaplazi (İM) varlığı araştırıldı. PNL, MNH ve HLO düzeyleri (0-3 arası skorlama) ordinal veri olduğu için bağımsız iki grup arasında non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji bulgularına göre (pozitif ve negatif hastalarda) *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (antrum için **p=0.006**, **p=0.001**, **p<0.001**; korpus için **p=0.001**, **p=0.010**, **p<0.001**). PNL, MNH ve HLO düzeyleri *H. pylori* enfeksiyonu pozitif hastalarda negatiflere göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu ile İM varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (antrum: p=0.616; korpus: p=0.870) (Tablo 38).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularına (pozitif ve negatif hastalarda) göre *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (antrum: **p=0.003**, **p=0.001**, **p<0.001**; korpus: **p=0.003**, **p=0.015**, **p<0.001**). PNL, MNH ve HLO düzeyleri *H. pylori* enfeksiyonu pozitif hastalarda negatiflere göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu ile İM varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (antrum: p=0.818; korpus: p=0.705) (Tablo 38).

Kültür bulgularına göre *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (antrum için **p=0.039**, p=0.164, **p<0.001**; korpus için **p=0.030**, **p=0.018**, **p<0.001**). PNL, MNH ve HLO düzeylerinin *H. pylori* enfeksiyonu pozitif hastalarda negatiflere göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu ile İM varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (antrum: p=0.528; korpus: p=0.822) (Tablo 38).

H. pylori enfeksiyonu pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde MNH ve PNL düzeyleri birbiriyle karşılaştırılarak arasındaki farklılık non-parametrik bir test olan Wilcoxon işaretli sıralar test ile değerlendirildiğinde, hem antrum hem de korpusta MNH düzeyi, PNL düzeyine göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. Hastaların HÜT ve histopatoloji pozitif bulgularına göre antrum ve korpusta p değeri sırasıyla **p=0.013** ve **p=0.036** saptandı.

Tablo 37. Hastaların HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulgularına göre gastrik biyopsi örneklerinde histopatolojik bulgular

Hasta No.	Cins	Endos-kopik bulgu	H.p HÜTve histopatoloji pozitifliği	H.p HÜT,histopatoloji ve/veya kültür pozitifliği	H.p kültür pozitifliği	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte poz.	Antrum PNL 0, 1+, 2+, 3+	Antrum MNH 0, 1+, 2+, 3+	Antrum HLO 0, 1+, 2+, 3+	Antrum İM poz=1 neg=0	Korpus PNL 0, 1+, 2+, 3+	Korpus MNH 0, 1+, 2+, 3+	Korpus HLO 0, 1+, 2+, 3+	Korpus İM poz=1 neg=0
No.1	K	GÜ/E	+	+	+	+	3	2	3	0	1	2	3	0
No.2	E	NEG	+	+	+	+	0	3	2	1				
No.3	K	DÜ/E	+	+	+	+	0	3	3	0	2	3	3	0
No.4	E	EG	+	+	+	+	3	0	3	0				
No.5	K	EG	+	+	+	+	2	0	3	1				
No.6	E	NEG	+	+	+	+	1	0	3	1				
No.7	K	NEG	+	+	+	+					1	0	2	0
No.8	K	EG	+	+	+	+	0	2	1	0	0	2	3	0
No.9	E	NEG	+	+	+	+	0	1	2	0				
No.10	K	NEG	+	+	+	+					0	2	1	1
No.11	E	EG	+	+	+	+					0	3	1	0
No.12	K	EG	+	+	+	+					0	1	2	0
No.13	E	DÜ/E	+	+	+	+					1	0	3	0
No.14	K	GÜ/E	+	+	+	+					1	0	2	0
No.15	K	DÜ/E	+	+	+	+	0	1	2	0				
No.16	K	NEG	–	+	+	+								
No.17	K	NM	–	+	+	+								
No.18	E	EG	–	+	+	+								
No.19	E	GÜ/E	–	+	+	+	3	1	0	0				
No.20	E	NEG	–	+	+	+								
No.21	E	NEG	–	+	+	+								
No.22	K	DÜ/E	–	+	+	+								
No.23	K	DÜ/E	–	+	+	+								
No.24	E	NM	–	+	+	+								
No.25	E	NEG	–	+	+	+								
No.26	E	NEG	–	+	+	+								
No.27	K	NEG	–	+	+	+	0	1	0	0				
No.28	E	DÜ/E	–	+	+	+								
No.29	E	NEG	–	+	+	+								
No.30	E	NEG	–	+	+	–					0	1	0	0
No.31	K	NEG	–	+	+	–					0	1	0	0
No.32	K	NEG	+	+	BA	+					2	2	2	0
No.33	E	GÜ/E	+	+	KON	+					2	0	1	0
No.34	E	NEG	+	+	KON	+	1	0	2	1	1	0	2	0
No.35	E	EG	+	+	KON	+					1	0	3	0
No.36	K	NEG	+	+	KON	+	1	0	3	1				

Tablo 37. Hastaların HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulgularına göre gastrik biyopsi örneklerinde histopatolojik bulgular (devamı)

No.37	K	EG	+	+	BA	–	0	2	2	0				
No.38	K	EG	+	+	–	–						1	1	0
No.39	K	NEG	+	+	–	–	0	2	1	0				
No.40	K	EG	+	+	BA	+	0	2	1	0				
No.41	E	NEG	–	–	+	–								
No.42	E	NEG	–	–	+	BA	0	1	0	0				
No.43	E	NEG	–	–	KON	+	3	0	2	0	3	0	1	0
No.44	E	GK	–	–	BA	+	0	1	2	1				
No.45	K	EG	–	–	BA	+	2	1	2	0				
No.46	E	NEG	–	–	BA	+					0	1	2	0
No.47	E	NEG	–	–	–	–					1	0	1	1
No.48	K	EG	–	–	–	–					0	1	1	0
No.49	E	EG	–	–	–	–	0	1	1	0				
No.50	K	NEG	–	–	–	BA	0	2	1	0				
No.51	E	NEG	–	–	BA	+								
No.52	E	EG	–	–	BA	+								
No.53	E	GK	–	–	–	+								
No.54	K	NEG	–	–	BA	+								
No.55	E	EG	–	–	KON	+								
No.56	K	NEG	–	–	KON	+								
No.57	K	EG	–	–	–	BA								
No.58	K	NEG	–	–	KON	BA	0	0	0	0				
No.59	K	NEG	–	–	KON	BA					0	1	0	0
No.60	K	NEG	–	–	BA	+								
No.61	K	NEG	–	–	–	+	3	0	0	0				
No.62	E	NEG	–	–	–	–					0	1	0	1
No.63	K	NEG	–	–	–	BA	0	1	0	0				
No.64	K	NEG	–	–	–	BA	0	0	0	0				
No.65	K	EG	–	–	–	BA	0	0	0	1				
No.66	K	NEG	–	–	KON	BA	0	1	0	0				
No.67	K	NEG	–	–	–	BA	0	1	0	0				
No.68	K	NM	–	–	–	BA								
No.69	K	NEG	–	–	KON	BA								
No.70	K	NEG	–	–	KON	BA	0	2	0	0	0	2	0	0
No.71	E	NEG	–	–	–	BA	0	2	0	1	0	1	0	0
No.72	K	EG	–	–	KON	BA	0	2	0	1	0	1	0	0
No.73	E	NEG	–	–	KON	–	0	1	0	0				
No.74	E	EG	–	–	BA	–								
No.75	K	EG	–	–	–	–								
No.76	E	GÜ/E	–	–	BA	–								
No.77	E	NEG	–	+	+	BA								
No.78	E	DÜ/E	–	–	KON	–								
No.79	K	GÜ/E	–	–	BA	BA	0	1	0	0				
No.80	K	NEG	–	–	–	+	0	1	0	0	0	1	0	0

Tablo 37. Hastaların HÜT, histopatoloji, kültür ve RT RT-PCR bulgularına göre gastrik biyopsi örneklerinde histopatolojik bulgular (devamı)

No.81	E	EG	–	–	–	+	0	0	1	1	0	0	0	0
No.82	E	NEG	+	+	+	+					3	3	2	1
No.83	K	NEG	+	+	+	+					0	1	1	0
No.84	K	EG	–	–	–	+	0	1	1	0	0	1	1	0
No.85	K	GÜ/E	–	–	–	–	3	3	1	1	0	2	2	0
No.86	K	NEG	+	+	+	+	0	1	1	0	1	2	3	0
No.87	K	EG	–	–	–	–	0	0	1	0	0	0	0	0
No.88	K	NEG	–	–	–	–					0	1	0	1
No.89	K	NEG	–	–	–	BA								
No.90	K	NEG	–	–	–	+	0	1	0	0	0	0	0	0
No.91	K	NEG	+	+	+	+					3	2	3	0
No.92	K	NEG	–	–	–	–					1	1	0	0
No.93	K	EG	–	–	–	+	1	1	0	0	2	2	3	0
No.94	K	DÜ/E	+	+	+	+					3	2	3	0
No.95	K	NEG	+	+	KON	+	1	2	3	1	0	1	3	0
No.96	K	GÜ/E	–	–	–	–	0	0	1	0	0	1	0	0
No.97	K	NEG	+	+	BA	+	0	1	1	0				
No.98	K	NEG	+	+	BA	+	0	2	3	0	2	2	3	0
No.99	K	GÜ/E	+	+	+	+	0	1	2	0	1	1	1	0
No.100	K	NEG	+	+	+	+	2	2	3	0	0	2	3	0
No.101	E	NEG	–	–	–	–	2	1	0	0				
No.102	E	GÜ/E	+	+	+	+	1	2	3	0	0	1	2	0
No.103	K	GÜ/E	+	+	+	+	2	3	3	0	1	2	3	0
No.104	E	DÜ/E	+	+	KON	+	2	3	2	1	0	1	3	0
No.105	E	NEG	+	+	+	+	3	2	3	0	3	3	3	1
No.106	E	NEG	+	+	+	+	1	2	1	1	1	2	3	1
No.107	E	DÜ/E	+	+	+	+	2	3	3	0	1	2	2	0
No.108	K	NEG	–	–	–	–	0	1	0	0				
No.109	E	NEG	–	+	+	+								
No.110	E	NEG	–	–	–	BA			2	1				
No.111	K	EG	–	–	–	–	0	2	1	0				
No.112	K	NEG	+	+	+	+	2	1	3	0	1	1	3	0
No.113	K	EG	–	–	KON	–	0	1	0	0	0	1	0	0
No.114	K	EG	+	+	–	+	2	2	2	0				
No.115	K	EG	+	+	BA	+	2	2	3	0				
No.116	K	NEG	+	+	+	+	2	2	3	0				
No.117	E	NEG	+	+	–	+	1	2	2	0	1	1	1	0
No.118	K	NEG	+	+	+	+	1	2	3	0	2	2	3	0
No.119	E	NEG	+	+	KON	+	1	2	1	0	0	2	1	0
No.120	K	NEG	+	+	–	+	1	3	1	1	1	3	0	1

H.p: *Helicobacter pylori*; BA: Biyopsi alınamadı; KON: Kontaminasyon; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit; NEG: Non-eroziv gastrit; GK: Gastrik kanser; NM: Normal mukoza; K: Kadın; E: Erkek; PNL: Polimorfonükleer lökosit; MNH: Mononükleer hücre; HLO: Helicobacter benzeri organizma; İM: İntestinal metaplazi

Tablo 38. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre hastalarda *H. pylori* enfeksiyonu görülme sıklığı ile histopatolojik bulguları (PNL, MNH, HLO, İM) arasındaki ilişki

		PNL				**MNH**				**HLO**				**İM**			
		Antrum		**Korpus**		**Antrum**		**Korpus**		**Antrum**		**Korpus**		**Antrum**		**Korpus**	
		(n+/n–)		**(n+/n–)**		**(n+/n–)**		**(n+/n–)**		**(n+/n–)**		**(n+/n–)**		**(n+/n–)**		**(n+/n–)**	
HÜT ve histo-patoloji (n+/n–)		34	32	33	22	34	32	34	22	34	33	34	22	34	33	33	22
	Med (min-max)	1 (0-3)	0 (0-3)	1 (0-3)	0 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-2)	2.50 (1-3)	0 (0-2)	2.50 (0-3)	0 (0-3)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)
	*p	**p=0.006**		**p=0.001**		**p=0.001**		**p=0.010**		**p<0.001**		**p<0.001**		p=0.616		p=0.870	
HÜT, histo-patoloji ve/veya kültür (n+/n–)		36	30	35	20	36	30	36	20	36	31	36	20	36	31	35	20
	Med (min-max)	1 (0-3)	0 (0-3)	1 (0-3)	0 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-2)	2 (0-3)	0 (0-2)	2 (0-3)	0 (0-3)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)
	*p	**p=0.003**		**p=0.003**		**p=0.001**		**p=0.015**		**p<0.001**		**p<0.001**		p=0.818		p=0.705	
Kültür (n+/n–)		23	23	25	16	23	23	25	17	23	24	25	17	23	24	25	16
	Med (min-max)	1 (0-3)	0 (0-3)	1 (0-3)	0 (0-2)	2 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	3 (0-3)	1 (0-2)	3 (0-3)	0 (0-3)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (1-2)
	*p	**p=0.039**		**p=0.030**		p=0.164		**p=0.018**		**p<0.001**		**p<0.001**		p=0.528		p=0.822	

PNL: Polimorfonükleer lökosit; MNH: Mononükleer hücre; HLO: Helicobacter benzeri organizma; İM: İntestinal metaplazi
*Bağımsız iki grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Mann-Whitney U) p değeri

Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* (HLO) ile PNL ve MNH düzeyleri arasındaki ilişki Spearman'ın korelasyon test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür ve sadece kültür pozitif hasta sonuçlarına göre hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde HLO ile PNL düzeyleri arasında anlamlı orta düzeyde pozitif korelasyon saptandı (**r=0.575, p=0.001; r=0.467, p=0.004; r=0.338, p=0.047; r=0.550, p=0.007; r=0.548, p=0.005)**, ancak HLO ile MNH düzeyleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı (p>0.05) (Tablo 39).

Tablo 39. Hastaların HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde HLO ile PNL ve MNH düzeyleri arasındaki ilişki

	Gastrik biyopsi		**Antrum/Korpus PNL**	**Antrum/Korpus MNH**
HÜT ve histopatoloji (+) n=48	**Antrum HLO** n=34	**r *p	**r=0.575 p<0.001**	r=–0.038 p=0.833
	Korpus HLO n=33		r=0.249 p=0.163	r=0.117 p=0.509
HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (+) n=66	**Antrum HLO** n=36	**r *p	**r=0.467 p=0.004**	r=0.056 p=0.744
	Korpus HLO n=35		**r=0.338 p=0.047**	r=0.172 p=0.317
Kültür (+) n=50	**Antrum HLO** n=23	**r *p	**r=0.550 p=0.007**	r=0.237 p=0.275
	Korpus HLO n=25		**r=0.548 p=0.005**	r=0.341 p=0.096

PNL: Polimorfonükleer lökosit; MNH: Mononükleer hücre; HLO: Helicobacter benzeri organizma
*Spearman'ın korelasyon testi p değeri
**Spearman'ın korelasyon katsayısı

H. pylori enfeksiyonu pozitif hastalarda PNL ve MNH düzeylerinin kadın ve erkek hastalar arasında dağılımı Mann-Whitney U test ile değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05).

4.9.8. *Hastaların Histopatolojik Bulgularına Göre Helicobacter pylori Gen Ekspresyon Bulguları*

Hastaların histopatolojik bulgularına göre *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı araştırıldı. Bu genlerin ekspresyonu pozitif ve negatif saptanan hastalar ile histopatolojik bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olup olmadığı değerlendirildi. PNL, MNH ve HLO düzeyleri (0-3 arası skorlama) ordinal veri olduğu için bağımsız iki grup arasında skor değerlerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde 32 ve 33 hastada PNL, MNH ve HLO düzeylerine göre *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı değerlendirildiğinde, araştırılan genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). *omp18* geni tüm hastalarda eksprese edildiği için istatistiksel analiz yapılamadı. Ayrıca *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon negatifliğinin sıklığı ≤5 olduğu için istatistiksel analizler yapılamadı. Antrumda PNL, MNH ve HLO düzeylerine göre *cagA* geni için sırasıyla $p=0.625$, $p=0.124$, $p=0.911$; *omp6* geni için sırasıyla $p=0.263$, $p=0.942$, $p=0.530$; korpusta *cagA* geni için sırasıyla $p=0.198$, $p=0.253$, $p=0.063$; *omp6* geni için sırasıyla $p=0.155$, $p=0.366$, $p=0.943$ değerleri elde edildi (Tablo 40).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde 33 hastada PNL, MNH ve HLO düzeylerine göre *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı değerlendirildiğinde, araştırılan genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). *omp18* geni tüm hastalarda eksprese edildiği için istatistiksel analiz yapılamadı. Ayrıca *omp13* ve *omp20* gen ekspresyon negatifliğinin sıklığı ≤5 olduğu için istatistiksel analizler yapılamadı. Antrumda PNL, MNH ve HLO düzeylerine göre *cagA* geni için sırasıyla $p=0.721$, $p=0.294$, $p=0.339$; *omp6* geni için sırasıyla $p=0.287$, $p=0.770$, $p=0.369$; korpusta *cagA* geni için sırasıyla $p=0.198$, $p=0.253$, $p=0.063$; *omp6* geni için sırasıyla $p=0.155$, $p=0.366$, $p=0.943$ değerleri elde edildi (Tablo 40).

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif sptanan 45 hastanın gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ile hastaların histopatolojik bulgular (PNL, MNH, HLO düzeyleri) arasındaki ilişki araştırıldı. Ancak araştırılan genlerin ekspresyon negatifliğinin sıklığı ≤5 olduğu için istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Tablo 40. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıkları ile histopatolojik bulguları (PNL, MNH, HLO) arasındaki ilişki

		Gastrik biyopsi	*cagA*						*omp6*						**omp13*			***omp18*			**omp20*		
			PNL		MNH		HLO		PNL		MNH		HLO		PNL	MNH	HLO	PNL	MNH	HLO	PNL	MNH	HLO
			n_{gen+}/n_{gen-}		n_{gen+}/n_{gen-}		n_{gen+}/n_{gen-}		n_{gen+}/n_{gen-}		n_{gen+}/n_{gen-}		n_{gen+}/n_{gen-}										
HÜT ve histo-patoloji (+) n=48	RT RT-PCR (+) n=45	Antrum	22	10	22	10	22	10	25	7	25	7	25	7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		Med (min-max)	1 (0-3)	1 (0-2)	2 (0-3)	2 (1-3)	3 (1-3)	2.5 (1-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	2 (0-2)	2 (1-3)	3 (1-3)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		*p	p=0.625		p=0.124		p=0.911		p=0.263		p=0.942		p=0.530		---	---	---	---	---	---	---	---	---
		Korpus	21	12	21	12	21	12	26	7	26	7	26	7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		Med (min-max)	1 (0-3)	1 (0-2)	2 (0-3)	1 (0-3)	3 (1-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	0 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-2)	3 (0-3)	2 (1-3)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		*p	p=0.198		p=0.253		p=0.063		p=0.155		p=0.366		p=0.943		---	---	---	---	---	---	---	---	---
HÜT, histo-patoloji /kültür (+) (n=66)	RT RT-PCR (+) n=60	Antrum	22	12	22	12	22	12	27	7	27	7	27	7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		Med (min-max)	1 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	2 (1-3)	3 (1-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	2 (0-2)	2 (0-3)	3 (1-3)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		*p	p=0.721		p=0.294		p=0.339		p=0.287		p=0.770		p=0.369		---	---	---	---	---	---	---	---	---
		Korpus	21	12	21	12	21	12	26	7	26	7	26	7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		Med (min-max)	1 (0-3)	3 (1-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	3 (1-3)	2 (0-3)	1 (0-3)	0 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-2)	3 (0-3)	2 (1-3)	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		*p	p=0.198		p=0.253		p=0.063		p=0.155		p=0.366		p=0.943		---	---	---	---	---	---	---	---	---

*Bağımsız iki grup arasında veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Mann-Whitney U) p değeri

**Gen ekspresyon negatifliğinin sıklığı n≤5 olduğu için Mann-Whitney U testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

***Tüm hastalarda eksprese edildiği için istatistiksel analiz yapılamadı

HÜT, histopatoloji ve kültür pozitif sonuçlarına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı ile histopatolojik bulgular (PNL, MNH, HLO düzeyleri) arasındaki ilişki Spearman'ın korelasyon test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı ile hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, sadece antrumda *omp13* geni ile HLO arasında anlamlı orta düzeyde negatif korelasyon saptandı ($r=-0.512$, $p=0.043$). Araştırılan diğer genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 41).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada *H. pylori* gen ekspresyon düzeyleri yukarıdaki histopatoloji bulguları olan aynı hastalara denk geldiği için aynı sonuçlar elde edildi ve araştırılan diğer genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ve korelasyon saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 41).

Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı ile hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, araştırılan genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ve korelasyon saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 42).

Tablo 41. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür (en az iki pozitiflik), ayrıca RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeyleri ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki

Gen ***	**Gastrik biyopsi**		**Antrum/Korpus PNL**	**Antrum/Korpus MNH**	**Antrum/Korpus HLO**
cagA	**Antrum** n=11	**r *p	r=–0.169 p=0.619	r=–0.209 p=0.538	r=0.080 p=0.814
	Korpus n=9		r=0.523 p=0.148	r=0.518 p=0.153	r=0.000 p=1.000
omp6	**Antrum** n=14	**r *p	r=0.110 p=0.707	r=0.151 p=0.608	r=0.165 p=0.573
	Korpus n=14		r=0.467 p=0.092	r=0.276 p=0.339	r=0.010 p=0.972
omp13	**Antrum** n=16	**r *p	r=–0.038 p=0.890	r=–0.094 p=0.730	**r=–0.512 p=0.043**
	Korpus n=17		r=0.268 p=0.298	r=0.203 p=0.434	r=0.080 p=0.759
omp18	**Antrum** n=20	**r *p	r=0.004 p=0.987	r=0.096 p=0.687	r=0.210 p=0.374
	Korpus n=20		r=–0.161 p=0.496	r=–0.161 p=0.498.	r=–0.047 p=0.844
omp20	**Antrum** n=15	**r *p	r=0.385 p=0.156	r=0.293 p=0.289	r=0.404 p=0.133
	Korpus n=18		r=–0.032 p=0.901	r=–0.150 p=0.553	r=0.132 p=0.600

PNL: Polimorfonükleer lökosit; MNH: Mononükleer hücre; HLO: Helicobacter benzeri organizma
*Spearman'ın korelasyon testi p değeri
**Spearman'ın korelasyon katsayısı
***Gen ekspresyon düzeyinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.

Tablo 42. Kültür ve RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeyleri ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki

Gen ***	**Gastrik biyopsi**		**Antrum/Korpus PNL**	**Antrum/Korpus MNH**	**Antrum/Korpus HLO**
cagA	**Antrum** n=7	**r *p	r=–0.412 p=0.359	r=–0.668 p=0.101	r=0.158 p=0.735
	Korpus n=8		r=0.300 p=0.470	r=0.252 p=0.547	r=0.126 p=0.766
omp6	**Antrum** n=9	**r *p	r=0.026 p=0.946	r=0.143 p=0.714	r=0.139 p=0.720
	Korpus n=11		r=0.512 p=0.108	r=0.335 p=0.314	r=–0.123 p=0.719
omp13	**Antrum** n=9	**r *p	r=–0.065 p=0.869	r=–0.267 p=0.487	r=–0.091 p=0.815
	Korpus n=12		r=0.505 p=0.078	r=0.511 p=0.074	r=0.256 p=0.399
omp18	**Antrum** n=11	**r *p	r=0.130 p=0.702	r=0.131 p=0.702	r=0.348 p=0.294
	Korpus n=14		r=–0.054 p=0.856	r=–0.089 p=0.762	r=–0.013 p=0.965
omp20	**Antrum** n=10	**r *p	r=0.385 p=0.156	r=0.293 p=0.289	r=0.404 p=0.133
	Korpus n=12		r=–0.169 p=0.599	r=0.061 p=0.850	r=0.318 p=0.314

PNL: Polimorfonükleer lökosit; MNH: Mononükleer hücre; HLO: Helicobacter benzeri organizma
*Spearman'ın korelasyon testi p değeri
**Spearman'ın korelasyon katsayısı
***Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.

4.9.9. *Hastaların Antrum ve Korpus Gastrik Biyopsi Örneklerinde Helicobacter pylori Gen Ekspresyon Bulguları*

RT RT-PCR çalışmamızda 39 hastanın iki antrum ve iki korpus gastrik biyopsi örneklerine ayrı ayrı olarak RT RT-PCR testi uygulanmıştır. RT RT-PCR testi pozitif saptanan 30 hastada *H. pylori cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18*, *omp20 (alpA)*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinde antrum için ortalama Ct değerleri sırasıyla 31.03, 34.14, 34.21, 32.15, 27.96, 31.38, 28.25 ve korpus için 31.05, 35.71, 35.53, 33.63, 29.50, 33.24, 29.19 saptandı. HÜT, histopatoloji ve kültür sonuçlarına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin dağılımı verilmiştir (Tablo 43,Tablo 44,Tablo 45). Ayrıca *H. pylori* enfeksiyonu pozitiflik kriterine göre ve de kültür sonuçlarına göre istatistiksel analizlerin bulguları aşağıda yer almıştır.

Tablo 43. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 24 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri

Hasta No.	Cins	Endos-kopik bulgu	H.p HÜT ve histopatoloji pozitifliği	RT RT-PCR house-keeping genlerinin birlikte poz.	Antrum *cagA*	Antrum *omp6*	Antrum *omp13*	Antrum *omp18*	Antrum *omp20*	Korpus *cagA*	Korpus *omp6*	Korpus *omp13*	Korpus *omp18*	Korpus *omp20*	Antrum ΔCt *cagA* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp6* *16S rRNA
No.82	E	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,897	0,250
No.83	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,289
No.86	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,964	0,002
No.91	K	NEG	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	–	0,078	
No.94	K	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	102,537	0,993
No.95	K	NEG	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–	+	+		
No.97	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+		0,008
No.98	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	2,949	0,259
No.99	K	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,128
No.100	K	NEG	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	1,526	
No.102	E	GÜ/E	+	+	–	–	+	+	+	–	–	+	+	+		
No.103	K	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+		0,000
No.104	E	DÜ/E	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	+	5,776	
No.105	E	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	5,657	0,314
No.106	E	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	3,387	1,248
No.107	E	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	0,959	0,688
No.112	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,547
No.114	K	EG	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	0,002	0,001
No.115	K	EG	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–		
No.116	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,028	0,441
No.117	E	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,785
No.118	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33,825	2,621
No.119	E	NEG	+	+	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	0,005	
No.120	K	NEG	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	+	+		0,384

Tablo 43. HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 24 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri (devamı)

Antrum ΔCt *omp13* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp18* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp20* *16S rRNA	Korpus ΔCt *cagA* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp6* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp13* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp18* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp20* *16S rRNA	Antrum ΔCt *cagA* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp6* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp13* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp18* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp20* •*ureA*	Korpus ΔCt *cagA* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp6* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp13* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp18* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp20* •*ureA*
0,507	0,019	15,889	10,196	0,683	0,590	0,023	6,233	0,171	0,007	0,015	0,001	0,460	0,198	0,013	0,011	0,000	0,121
0,144	0,252	20,966		0,507	0,334	1,395	16,111		0,008	0,004	0,007	0,616		0,009	0,006	0,024	0,272
0,722	0,444	21,112	9,646	0,001	0,559	0,908	31,341	0,142	0,000	0,015	0,009	0,429	0,230	0,000	0,013	0,022	0,747
0,768	0,044		1,102		0,387	0,953		0,966		9,514	0,543		0,240		0,084	0,207	
0,354	0,933	9,063	42,814	1,079	0,457	1,072	9,448	5,242	0,051	0,018	0,048	0,463	1,569	0,040	0,017	0,039	0,346
0,000	3,074	53,446				2,828	58,485			0,000	0,015	0,262				0,010	0,202
0,590	0,346	1,972	0,154		0,023	0,071	2,000		0,008	0,603	0,354	2,014	0,633		0,095	0,291	8,225
0,022	1,338	8,634		0,532	0,183	0,092	1,932	0,191	0,017	0,001	0,087	0,559		1,329	0,457	0,230	4,823
0,002	3,182	28,051		0,001	0,024	2,532	24,420		0,002	0,000	0,038	0,339		0,000	0,000	0,042	0,409
0,274	0,664	0,578		0,001	0,301	2,235	6,869	0,457		0,082	0,199	0,173		0,000	0,004	0,028	0,085
0,053	1,125	9,781			0,005	0,366	8,456			0,001	0,031	0,270			0,001	0,090	2,071
0,050	0,966	58,892			0,017	1,157	64,893		0,000	0,002	0,045	2,751			0,001	0,037	2,099
	0,525		0,547	0,361	0,460	0,158	2,099	1,338			0,122		1,329	0,877	1,117	0,384	5,098
	3,387	29,243	14,621	0,457	0,241	5,696	26,355	0,123	0,007		0,074	0,637	0,027	0,001	0,000	0,011	0,049
	0,717	8,694	2,732	0,354		0,361	20,821	0,395	0,146		0,084	1,014	0,291	0,038		0,038	2,219
0,020	0,979		8,112	0,281	0,098	1,223		0,064	0,046	0,001	0,066		0,207	0,007	0,003	0,031	
0,063	0,883	33,359		0,187	0,048	1,181	10,196		0,030	0,003	0,049	1,840		0,010	0,003	0,064	0,551
0,356	2,462		0,020		0,199	1,000		0,000	0,000	0,002	0,016		0,000		0,002	0,012	
	0,824					0,103					0,075					1,828	
0,707	0,841	39,671	2,497	0,301	0,518	0,637	34,297	0,240	0,026	0,042	0,050	2,362	0,097	0,012	0,020	0,025	1,338
0,297	0,993	31,341		0,306	0,655	1,376	32,900		0,030	0,011	0,037	1,181		0,005	0,012	0,024	0,578
0,566	2,412	89,884	74,028	0,186	0,824	5,464	108,383	0,521	0,040	0,009	0,037	1,385	0,299	0,001	0,003	0,022	0,438
0,084	1,395	23,588			0,270	3,434	45,255	0,000		0,004	0,060	1,014			0,003	0,033	0,435
0,790	1,778					0,257	0,463		0,013	0,026	0,058					1,301	2,346

H.p: *Helicobacter pylori*; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit,; NEG: Non-eroziv gastrit; Ct: Eşik döngü sayısı; ΔCt: Normalize Ct değer; K: Kadın; E: Erkek

*Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.

•Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu *ureA* house-keeping gene göre yapılmıştır.

Tablo 44. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 25 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri

Hasta No.	Cins	Endoskopik bulgu	H.p HÜT,histopatoloji ve/veya kültür pozitifliği	RT RT-PCR housekeeping genlerinin birlikte poz.	Antrum *cagA*	Antrum *omp6*	Antrum *omp13*	Antrum *omp18*	Antrum *omp20*	Korpus *cagA*	Korpus *omp6*	Korpus *omp13*	Korpus *omp18*	Korpus *omp20*	Antrum ΔCt *cagA* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp6* *16S rRNA
No.82	E	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,897	0,250
No.83	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,289
No.86	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,964	0,002
No.91	K	NEG	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	–	0,078	
No.94	K	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	102,537	0,993
No.95	K	NEG	+	+	–	–	+	+	+	–	–	–	+	+		
No.97	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+		0,008
No.98	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	2,949	0,259
No.99	K	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,128
No.100	K	NEG	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	1,526	
No.102	E	GÜ/E	+	+	–	–	+	+	+	–	–	+	+	+		
No.103	K	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+		0,000
No.104	E	DÜ/E	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+	+	5,776	
No.105	E	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	5,657	0,314
No.106	E	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	3,387	1,248
No.107	E	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	0,959	0,688
No.109	E	NEG	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+		0,051
No.112	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,547
No.114	K	EG	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	0,002	0,001
No.115	K	EG	+	+	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–		
No.116	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,028	0,441
No.117	E	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,785
No.118	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33,825	2,621
No.119	E	NEG	+	+	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	0,005	
No.120	K	NEG	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	+	+		0,384

Tablo 44. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 25 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri (devamı)

Antrum ΔCt *omp13* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp18* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp20* *16S rRNA	Korpus ΔCt *cagA* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp6* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp13* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp18* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp20* *16S rRNA	Antrum ΔCt *cagA* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp6* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp13* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp18* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp20* •*ureA*	Korpus ΔCt *cagA* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp6* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp13* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp18* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp20* •*ureA*
0,507	0,019	15,889	10,196	0,683	0,590	0,023	6,233	0,171	0,007	0,015	0,001	0,460	0,198	0,013	0,011	0,000	0,121
0,144	0,252	20,966		0,507	0,334	1,395	16,111		0,008	0,004	0,007	0,616		0,009	0,006	0,024	0,272
0,722	0,444	21,112	9,646	0,001	0,559	0,908	31,341	0,142	0,000	0,015	0,009	0,429	0,230	0,000	0,013	0,022	0,747
0,768	0,044		1,102		0,387	0,953		0,966		9,514	0,543		0,240		0,084	0,207	
0,354	0,933	9,063	42,814	1,079	0,457	1,072	9,448	5,242	0,051	0,018	0,048	0,463	1,569	0,040	0,017	0,039	0,346
0,000	3,074	53,446				2,828	58,485			0,000	0,015	0,262				0,010	0,202
0,590	0,346	1,972	0,154		0,023	0,071	2,000		0,008	0,603	0,354	2,014	0,633		0,095	0,291	8,225
0,022	1,338	8,634		0,532	0,183	0,092	1,932	0,191	0,017	0,001	0,087	0,559		1,329	0,457	0,230	4,823
0,002	3,182	28,051		0,001	0,024	2,532	24,420		0,002	0,000	0,038	0,339		0,000	0,000	0,042	0,409
0,274	0,664	0,578		0,001	0,301	2,235	6,869	0,457		0,082	0,199	0,173		0,000	0,004	0,028	0,085
0,053	1,125	9,781			0,005	0,366	8,456			0,001	0,031	0,270			0,001	0,090	2,071
0,050	0,966	58,892			0,017	1,157	64,893		0,000	0,002	0,045	2,751			0,001	0,037	2,099
	0,525		0,547	0,361	0,460	0,158	2,099	1,338			0,122		1,329	0,877	1,117	0,384	5,098
	3,387	29,243	14,621	0,457	0,241	5,696	26,355	0,123	0,007		0,074	0,637	0,027	0,001	0,000	0,011	0,049
	0,717	8,694	2,732	0,354		0,361	20,821	0,395	0,146		0,084	1,014	0,291	0,038		0,038	2,219
0,020	0,979		8,112	0,281	0,098	1,223		0,064	0,046	0,001	0,066		0,207	0,007	0,003	0,031	
0,299	0,376	20,821	749,612	0,079	0,415	0,812	26,173		0,008	0,049	0,061	3,387	28,246	0,003	0,016	0,031	0,986
0,063	0,883	33,359		0,187	0,048	1,181	10,196		0,030	0,003	0,049	1,840		0,010	0,003	0,064	0,551
0,356	2,462		0,020		0,199	1,000		0,000	0,000	0,002	0,016		0,000		0,002	0,012	
	0,824					0,103					0,075					1,828	
0,707	0,841	39,671	2,497	0,301	0,518	0,637	34,297	0,240	0,026	0,042	0,050	2,362	0,097	0,012	0,020	0,025	1,338
0,297	0,993	31,341		0,306	0,655	1,376	32,900		0,030	0,011	0,037	1,181		0,005	0,012	0,024	0,578
0,566	2,412	89,884	74,028	0,186	0,824	5,464	108,383	0,521	0,040	0,009	0,037	1,385	0,299	0,001	0,003	0,022	0,438
0,084	1,395	23,588			0,270	3,434	45,255	0,000		0,004	0,060	1,014			0,003	0,033	0,435
0,790	1,778					0,257	0,463		0,013	0,026	0,058					1,301	2,346

H.p: *Helicobacter pylori*; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; NEG: Non-eroziv gastrit; Ct: Eşik döngü sayısı; ΔCt: Normalize Ct değer; K: Kadın; E: Erkek
*Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.•Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu *ureA* house-keeping gene göre yapılmıştır.

Tablo 45. Kültür sonucunun pozitif olduğu16 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri

Hasta No.	Cins	Endo-skopik bulgu	H.p kültür pozitifliği	RT RT-PCR house keeping genlerinin birlikte poz.	Antrum *cagA*	Antrum *omp6*	Antrum *omp13*	Antrum *omp18*	Antrum *omp20*	Korpus *cagA*	Korpus *omp6*	Korpus *omp13*	Korpus *omp18*	Korpus *omp20*	Antrum ΔCt *cagA* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp6* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp13* *16S rRNA
No.82	E	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5,897	0,250	0,507
No.83	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,289	0,144
No.86	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6,964	0,002	0,722
No.91	K	NEG	+	+	+	–	+	+	–	+	–	+	+	–	0,078		0,768
No.94	K	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	102,537	0,993	0,354
No.99	K	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,128	0,002
No.100	K	NEG	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	1,526		0,274
No.102	E	GÜ/E	+	+	–	–	+	+	+	–	–	+	+	+			0,053
No.103	K	GÜ/E	+	+	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+		0,000	0,050
No.105	E	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	5,657	0,314	
No.106	E	NEG	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	3,387	1,248	
No.107	E	DÜ/E	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	0,959	0,688	0,020
No.109	E	NEG	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+		0,051	0,299
No.112	K	NEG	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+		0,547	0,063
No.116	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,028	0,441	0,707
No.118	K	NEG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	33,825	2,621	0,566

Tablo 45. Kültür sonucunun pozitif olduğu 16 hastanın antrum ve korpus biyopsi örneklerinde RT RT-PCR pozitifliği ile *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri (devamı)

Antrum ΔCt *omp18* *16S rRNA	Antrum ΔCt *omp20* *16S rRNA	Korpus ΔCt *cagA* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp6* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp13* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp18* *16S rRNA	Korpus ΔCt *omp20* *16S rRNA	Antrum ΔCt *cagA* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp6* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp13* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp18* •*ureA*	Antrum ΔCt *omp20* •*ureA*	Korpus ΔCt *cagA* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp6* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp13* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp18* •*ureA*	Korpus ΔCt *omp20* •*ureA*
0,019	15,889	10,196	0,683	0,590	0,023	6,233	0,171	0,007	0,015	0,001	0,460	0,198	0,013	0,011	0,000	0,121
0,252	20,966		0,507	0,334	1,395	16,111		0,008	0,004	0,007	0,616		0,009	0,006	0,024	0,272
0,444	21,112	9,646	0,001	0,559	0,908	31,341	0,142	0,000	0,015	0,009	0,429	0,230	0,000	0,013	0,022	0,747
0,044		1,102		0,387	0,953		0,966		9,514	0,543		0,240		0,084	0,207	
0,933	9,063	42,814	1,079	0,457	1,072	9,448	5,242	0,051	0,018	0,048	0,463	1,569	0,040	0,017	0,039	0,346
3,182	28,051		0,001	0,024	2,532	24,420		0,002	0,000	0,038	0,339		0,000	0,000	0,042	0,409
0,664	0,578		0,001	0,301	2,235	6,869	0,457		0,082	0,199	0,173		0,000	0,004	0,028	0,085
1,125	9,781			0,005	0,366	8,456			0,001	0,031	0,270			0,001	0,090	2,071
0,966	58,892			0,017	1,157	64,893		0,000	0,002	0,045	2,751			0,001	0,037	2,099
3,387	29,243	14,621	0,457	0,241	5,696	26,355	0,123	0,007		0,074	0,637	0,027	0,001	0,000	0,011	0,049
0,717	8,694	2,732	0,354		0,361	20,821	0,395	0,146		0,084	1,014	0,291	0,038		0,038	2,219
0,979		8,112	0,281	0,098	1,223		0,064	0,046	0,001	0,066		0,207	0,007	0,003	0,031	
0,376	20,821	749,612	0,079	0,415	0,812	26,173		0,008	0,049	0,061	3,387	28,246	0,003	0,016	0,031	0,986
0,883	33,359		0,187	0,048	1,181	10,196		0,030	0,003	0,049	1,840		0,010	0,003	0,064	0,551
0,841	39,671	2,497	0,301	0,518	0,637	34,297	0,240	0,026	0,042	0,050	2,362	0,097	0,012	0,020	0,025	1,338
2,412	89,884	74,028	0,186	0,824	5,464	108,383	0,521	0,040	0,009	0,037	1,385	0,299	0,001	0,003	0,022	0,438

H.p: *Helicobacter pylori*; GÜ/E: Gastrik ülser/erozyon; DÜ/E: Duodenal ülser/erozyon; EG: Eroziv gastrit,; NEG: Non-eroziv gastrit;Ct: Eşik döngü sayısı; ΔCt: Normalize Ct değer; K: Kadın; E: Erkek;
*Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılmıştır.•Gen ekspresyon düzeylerinin normalizasyonu *ureA* house-keeping gene göre yapılmıştır.

Hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı araştırıldı, veriler McNemar's Chi-Square test ile değerlendirildi. *omp18* geni tüm hastalarda eksprese edildiği için istatistiksel analiz yapılamadı:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 24 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 24 hastanın *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıkları antrum için sırasıyla 14 (%58.3), 17 (%70.8), 20 (%83.3), 24 (%100.0) ve 18 (%75.0); korpus için sırasıyla 12 (%50.0), 15 (%62.5), 20 (%83.3), 24 (%100.0) ve 20 (%83.3) saptandı. Antrum ve korpus arasında araştırılan genlerin ekspresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 46).

HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 25 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 25 hastanın *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıkları antrum için sırasıyla 14 (%56.0), 18 (%72.0), 21 (%84.0), 25 (%100.0) ve 19 (%76.0); korpus için sırasıyla 13 (%52.0), 16 (%64.0), 21 (%84.0), 25 (%100) ve 21 (%84.0) saptandı. Antrum ve korpus arasında araştırılan genlerin ekspresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 46).

Kültür sonucunun pozitif olduğu 16 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan16 hastanın gen ekspresyon görülme sıklıkları antrum için sırasıyla 10 (%62.5), 13 (%81.3), 14 (%87.5), 16 (%100.0) ve 14 (%87.5); korpus için sırasıyla 10 (%62.5), 13 (%81.3), 15 (%93.8), 16 (%100.0) ve 14 (%87.5) saptandı. Antrum ve korpus arasında araştırılan genlerin ekspresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 46).

Tablo 46. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleinde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının dağılımı

		cagA		***omp6***		***omp13***		****omp18***		***omp20***	
		Antrum n (%)	**Korpus n (%)**	**Antrum n (%)**	**Korpus n (%)**	**Antrum n (%)**	**Korpus n (%)**	**Antrum n (%)**	**Korpus n (%)**	**Antrum n (%)**	**Korpus n (%)**
HÜT ve histo-patoloji/ PCR (+) n=24		14 (%58.3)	12 (%50.0)	17 (%70.8)	15 (%62.5)	20 (%83.3)	20 (%83.3)	**24 (%100.0)	**24 (%100.0)	18 (%75.0)	20 (%83.3)
	*p	p=0.625		p=0.687		p=1.000		—		p=0.500	
HÜT, histo-patoloji ve/veya kültür/PCR (+) n=25		14 (%56.0)	13 (%52.0)	18 (%72.0)	16 (%64.0)	21 (%84.0)	21 (%84.0)	**25 (%100.0)	**25 (%100.0)	19 (%76.0)	21 (%84.0)
	*p	p=1.000		p=0.687		p=1.000		—		p=0.500	
Kültür/PCR (+) n=16		10 (%62.5)	10 (%62.5)	13 (%81.3)	13 (%81.3)	14 (%87.5)	15 (%93.8)	**16 (%100.0)	**16 (%100.0)	14 (%87.5)	14 (%87.5)
	*p	p=1.000		p=1.000		p=1.000		—		p=1.000	

*Gözlenen ve beklenen değerler arasında karşılaştırma testi (McNemar's Chi-Square) p değeri
**Gen ekspresyon görülme sıklık olasılığı olmadığı (gözlenen ve beklenen sıklıklar) için McNemar's Chi-Square testi yapılamadı ve p değerleri elde edilemedi.

Aynı hastalarda antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı araştırıldı. Tüm genlerin ekspresyon düzeyleri normal dağılıma uymadığı için bağımlı iki grup arasında ortanca "median" değerler üzerinden *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı non-parametrik bir test olan Wilcoxon işaretli sıralar test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji ayrıca HÜT, histopatoloji ve/veya kültür pozitif bulgularına göre sırasıyla RT RT-PCR testi pozitif saptanan 24 ve 25 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin dağılımı değerlendirildiğinde, *cagA, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeyleri antrumda, korpusa göre daha yüksek; *omp6* ve *omp13* gen ekspresyon düzeyleri ise antrumda, korpusa göre daha düşük saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 47-A,Tablo 47-B).

Kültür pozitif sonuçlarına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan 16 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde sadece *omp6* ve *omp13* gen ekspresyon düzeyleri (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (**p=0.014**, **p=0.026**). *H. pylori omp6* ve *omp13* genlerinin ekspresyon düzeyleri korpusta antruma göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptandı. Araştırılan diğer genlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 47-A,Tablo 47-B).

Tablo 47-A. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (16S rRNA house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		cagA		***omp6***		***omp13***		***omp18***		***omp20***	
		Antrum	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**
		****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**
HÜT ve histopatoloji/ RT RT-PCR (+) n= 24		3.71 (0.00-102.54)	5.42 (0.02-74.03)	0.31 (0.00-2.62)	0.31 (0.00-1.08)	0.29 (0.00-0.79)	0.29 (0.01-0.82)	0.95 (0.02-3.39)	1.04 (0.02-5.70)	22.35 (0.58-89.88)	18.50 (0.46-108.38)
	*p	p=0.424		p=0.279		p=0.744		p=0.668		p=0.586	
HÜT, histopatoloji ve/veya kültür/RT RT-PCR (+) n= 25		3.71 (0.00-102.54)	8.11 (0.02-749.61)	0.30 (0.00-2.62)	0.30 (0.00-1.08)	0.30 (0.00-0.79)	0.30 (0.01-0.82)	0.93 (0.02-3.39)	1.00 (0.02-5.70)	21.11 (0.58-89.88)	20.82 (0.46-108.38)
	*p	p=0.424		p=0.331		p=0.629		p=0.563		p=0.469	
Kültür/RT RT-PCR (+) n=16		4.84 (0.08-102.54	9.92 (1.10-749.61)	0.31 (0.00-2.62)	0.28 (0.00-1.08)	0.29 (0.00-0.77)	0.33 (0.01-0.82)	0.86 (0.02-3.39)	1.12 (0.02-5.70)	21.04 (0.58-89.88)	22.62 (6.23-108.38)
	*p	p=0.260		p=0.388		p=0.638		p=0.063		p=0.638	

Tablo 47-B. HÜT, histopatoloji ve kültür bulgularına göre RT RT-PCR testi pozitif saptanan hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* gen ekspresyon düzeylerinin (*ureA* house-keeping gene göre normalizasyonu) dağılımı

		cagA		***omp6***		***omp13***		***omp18***		***omp20***	
		Antrum	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**	**Antrum**	**Korpus**
		****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**	****Median (Min-Max)**
HÜT ve histopatoloji/ PCR (+) n= 24		0.22 (0.00-5.24)	0.24 (0.00-1.57)	0.01 (0.00-0.15)	0.01 (0.00-1.33)	0.01 (0.00-0.51)	0.06 (0.00-1.12)	0.05 (0.00-0.54	0.04 (0.00-1.83)	0.63 (0.17-2.75)	0.56 (0.05-8.23)
	*p	p=0.103		p=0.077		p=0.101		p=0.637		p=0.557	
HÜT, histopatoloji ve/veya kültür/PCR (+) n= 25		0.22 (0.00-5.24)	0.24 (0.00-28.25)	0.01 (0.00-0.15)	0.01 (0.00-1.33)	0.01 (0.00-9.51)	0.01 (0.00-1.12)	0.05 (0.00-0.54	0.03 (0.00-1.83)	0.64 (0.17-3.39)	0.58 (0.05-8.23)
	*p	p=0.103		p=0.059		p=0.064		p=0.518		p=0.398	
Kültür/PCR (+) n=16		0.32 (0.06-5.24)	0.24 (0.03-28.25)	0.01 (0.00-0.15)	0.01 (0.00-0.04)	0.01 (0.00-9.51)	0.00 (0.00-0.04)	0.05 (0.00-0.54)	0.3 (00.0-21)	0.63 (0.17-3.39)	0.50 (0.50-2.22
	*p	p=0.097		**p=0.014**		**p=0.026**		p=0.083		p=0.140	

*Bağımlı iki grup arasında normal dağılımı olmayan veri dağılımının non-parametrik karşılaştırma testi (Wilcoxon işaretli sıralar) p değeri
**Non-parametrik dağılım gösteren verinin merkezi ve uç ölçütleri

4.9.10. *Helicobacter pylori ureA Gen Ekspresyon Bulguları*

H. pylori dış membran proteinleri dışında *ureA* geninin *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde rolü olup olmadığı araştırıldı. RT RT-PCR çalışmamızda 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genleri *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeylerinin saptanmasında kullanılmıştır. Araştırmamızda *ureA* house-keeping geninin normalizasyonu 16S rRNA house-keeping gene göre yapılarak *ureA* gen ekspresyon düzeyinin dağılımı hastaların endoskopik, ayrıca histopatolojik bulgularına göre istatistiksel olarak değerlendirildi. *ureA* gen ekspresyon düzeyleri normal dağılıma uymadığı için gastrik ülser/erozyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E) ve eroziv gastrit (EG) hasta grupları non-eroziv gastrit+normal mukoza (NEG+NM) hasta grubu ile tek tek karşılaştırılarak bağımsız ikili gruplar arasında ortanca "median" değerler üzerinden *H. pylori ureA* gen ekspresyon düzeyinin dağılımı non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U test ile değerlendirildi:

HÜT ve histopatoloji bulgularının pozitif olduğu 48 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada *H. pylori ureA* gen ekspresyon düzeyi açısından GÜ/E, DÜ/E ve EG hasta grupları ile NEG+NM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). İkili hasta gruplarında p değerleri sırasıyla $p=0.717$, $p=0.108$, $p=0.419$ saptandı. HÜT, histopatoloji ve/veya kültür bulgularının pozitif olduğu 66 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 60 hastada *H. pylori ureA* gen ekspresyon düzeyi açısından GÜ/E, DÜ/E ve EG hasta grupları ile NEG+NM hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). İkili hasta gruplarında p değerleri sırasıyla $p=0.466$, $p=0.165$, $p=0.519$ saptandı. Kültür sonucunun pozitif olduğu 50 hastada RT RT-PCR testi pozitif saptanan 45 hastada da gruplarar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). İkili hasta gruplarında p değerleri sırasıyla $p=0.920$, $p=0.166$, $p=0.881$ saptandı.

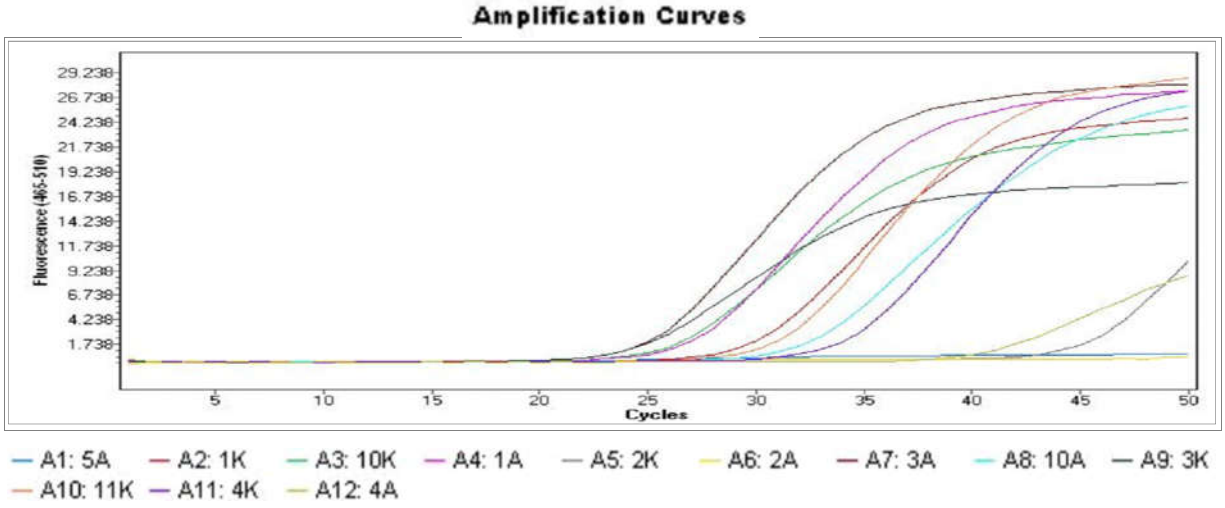
H. pylori ureA gen ekspresyon düzeyi ile histopatolojik bulgular (PNL, MNH, HLO düzeyleri) arasındaki ilişki Spearman'ın korelasyon test ile değerlendirildiğinde, hastalarımızda *H. pylori ureA* gen ekspresyon düzeyi ile PNL, MNH ve HLO düzeyleri arasında anlamlı düzeyde korelasyon saptanmadı (antrum: $r=0.162$, $r=–0.194$, $r=0.276$; korpus: $r=–0.010$, $r=–0.109$, $r=–0.184$ ve p değerleri $p>0.05$).

Hasta bazlı sonuçlarda *ureA* gen ekspresyon pozitifliği, HÜT test sonuçları ile karşılaştırıldığında, 76 hastanın 66'sında *ureA* ve HÜT her ikisi de pozitif saptandı, ancak dokuz hastada HÜT negatif iken *ureA* gen ekspresyonu pozitif saptandı. Sadece bir hastada

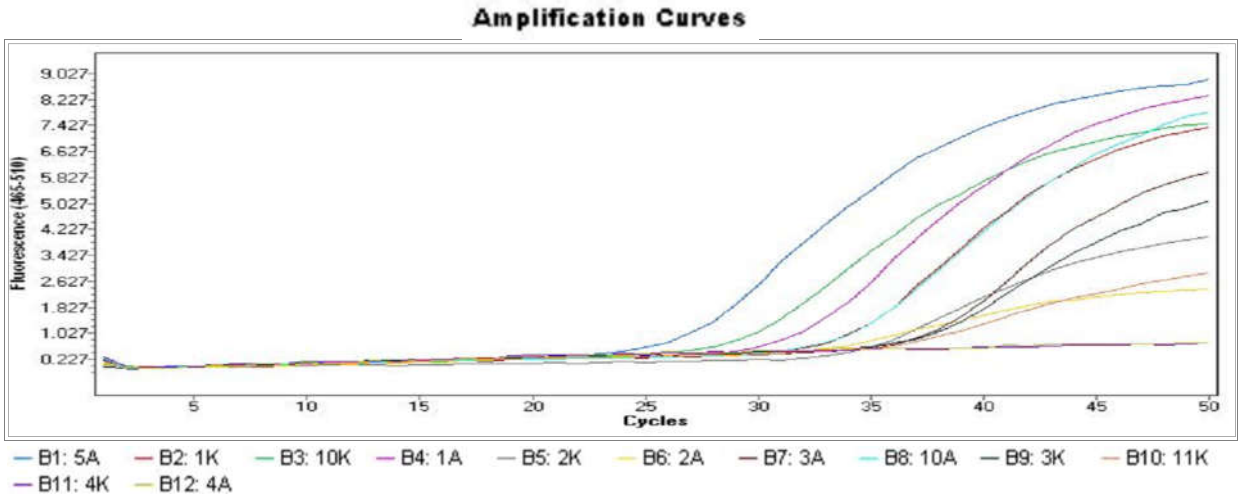
HÜT pozitif, *ureA* ise negatif bulundu. Antrum ayrı korpus ayrı olarak değerlendirildiğinde, antrum ve korpusta *ureA* ve HÜT her ikisi de pozitif saptanan 25 ve 12 hastanın sırasıyla dörd'ünde ve dokuz'unda HÜT negatif iken *ureA* gen ekspresyonu pozitif saptandı. Sadece korpusta bir hastanın HÜT sonucu pozitif, *ureA* ise negatif bulundu. Gözlenen ve beklenen değerlerin %50'sinde bir ve birin altında olduğu için Chi-Square uyum testi yapılamadı.

Araştırmamızda 39 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerine ayrı ayrı olarak RT RT-PCR testi uygulanarak *ureA* geninin rölatif ekspresyon düzeyinin antrum ve korpus arasında dağılımı Wilcoxon işaretli sıralar test ile değerlendirildiğinde, bu genin ekspresyon düzeyi korpusta, antruma göre daha yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. HÜT ve histopatoloji; HÜT, histopatoloji ve/veya kültür ve sadece kültür pozitif hastalarda p değerleri sırasıyla p=0.256, p=0.229, p=0.093 saptandı. Bu hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde PNL, MNH ve HLO düzeyleri birbiriyle karşılaştırılarak arasındaki farklılık non-parametrik bir test olan Wilcoxon işaretli sıralar test ile değerlendirildiğinde, antrum ve korpus arasında PNL, MNH ve HLO ortalama sıra değerleri birbirine çok yakın saptandı, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0.05).

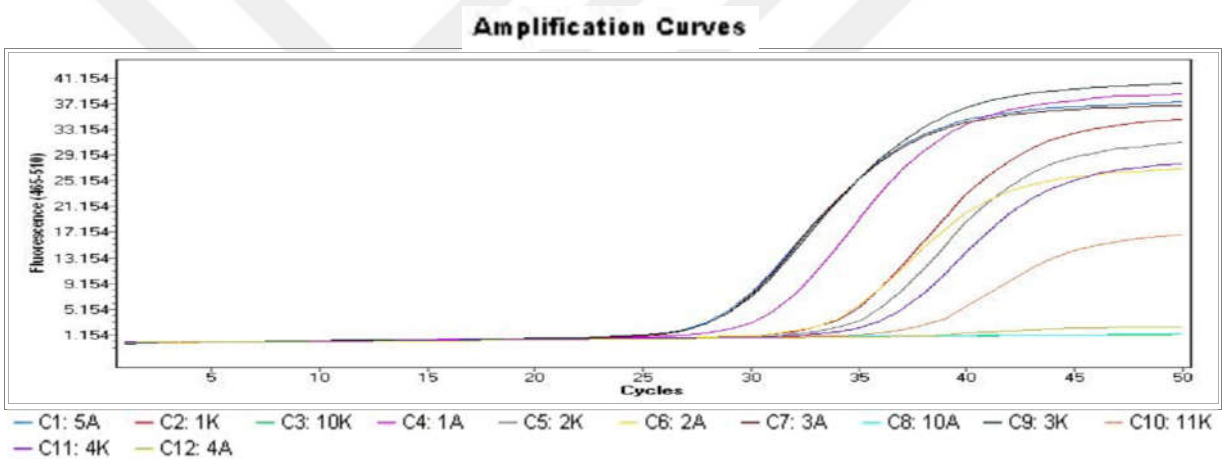
RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve korpus birlikte veya antrum ayrı, korpus ayrı gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18, omp20* hedef genleri, ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genleri için 18.99-45.00 arasında Ct değerleri elde edildi. Bu genlerin amplifikasyon eğrileri Şekil 23, Şekil 24, Şekil 25, Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29, Şekil 30'da verilmiştir.



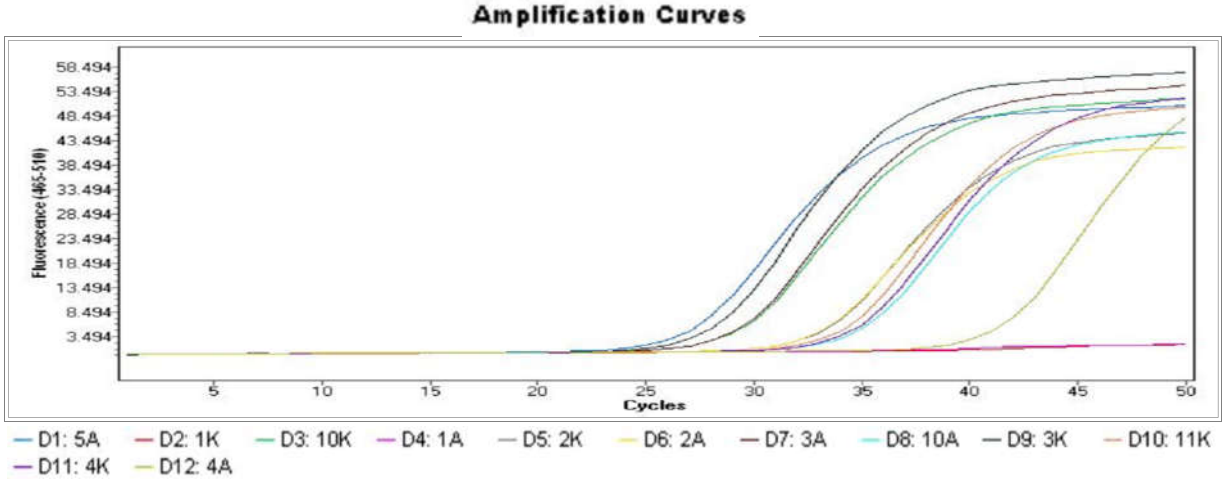
Şekil 23. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA* geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)



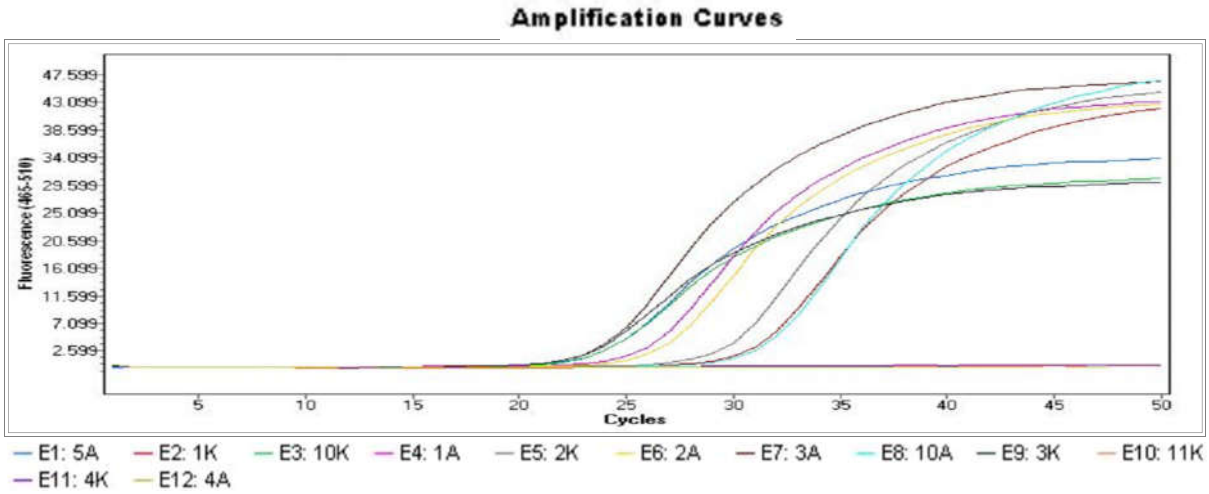
Şekil 24. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp6* geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)



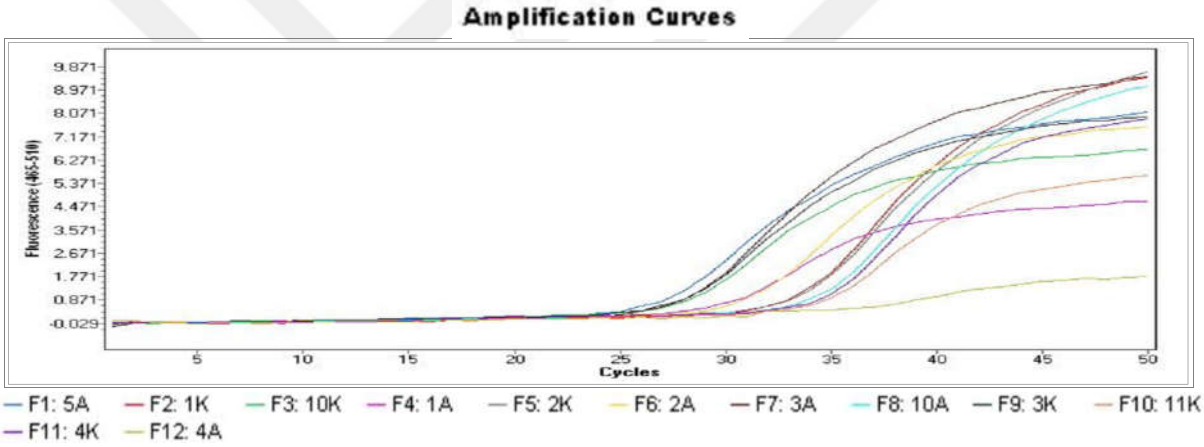
Şekil 25. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp13* geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)



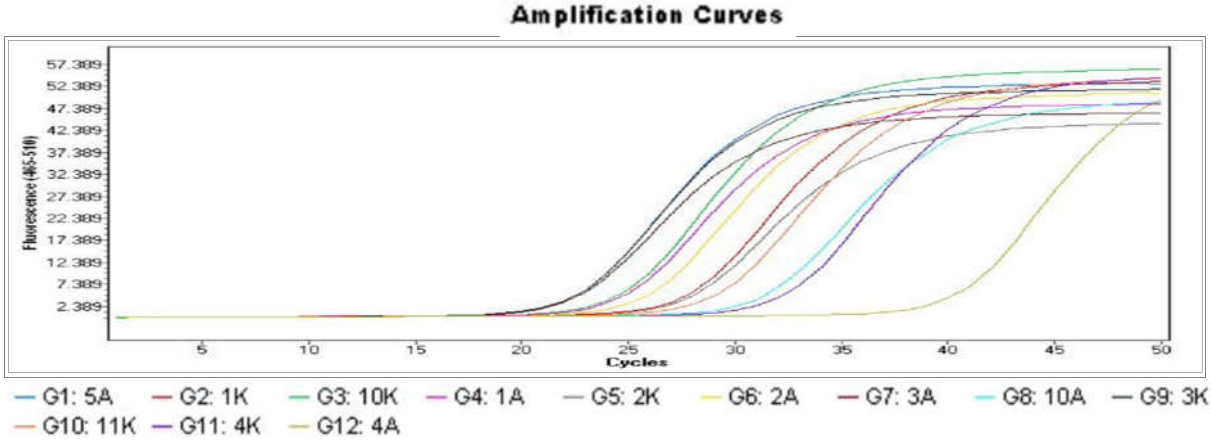
Şekil 26. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp18* geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)



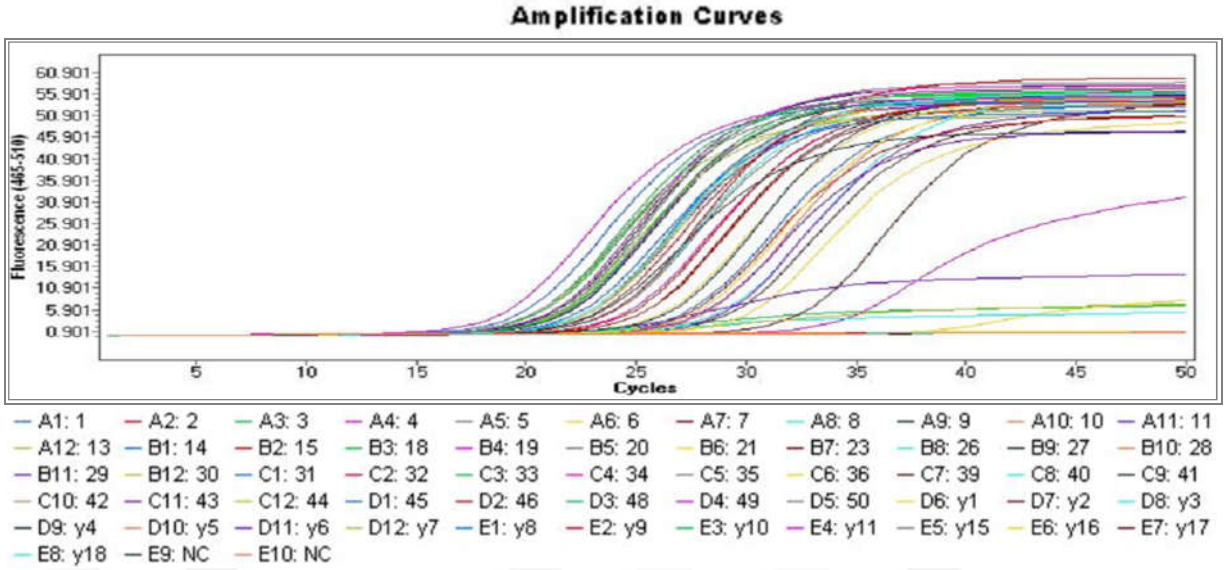
Şekil 27. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori omp20* geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)



Şekil 28. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori* 16S rRNA geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: korpus)



Şekil 29. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori ureA* geninin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)



Şekil 30. RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda hastaların antrum ve korpus birlikte gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18, omp20*, 16S rRNAve *ureA* genlerinin amplifikasyon eğrileri (A: Antrum; K: Korpus)

4.9.11. *Real-time RT-PCR Testinin Tekrarlanabilirlik Bulguları*

RT RT-PCR testinin tekrarlanabilirliği için çalışmamızda hasta grubundan randomize olarak sekiz (antrum ve korpus birlikte) ve altı (antrum ayrı korpus ayrı) toplam 14 hastanın gastrik biyopsi örneklerinin cDNA'ları, negatif kontrol (PCR grade saf su) ve pozitif kontrol *H. pylori* NCTC 11637 H.p.-1 standart stok suşu ile birlikte *H. pylori cagA*, *omp6, omp13*, *omp18*, *omp20* hedef genleri ayrıca 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genleri için RT RT-PCR testi tekrar edildi.

Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation, CV) her bir gen için "CV=100×standart sapma/ortalama" formülünden hesaplanarak RT RT-PCR tekrarlanması sonucu toplam ortalama CV değeri %1.70 elde edildi (Tablo 48).

Tablo 48. RT RT-PCR testinin tekrarlanabilirliği ve elde edilen CV değerleri

Hasta No.	*cagA*	*omp6*	*omp13*	*omp18*	*omp20*	16S rRNA	*ureA*
	*1.Ct-2.Ct değeri	*1.Ct-2.Ct değeri	*1.Ct-2.Ct değeri	*1.Ct-2.Ct Değeri	*1.Ct-2.Ct değeri	*1.Ct-2.Ct değeri	*1.Ct-2.Ct değeri
			Antrum ve korpus birliktee				
4-E (A+K)	00.00-00.00 CV= 00.00	32.11-31.72 CV= 0.84	31.26-30.70 CV= 1.27	25.72-26.44 CV= 1.95	24.81-24.87 CV= 0.17	28.56-28.66 CV= 0.24	21.95-21.72 CV= 0.74
7-E (A+K)	23.91-26.67 CV= 7.71	33.95-37.02 CV= 6.11	29.05-29.36 CV= 0.75	24.56-26.85 CV= 6.29	00.00-00.00 CV= 00.00	25.73-26.75 CV= 2.74	21.95-24.76 CV= 8.50

10-E (A+K)	41.92-40.80 CV= 1.91	41.70-41.14 CV= 0.95	00.00-00.00 CV= 00.00	26.35-27.74 CV= 3.63	22.94-23.78 CV= 2.54	28.62-29.20 CV= 1.41	22.97-23.48 CV= 1.55
11-E (A+K)	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	31.73-31.31 CV= 0.94	34.50-34.81 CV= 0.63	25.23-24.24 CV= 2.83	30.62-29.69 CV= 2.18	25.44-24.04 CV= 4.00
19-E (A+K)	00.00-00.00 CV= 00.00	28.16-27.82 CV= 0.85	28.08-27.61 CV= 1.19	26.28-26.65 CV= 0.98	22.45-22.18 CV= 0.85	30.74-30.49 CV= 0.57	21.49-20.81 CV= 2.27
27-E (A+K)	28.22-26.69 CV=3.93	32.25-33.55 CV=2.79	45.00-43.19 CV=2.90	29.75-31.06 CV=3.05	39.54-38.20 CV=2.44	31.58-31.50 CV=0.18	24.60-28.22 CV=9.70
30-E (A+K)	00.00-00.00 CV=00.00	28.72-29.46 CV=1.70	00.00-00.00 CV=00.00	28.23-31.26 CV=7.19	23.33-25.23 CV=5.51	29.33-30.86 CV=3.58	23.85-26.67 CV=7.87
37-E (A+K)	24.39-24.86 CV=1.35	29.27-30.13 CV=2.05	28.29-28.20 CV=0.22	27.11-28.10 CV=2.54	23.63-24.12 CV=1.44	38.25-37.92 CV=0.61	22.34-23.42 CV=0.24
			Antrum ayrı, korpus ayrı				
10 (K)	00.00-00.00 CV=00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	38.15-37.66 CV= 0.91	38.88-37.74 CV= 2.09	36.51-36.70 CV= 0.36	36.57-36.11 CV= 0.89	36.11-37.95 CV= 3.51
11 (A)	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	39.68-39.21 CV= 0.84	00.00-00.00 CV= 00.00	40.25-39.63 CV= 1.09
12 (K)	26.54-26.17 CV= 0.99	29.49-29.48 CV= 2.37	00.00-00.00 CV= 00.00	29.46-28.81 CV= 1.57	23.61-23.05 CV= 1.69	27.99-28.12 CV= 0.32	24.76-24.47 CV= 0.83
12 (A)	30.56-31.06 CV= 1.14	31.04-31.49 CV= 1.01	36.17-36.35 CV= 0.35	30.53-31.02 CV= 1.12	00.00-00.00 CV= 00.00	30.50-30.86 CV= 0.82	26.60-27.87 CV= 3.29
35 (K)	00.00-00.00 CV= 00.00	33.63-34.00 CV= 0.77	35.60-35.35 CV= 0.49	30.97-30.46 CV= 1.17	27.86-27.74 CV= 0.33	31.21-32.13 CV= 2.05	00.00-00.00 CV=00.00
36 (A)	00.00/00.00 CV= 00.00	00.00/00.00 CV= 00.00	00.00/00.00 CV= 00.00	00.00/00.00 CV= 00.00	39.68/39.21 CV= 0.84	00.00/00.00 CV= 00.00	40.25 /39.63 CV= 1.09
NK	00.00-00.00 CV=00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00	00.00-00.00 CV= 00.00
Ortalama CV değeri	%1.31	%1.49	%0.69	%2.47	%1.46	%1.19	%3.35
Toplam Ortalama CV değeri	%1.70						

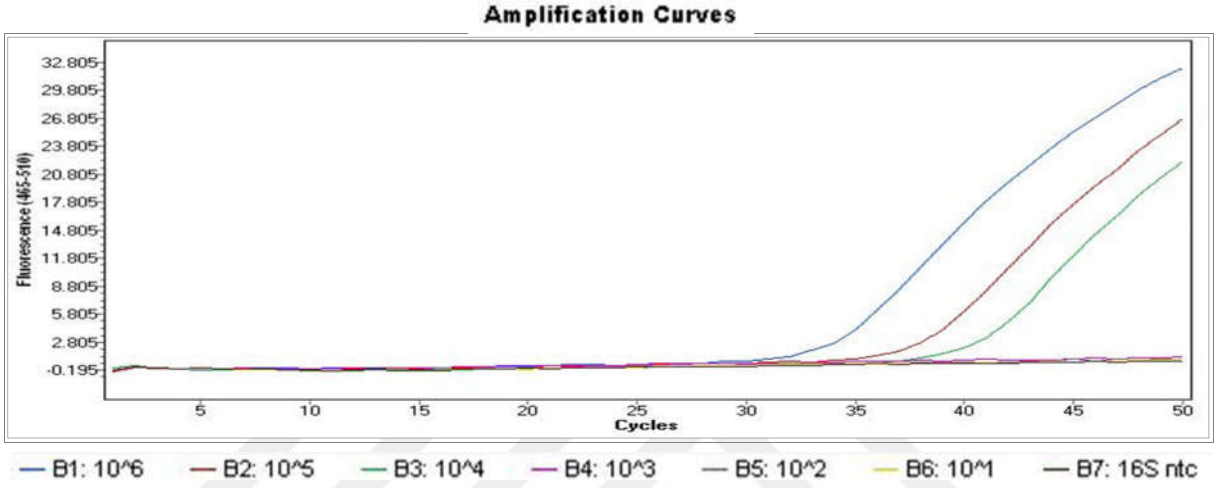
CV: Coefficient of variation, varyasyon katsayısı; Ct: Cycle threshold/Eşik döngü sayısı; NK: Negatif kontrol (PCR grade saf su); A: Antrum; K: Korpus; E: İlk alınan hastaların antrum ve korpus birleştirilmiş gastrik biyopsi önekleri

* İki kez tekrarlanan RT RT-PCR çalışmamızda elde edilen Ct değerleri

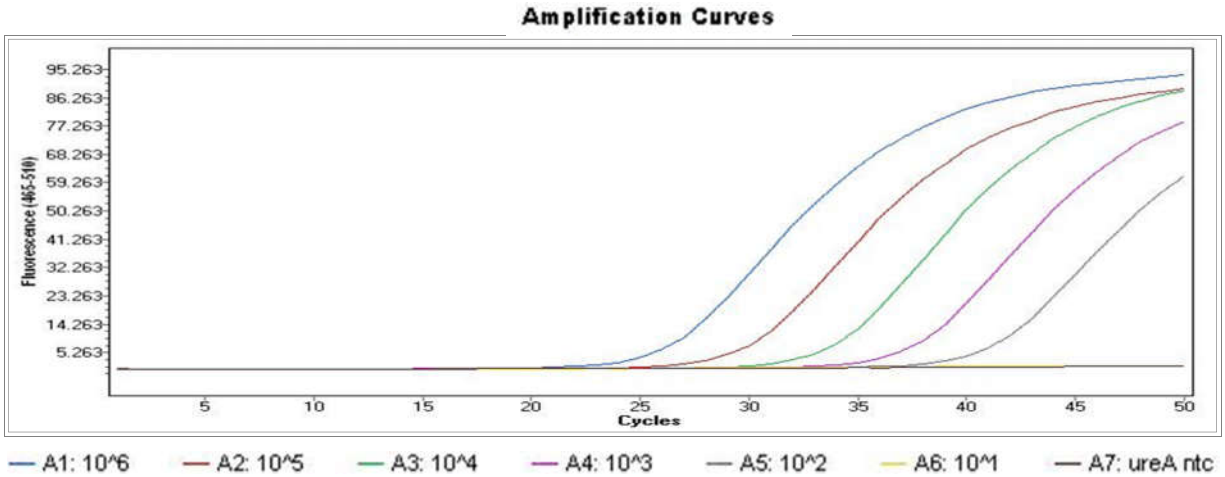
4.9.12. *Real-time RT-PCR Testinin Analitik Duyarlılık Bulguları*

RT RT-PCR testinin *H. pylori*'nin saptayabilecek en düşük cDNA miktarını belirlemek için pozitif kontrolün hazırlanmasında yer alan protokole göre *H. pylori* NCTC 11637 (*cagA, vacA, oipA* ve *babA* pozitif) standart suşunun subkültüründen bakteri süspansiyonu (10^8 CFU/ml) hazırlanarak elde edilen cDNA örneğinden PCR grade saf su (Zymo Research) ile $1/10^1$-$1/10^5$ seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlarda RT RT-PCR deneyi sadece *H.*

pylori 16S rRNA ve *ureA* house-keeping genlere uygulanmıştır. Sonuçlarımızda 16S rRNA geni için $1/10^1$-$1/10^3$ dilüsyonlarda Ct değeri saptandı. Ancak $1/10^4$, $1/10^5$ dilüsyonlarda herhangi bir Ct değeri saptanmadı. *ureA* geni için $1/10^1$-$1/10^5$ dilüsyonlarda Ct değeri elde edildi. Sonuçta RT RT-PCR testinin saptayabilecek en düşük *H. pylori* cDNA dilüsyonu belirlendi. *H. pylori* gen ekspresyonunun saptanmasında *ureA* house-keeping geninin analitik duyarlılığı 16S rRNA house-keeping genine kıyasla 100 kat daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 31,Şekil 32).



Şekil 31. RT RT-PCR çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart stok suşunun subkültüründen hazırlanan cDNA örneklerinde ($1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$ dilüsyonları) 16S rRNA geninin amplifikasyon eğrileri



Şekil 32. RT RT-PCR çalışmamızda *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun subkültüründen hazırlanan cDNA örneklerinde ($1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ dilüsyonları) *ureA* geninin amplifikasyon eğrileri

5. TARTIŞMA

H. pylori'nin birçok virülans faktörünün enfeksiyonun oluşumunda ve hastalığın seyrine etkisi olduğu bildirilmiştir. *H. pylori* genomu suşlar arasında yüksek derecede polimorfizm göstermekle beraber bakteri kolonizasyonunda ve inflamatuvar yanıtların oluşumunda dış membran protein genleri (OMPs) ayrıca VacA, CagA virülans faktörlerinin önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Virülans genlerinin ekspresyonunun araştırılması ve virülansı öngören markerlerin belirlenmesi ile hastaların etkin tedavisi sağlanmakla beraber *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı bildirilmektedir (9,11-14).

Araştırmamızın önemli bir kısmı olan, gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin kültürü ve izolasyonunda farklı kültür besiyerlerinin etkinliğinin değerlendirilmesi, ayrıca stok ve indikatör besiyerlerinin geliştirilmesi yer almıştır. *H. pylori* enfeksiyonunun mikrobiyolojik tanısının konulması, antimikrobiyal duyarlılık testlerinin yapılması ve antibiyotik direnç paternlerinin belirlenmesi, virülans faktörlerinin saptanması ve aşı geliştirilmesi için bakterinin saf kültürü gerekmektedir (3,59).

Çalışmamızda *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneklerinden daha yüksek oranda izolasyonunu sağlamak amacıyla %7 defibrine at kanlı besiyerinin yanında %10 taze insan serumlu Columbia Blood agar besiyeri de kullanıldı. Her iki besiyerinde *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneklerinden %66 oranında bakteri izolasyonu sağlandı. *H. pylori'*nin kültürü için taze insan serumu, at veya koyun kanı gibi suplementlere göre daha ucuz olduğu ve kolaylıkla bulunduğundan alternatif bir suplement olarak *H. pylori* kültür besiyerinde kullanılabileceği gösterildi (144).

H. pylori'nin kültürü için %5-10 defibrine at veya koyun kanı içeren Columbia Blood agar veya Brain Heart Infusion agar besiyerleri kullanılır (1,124,125). Kan yerine bovine kalf serumu veya albumin, aktif kömür ve nişasta gibi suplementlerin kullanıldığı da bildirilmiştir. Siklodekstrin, sodyum pirovat, ferro sülfat ve müsin gibi üreme hızlandırıcı maddelerin *H. pylori*'nin üremesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. *H. pylori*'nin kültürü için isovitaleks ve hemin içeren kansız kültür besiyerleri de geliştirilmiştir. Bu suplementlerin kültür besiyerinde toksik bileşenlerin uzaklaştırılmasında rolü olduğu bildirilmiştir (1,3,128,132).

Ayrıca, %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür ve *H. pylori* selektif suplement **(**DENT) içeren Columbia Blood agar besiyeri kullanılarak hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü yapıldı. Bu besiyerinin kullanıldığında %10 taze insan

serumlu besiyerine göre *H. pylori*'nin kültürde daha tipik spiral morfolojisi gözlendi. Bu besiyeri %0.3 aktif kömür içerdiği için *H. pylori*'nin üremesini hızlandırarak bakterinin subkültüründe 48 saatte üreme saptandı (145). Aktif kömür eklendiğinde kültür besiyerinde oluşan hidrojen peroksit ve süperoksit iyonu gibi toksik bileşenler ortadan kaldırılmış olup, *H. pylori*'nin üremesini hızlandırdığı, ayrıca hemoglobinde bulunan hem proteininin üreme hızlandırıcı rolü olduğu bildirilmiştir (128,133).

H. pylori'nin %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür, *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerinde kültürü yapılırken *H. pylori* selektif suplement **(**DENT) içermeyen %1 çözünebilir hemoglobin, %0.3 aktif kömür, Columbia Blood agar besiyeri de kullanılarak hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinin kültürü yapıldı. *H. pylori* izolasyon oranı suplementsiz **(**DENT) besiyerinde, suplementli **(**DENT) besiyerine göre daha yüksek saptandı (antrum için %90 ve %75; korpus için %100 ve %66.6). Ancak suplementsiz **(**DENT) besiyerinde bazen *H. pylori* dışında diğer bakterilerin üremesi de saptandı. Suplementsiz (DENT) besiyerinde *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneklerinden daha yüksek oranda izolasyonu sağlanmasına rağmen kültürde kontaminasyon riskinin arttığı saptandı (147).

H. pylori yavaş ve zor üreyen bir bakteridir. Gastrik biyopsi örneklerinde nazofarenks veya orofarenks normal florası bulunduğu nedeni ile *H. pylori*'nin üremesini sağlamak için seçici kültür besiyeri kullanılmaktadır. Bu amaçla vankomisin, trimetoprim, sefsulodin ve amfoterisin B içeren suplementli (DENT) kültür besiyeri geliştirilmiştir. Ancak *H. pylori*'nin kültürü yapıldığı zaman bazı bakteri suşlarının bu suplementte bulunan antibiyotiklere duyarlılığı nedeni ile bu suşların kaçırılmaması için antibiyotik içeren besiyerinin yanında antibiyotik içermeyen besiyerinin kullanılması önerilmektedir (3).

Kültür besiyeri ile ilgili yaptığımız başka bir çalışmada kültürde üreyen *H. pylori* kolonilerinin identifikasyonunu kolaylaştırmak amacıyla %1 hemoglobin, *H. pylori* selektif suplement (DENT) içeren Columbia Blood agar besiyerine %0.004 oranında (40 mg/L) ″triphenyl tetrazolium chloride″ (TTC) eklenerek indikatör besiyeri geliştirildi. Hastaların antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örnklerinin kültürü indikatör besiyerinde de yapıldı. Tüm *H. pylori* suşları TTC varlığında üredi, az veya çok miktarda pigment oluşumu ile altın renkli *H. pylori* kolonileri görüldü ve saptandı. TTC'siz besiyerinde ise *H. pylori* kolonileri şeffaf ve gri renkte görüldü. Orofarenksten endoskopi forsepsine olası diğer bakterilerin bulaşı nedeni ile TTC'li besiyerinde üreyen bakteriler kırmızı veya pembe renkli koloniler

oluşturdu (146). *H. pylori* TTC'yi formazan'a indirgeyerek altın renkli koloniler oluştururken, kültürde üreyen diğer bakteriler ise kırmızı veya pembe renkli koloniler oluşturur. TTC tolerans testi biyokimyasal tanı testi olarak *H. pylori* kolonilerinin diğer bakterilerden ayrımında özellikle biyopsi örneklerinde bakteri yoğunluğu az olduğu zaman *H. pylori*'nin idantifikasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir (1,3,131).

Çalışmamızda antrum ve/veya korpus gastrik biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşlarının daha uzun süre canlılığını sağlayan stok besiyerlerini araştırmak amacıyla *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kullanılarak %20 gliserol, %5 DMSO, %5 PEG, 0.3 M sakkaroz ve %10 taze insan serumu gibi kriyoprezervatif ajanları içeren besiyerlerinde *H. pylori* standart suşu iki farklı koşulda (–20°C ve –80°C'de) stoklanarak değerlendirildi. *H. pylori* canlandırma oranı –80°C'de saklanan stok besiyerlerinde, –20°C'de tutulan stok besiyerlerine göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. Araştırmamızda 56°C'de 30 dakika ısıtılması ile inaktive edilmiş taze insan serumunun *H. pylori* üzerine koruyucu etkisi olduğu belirlendi. Sonuçta, BHI+%20 gliserol+%10 taze insan serumu ve BHI+%20 gliserol+%10 taze insan serumu+0.3 M sakkaroz içeren stok besiyerlerinde *H. pylori*'nin –80ºC'de daha canlı tutulduğu gösterildi (127). *H. pylori* izolatlarının uzun süre genetik yapısı değişmeden canlı olarak tutulabilmesi için %20'lik gliserol içeren sıvı besiyerinde stoklanarak daha ileride yapılacak olan deneylerde kullanılmak üzere –80°C sıcaklıkta saklanır. Ökaryot ve prokaryot hücrelerin stoklanmasnda çeşitli kriyoprezervatif maddeler kullanılmaktadır. Bu maddeler hücre veya bakterinin dondurma işlemi sırasında buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek bakterinin korunmasını sağlar. Ayrıca kriyoprezervatifler bakterinin içine penetre olup lipit içeriğini değiştirerek bakterinin soğuk strese karşı toleransını arttırır. Buna rağmen kriyoprezervatif maddeler toksik ve koruyucu etkilerine göre birbirinden farklılık göstermektedir (127). Kriyoprezervatiflerin serumla birlikte kullanılması ile daha koruyucu etkisinin olduğu saptandı. Çalışmamızda –20°C ve –80°C'de stoklanan *H. pylori* standart suşunun canlandırılmasında kullanılan kriyoprezervatiflerin koruyucu etkisine göre farklı sonuçlar elde edildi (127).

H. pylori'nin gastrik biyopsi örneklerinden izolasyonunda bakterinin kültürü yapılıncaya kadar canlı kalabilmesini sağlamak için transport besiyeri kullanılır. *H. pylori*'nin başarılı bir şekilde saf kültürünün elde edilmesi için biyopsi örneğinin en kısa sürede uygun bir ortam içinde laboratuvara ulaştırılması ve en kısa zaman içerisinde kültürün yapılması önerilmektedir. Yarı sıvı besiyerlerinin kullanılması ile mikroaerofilik koşulların sağlandığı

ve bakterinin havadaki oksijenin toksik etkisinden korunduğu bildirilmiştir. *H. pylori*'nin %20 gliserol içeren besiyerinde +4°C'de tutulması ile biyopsi örneklerinin %81'inden izole edildiği gösterilmiştir. *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneğinde daha az sayıda bulunduğu takdirde yalancı negatif sonuçlara yol açabilmektedir (3,125).

Çalışmamızda *H. pylori*'nin kültürü için ilk kullandığımız transport besiyerinde diğer bakterilerin üremesini engellemek için *H. pylori* selektif suplement (DENT) ayrıca mikroaerofilik ortam sağlamak için transport besiyerine %0.4 oranında jelatin eklenerek yarı sıvı transport besiyeri geliştirildi. İkinci transport besiyeri için %20 gliserol içeren Brain Heart Infusion buyyon (BHI) kullanıldı ve *H. pylori* kültürü yapılıncaya kadar biyopsi örnekleri –80°C'de saklandı. Her iki besiyerinde taşınan biyopsi örneklerinden kültürde *H. pylori* izole edilmiş, ancak zaman ve GasPak tasarrufu açısından %20 gliserol içeren transport besiyeri, gliserol içermeyen besiyerine göre kullanılması daha uygun görüldü (3).

H. pylori enfeksiyonu tüm hastalarda kronik gastrik inflamasyon oluşturmasına rağmen hastaların az bir kısmında daha şiddetli patolojik veya klinik sonçlara yol açmaktadır. Virülan genotipler ile enfekte hastalarda peptik ülser veya gastrik kanser daha sık görülmektedir (6,148). *H. pylori*'nin virülans faktörleri, CagA ve önemli dış membran protein (OMPs) gen ekspresyonlarının bu hastalıkların ortaya çıkmasında rölü olduğu bildirilmiştir (11). Hastalarımızda bu genlerin ekspresyonu incelenerek klinik, endoskopik veya histopatolojik bulguları ile herhangi bir ilişki olup olmadığı araştırıldı.

RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin endoskopik hasta grupları arasında dağılımının istatistiksel yöntemler kullanılarak analizi yapılmıştır. Gastrik ülser/eroziyon (GÜ/E), duodenal ülser/erozyon (DÜ/E), eroziv gastrit (EG) ve non-eroziv gastrit (NEG) hastalarda, ikili ve tüm hasta grupları arasında, ayrıca her grubun kendi içinde *H. pylori* gen ekspresyonlarının karşılaştırılması sonucunda ikili hasta gruplarında *H. pylori omp13 (oipA)* geninin rölatif ekspresyon düzeyi (ΔCt) GÜ/E ve EG hastalarda, NEG hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük saptandı. Diğer bir deyişle *omp13* geninin rölatif ekspresyon düzeyi NEG hastalarda, GÜ/E ve EG hastalara göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edildi. Oysa gen ekspresyon görülme sıklığı açısından araştırdığımız genlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Diğer genlerden farklı olarak *cagA* geninin rölatif ekspresyon düzeyi EG hastalarda, p değeri anlamlı sınıra yakın saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

H. pylori Omp13 (OipA, HopH) önemli bir dış membran proteini olarak *omp13* geni tarafından kodlanır (15). Bu proteinin inflamasyondaki rolü ilk defa Yamaoka ve ark. tarafından açıklanmıştır. Ayrıca OipA proteini bir adezin olarak bildirilmiştir. Gastrik epitel hücrelerinden IL-8 salınımını indüklediği gösterilmiştir (12,149). *H. pylori*'de faz varyasyonu ile regüle edilen dış membran protein genlerinin ekspresyonu *H. pylori* enfeksiyonu sürecinde sürekli değişmektedir. Bu genlerin kodladığı adezinler bakteri ile konak hücre arasındaki etkileşimden etkilenmektedir. Bu mekanizma ile bakterinin konak immün yanıtından kaçışı ve enfeksiyonun kronikleşmesine yol açtığı düşünülmektedir (17,78). Dossumbekova ve ark. ayrıca Ando ve ark., PCR yöntemi ile *oipA* (*omp13*) geninin sinyal peptit kodlayan bölgesinde CT tekrarlarının varyasyonuna göre genin fonksiyonel olup olmadığını araştırmışlardır. Bu genin CT dinükleotit tekrarları sayısına bağlı olarak kaymış iplikle eşleşme hatası (SSM) mekanizması ile regüle edildiği ve bakteriyal genlerin ekspresynunun (switch "on" veya fonksiyonel *oipA*, switch "off" veya fonksiyonel olmayan *oipA*) faz varyasyonu ile sürekli değiştiği bildirilmiştir. Fonksiyonel *oipA* geni ile *cagA* pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Fonksiyonel *oipA* genini eksprese eden suşların birçoğu *cagA* pozitif, *vacA* s1 ve bu geni eksprese etmeyenlerin birçoğu *cagA* negatif, *vacA* s2 olduğu gösterilmiştir. Böylece *H. pylori* enfeksiyonunun patogenezinde *oipA* ve *cagA*'nın sinerjistik etkileri ile daha ciddi hastalık oluşturabileceği için biyolojik açıdan önemli olduğu bildirilmiştir (11,36,72,115). Yamaoka ve ark.'nın çalışmalarında fonksiyonel *oipA* geninin ekspresyonu ile duodenal ülser, gastrik kanser, *H. pylori* yoğunluğu ve nötrofil infiltrasyonu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (13,98).

Çalışmamızda kısa amplikonlar (93 nükleotit) elde edildiğinden, tekrar DNA elde edilemediğinden dolayı *omp13* geninin sinyal peptit bölgesi incelenmediği ve sekans analizi yapılamadığı için gen transkriptlerinin fonksiyonel olup olmadığı belirlenemedi. İstatistiksel analizlerimizde gastrik ülser/eroziyon (GÜ/E) ve duodenal ülser/erozyon (DÜ/E) hasta grupları birleştirilerek peptik ülser (PÜ/E) hasta grubu olarak gruplandırıldı, bu grup ile non-eroziv gastrit (NEG) hasta grubu arasında *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildi. Hasta sayısının çoğaltılması sonucunda da aynı sonuçlar elde edildi, *omp13* geninin rölatif ekspresyon düzeyi PÜ/E hastalarda, NEG hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük saptandı. Diğer bir deyişle bu genin rölatif ekspresyon düzeyi NEG hastalarda, PÜ/E hastalara göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. Araştırmamızda *omp13* gen ekspresyon negatifliğinin

sıklığı ≤5 olduğu için bu genin ekspresyon görülme sıklığı ile polimorfonükleer lökosit (PNL), mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu ve HLO düzeyleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilemedi, ancak antrumda bu genin ekspresyon düzeyi ile HLO arasında anlamlı orta düzeyde negatif korelasyon saptandı. Hastalarımızdan elde edilen sonuçlara göre *omp13* gen ekspresyonu ile inflamatuvar hücre yoğunluğu (PNL, MNH) arasında herhangi bir korelasyon saptanmadığı için NEG hastalarda bu genin fazla ekspresyonu ile bakterinin gastrik mukozasına tutunması ile *H. pylori* enfeksiyonunun kronikleşmesinde rolü olabileceği düşünüldü. Ayrıca, GÜ/E, DÜ/E, EG ve NEG hasta grupları *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon düzeyleri açısından birbiriyle karşılaştırıldığında, *omp13* ve *cagA* genlerinde p değerleri anlamlı sınıra yakın saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

GÜ/E, DÜ/E, EG ve NEG hasta gruplarında, her grubun kendi içinde *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, NEG hastalarda *cagA*, *omp6*, *omp13* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı, ayrıca DÜ/E hastalarda *cagA* ve *omp20* genlerinin ekspresyon görülme sıklığı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Oysa GÜ/E ve EG hastalarda gen ekspresyon görülme sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu analizlerde her bir hasta grubu NEG grubu ile tek tek karşılaştırmadan sadece kendi içinde gen ekspresyon görülme sıklıkları değerlendirildiği için bu genlerde gözlenen artışın hastaların endoskopik bulguları ile ilişkili olmadığı ve bu artışın hasta sayısının az olduğundan kaynaklandığı düşünüldü. NEG hastalarda *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının yüksek bulunmasının nedenini açıklamak için bu grup içerisinde antral gastritli hastalar dışında pan-gastritli hastalar yer aldığından ve bu hastaların gen ekspresyon üzerine etkisi olabileceği düşünülerek *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin iki hasta grubu arasında dağılımı istatistiksel anlaliz yöntemleri ile incelendi. Bu genlerin ekspresyon görülme sıklıkları ve düzeyleri pan-gastritli hastalarda, antral gastritli hastalara göre daha yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Yapılan birçok araştırmada *H. pylori* ile enfekte hastalarda görülen gastrit paterninin farklı patolojilere yol açabileceği bildirilmektedir. Pan-gastrit veya korpus ağırlıklı gastriti olan hastalarda asit üretimi normal enfekte hastalara göre daha az olduğu için gastrik ülser veya atrofik korpus gastrit daha hızlı bir şekilde gelişerek gastrik kanser riskini arttırmaktadır (150). Korpus ağırlıklı pan-gastritli hastalarda *H.*

*pylori'*nin hem antrum hem de korpusta lokalize olmakla beraber korpus mukozası ile yakın temasta olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunun akut fazında IL-1β geninin fazla ekspresyonu sonucunda parietal hücre fonksiyonunun kaybı ile asit salınımının azaldığı ve hipoklorhidrinin geliştiği bildirilmiştir (9). Antrum ağırlıklı gastriti olan hastalarda ise hipergastrinemi veya fazla asit salgılanması ile duodenal ülser daha sık görülmektedir. Antrum ağırlıklı gastritin gastroözofajial reflü hastalığına (GERD) yol açabileceği ve pan-gastriti olan hastaların hipoklorhidri nedeni ile bu hastalıktan korunduğu gösterilmiştir. Duodenal ülserli hastalarda gastrik adenokarsinoma gelişme riskinin göreceli olarak düşük olduğu bildirilmiştir. *cagA* pozitif *H. pylori* suşunu taşıyan ve pan-gastrit veya korpus ağırlıklı gastriti olan hastalarda özofajial hastalığa karşı direnç gelişmesine rağmen gastrik kanser gibi hastalığa yatkın olduğu düşünülmektedir (151). Queiroz ve ark.'nın PCR çalışmasında *cagA* pozitif suşlarının korpusta daha şiddetli gastrit oluşturduğu gösterilmiştir (107). Yamaoka ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada fonksiyonel *omp13 (oipA)* geni ile antrum ağırlıklı gastrit arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (152). Sepulveda ve ark.'nın çalışmasında ailede gastrik kanser öyküsü ve 36 yaş altında olan hastalarda pan-gastrit, aile öyküsü olmayanlarda ise antrum ağırlıklı gastritin geliştiği bildirilmiştir. Pan-gastriti olan hastaların mide korpusunda *H.pylori* yoğunluğu yüksek saptanmıştır (153). Yapılan bazı çalışmalarda ise hipoklorhidrili hastalarda *H. pylori* yoğunluğu daha az bulunmuş, ancak Seo ve ark. *H. pylori* hızlı üreaz testi pozitifliğini hipoklorhidrili hastalarda, gastrik asit pH'sı normal olan hastalara göre daha yüksek saptamışlardır (154). CagA EPIYA-D motifi içeren Doğu Asya *H. pylori* suşları ile peptik ülser veya gastrik kanser gelişme riski arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu suşlar başlıca korpus ağırlıklı gastrit veya hipoklorhidri ile birlikte pan-gastritin gelişimine neden olmaktadır. Uzun süreli hipoklorhidrinin kronik atrofik gastrit ve sonuçta gastrik kansere yol açabileceği bildirilmektedir (11,155).

Bulgularımızda pan-gastritli hastalar ile antral gastritli hastalar arasında HLO, PNL ve MNH skor değerleri açısından belirgin bir farklılık saptanmadı. AHLO skor değeri pan-gastritli hastalarda, antral gastritli hastalara göre biraz daha düşük, KHLO skor değeri ise biraz daha yüksek bulundu. Sonuçlarımıza göre istatistiksel olarak anlamsız bir düzeyde *H. pylori* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin pan-gastritli hastalarda yüksek saptanmasının önemli nedenlerinden biri pan-gastritli hastalarda hipoklorhidrinin gelişmesidir. Böylece pan-gastritli hastalarda gastrik ortamdaki yüksek pH'nın bu genlerin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi olduğu ve gen ekspresyonlarında saptanan artışının *H.*

pylori yüküne bağlı olmadığı düşünüldü. Pan-gastritli hastalarda araştırdığımız genlerin virülans markeri olup olmadığı konusunda elde edilen bulgulara yönelik daha fazla ileri çalşmalara gereksinim duyulduğu kanısana varıldı.

Çalışmamızda 39 hastanın antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerine ayrı ayrı olarak uygulanan RT RT-PCR testi sonucunda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18*, *omp20*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinde ortalama Ct değerleri antrumda, korpusa göre daha düşük saptandı. Ct değeri, örnekteki hedef nükleik asit miktarı ile ters orantılıdır. Diğer bir deyişle gen transkriptleri (mRNA) ne kadar fazla olursa RT RT-PCR sürecinde biriken ürün o kadar hızlı tespit edilir ve Ct değeri o kadar düşük saptanır (143).

Bulgularımızda *H. pylori cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı açısından hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Ancak *omp6* ve *omp13* genlerinin rölatif ekspresyon düzeyleri korpusta, antruma göre anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. *H. pylori*'nin Hop ailesindeki dış membran proteini olan Omp6 (HopA), bir porin proteini olarak *omp6* (HP0229) geni tarafından kodlanır. *H. pylori*'nin insan gastrik adenokarsinoma mukozal hücrelerine (AGS) teması sonucu *omp6* geninin ekspresyonunda upregülasyon gösterilmiştir. Böylece *H. pylori*'nin gastrik mukozaya tutunmasında Omp6 proteinin rolü olduğu bildirilmiştir (15,156). Bunun dışında Omp6 gibi Hop ailesindeki dış membran proteinleri, transmembran kanalları veya porin yapıların oluşturması ile bakterinin metabolizmasında önemli olduğu bilinmektedir (112,157). Carlsohn ve ark.'nın proteomiks araştırmalarında *omp6* gen ekspresyonunun kaybı ile duodenal ülser arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir. *H. pylori*'nin önemli diğer adezinlerinden Omp13 (OipA), Omp20 (AlpA) ve Omp21 (AlpB) proteinlerinin *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde rolü olduğu bildirilmiştir (15,158). *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre *H. pylori* genomunun % 7'sinin ortam pH'sından etkilendiği bildirilmiştir. Asidik ortamda *cagA, vacA, omp20 (alpA), omp21 (alpB*), *omp13, omp6* gen ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir. *ureA* ve *ureB* genlerinin ekspresyonunda ise artış gözlenmiştir (112). Hayvan modeli üzerinde yapılan bir çalışmada asidik ortamda *ureA*, *ureB* ve *cagA* gen ekspresyonlarının upregülasyonu gösterilmiştir. Bu çalışmada *H. pylori*'nin yerleşim yeri olan gastrik pH'nın bakterinin birçok gen ekspresyonunun regülasyonunda rolü olduğu bildirilmiştir (120). Bugaytsova ve ark. radioimmunoassay (RIA) yöntemi ile yaptıkları çalışmalarında *H. pylori*'nin diğer bir adezin proteini olan BabA'nın gastrik mukozaya bağlanma afinitesinin pH'ya bağlı olarak değiştiğini

bildirmişlerdir. Normalde gastrik asiditesi antrumda (pH'sı yüksek, asiditesi düşük), korpusa göre daha düşük olduğu için *H. pylori*'nin tercih ettiği yerleşim yeri antrum bölgesidir. Düşük pH'da bu adezinin gastrik mukozaya bağlanmasında azalma, yüksek pH'da ise artış gösterilmiştir. Aside duyarlılık bakteriyal suşlar ve coğrafi bölgelere göre değişmekte olup böylece antrum ya da korpusta gen ekspresyonunun değişmesi ile farklı patolojilere yol açabileceği bildirilmektedir (159). *H. pylori* enfeksiyonu kronik seyirli bir enfeksiyondur. Bakteriyal adezinlerinin eksprese edilmesi ile *H. pylori*'nin gastrik epitel hücrelerine sürekli tutunması ve kalıcı kolonizasyonu sağlanarak bakteriyal toksinlerin gastrik epitel hücrelerine translokalizasyonu ile gastrik mukozal hasara yol açabileceği bildirilmektedir (17,67).

RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori omp6* ve *omp13* genlerinin rölatif ekspresyon düzeylerinin korpusta, antruma göre daha yüksek saptandığı klinik açıdan önemli olabilir. Bulgularımızda HLO, PNL ve MNH skor değerleri açısından antrum ve korpus arasında belirgin bir farklılık saptanmadı. AHLO skor değeri, KHLO değerine göre biraz yüksek bulundu. Bu yüzden korpusta *H. pylori omp6* ve *omp13* gen ekspresyon düzeylerindeki artışının *H. pylori* yüküne bağlı olmadığı düşünüldü. Korpusta (pH'sı düşük, asiditesi yüksek) asidite antruma göre daha yüksektir. Böylece gen ekspresyonlarının pH veya gastrik mikro çevresindeki diğer fizyolojik faktörlerden etkilenebileceği düşünüldü. Araştırmamızda hastaların antrum ve korpus bölgelerinin pH değerleri ile ilgili herhangi bir bilgi olmadığı için söz konusu genlerin ekspresyon düzeylerinin gastrik asiditeden olumlu ya da olumsuz yönde etkilendiği araştırılamadığı için daha ileri araştırmalar gerektirir. *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde korpus bölgesindeki fizyolojik ve patolojik değişikliklerin gastrik kanser gelişiminde önemli olduğundan *omp6* veya *omp13* gibi bakteriyal adezin genlerinin ekspresyonlarının bu hastalığın ortaya çıkmasında olası bir faktör olabileceği kanısına varıldı.

Histopatolojik bulgularımıza göre *H. pylori* enfeksiyonu ile polimorfonükleer lökosit (PNL), mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu ve HLO düzeyleri arasında ilişki olduğu saptandı. *H. pylori* enfeksiyonu ile intestinal metaplazi (İM) arasında herhangi bir ilişki bulunmadı. HLO ile PNL düzeyleri arasında anlamlı orta düzeyde pozitif korelasyon saptanırken, HLO ile MNH düzeyleri arasında saptanmadı. Yapılan bir çok çalışmada *H. pylori* kolonizasyon yoğunluğu ile PNL ayrıca MNH infiltrasyon şiddeti arasında korelasyon bulunmuştur. Yamaoka ve ark. PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori* yoğunluğu ile nötrofil infiltrasyon şiddeti arasında korelasyon bildirmişlerdir (98). Basso ve ark.'nın PCR

çalışmasında antrum ve korpusta *H. pylori* yoğunluğu ile polimorfonükleer hücreleri, korpusta ise *H. pylori* yoğunluğu ile mononükleer hücreleri arasında korelasyon gösterilmiştir (160).

H. pylori enfeksiyonu ile atrofik gastrit, intestinal metaplazi, displazi ve gastrik adenokarsinoma arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Basso ve ark. PCR yöntemi ile *vacA* geninde s1, i1 ve m1 allelik tiplerinin varlığı ayrıca *cagA* geninin pozitifliği veya korpusta yüksek düzeyde *H. pylori* kolonizasyonunun intestinal metaplazi geliştirme riskini arttırdığını göstermişlerdir (160). Ancak çalışmamızda *H. pylori* enfeksiyonu ile intestinal metaplazi arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. *H. pylori* enfeksiyonu veya bakteriyel virülans faktörleri ile yaş ve cinsiyet arasında herhangi bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (32,111,161, 162). Araştırmamızda kadın ve erkek hastalarda aktivite, kronisite ve HLO düzeyleri incelendi. Hem antrum hem de korpusta erkek hastalarda aktivite, kronisite ve HLO düzeyleri kadın hastalara göre anlamlı olmayan düzeyde daha yüksek saptandı. Kato ve ark. *H. pylori* ile enfekte hastaların antrum gastrik biyopsi örneklerinde inflamasyon ve aktivite derecesi erkek hastalarda kadın hastalara göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulmuşlardır. Erkek ve kadın hastalar arasında IL-8 mRNA düzeyindeki gözlenen fark anlamlı bulunmamıştır (116). Sonuçlarımız literatür çalışmaları desteklemiştir.

Araştırmamızda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının PNL, MNH, HLO düzeylerine göre dağılımı değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Sadece antrumda HLO ile *omp13* geni arasında anlamlı orta düzeyde negatif korelasyon saptandı. Twisk ve ark.'nın ELISA yöntemi ile yaptıkları çalışmada *H. pylori* ile enfekte hastalarda bakteri yoğunluğu açısından *cagA* pozitif ve negatif suşlar arasında anlamlı düzeyde farklılık saptanmamıştır (163).

Çalışmamızda histopatolojik bulgularımıza göre MNH skor değeri, PNL skor değerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. Böylece *H. pylori* enfeksiyonu pozitif bulunan hastalarımızda mononükleer inflamatuvar hücrelerin polimorfonükleer hücrelere göre baskın olarak görüldüğü ve hastaların kronik bir enfeksiyon döneminde olduğu saptandı. *H. pylori* enfeksiyonunda yüksek seviyede mononükleer hücre infiltrasyonu ile DNA metilasyonu ve gastrik kanser gelişme riski arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Mononükleer hücrelerin kronik inflamasyon oluşturması ile anormal DNA metilasyonuna yol açabileceği bildirilmiştir (164).

RT RT-PCR çalışmamızda *H. pylori* enfeksiyonu patogenezinde *ureA* geninin rolü olup olmadığını araştırmak için gen ekspresyon düzeyinin hastaların endoskopik, ayrıca

histopatolojik bulgularına göre (PNL, MNH ve HLO düzeyleri) dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, *H. pylori* üreaz α subünitesini kodlayan *ureA* geninin ekspresyonu ile endoskopik veya histopatolojik bulgular arasında herhangi bir ilişki bulunmadı. Ayrıca *ureA* geninin rölatif ekspresyon düzeyi korpusta, antruma göre daha yüksek saptanmasına rağmen arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Antrum ve korpus arasında HLO düzeyinde belirgin bir farklılık saptanmadığından ve *ureA* geninin normalize edilmiş ekspresyon düzeyi antrum ve korpus arasında değerlendirildiği için korpusta *ureA* gen ekspresyonunun artması ile *H. pylori*'nin asidik ortama uyum sağladığı düşünüldü. *H. pylori* üreaz enzimi bakteri kolonizasyonunda önemli bir faktör olmasına rağmen enzim aktivitesi ile açığa çıkan amonyum gastrik epitel hücrelerine toksik etki göstermekle beraber bu enzimin A ve B subünitesi bir adezin olarak MHC II ve CD74'e bağlanarak sırasıyla apoptozu ve IL-8 salınımını indüklediği bildirilmiştir (63,67). Merrell ve ark.'nın *in vitro* çalışmasında asidik ortamda *ureA* ve *ureB* gen ekspresyon artışı gözlendiği bildirilmiştir (112). Scott ve ark.'nın gerbil hayvan modelli çalışmalarında da asidik ortamda *ureA*, *ureB* ve *cagA* gen ekspresyonlarının upregülasyonu gösterilmiştir (120). Lee ve ark. *H. pylori* üreaz enzimi aktivitesini etkileyen *amiE* geninin ekspresyonunu hastaların antrum ve korpus gastrik biyopsi örneklerinde incelemişlerdir. Gen ekspresyon düzeyi korpusta, antruma göre anlamlı düzeyde 1.5 kat daha fazla saptanmıştır. Gen ekspresyonunun korpusta düşük pH seviyesinden etkilendiği açıklanmıştır. Antrumda üreaz enzimi aktivitesi ile bakteri yoğunluğu arasında korelasyon bildirilmiştir (93). Araştırmamızda elde edilen bulgular literatürdeki çalışmalar ile kısmen uyum içindedir. Ancak korpusta görülen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Bulgularımıza göre *H. pylori*'nin farklı kültür besiyerlerinde subkültüründen elde edilen Ct değerleri (gen transkriptleri) birbirinden farklılık gösterdi. Bu farklılıkların başlangıç bakteri yoğunluğu, kültür besiyerinde farklı suplementlerin (çözünebilir hemoglobin ya da defibrine at kanı) kullanılması veya bakterinin üreme fazı dönemlerinden kaynaklandığ ve *H. pylori*'nin üreme fazındaki dönemlere bağlı olarak gen ekspresyonunda değişiklikler bildirilmiştir. *in vitro* şartlarda *H. pylori*'nin logaritmik üreme fazından duraklama fazına geçişinde birçok gen ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (30).

RT RT-PCR testinde kullanılan primerlerin *H. pylori* genlerine spesifik olup olmadığını araştırmak için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılır. Bu analizde çift sarmallı cDNA'nın sıcaklığı artırılarak floresan sinyalin sıcaklığına bağlı olarak grafikler oluşturulup primer-dimer'lerden kaynaklanan ve spesifik olmayan sinyaller tespit edilir (61,140).

Çalışmamızda ise TaqMan hidroliz probları kullanıldığından amplifikasyon sırasında bu probların cDNA'lardan ayrıldığı için erime eğrisi analizi yapılamadı. Bu yüzden geliştirdiğimiz RT RT-PCR testinin güvenirliliğini ve geçerliliğini değerlendirmek için randomize olarak seçilen gastrik biyopsi örneklerinde RT RT-PCR testi tekrarlanarak pozitif ve negatif kontrol suşlar ile standardizasyon çalışmaları yapıldı. Sonuçta CV değeri %1.70 elde edildi. Bu değer <%10 olduğu için iyi sonuç olarak değerlendirildi (165).

RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *ureA* house-keeping geninin Ct değerleri 16S rRNA genine kıyasla daha düşük (*ureA* mRNA transkriptleri daha fazla) saptandı. *H. pylori* gen ekspresyonunun saptanmasında RT RT-PCR testinin saptayabileceği en düşük bakteriyal cDNA dilüsyonu araştırıldı, *ureA* house-keeping geninin analitik duyarlılığı 16S rRNA house-keeping genine kıyasla 100 kat daha yüksek saptandı. Lazaro ve ark.'nın rölatif RT RT-PCR deneylerinde hedef genin ekspresyon düzeyinin saptanmasında referans house-keeping genleri kullanılarak genin normalizasyonu yapılmıştır. House-keeping genin özellikle eksperimental çalışmalarda ekspresyonunun daha stabil olması gerektiği bildirilmiştir (61,165).

Araştırmamızda daha güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için birden fazla house-keeping geni kullanıldı.16S rRNA ve *ureA* house-keeping genleri dışında herhangi bir internal kontrol (IC) kullanılmadı. Araştırdığımız *H. pylori* genlerinde sadece *omp18* geninin tüm hastalarda ekprese edildiği için *H. pylori* gen ekspresyon çalışmamızda bu genin internal kontrol olarak kullanılabileceği gösterildi. *omp18* geninin ekspresyon görülme sıklığı ile ilgili istatistiksel analiz yapılamadı. Ayrıca bu genin ekspresyon düzeyi ile hastaların endoskopik veya histopatoloji bulguları arasında herhangi bir ilişki saptanmadı. *H. pylori* Omp18 dış membran proteini düşük moleküler ağırlığında peptidoglikan ile ilişkili lipoprotein prekürsörü olarak *omp18* (HP1125) geni tarafından kodlanır ve tüm *H. pylori* suşları tarafından eksprese edilir. Omp18 proteini dendritik hücrelerinden IL-12 salınımını indükleyerek inflamatuvar yanıtları oluşturur (15,75,73). Omp18 dış membran proteinin güçlü bir antijen olduğu ve interferon gamma (IFN-γ)'nın üretimini indüklediği bildirilmiştir. Bu proteinin interferon gammanın modülayonu ile enfekte hastalarda persistan enfeksiyona yol açabileceği bildirilmektedir (81).

Araştırmamızda hastaların gastrik biyopsi örneklerinde *cagA, omp6, omp13, omp18,* 16S rRNA ve *ureA* genlerinin Ct değerleri *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun subkültüründen elde edilen Ct değerlerine göre daha yüksek saptandı. Diğer bir deyişle gen

veya mRNA transkriptleri hastaların gastrik biyopsi örneklerinde,standart bakteri suşlarının kültüründe bulunan gen transkriptlerine kıyasla daha az saptandı. Boonjakuakul ve ark.'nın qRT RT-PCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada *in vivo* şartlarda hastaların gastrik biyopsi örneklerinde, aynı zamanda *in vitro* şartlarda kültürde üreyen *H. pylori* suşlarında birçok virülans geninin ekspresyonu araştırılmıştır. *H. pylori* gen ekspresyon düzeyleri *in vitro* şartlarda *in vivo* şartlara göre daha yüksek saptanmıştır. Gastrik ortamda bakteri üremesinin duraklama fazında olduğu düşünülerek gen ekspresyon düzeyinin düşük seviyelerde saptandığı bildirilmiştir (29). RT RT-PCR çalışmamızda hastaların gastrik biyopsi örneklerinde bakteri sayısının belirlenmediği ve kürtürdeki bakteri sayısı ile eşitleme yapılamadığı için *in vivo* ve *in vitro* sonuçları Ct değerleri açısından birbiriyle karşılaştırılamadı.

RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *ureA* ve 16S rRNA house-keeping genleri kullanıldığından ve bu genlerin ekspresyonu ile hastaların gastrik biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin saptanmasında bu testin aynı zamanda bir tanı yöntemi olarak kullanılabileceği kanısına varıldı. RT RT-PCR test sonuçları HÜT, kültür ve histopatoloji sonuçları ile karşılaştırılarak performansı değerlendirildi. Bu yöntemin tanısal duyarlılığı oldukça yüksek (%100'e varan) ve özgüllüğü %40-60 arasında saptandı. RT RT-PCR bulguları ile HÜT, histopatoloji ve kültür bulguları arasında uyumluluk değerlendirildiğinde, RT RT-PCR sonuçlarının sadece kültür sonuçları ile uyumlu olduğu saptandı. Bir çok çalışmada *H. pylori* gen transkriptlerinin saptanmasında real-time PCR yönteminin daha duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Özgül primerler ile üniversal TaqMan probların birlikte kullanıldığında yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuçların elde edildiği bildirilmiştir (34,137).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1- Ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun araştırılmasında kullanılan RT RT-PCR testinin geliştirilmesi ile bu testin *H. pylori* gen ekspresyonunun saptanmasında kullanılabileceği gösterildi.

2- RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori omp13* geninin ekspresyon düzeyinin gastrik ülser/erozyon ve eroziv gastritli hastalarda, non-eroziv gastritli hastalara göre daha düşük saptandığı klinik açıdan önemli olabileceği düşünüldü.

3- RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori omp6* ve *omp13* geninin ekspresyon düzeylerinin korpusta, antruma göre daha yüksek saptandığı klinik açıdan önem taşıyabileceği düşünüldü.

4- RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmamızda *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18*, *omp20*, 16S rRNA ve *ureA* genlerinde ortalama Ct değerleri antrumda, korpusa göre daha düşük saptandı. Gastrik biyopsi örneklerinde ortalama Ct değerlerinin *H. pylori* NCTC 11637 standart suşunun subkültüründeki değerlere göre daha yüksek bulundu.

5- *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18* ve *omp20* gen ekspresyon görülme sıklığı ve düzeyleri pan-gastritli hastalarda, antral gastritli hastalara göre daha yüksek saptanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

6- *H. pylori* enfeksiyonu ile polimorfonükleer lökosit (PNL), mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu ve HLO düzeyleri arasında anlamlı düzeyde ilişki saptanırken, intestinal metaplazi (İM) arasında ilişki bulunmadı.

7- *H. pylori*'nin gastrik biyopsi örneklerinde saptanmasında RT RT-PCR yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %94.0 ve %60.0 olarak saptandı. TaqMan prob RT RT-PCR testin güvenilir bir yöntem olarak *H. pylori* enfeksiyonu patogenezi ile ilgili gen ekspresyon çalışmalarında kullanılabileceği gösterildi.

8- RT RT-PCR gen ekspresyon çalışımaları sonucunda *H. pylori* enfeksiyonlu hastalarımızda *cagA* geni ayrıca dış membran proteinlerinden *omp6, omp13, omp18*, *omp20* gen ekspresyon görülme sıklıklarının ve düzeylerinin hastaların klinik sonuçları üzerinde istatistiksel olarak belirgin bir etkisi olmadığı gösterildi.

9- Gen ekspresyon çalışmalarında daha fazla hasta sayısı ile çalışılması ve daha ileri moleküler yöntemlerinin de yer alması önerildi.

10- *H. pylori cagA, omp6, omp13, omp18*, *omp20*, 16S rRNA ve *ureA* gen ekspresyonlarının antrum ve korpus bölgelerine göre farklılık gösterdiği için *H. pylori* enfeksiyonu patogenezi ile ilgili gen ekspresyon çalışmalarında antrum ayrı korpus ayrı olarak çalışılması gerektiği belirtildi.

11- Araştırmamızda *omp18* geni tüm hastalarda ekprese olduğu için RT RT-PCR gen ekspresyon çalışmalarında internal kontrol (IC) olarak kullanılabileceği gösterildi.

12- Gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori*'nin kültürü ve izolasyonunda *H. pylori* suşlarının selektif suplementte bulunan antibiyotiklere duyarlı olabileceği için antibiyotik suplement (DENT) içeren besiyerinin yanında antibiyotik suplement (DENT) içermeyen, aynı zamanda *H. pylori*'nin kültürde idantifikasyonunu kolaylaştırmak için TTC'li indikatör besiyerinin kullanılması önerildi.

13- *H. pylori* klinik suşlarının izole edilmesinde %7 defibrine at kanlı *H. pylori* selektif DENT suplement içeren Columbia Blood agar besiyerine alternatif olarak aynı oranda bakteri izolasyonu sağlayan diğer besiyerlerinin (kan içermeyen aktif kömür, TTC ve çözünebilir hemoglobin suplementli besiyerleri) kullanılabileceği gösterildi.

7. KAYNAKLAR

1. Solnick JV, O'rourke JL, Vandamme P, Lee A. The genus *Helicobacter.* Prokaryotes 2006; 7: 139-177.

2. Fletcher N. Two Australians win the 2005 Nobel prize in physiology or medicine. Aust Acad Sci Newsletter 2005; 63: 1-12.

3. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 280-322.

4. Ražuka-Ebela D, Giupponi B, Franceschi F. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. Helicobacter. 2018; 23(Suppl. 1): e12520. https://doi.org/10.1111/hel.12520.

5. Malfertheiner P, Mégraud F, O 'Morain CA, Gisbert JP et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht V/Florence Consensus Report. Gut 2017; 66: 6-30. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312288.

6. Sgouros SN, Bergele C. Clinical outcome of patients with *Helicobacter pylori* infection: the bug, the host, or the environment? Postgrad Med J 2006; 82: 338-342.

7. Yücel T, Aygin D, Şen S, Yücel O. The prevalence of *Helicobacter pylori* and related factors amoung university students in Turkey. Jpn J Infect Dis 2008; 61: 179-183.

8. Yılmaz Ö, Şen N, Küpelioğlu AA, Şimşek İ. Detection of *H pylori* infection by ELISA and Western blot techniques and evaluation of anti CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients. World J Gastroenterol 2006; 12: 5375-5378.

9. Kusters JG, Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 449-490. doi:10.1128/CMR.00054-05.

10. Aydın F, Kaklıkkaya N, Özgür O, Çubukçu K et al. Distribution of *vacA* alleles and *cagA* status of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease and non-ulcer dyspepsia. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 1102-1104.

11. Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. Gastroenterol Res Pract 2012; 2012: 1-9.

12. Maeda S, Mentis AF. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2007; 12 (Suppl.1): 10-14.

13. Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. Gut 2006; 55: 775-781.

14. Shao SH, Wang H, Chai SG, Liu LM. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. World J Gastroenterol 2005; 11: 3011-3013.

15. Carlsohn E, Nystrom J, Karlsson H, Svennerholm AM et al. Characterization of the outer membrane protein profile from disease-related *Helicobacter pylori* isolates by subcellular fractionation and Nano-LCFT-ICRMS analysis. J Proteome Res 2006; 5: 3197-3204.

16. Israel DA, Salama N, Krishna U, Rieger UM et al. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 14625-14630.

17. Cooke CL, Hu JL, Solnick JV. The role of genome diversity and immune evasion in persistent infection with *Helicobacter pylori.* FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45: 11-23.

18. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest 2001; 107: 767-773.

19. Piazuelo MB, Correa P. Gastric cancer: Overview. Colomb Med 2013; 44(3): 192-201.

20. Peek RM, JR. Events at the host- microbial interface of the gastrointestinal tract IV. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* persistence. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 289: G8-G12.

21.Yamaoka Y. Increasing evidence of the role of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. J Infect Developing Countries 2008; 2: 174-181.

22. Baik SC, Kim KM, Song SM, Kim DS et al. Proteomic analysis of the sarcosine insoluble outer membrane fraction of *Helicobacter pylori* strain 26695. J Bacteriol 2004; 186: 949-955.

23. Govorun VM, Moshkovskii SA, Tikhonova, Goufman EI et al. Comparative analysis of proteome maps of *Helicobacter pylori* clinical isolates. Biochemistry 2003; 68: 42-49.

24. Ruzsovics A, Molnar B, Tulassay Z. Review article: deoxyribonucleic acid-based diagnostic techniques to detect *Helicobacter pylori.* Aliment Pharmacol Ther 2004; 19: 1137-1146.

25. Ramirez-Lazaro MJ, Lario S, Casalots A, Sanfeliu E et al. Real-time PCR improves *Helicobacter pylori* detection in patients with peptic ulcer bleeding. PLoS ONE 2011; 6: 1-7.

26. Liu H, Rahman A, Semino-Mora C, Doi SQ et al. Specific and sensitive detection of *Helicobacter pylori* in biological specimens by real-time RT-PCR and *in situ* hybridization. PLoS ONE 2008; 3: 1-7.

27. Kumar A, Imran M, Kumar Singh A, Chandel D et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal diseases by real-time PCR. J Biomed Sci Res 2010; 2: 170-178.

28. Peek RM Jr, van Doorn LJ, Donahue JP, Tham KT et al. Quantitative detection of *Helicobacter pylori* gene expression *in vivo* and relationship to gastric pathology. Infect Immun 2000; 68(10): 5488-5495.

29. Boonjakuakul JK, Syvanen M, Suryaprasad A, Bowlus CL et al. Transcription profile of *Helicobacter pylori* in the human stomach reflects its physiology *in vivo*. J Infect Dis 2004; 190: 946-956.

30. Boonjakuakul JK, Canfield DR, Solnick JV. Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression *in vitro* and in the Rhesus Macaque. Infect Immun 2005; 73 (8): 4895-4904.

31. Garza-Gonzalez E, Bocanegra-Garcia V, Bosques-Padilla FJ, Flores-Gutiérrez JP et al. mRNA levels of TLR4 and TLR5 are independent of *Helicobacter pylori.* World J Gastroenterol 2008; 14: 5306-5310.

32. Wen S, Felley CP, Bouzourene H, Reimers M et al. Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. J Immunol 2004; 172: 2595-2606.

33. Mannick EE, Schurr JR, Zapata A, Lentz JJ et al. Gene expression in gastric biopsies from patients infected with *Helicobacter pylori.* Scand J Gastroenterol 2004; 39: 1192-1200.

34. Gieseler S, König B, König W, Backert S. Strain-specific expression profiles of virulence genes in *Helicobacter pylori* during infection of gastric epithelial cells and granulocytes. Microb Infect 2005; 7: 437-447.

35. Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK et al. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 2106-2111.

36. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of *hopH* gene polymorphisms. J Infect Dis 2006; 194: 1346-1355.

37. Skoog EC, Sjoling A, Navabi N, Holgersson J et al. Human gastric mucins differently regulate *Helicobacter pylori* proliferation, gene expression and interactions with host cells. PLoS ONE 2012; 7: 1-17.

38. Aviles-Jimenez F, Reyes-Leon A, Nieto-Patlan E, Hansen LM et al. *In vivo* expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in patients with gastritis, ulcer and gastric cancer. Infect Immun 2011; 10: 1-37.

39. Caner V, Yılmaz M, Yönetci N, Zencir S et al. *H pylori iceA* alleles are disease-specific virulence factors. World J Gastroenterol 2007; 13: 2581-2585.

40. Sarıbaşak H, Salih BA, Yamaoka Y, Sander E. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. J Clin Microbiol 2004; 42: 1648-1651.

41. Saltık I, Demir H, Engin D, Ertunç ÖD et al. The *cagA* status of *Helicobacter pylori* isolates from dyspeptic children in Turkey. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 36: 147-149.

42. Salih BA, Abasıyanık MF, Ahmed N. A preliminary study on the genetic profile of *cag pathogenicity-island* and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey. Infect Genet Evol 2007; 7: 509-512.

43. Günther D, Günther T, Pavilonis A, Kupčinskas L. What Bizzozero never could imagine-*Helicobacter pylori* today and tomorrow. Medicina 2003; 39: 542-549.

44. Marshall BJ. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): American Society for Microbiology (ASM) Press 2001; Chapter 3. http://www.helico.com/sites/default/files/publications/B28.pdf.

45. Meuler DA. *Helicobacter pylori* and the bacterial theory of ulcers. *National Center for Case Study Teaching in Science* (NCCSTS) 2011; 1-7.

46. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html.

47. Andersen LP, Wadström T. Basic Bacteriology and Culture. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): American Society for Microbiology (ASM) Press; 2001; Chapter 4. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2444.

48. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori.* Nature 1997; 388: 539-547.

49. Jagadish CD, Nibedita P. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* in children. Indian J Pediatr 2007; 74: 287-290.

50. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005; 43: 93-100.

51. Adams BL, Bates TC, Oliver JD. Survival of *Helicobacter pylori* in a natural fresh water environment. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 7462-7466.

52. Kusano K, Inokuchi A, Fujimoto K, Miyamoto H et al. Coccoid *Helicobacter pylori* exists in the palatine tonsils of patients with IgA nephropathy. J Gastroenterol 2010; 45: 406-412.

53. Baker KH, Hegarty JP, Redmond B, Reed NA et al. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori.* Appl Environ Microbiol 2002; 68: 981-984.

54. Cole SP, Harwood J, Lee R, She R et al. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori.* J Bacteriol 2004; 186: 3124-3132.

55. Andersen LP, Dorland A, Karacan H, Colding H et al. Possible clinical importance of the transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid form. Scand J Gastroenterol 2000; 35: 897-903.

56. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin APS et al. The European *Helicobacter pylori* Study Group. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 167-180.

57. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Bazzoli F et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht III Consensus Report. Gut 2007; 56:772–781. doi: 10.1136/gutjnl-2006-101634.

58. Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain CA, Atherton J et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut 2012; 61: 646-664. doi:10.1136/gutjnl-2012-302084.

59. Krogfelt KA, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2005; 10 (Suppl. 1): 5-13.

60. Redeen S, Petersson F, Tornkrantz E, Levander H et al. Reliability of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol Res Pract 2011; 2011: 1-6.

61. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR, Overview and principles. Current Protocols Essential Laboratory Techniques 10.3.1-10.3.33. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Inc. http://www.oardc.ohiostate.edu/mcic/documents/Current Protocols Real-time%20PCR.pdf.

62. Matsuda M, Noda Y, Takemor Y. Utility and limitations of a method for detecting *Helicobacter pylori*-specific antigens in the stool. J Gastroenterol 2003; 38: 222-228.

63. Papamichael K, Mantzaris GJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection: colonization, virulence factors of the bacterium and immune and non-immune host response. Hospital Chronicles 2012; 7(1): 32-37.

64. Amsterdam K, Ende A. Nutrients released by gastric epithelial cells enhance *Helicobacter pylori* growth. Helicobacter 2004; 9: 614-621.

65. Delahay RM, Rugge M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2012; 17(Suppl. 1): 9-15.

66. Sycuro LK, Wyckoff TJ, Biboy J, Born P et al. Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori*'s cell shape, motility and colonization potential. PLos Pathog 2012; 8: e1002603.

67. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. World J Gastroenterol 2006; 12: 5599-5605.

68. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. Annu Rev Pathol Mech Dis 2006; 1: 63-96.

69. Terradot L, Waksman G. Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. FEBS J 2011; 278: 1213-1222.

70. Panayotopoulou EG, Sgouras DN, Papadakos K, Kalliaropoulos A et al. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Clin Microbiol 2007; 45: 488-495.

71. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham D et al. Variants of the 3' region of the cagA gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *Helicobacter pylori*-associated diseases. J Clin Microbiol 1998; 36: 2258-2263.

72. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010; 7: 629-641.

73. Peek RM, Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori* induced gastric malignancy. Physiol Rev 2010; 90: 831-858.

74. Holton J, Figura N, Vaira B. *Helicobacter pylori.* An atlas of investigation and management. Section 1. Discovery, metabolism, genome and taxonomy. Page 1-22. ©Atlas Medical Publishing Ltd 2012. http://www.clinicalpublishing.co.uk.

75. Rathinavelu S, Kao JY, Zavros Y, Merchant JL. *Helicobacter pylori* outer membrane protein 18 (Hp1125) induces dendritic cell maturation and function. Helicobacter 2005; 10: 424-432.

76. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori.* Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 7533-7538.

77. Odenbreit S, Kavermann H, Puls J, Haas R. CagA tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from AlpAB, HopZ and Bab group outer membrane proteins. Int J Med Microbiol 2002; 292: 257-266.

78. Vries N, Duinsbergen D, Kuipers EJ, Pot RGJ. Transcriptional phase variation of a type III restriction-modification system in *Helicobacter pylori.* J Bacteriol 2002; 184: 6615-6623.

79. Kudo T, Nurgalieva ZZ, Conner ME, Crawford S et al. Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and *oipA* gene switch status. J Clin Microbiol 2004; 42: 2279-2281.

80. Voland P, Weeks DL, Vaira D, Prinz C et al. Specific identification of three low molecular weight membrane-associated antigens of *Helicobacter pylori.* Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 533-544.

81. Shan Y, Lu X, Han Y, Li X et al. *Helicobacter pylori* outer membrane protein 18 (Hp1125) is involved in persistent colonization by evading interferon-gama. Bio Med Research International 2015: 1-12.

82. Matsuo Y, Kido Y,Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis.Toxins 2017**;** 9 (3)**:** 101. doi: 10.3390/toxins9030101.

83. Gonzalez-Lopez MA, Olivares-Trejo JJ. The gene frpB2 of *Helicobacter pylori* encodes an hemoglobin-binding protein involved in iron acquisition. Biometals 2009; 22(6): 889-894.

84. Cooksley C, Jenks PJ, Green A, Cockayne A et al. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stres damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. J Med Microbiol 2003; 52: 461-469.

85. Waskito LA, Salama NR, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 2018; 23(Suppl. 1): e12516. https://doi.org/10.1111/hel.12516.

86. Hathroubi S, Servetas SL, Windham I, Merrell DS et al. Review article: *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2018; 2(82): e00001-18.

87. Sheikhian A, Hassan ZM, Mustafaie A, Shokri F et al. Extraction of the outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* and evaluation of their presence in stool of the infected individuals. Iran Biomed J 2004; 8: 83-88.

88. Yu-Lin Su, Hsiang-Ling Huang, Bo-Shih Huang, Po-Chung Chen et al. Combination of OipA, BabA, and SabA as candidate biomarkers for predicting *Helicobacter pylori* related gastric cancer. Sci Rep-UK 2016; 6:36442. http://www. nature.com/ scientificreports.

89.Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. Cell Microbiol 2008; 10(4): 1008-1020.

90. Jafarzadeh A, Rezayati MT, Nemati M. Specific serum immunoglobulin G to *Helicobacter pylori* and CagA in healthy children and adults (south-east of Iran). World J Gastroenterol 2007; 13: 3117-3121.

91. Jonge R, Durrani Z, Rijpkema SG, Kuipers E et al. Role of the *Helicobacter pylori* outer-membrane proteins AlpA and AlpB in colonization of the guinea pig stomach. J Med Microbiol 2004; 53: 375-379.

92. Bergman MP, Engering A, Smits HH, Van Vliet SJ et al. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T Helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. J Exp Med 2004; 200: 979-990.

93. Lee HK, Kim H, Chae HS, Choi SS et al. Differences of urease activity and expression of associated genes according to gastric topography. Helicobacter 2011; 16: 20-26.

94. Yakoob J, Fan X, Hu G, Zhang Z. Genetic and phenotype changes following *in vitro* interactions between *Helicobacter pylori* strains. J Gastroenterol Hepatol 2004; 19: 626-631.

95. Thyagarajan SP, Ray P, Kumar Das B, Ayyagari A et al. Geographical difference in antimicrobial resistance pattern of *Helicobacter pylori* clinical isolates from Indian patients: Multicentric study. J Gastroenterol Hepatol 2003; 18: 1373-1378.

96. Andrew Pena J, Fox JG, Ferraro MJ, Versalovic J. Molecular resistance testing of *Helicobacter pylori i*n gastric biopsies. Arch Pathol Lab Med 2001; 125: 493-497.

97. Gerrits MM, van Vliet AHM, Kuipers E, Kusters JG. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: Molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006; 6: 699-709.

98. Yamaoka Y, Kikuchi S, EI-Zimaity HMT, Gutierrez O et al. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. Gastroenterol 2002; 123: 414-424.

99. Voland P, Hafsi N, Zeitner M, Laforsch S et al. Antigenic properties of HpaA and Omp18, two outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. Infect Immun 2003; 71: 3837-3843.

100. Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and diseases associated with *Helicobacter pylori* by *Helicobacter pylori* outer membrane proteins. World J Gastroenterol 2004; 10: 3464-3469.

101. Lai CH, Kuo CH, Chen PY, Poon SK et al. Association of antibiotic resistance and higher internalization activity in resistant *Helicobacter pylori* isolates. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 466-471.

102. Godoy AP, Ribeiro ML, Benvengo YH, Vitiello L et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol 2003; 3: 1-6.

103. Hartland S, Newton JL, Griffin M, Donaldson P. A functional polymorphism in the interleukin-1 receptor-1 gene is associated with increased risk of *Helicobacter pylori* infection but not with gastric cancer. Dig Dis Sci 2004; 49: 1545-1550.

104. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S et al. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, dupA in China. BMC Gastroenterol 2008; 8: 1-6.

105. Bazargani A, Ekrami AR, Bassiri E, Saber Firoozi M. Frequency of CagA in *Helicobacter pylori* isolates of patients with peptic ulcer diseases (PUD) and non-ulcer dyspepsia (NUD) at Namazi Hospital, Shiraz, Iran. Govaresh 2005; 10: 116-119.

106. Nguyen T, Uchida T, Tsukamoto Y, Trinh DT et al. *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross sectional, hospital-based study. BMC Gastroenterol 2010; 10: 1-7.

107. Queiroz DMM, Aguiar Rocha G, Oliveira CA, Camargos Rocha AM et al. Role of corpus gastritis and cagA-positive *Helicobacter pylori* infection in reflux esophagitis. J Clin Microbiol 2002; 40: 2849-2853.

108. Dabiri H, Jafari F, Baghaei K, Shokrzadeh L et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *oipA*, *iceA*, *babA2* and *babB* genotypes in Iranian dyspeptic patients. Microb Pathogenesis 2017; 105: 226-230.

109. Serin E, Yılmaz U, Künefeci G, Özer B et al. Serum positive *cagA* in patients with non-ulcer dyspepsia and peptic ulcer disease from two centers in different regions of Turkey. World J Gastroenterol 2003; 9: 833-835.

110. Tiftikçi A, Çiçek B, Eser Vardareli N, Saruç M et al. *Helicobacter pylori'*nin midede yerleşim yeri. ACU Sağlık Bil Derg 2010; 1: 159-161.

111. Saruç M, Göksel G, Özkaya S, Güçlü F et al. The effect of CagA status on response to *Helicobacter pylori* eradication therapy in western Turkey. Braz J Med Biol Res 2001; 34: 1435-1439.

112. Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, Tompkins LS et al. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori.* Infect Immun 2003; 71: 3529-3539.

113. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Scott DR. The gastric biology of *Helicobacter pylori.* Annu Rev Physiol 2003; 65: 349-369.

114. Chen DS, Huang AL, Tao XH, Wang PL et al. Cloning and sequence analysis of gene *oipA* encoding an outer membrane protein of human *Helicobacter pylori.* World J Gastroenterol 2004; 10: 3205-3207.

115. Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM et al. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. J Clin Microbiol 2002; 40: 239-246.

116. Kato S, Matsukura N, Togashi A, Masuda G et al. Sex differences in mucosal response to *Helicobacter pylori* infection in the stomach and variations in interleukin-8, COX-2 and trefoil factor family 1 gene expression. Aliment Pharmacol Ther 2004; 20 (Suppl. 1): 17-24.

117. Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI et al. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. J Clin Microbiol 1995; 33(1): 28-32.

118. Park SM, Park J, Kim JG, Cho HD et al. Infection with *Helicobacter pylori* expressing the *cagA* gene is not associated with an increased risk of developing peptic ulcer diseases in Korean patients. Scand J Gastroenterol 1998; 33: 923-927.

119. Ruzsovics A, Molnar B, Unger Z, Tulassay Z et al. Determination of *Helicobacter pylori cagA*, *vacA* genotypes with real-time PCR melting curve analysis. J Physiol 2001; 95: 369-377.

120. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Oh J et al. Gene expression *in vivo* shows that *Helicobacter pylori* colonize an acidic niche on the gastric surface. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 7235-7240.

121. Debraekeleer A, Remaut H. Future perspective for potential *Helicobacter pylori* eradication therapies. Future Microbiol 2018; 13(6): 671-687. www.futuremedicine.com.

122. Güvenir M. *Helicobacter pylori* CagA EPIYA motifleri ile klaritromisin direnci, gastropatolojik ve klinik ilişkinin araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 2010: 1-89.

123. Roosendaal R, Kuipers EJ, Van Den Brule AJC, Salvador Pena A et al. Importance of the fiberoptic endoscope cleaning procedure for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 1123-1126.

124. McNulty CA, Wyatt JI. ACP. Best practice No.154 Feb.1999. *Helicobacter pylori.* J Clin Pathol 1999; 52: 338-344.

125. Chomvarin C, Kulsantiwong P, Chantarasuk Y, Chantrakooptungool S et al. Comparison of media and antibiotic supplements for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. SAJTMPH 2006; 37: 1163-1169.

126. Sodium phosphate buffer preparation. Protocol online. http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/36978.html

127. Davoudi Oskouei D, Bekmen N, Ellidokuz H, Yılmaz Ö. Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in stock culture media. Braz J Microbiol 2010; 41: 1-9.

128. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJG, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: Review of microbiologic methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003; 36: 616-622.

129. Boyanova L, Koumanova R, Lazarova E, Lelev C. *Helicobacter pylori* and *Helicobacter heilmannii* in children. A Bulgarian study. Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 46: 249-252.

130. Baron EJ, Finegold SM. Bailey &Scott's Diagnostic Microbiology. 8th edition. United States of America, C.V. Mosby Company, 1990;A-43.

131. Queiroz DMM, Mendes E, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 1987; 25: 2378-2379.

132. Shibayama K, Nagasawa M, Ando T, Minami M et al. Usefulness of adult bovine serum for *Helicobacter pylori* culture media. J Clin Microbiol 2006; 44: 4255-4257.

133. Taneera J, Moran AP, Hynes SO, Nilsson HO et al. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and β-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. Microbiol 2002; 148 (Pt 3): 677-684.

134. Paik IK, Kim YS, Shin WC, Lee JH. Comparison of selective media for culture of *Helicobacter pylori.* Korean J Clin Microbiol 2001; 4: 11-15.

135. Smith AC, Hussey MA. Gram Stain Protocols. American Society for Microbiology, ASM MicrobeLibrary 2012. http://www.microbelibrary. org/component/resource/gram-stain/2886-gram-stain protocols

136. Collee JG, Miles RS.Tests for identification of bacteria. In: Collee JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP, editors. Mackie and McCartney Practical medical microbiology. Thirteenth ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989. p. 152-154.

137. Monno R, Giorgio F, Carmine P, Soleo L et al. *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance detected by E-test and TaqMan real-time polymerase chain reaction: a comparative study. APMIS 2012; 120: 712-717.

138. Rüssmann H, Adler K, Hass R, Gebert B et al. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent *in situ* hybridization. J Clin Microbiol 2001; 11: 4142-4144.

139. Stolte M, Meining A. The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment. Can J Gastroenterol 2001; 15: 591-598.

140. Custom design real-time PCR gene expression. Roche Applied Science. http://www.roche-applied-science.com

141. TriPure Isolation Reagent. Nucleic Acid Isolation and Purification Manual. Roche Applied Science. http:// www.roche-applied-science.com

142. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit Protocol. Version 6.0, August 2006. Roche Applied Science. http://www.roche-applied-science.com

143. Xia M, Sherlock J, Hegerich P, You X et al. DataAssist™ – Data analysis software for TaqMan real-time PCR data. Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists (IMECS) 2010 Vol I, March 17-19, Hong Kong.

144. Oskouei DD, Bekmen N, Demiray E, Soytürk M, Sarıoğlu S, Yılmaz Ö. Comparison of different blood supplements in culture media for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P117. Helicobacter 2008; 10: 456.

145. Davoudi Oskouei D, Doğan Y, Bekmen N, Yalçin M, Sağol Ö, Ellidokuz H, Soytürk M, Şimşek İ, Yılmaz Ö. A novel convenient culture medium for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd

International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.18. Helicobacter 2010; 15: 364.

146. Davoudi Oskouei D, Doğan Y, Bengi G, Sağol Ö, Soytürk M, Akpınar H, Şimşek İ, Yılmaz Ö. Indicator medium for culture and identification of *Helicobacter pylori* colonies isolated from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.11. Helicobacter 2010; 15: 361.

147. Dogan Y, Davoudi Oskouei D, Binicier Ö, Demiray Gürbüz e, Soytürk M, Ellidokuz H, Akpınar H, Şimşek İ, Yılmaz Ö. Is antibiotic supplemented culture medium inhibits recovery of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens? European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.13. Helicobacter 2010; 15: 362.

148. Farzi N, Malekian T, Alebouyeh M, Vaziri F et al. Genotype diversity and quasispecies development of *Helicobacter pylori* in a single host. Jpn J Infect Dis 2015; 68:176-180.

149. Horridge DN, Begley AA, Kim J, Aravindan N et al. Outer inflammatory protein a (OipA) of *Helicobacter pylori* is regulated by host cell contact and mediates CagA translocation and interleukin-8 response only in the presence of a functional *cag* pathogenicity island type IV secretion system. Pathog Dis 2017; 75(8): 1-11. doi: 10.1093/femspd/ftx113.

150. Moayyedi P, Wason C, Peacock R, Walan A. Changing patterns of *Helicobacter pylori* gastritis in long-standing acid suppression. Helicobacter 2000; 5: 206-214.

151. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. J Clin Invest 2009; 119: 2475-248.

152. Yamaoka Y, El-Zimaity HMT, Malaty HM, Osato MS et al. *Helicobacter pylori* virulence factors and the pattern of gastritis: *oipA, vacA, and cagA* tyrosine phosphorylation motifs EPIYA. Gut 2002; 51 (Suppl.2): 1-3.

153. Sepulveda A, Peterson LE, Shelton J, Gutierrez O et al. Histological patterns of gastritis in *Helicobacter pylori*-infected individuals with a family history of gastric cancer. Am J Gastroenterol 2002; 97(6): 1365-70.

154. Seo JH, Park HK, Park JS, Yeom JS et al. Association between gastric pH and *Helicobacter pylori* infection in children. Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr 2015; 18(4): 246-252. http://dx.doi.org/10.5223/pghn.2015.18.4.246.

155. Hong SJ, Kim SW. *Helicobacter pylori* infection in gastroesophageal reflux disease in the Asian countries. Gastroent Res Pract 2015; http://dx.doi.org/ 10.1155/ 2015/985249.

156. Kim N, Marcus EA, Wen Y, Weeks DL et al. Genes of *Helicobacter pylori* regulated by attachment to AGS cells. Infect Immun 2004; 72: 2358-2368.

157. Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P et al. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. Infect Immun 2000; 68: 4155-4168.

158. Odenbreit S, Faller G, Haas R. Role of the AlpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. Int J Med Microbiol 2002; 292: 247-256.

159. Bugaytsova JA, Björnham O, Chernov YA, Gideonsson P et al. *Helicobacter pylori* adapts to chronic infection and gastric disease via pH-responsive BabA-mediated adherence. Cell Host Microbe 2017; 21: 376-389. http://dx.doi.org/10.1016/j.chom. 2017.02.013.

160. Basso D, Zambon CF, Letley DP, Stranges A et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. Gastroenterol 2008; 135: 91-99.

161. Nimri LF, Matalka I, Bani-Hani KE, Ibrahim M. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. BMC Gastroenterol 2006; 6: 1-6.

162. Ghosh P, Bodhankar SL. Determination of risk factors and transmission pathways of *Helicobacter pylori* in asymptomatic subjects in Western India using polymerase chain reaction. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 2012; 2 (1): 12-17.

163. Twisk M, Kusters JG, Balk AG, Kuipers EJ et al. Colonization density and topographic localisation of *Helicobacter pylori* do not depend on the *cagA* status. J Clin Pathol 2001; 54: 771-773.

164. Schneider BG, Piazuelo MB, Sicinschi LA, Mera R et al. Virulence of infecting *Helicobacter pylori* strains and intensity of mononuclear cell infiltration are associated with levels of DNA hypermethylation in gastric mucosae. Epigenetics 2013; 11(8): 1153-1161. http://dx.doi.org/10.4161/epi.26072.

165. de Jonge HJM, Fehrmann RSN, de Bont ESJM, Hofstra RMW et al. Evidence based selection of house-keeping genes. PloS ONE 2007; 9: e898.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı ile ilgili doküman-1

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Tel. : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74 Fax : 0 232 - 259 05 41 İnciraltı 35340-İzmir

Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 11000

09 Kasım 2005

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Fakültemiz Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığının 06/09/2005 tarih ve 199 sayılı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen: Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Özlem YILMAZ'ın sorumlusu olduğu 122 protokol no.lu **"Helicobacter Pylori enfeksiyonu tanısında idrar antikor testleri ile invaziv metodların karşılaştırılması."** isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik kurulu kararı ve sonuç ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Şebnem ÖZKAN
Dekan

Sn. Doç. Dr. Özlem Yılmaz'a

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 06.09.2005/199

tik Kurul Üyeleri

oç. Dr. Cem Şeref BEDİZ
oç. Dr. Uğur MUNGAN
oç. Dr. Hüray İŞLEKEL
oç. Dr. Arzu SAYINER
oç. Dr. Özgül SAĞOL
oç. Dr. Görsev YENER
ard. Doç. Dr. Cenk ERDAL
oç. Dr. Kamer UYSAL
oç. Dr. Mustafa SEÇİL
ard. Doç. Dr. Ayşe KARCI
rhan ÖZKUL

Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun **06 Eylül 2005** tarih ve **17/15/05** no.lu toplantısında, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Özlem YILMAZ'ın sorumlu olduğu **122** protokol no.lu **"Helicobacter Pylori enfeksiyonu tanısında idrar antikor testleri ile invaziv metodların karşılaştırılması."** İsimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI
Klinik ve Laboratuar Araştırmaları
Etik Kurulu Üyesi

Doç. Dr. Görsev YENER
Klinik ve Laboratuar Araştırmaları
Etik Kurulu Başkan V.

Tel: 0232 412 22 54

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 06.09.2005/199

Etik Kurul Üyeleri

Doç. Dr. Cem Şeref BEDİZ
Doç. Dr. Uğur MUNGAN
Doç. Dr. Hüray İŞLEKEL
Doç. Dr. Arzu SAYINER
Doç. Dr. Özgül SAĞOL
Doç. Dr. Görsev YENER
Yard. Doç. Dr. Cenk ERDAL
Doç. Dr. Kamer UYSAL
Doç. Dr. Mustafa SEÇİL
Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI
Orhan ÖZKÜL

Etik Kurul Sekreteri
Yonca YILDIRIM

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun **06 Eylül 2005** tarih ve **17/15/05** no.lu toplantısında, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Özlem YILMAZ'ın sorumlu olduğu **122** protokol no.lu **"Helicobacter Pylori enfeksiyonu tanısında idrar antikor testleri ile invaziv metodların karşılaştırılması."** İsimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Yard. Doç. Dr. Ayşe KARCI
Klinik ve Laboratuar Araştırmaları
Etik Kurulu Üyesi

Doç. Dr. Görsev YENER
Klinik ve Laboratuar Araştırmaları
Etik Kurulu Başkan Yc.

Tel: 0232 412 22 54

KF.Öİ.....

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

"Çağdaş eğitim, bilimsel gelişme, hizmette kalite."

ÖĞRETİM ÜYESİ TARAFINDAN ÖNERİLEN DOKTORA TEZ KONUSU FORMU

1- Önerilen Tez Başlığı : *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi

2- Tezin Amacı (200 kelimeyi geçmeyecek) : Ekte

3- Gereç – Yöntem (Özetle) : Ekte

4- Tezin Getireceği Yenilikler : Ekte

5- Tezin Bütçesi

Bütçe Gerektiriyor mu? **Evet** [+] **Hayır** [ ]

EVET ise;

- **Projenin Adı** : *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında idrar antikor testleri ile invaziv metotların karşılaştırılması
- **Destekleyen Kuruluş** : Diğer ve DEÜ Araştırma Fonu
- **Proje hangi aşamadadır?** : Etik kurul onayı alındı.
- **Proje metninin tamamı ile varsa proje kabul yazısı ve Etik Kurul Onayı eklenecektir. ***

* (Bu yıl için, kabul yazısı ve Etik Kurul onayı Doktora Giriş Sınavı'ndan önce teslim edilebilir)

6- Ek Bilgiler (Gerektiğinde) : Etik kurul onayı alınan çalışmada histopatolojik inceleme ve hızlı üreaz testi için alınan biyopsi örneklerine kültür ve antibiyotik duyarlılık testleri uygulanacaktır.

Yukarıda belirtilen konuda doktora tez danışmanı olmak istiyorum. Gereğini arz ederim.

Doç.Dr. Özlem Yılmaz
Öğretim Üyesi Adı Soyadı

UYGUNDUR
29.11.2005
Prof. Dr. S. Hakan ABBASOĞLU
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

29.12.2005

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurul Başkanlığına,

06.09.2005/199 tarih ve sayılı etik kurul onayı alınan " *Helicobacter pylori* enfeksiyonu tanısında idrar antikor testleri ile invaziv metodların karşılaştırılması" konulu projede sehven bir paragraf eksik yazılmıştır. İlgili yere konan paragraf sayfa 2 Ek 2'de yer alan " Hasta örnekleri " başlığı altında " Mikrobiyolojik Yöntemler " içinde ilk paragraf (italik yazılı) kısmına eklenmiştir. Hastaya fazladan bir girişim uygulanmayacaktır. Metne eklenen paragraf aşağıdaki gibidir.

"Alınan biyopsi örneklerine H. pylori izolasyonu amaçlı kültür, antibiyotik duyarlılık testleri ve moleküler yöntemler uygulanacaktır."

Gereğine bilgilerinizi dilerim.

Doç. Dr. Özlem YILMAZ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

"Çağdaş eğitim, bilimsel gelişme, hizmette kalite."

DOKTORA TEZ ÖNERİSİ FORMU

Tez sahibinin adı soyadı : Daryoush Davoudi OSKOUEI

Programı : Mikrobiyoloji

Danışmanı : Doç.Dr. Özlem YILMAZ

Kuruluş Onay/onayları :

Tıbbi Etik yönünden uygunluk : ☒ Etik Kurul'ca uygun görüldü.

☐ Etik Kurul işlemi sürmektedir.

☐ İzmir dışında veya yurtdışında tezimi yapacak olduğumdan Etik Kurul raporunu, yapacağım yerden alacağım.

Önerilen Tez Başlığı : Helicobacter pylori enfeksiyonu tanısında kültür ve antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi

Tez Konusu Hakkında Bilgiler

1. Amacı, ortaya çıkış kaynağı * EKTE SUNULMUŞTUR

2. Konunun önemi, getireceği yenilikler ve sonuçlar, bunların uygulanabilirliği

3. Araştırma gereç ve yöntemler
(Araştırmada kullanılacak materyal, başvurulacak yöntem ya da yöntemler ayrıntılı belirtilecek)

4. Araştırma evreni ve zaman çizelgesi
(Tezin nerede yapılacağı, çalışma evreni ya da örneklemi ile zamanlamada tez hazırlık dönemi, veri toplama ve değerlendirme ve basım için planlanan zaman dilimleri gösterilecek)

5. Tezin bütçesi

6. İlgili yayınlar ışığında planlanan araştırmanın yeri

7. Araştırmanın kaynağını oluşturan mevcut yayın listesi

8. Etik Kurul onayı.

* 200 kelimeden fazla olmayacak (Tez taslağının tümü 4-5 sayfada toplanacaktır).

Tez danışmanı bulunduğum ....Mikrobiyoloji..... Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Daryoush Davoudi OSKOUEI'nin tez konusu / tez başlığı değişikliği Anabilim Dalımızca görüşülmüş olup, tez konusu hakkındaki istenen bilgiler ilişikte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Özlem YILMAZ

UYGUNDUR
25./9./2006
Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.Y.Hakan AĞAÇIOĞLU

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SBE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Gelen Evrak Tarih : 26.9.2006
Sayı : 1886

Form No: KF.Öİ.35
Rev.Tarihi/No:

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
Tarih ve Sayı: 25.04.2008/ 148

Etik Kurul Üyeleri
Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Prof.Dr.Mustafa SEÇİL
Prof.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus KARSLI

Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 24 Nisan 2008 tarih ve 10/09/2008 no.lu toplantısında; 123/2008 Protokol numaralı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Özlem YILMAZ'ın proje yöneticisi ve Daryoush DAVOUDI OSKOUEI'in sorumlusu olduğu, **"Helicobacter pylori enfeksiyonunda bakteriyel dış membran proteinlerinin incelenmesi"** isimli projede; Bilgilendirilmiş Onam Formunda (BOF) 1-c, 3. ve 7. maddelerin gereklerinin yerine getirilmesinden sonra projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkanı

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Tel: 0232 412 22 54

8.2. Etik Kurul Onayı ile ilgili doküman-2

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 312

06.04.2015

Sayın Prof.Dr.Özlem Yılmaz,

Kurulumuz tarafından 02.04.2015 tarih ve 120/2008 protokol numaralı 2015/10-40 karar numarası ile görüşülen "**Helicobacter Pylori Enfeksiyonunda Bakteriyel Dış Membran Proteinlerinin İncelenmesi**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	123-2008	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Helicobacter Pylori Enfeksiyonunda Bakteriyel dış Membran Proteinlerinin İncelenmesi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Özlem Yılmaz Tıbbi Mikrobiyoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	**Belge Adı**	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
	Araştırıcı Dilekçesi	01.04.2015	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2015/10-40**	**Tarih: 02.04.2015**
	Prof.Dr.Özlem Yılmaz'ın sorumlusu olduğu **"Helicobacter Pylori Enfeksiyonunda Bakteriyel dış Membran Proteinlerinin İncelenmesi"** isimli klinik araştırma, Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulundan 123/2008 protokol nolu çalışma 24.04.2008 tarih ve 10/09/2008 nolu toplantısında koşullu onay almıştır. Etik Kurul kararında belirtilen Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu ile ilgili eksikliklerin 06.05.2008 tarihli araştırıcı dilekçesi ile tamamlandığı görülmüş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ahmet Turan IŞIK	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	katılamadı
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	katılamadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.3. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Gönüllü Bilgilendirme Formu No.2

Değerli Hastamız,

Sizin muayeneniz ve değerlendirilmeniz sonucunda doktorunuz tarafından endoskopi yapılması gerekli bulunmuştur. Mide mukozasına yerleşen *Helicobacter pylori* adındaki bakterinin gastrit, mide ülseri ve mide kanseri ile ilişkisi kanıtlanmıştır. Enfeksiyona neden olan bu bakterinin tanısı ve sonuçta size uygun tedavinin uygulanabilmesi için endoskopi sırasında rutin olarak alınan biyopsi örneği hızlı üreaz testi ve histopatolojik yöntemleri ile incelenecektir, ancak katılacağınız çalışmada sizin midenizdeki *Helicobacter pylori* suşunun genetik özelliklerini daha fazla tanımlamak için endoskopi sırasında midenizden 4 adet daha biyopsi alınacak ve bu biyopsiler de bakterinin araştırılması için kültür ve moleküler yöntemler uygulanarak ileri incelemeleri yapılacaktır. Bu işlemler size herhangi bir zarar vermemektedir. Yaklaşık 250 gönüllü kişi bir yıl boyunca bu araştırmaya alınacak ve sizin katılacağınız süre 1 ay olup testlerin sonucu daha etkin tedaviniz yapılabileceği için kontrol ve tedavi altında olduğunuz bölüme bildirilecektir. Ayrıca katkıda bulunacağız bu araştırmada bakterinin genetik özelliğinin incelenmesi ile belirli bakteriyel suşları ile siz ve diğer benzer hastalarda ortaya çıkan hastalıklar arasında ilişki incelenip elde edilen bilgiler değerlendirilerek Türkiye;deki *Helicobacter pylori* enfeksiyonu kontrolünde yarar sağlayacaktır.

Gönüllü bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Gönüllü olarak bu çalışmada yer alan tüm hastaların kişisel bilgileri gizli tutulacaktır. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır. Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları sizden veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluştan talep edilmeyecektir. Eğer çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız ilgili bölümü imzalamanız gerekmektedir.

Gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren yukarıdaki metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu klinik laboratuvar araştırmasına kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın;

Ad :

Soyad:

Adresi:

Telefon(Ev/Cep):

Tarih :

İmza :

Araştırma Sorumlusu

Ad Soyad : Telefon :

Adres : İmza :

Tanıklık Eden Araştırmacı

Ad Soyad : Telefon :

Adres : İmza :

İrtibat Kurulabilecek Telefon Numaraları

Daryoush DAVOUDI 0232-412-45-01
0539-511-69-00

8.4. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ
Doktora Öğrencisi Daryoush DAVOUDI OSKOUEI

TC Kimlik No **Pasaport No**:	99691114134 N21091273
Doğum Yılı:	1961
Yazışma Adresi:	Tebriz Üniversitesi, İlaç ve Gıda Araştırma Merkezi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Rahahen Cad. Tebriz/İran
Telefon:	+98 411 442 24 38
e-posta:	daryoush_davoudi@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
İran	Tebriz Üniversitesi	Fen	Biyoloji	Lisans	1986
İran	Tahran Üniversitesi	Tıp	Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	1998

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Tahran Üniversitesi	İran	Tahran	Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi	1994-1996
Tebriz Üniversitesi	İran	Tebriz	Eğitim Geliştirme Merkezi (EDC)	Araştırma Görevlisi	1996-2001
Shams Medikal Merkezi	İran	Tebriz	Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Biyolog	1996-2001
Tebriz Üniversitesi	İran	Tebriz	İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi (DARC) Bakteriyoloji Laboratuvarı	Araştırma Görevlisi	2002-2004
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü (SBE)	Mikrobiyoloji Doktora Özel Öğrencisi	Eylül, 2004-Şubat, 2006

Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	Sağlık Bilimleri Enstitüsü (SBE)	Mikrobiyoloji Doktora Öğrencisi	Eylül, 2007'den devam etmektedir
Tebriz Üniversitesi	İran	Tebriz	İlaç ve Gıda Araştırma Merkezi (FDA), Mikrobiyoloji Laboratuvarı	Araştırma Görevlisi	2011'den devam etmektedir

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Sağlık Bilimleri

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Designing and Manufacturing of a Diagnostic Kit for Detection of Antibiotics in Milk*	Tebriz Üniversitesi	3000	01.02.2002-01.02.2003	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal
Helicobacter pylori Enfeksiyonunun Tanısında Kültür ve Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Önemi	Dokuz Eylül Üniversitesi			Araştırmacı/ Uzman	
Birinci Basamak Sağlık Hizmeti Veren Hekimlerin ve DEÜ Tıp Fakültesi Dönem 6 Öğrencilerinin Dispepsi Yakınması ile Gelen Hastaya ve *Helicobacter pylori* Enfeksiyonuna Yaklaşımı	Dokuz Eylül Üniversitesi	0,00	01.01.2006-01.01.2007	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Helicobacter pylori Enfeksiyonunda Bakteriyel Dış Membran Proteinlerinin İncelenmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	99,794,500	26.02.2008-26.06.2012	Araştırmacı/ Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

DEMİRAY-GÜRBÜZ, BEKMEN N, **DAVOUDI OSKOUEI D**, GÜVENİR M and YILMAZ Ö. The effect of 50 Hz electromagnetic field on *Helicobacter pylori*. Afr J Microbiol Res 2013; 7 (43): 5066-5069.

DAVOUDI OSKOUEI D, BEKMEN N, ELLİDOKUZ H, YILMAZ Ö. Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of *Helicobacter pylori* in stock culture media. Braz J Microbiol 2010; 41: 1038-1046.

DEHPOUR AR, MIRSALEHIAN A, AKBARI NAKHJAVANI F, **DAVOODI OSKOEI D**, MANI A, AMANPOUR S, FAYAZ MOGHADAM K, ATAEI Z. Effect of pretreatment with omeprazole on the frequency of *Helicobacter pylori* colonization in the antrum and gastric body of non -germ-free immature rats. Pharm Pharmacol Commun 2000; 6: 173-177.

Hakemli konferans/Sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

DAVOUDİ OSKOUEİ D, AKPINAR H, SARIOĞLU S, KESKİNOĞLU P, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. *Helicobacter pylori* outer membrane protein genes expression in gastric biopsy specimens of patients and their association with clinical, endoscopic and histopathologic findings. European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), **X**XXIInd International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer. September 05-07, 2019, Innsbruck, Austria, P6.09. Helicobacter 2019; 24,S1: 116.

DAVOUDİ OSKOUEİ D, AKPINAR H, SARIOĞLU S, KESKİNOĞLU P, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. The *cagA* and some outer membrane proteins gene expression profiles in gastric tissues of adult Turkish patients with *Helicobacter pylori* infection. European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), **X**XXIInd International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer. September 05-07, 2019, Innsbruck, Austria, P6.13. Helicobacter 2019; 24,S1: 117.

DAVOUDI OSKOUEI D, DOĞAN Y, BEKMEN N, YALÇIN M, SAĞOL Ö, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. A novel convenient culture medium for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.18. Helicobacter 2010; 15: 364.

DAVOUDI OSKOUEI D, DOĞAN Y, BENGİ G, SAĞOL Ö, SOYTÜRK M, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Indicator medium for culture and identification of *Helicobacter pylori* colonies isolated from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.11. Helicobacter 2010; 15: 361.

DOGAN Y, **DAVOUDI OSKOUEI D**, BİNİCİER Ö, DEMİRAY GÜRBÜZ E, SOYTÜRK M, ELLİDOKUZ H, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Is antibiotic supplemented culture medium inhibits recovery of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens? European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2010, Rotterdam, Holland, P4.13. Helicobacter 2010; 15: 362.

YILMAZ Ö, DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, **OSKOUEI DD**, TÜMER S, SOYTÜRK M, SAĞOL Ö, AKPINAR H, ŞİMŞEK İ. *Helicobacter pylori* detection and susceptibility testing: histopathology through culture to FISH. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIInd International workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal, P101.19. Helicobacter 2009; 14: 344.

DEMİRAY GÜRBÜZ E, BEKMEN N, GÜVENİR M, **OSKUOEI DD**, YILMAZ Ö. The effect of 50 Hz electromagnetic field (EMF) on *Helicobacter pylori*. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 17-19, 2009, Porto, Portugal P08.09. Helicobacter 2009;14: 390-91.

İZMİRLİ M, YETİŞ Ç, KAYALI RD, HUSSEİN ZM, HEMED SN, BEKMEN N, GVENİR M, **OSKOUEI DD**, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, ŞİMŞEK İ, YILMAZ Ö. Investigation of *Helicobacter pylori* infection in patients referred to upper endoscopy in the Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Gastroenterology Polyclinics by the Third Year Medical School Students. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P119. Helicobacter 2008; 13: 457.

OSKOUEI DD, BEKMEN N, DEMİRAY E, SOYTÜRK M, SARIOĞLU S, YILMAZ Ö. Comparison of different blood supplements in culture media for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. September 18-20, 2008, Riga, Latvia, P117. Helicobacter 2008; 10: 456.

YILDIZ B, İZMİRLİ M, ÖZDEMİR E, AKKAYA N, ALAGÖZ S, DEMİRAY E, BEKMEN N, **DAVOUDI D**, ELLİDOKUZ H, SOYTÜRK M, YILMAZ Ö. A questionnaire survey to test and treat strategy of *Helicobacter pylori* infection by the second year medical school students. European Helicobacter Study Group (EHSG) XXth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation. September 20-22, 2007, İstanbul, Turkey, P115. Helicobacter 2007;12: 447.

PATENTLER

*Designing and manufacturing of a diagnostic kit for detection of antibiotics in milk.
Registered patent No. 35077-24/05/2006, Iranian Registration Innovation Organization (ekte yer almaktatır).

DARYOUSH DAVOUDI OSKOUEI

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Doğum Tarihi	23/02/1961
İletişim Adresi	Tebriz Üniversitesi, İlaç ve Gıda Araştırma Merkezi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
Telefon	(939) 721 59 55
E-posta	d.davoudi1961@gmail.com
Web Adresi	

Öğrenim Bilgileri

01 Eylül 2007 - Şu Anda (12 yıl 7 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MİKROBİYOLOJİ (DR)

01 Ekim 1994 - 01 Şubat 1998 (3 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, TAHRAN ÜNİVERSİTESİ, İRAN
TAHRAN ÜNİVERSİTESİ, TAHRAN ÜNİVERSİTESİ
Tez Başlığı: Study of inhibitory effects of lactic acid bacteria on Helicobacter pylori in vitro and in vivo
Tez Konusu: Helicobacter pylori
Tarih: 1998
null

01 Ekim 1979 - 01 Ocak 1986 (6 yıl 4 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, TEBRIZ UNIVERSITY, İRAN
TEBRIZ UNIVERSITY, TEBRIZ UNIVERSITY

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Mayıs 2011 - 01 Aralık 2019 (8 yıl 8 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, TEBRİZ ÜNİVERSİTESİ-İLAÇ VE GIDA ARAŞTIRMA MERKEZİ (FDA)

01 Eylül 2004 - 01 Şubat 2006 (1 yıl 6 ay) (Tam Zamanlı)
DİĞER, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

01 Ocak 2002 - 01 Ocak 2004 (2 yıl 1 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, TEBRİZ ÜNİVERSİTESİ-İLAÇ UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ (DARC)

01 Mart 1996 - 01 Aralık 2001 (5 yıl 10 ay) (Yarı Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, TEBRİZ ÜNİVERSİTESİ-EĞİTİM GELİŞTİRME MERKEZİ (EDC)

01 Mart 1996 - 01 Şubat 2001 (5 yıl) (Yarı Zamanlı)
ARAŞTIRMACI, SHAMS MEDİKAL MERKEZİ

01 Ekim 1994 - 01 Şubat 1996 (1 yıl 5 ay) (Yarı Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, TAHRAN ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: Orta, Konuşma: İyi)

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: Orta, Konuşma: İyi)

FARSÇA (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji -- Tıbbi Mikrobiyoloji

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

E. DEMİRAY GÜRBÜZ, N. BEKMEN, D. DAVOUDI OSKOUEI, M. GÜVENİR & Ö. YILMAZ, The effect of 50 Hz electromagnetic field on Helicobacter pylori, AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH, 2013, 1996-0808, 7, 43, 5066-5069.

D. DAVOUDI OSKOUEI, N. BEKMEN, H. ELLİDOKUZ & Ö. YILMAZ, Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of Helicobacter pylori in stock culture media, BRAZİLİAN JOURNAL OF MİCROBİOLOGY , 2010, 1517-8382, 41, 4, 1038-1046.

A. R. DEHPOUR, A. MİRSALEHİAN, F. A. NAKHJAVANİ, D. DAVOUDI OSKOUEI, A. R MANİ, S. AMANPOUR, K. F. MOGHADAM & Z. ATAEİ, Effect of pretreatment with omeprazole on the frequency of Helicobacter pylori colonization in the antrum and gastric body of non -germ-free immature rats, Pharmacy and Pharmacology Communications , 2000, 1460-8081, 6, 4, 173-177.

Bildiriler

D. DAVOUDI OSKOUEI, H. AKPINAR, S. SARIOĞLU, P. KESKİNOĞLU, M. SOYTÜRK, H. ELLİDOKUZ, İ. ŞİMŞEK & Ö. YILMAZ, Helicobacter pylori outer membrane protein genes expression in gastric biopsy specimens of patients and their association with clinical, endoscopic and histopathologic findings, Poster Sunumu, European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), XXXIInd International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer. Innsbruck, Austria, P6.09. Helicobacter 2019; 24,S1: 116., 05 Eylül 2019, 07 Eylül 2019.

D. DAVOUDI OSKOUEI, H. AKPINAR, S. SARIOĞLU, P. KESKİNOĞLU, H. ELLİDOKUZ, M. SOYTÜRK, İ. ŞİMŞEK & Ö. YILMAZ, The cagA and some outer membrane proteins gene expression profiles in gastric tissues of adult Turkish patients with Helicobacter pylori infection, Poster Sunumu, European Helicobacter and Microbiota Study Group (EHMSG), XXXIInd International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer. Innsbruck, Austria, P6.13. Helicobacter 2019; 24,S1: 117., 05 Eylül 2019, 07 Eylül 2019.

D. DAVOUDI OSKOUEI, Y. DOĞAN, N. BEKMEN, M. YALÇIN, Ö. SAĞOL, H. ELLİDOKUZ, M. SOYTÜRK, İ. ŞİMŞEK & Ö. YILMAZ, A novel convenient culture medium for isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation

and gastric cancer. Rotterdam, Holland, P4.18. Helicobacter 2010; 15: 364., 17 Eylül 2010, 19 Eylül 2010.

D. DAVOUDI OSKOUEI, Y. DOĞAN, G. BENGİ, Ö. SAĞOL, M. SOYTÜRK, H. AKPINAR, İ. ŞİMŞEK & Ö. YILMAZ, Indicator medium for culture and identification of Helicobacter pylori colonies isolated from gastric biopsy specimens, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Rotterdam, Holland, P4.11. Helicobacter 2010; 15: 361., 17 Eylül 2010, 19 Eylül 2010.

Y. DOĞAN, D. DAVOUDI OSKOUEI, Ö. BİNİCİER, E. DEMİRAY GÜRBÜZ, M. SOYTÜRK, H. ELLİDOKUZ, H. AKPINAR, İ. ŞİMŞEK & Ö. YILMAZ, Is antibiotic supplemented culture medium inhibits recovery of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens? , Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Rotterdam, Holland, P4.13. Helicobacter 2010; 15: 362., 17 Eylül 2010, 19 Eylül 2010.

Ö. YILMAZ, E. DEMİRAY GÜRBÜZ, N. BEKMEN, D. DAVOUDI OSKOUEI, S. TÜMER, M. SOYTÜRK, Ö. SAĞOL, H. AKPINAR & İ. ŞİMŞEK, Helicobacter pylori detection and susceptibility testing: histopathology through culture to FISH, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIInd International workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Porto, Portugal, P101.19. Helicobacter 2009; 14: 344., 17 Eylül 2009, 19 Eylül 2009.

E. DEMİRAY GÜRBÜZ, N. BEKMEN, M. GÜVENİR, D. DAVOUDI OSKOUEI & Ö. YILMAZ, The effect of 50 Hz electromagnetic field (EMF) on Helicobacter pylori, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIInd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Porto, Portugal P08.09. Helicobacter 2009;14: 390-91., 17 Eylül 2009, 19 Eylül 2009.

D. DAVOUDI OSKOUEI, N. BEKMEN, E. DEMİRAY GÜRBÜZ, M. SOYTÜRK, S. SARIOĞLU & Ö. YILMAZ, Comparison of different blood supplements in culture media for isolation of Helicobacter pylori from gastric biopsy specimens, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Riga, Latvia, P117. Helicobacter 2008; 10: 456., 18 Eylül 2008, 20 Eylül 2008.

N. BEKMEN, M. GÜVENİR, D. DAVOUDI OSKOUEI, H. ELLİDOKUZ, M. SOYTÜRK, İ. ŞİMŞEK & Ö. YILMAZ, Investigation of Helicobacter pylori infection in patients referred to upper endoscopy in the Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Gastroenterology Polyclinics by the Third Year Medical School Students, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG), XXIst International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Riga, Latvia, P119. Helicobacter 2008; 13: 457., 18 Eylül 2008, 20 Eylül 2008.

E. DEMİRAY GÜRBÜZ, N. BEKMEN, D. DAVOUDI OSKOUEI, H. ELLİDOKUZ, M. SOYTÜRK & Ö. YILMAZ, A questionnaire survey to test and treat strategy of Helicobacter pylori infection by the second year medical school students, Poster Sunumu, European Helicobacter Study Group (EHSG) XXth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation. İstanbul, Turkey, P115. Helicobacter 2007;12: 447., 20 Eylül 2007, 22 Eylül 2007.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Helicobacter pylori Enfeksiyonunda Bakteriyel Dış Membran Proteinlerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Şubat 2008, 01 Şubat 2012.

EĞİTİM ARAŞTIRMALARI, ARAŞTIRMACI, Helicobacter pylori Enfeksiyonunun Tanısında Kültür ve Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Önemi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Şubat 2006, 01 Şubat 2008.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Birinci Basamak Sağlık Hizmeti Veren Hekimlerin ve DEÜ Tıp Fakültesi Dönem 6 Öğrencilerinin Dispepsi Yakınması ile Gelen Hastaya ve Helicobacter pylori Enfeksiyonuna Yaklaşımı, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Ocak 2006, 01 Ocak 2007.

UYGULAMALI ARAŞTIRMA, ARAŞTIRMACI, Designing and Manufacturing of a Diagnostic Kit for Detection of Antibiotics in Milk, Yürütülen Kuruluş: TEBRİZ ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TEBRİZ ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Şubat 2002, 01 Şubat 2003.

Patentler

Designing and manufacturing of a diagnostic kit for detection of antibiotics in milk, DİAGNOSTİC KİT, Patent Tescil, Ulusal, Başvuru No: 35077, 24 Mayıs 2006

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

محمدرضا مجتهدی: مترجم رسمی ترکی استانبولی دادگستری جمهوری
می ایران نشانی: تبریز، بالاتر از چهارراه آبرسان، ساختمان اسکان، طبقه
م- تلفن: ۳۳۵۷۱۷۴
Dr. M. RIZA MOCTEHİDİ: İRAN İSLAM CUMHURİYİ
ADLİYESİ TÜRKÇE RESMİ ÇEVİRMENİ. ADRES: ABRES
KAVŞAĞI, ESKAN APT., E7, TEBRİZ- TEL: 3357174

جمهوری اسلامی ایران
قوه قضائیه - اداره مترجمین رسمی
شماره ۸۸۲۹۱۵ سری ز
ردیف دفتر ثبت ۲۳۱۴

Yargı Gücü

Yurt Tapu ve Senetleri Kayıt Kurumu

Şirketleri Tescil ve Endüstriyel Mülkiyet Genel Müdürlüğü

014317 Seri A/82 (30) Özel (82-4) T

İcat kayıt defteri NO.: **35077** İcat kayıt tarihi: **24.05.2006**

Bildirge kayıt defteri NO.: **38411210** Teslim ve himaye tarihi: **31.01.2006**

İCAT TESCİL SERTİFİKASI

İcatları Tescil Kanunu uyarınca;

"Süt Anti Biyotik Tespiti Seti Tasarımı ve Yapımı " ile ilgili İcat, **Yirmi yıl** süre için;

İran İslam Cumhuriyeti uyruklu, ikametgahlarını İran'da "TEBRİZ TIP BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ FARMAKOLOJİK UYGULAMALI ARAŞTIRMALAR MERKEZİ, ÜNİVERSİTE CAD., TEBRİZ" olarak belirten **MOHAMMADREZA NAHAEI, DARYOUSH DAVOUDI, MOHAMMAD AKBARI DIBAVAR, MEHRAN MESGARI ABBASI** ve **TEBRİZ TIP BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ FARMAKOLOJİK UYGULAMALI ARAŞTIRMALAR MERKEZİ** adına tescil edilmiştir.

İşbu belge, ilişiğinde icat izah ve Plan'ından bir nüsha bulundurmaktadır.

Endüstriyel Mülkiyet Daire Başkanı: İmza ("Aslı Gibidir" yazısıyla birlikte)

^^^

قوه قضائیه

شماره و دفتر ثبت اختراع ۳۵۰۷۷
تاریخ ثبت اختراع ۱۳۸۵/۰۳/۰۳

سازمان ثبت اسناد و املاک کشور

شماره و دفتر ثبت اظهارنامه ۳۸٤۱۱۲۱
تاریخ تسلیم و حمایت ۱۳۸٤/۱۱/۱۱

۶۰۰ ریال

اداره کل ثبت شرکتها و مالکیت صنعتی

۰۱٤۳۱۷ *

سری ا الف/۸۲

گواهی نامه ثبت اختراع

(۲۰) اختصاصی (۴-۸۲) ت

طبق قانون ثبت اختراعات گواهی می شود اختراع راجع به طراحی و ساخت کیت تشخیص آنتی بیوتیک در شیر.

که در تاریخ ------ در کشور ------ بشماره ------ تقاضای ثبت شده است

بنام آقای محمدرضا نهایی، آقای داریوش داودی، آقای محمد اکبری دیباور، آقای مهران مسگری عباسی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

تابعیت: جمهوری اسلامی ایران

مقیم تبریز، خیابان دانشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

که نشانی خود را در ایران به شرح فوق تعیین نموده است

برای مدت بیست سال ماه روز

به ثبت رسیده است این ورقه که یک نسخه از توصیف و نقشه اختراع را به پیوست دارد بمالک آن تسلیم

رئیس اداره مالکیت صنعتی

۵۴۲۰

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی تبریز
معاونت غذا و دارو

DR. MOHAMMAD RIZA MOCTEHED
دکتر محمدرضا مجتهدی
مترجم رسمی زبان ترکی استانبولی
قوه قضائیه
۸۵
YARGI GÜCÜRESMİ TERCÜMANI

African Journal of Microbiology Research

OPEN ACCESS

October 2013 Vol. 7 Num. 43

www.academicjournals.org

academicJournals

Vol. 7(43), pp. 5066-5069, 25 October, 2013
DOI: 10.5897/AJMR10.909
ISSN 1996-0808 ©2013 Academic Journals
http://www.academicjournals.org/AJMR

African Journal of Microbiology Research

Short Communication

The Effect of 50 Hz electromagnetic field on *Helicobacter pylori*

Ebru Demiray-Gürbüz, Neslihan BEKMEN, Daryoush DAVOUDİ OSKOUEİ, Meryem GÜVENİR and Özlem YILMAZ*

Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, Inciraltı-Izmir, Turkey.

Accepted 24 September, 2013

We aimed to determine the impact of 50 Hz, 3 mT electromagnetic field (EMF) on the growth of *Helicobacter pylori* and the changes in morphology, survival and viability after exposure in both 20 and 120 min of *in vitro* experiments. The bacterial suspension (~10^8CFU/mL) of cultured *H. pylori* NCTC 11637 in Brucella Broth were exposed to 50 Hz EMF for 20 and 120 min in a microaerophilic condition at 25-28°C. Viability or culturability of 10^4 and 10^5 dilutions was determined after 20 and 120 min by spread plate colony count method. The exposure to 50 Hz EMF for 120 min had inhibitory effect on *H. pylori* colonies with reduction in bacterial viability as well as morphologic changes which were observed from typical spiral form to elongated bacillary form.

Key words: *Helicobacter pylori*, electromagnetic fields.

INTRODUCTION

Biologic system response to the exposure of electromagnetic field (EMF) is changed by the frequency and intensity of EMF, exposure time and the structure of biological system (Nakasono and Saiki, 2000; Yi-Li et al., 1997). Magnetic fields are in use for magnet resonance tomography, magnetic stimulation of brain areas and magnetic drug targeting in medicine. There are several studies that prove the therapeutic benefit of magnetic fields (Obermeier et al., 2009).

There are many biological studies to clarify the biological effects of magnetic fields. The exposure effects are not understood (Nakasono and Saiki, 2000). There are EMF in high voltage line and electricity machine such as television at home and office for human use (Cellini et al., 2008; Erol et al., 2003). The biological effect of magnetic field is found to be general stress factor in bacteria, yeast and HL60 human leukemia cells. The general stress response via temperature, toxins, heavy metals, free radicals is found in all bacteria, plant and animal cells. The mechanism of the stress response is well known in *Escherichia coli* (Nakasono and Saiki, 2000). *E. coli* ATCC 700926 was shown to respond to exposure of 50 Hz and 0.1-1.0 mT modifying morphology from bacillary to coccoid as an immediate effect (Cellini et al., 2008).

Helicobacter pylori infection is very common worldwide, occurring in 25-50% of the population in developed countries, 80-90% in developing regions (Bardhan, 1997). Its natural habitat is human stomach, but it can survive in dental plaque, feces in human and animal and water (Adams et al., 2003; Kabir, 2003). There is a strong link between *H. pylori* and gastric cancer in many countries. By contrast, low gastric cancer rates have been reported in some countries with a high prevalence of *H. pylori* infection, such as India and Bangladesh. (Machida-Montani et al.,2004). Chronic *H. pylori* induced inflammation can eventually lead to atrophic gastritis and intestinal metaplasia which occurs in approximately half of the *H. pylori*-colonized population. *H. pylori* increases the risk of gastric cancer development via atrophy and intestinal metaplasia in *H. pylori* positive person than uninfected persons. Gastric cancer is the second most

*Corresponding author. E-mail: ozlem.yilmaz@deu.edu.tr. Tel: 0090 232 4124506. Fax: 0090 232 2590541.

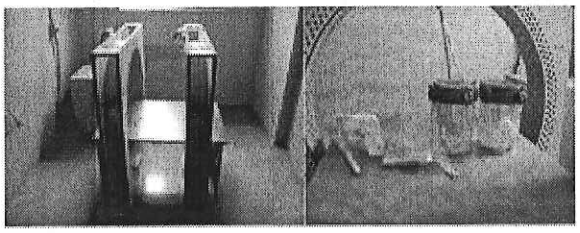


Figure 1. The cylindrical solenoid electromagnetic field aparatus used for exposure of *H. pylori* NCTC 11637 to EMF (50 Hz of frequency and 3.0 mT of intensity). The bacterial suspensions of *H. pylori* contained in anaerobic jar and Cook roasting bag transparent to the EMF was located on the middle part of the magnetic field inside the coil system.

common cause of cancer-related deaths worldwide (Peek and Crabtree, 2006). This difference in gastric cancer rates in populations with similar high prevalences of *H. pylori* infection could be related to the difference in the diversity of *H. pylori* strains, ethnicity and environmental factors (Machida-Montani et al.,2004) Consequently, the viability of *H. pylori* in different environment is related to its genetic variability and its environment adaptability. *H. pylori* modifies itself from spiral to coccoid form in which is viable but not culturable (VBNC) state. This cellular response to environmental stress is emphasized when bacterial cells organize themselves into microbial communities forming biofilm. Therefore, the capability for this pathogen to produce a polymeric matrix forming biofilm may play a very important role in its survival in the environment. The influence of electromagnetic microwaves on living organisms have been widely described resulting with different effects. In particular, for prokaryotic systems, the exposure to electromagnetic fields produces stress effects causing phenotypic and transcriptional changes on free cells and affecting the surface adhesion on cells organized in biofilm (Di Campli et al., 2010).

We aimed to detect the role of exposure of 50 Hz 3.0 mT electromagnetic fields (EMF) stress on the growth of *H. pylori* and its adaptibility to environmental changes in the morphology, viability and proliferation of *H. pylori*.

MAGNETIC FIELD EXPOSURE SYSTEM AND FIELD CHARACTERISTICS

The magnetic fields were generated with 50 Hz alternative flow frequency to 30-80 Gauss (G) EMF by a pair of Helmholtz cylindrical solenoid system which was used in the Department of Anatomy, Faculty of Medicine, for experimental design. Electromagnetic field system was composed of 95 cm scaled in diameter with two copper solenoids which is positioned 50 cm distance between the coils (Figure 1). Solenoids were connected in series to a generator delivering an AC current. The output current was 6.43 A at 50 Hz. The magnetic field intensity and the stress of electromagnetic field were measured by transformator and a digital teslameter (FW Bell, 5170, Pacific Scientific-OECO, Milwaukie, OR, USA). The teslameter accuracy was ±2% for AC (Alihemmati, 2009; Kiray et al., 2013; Tayefi et al., 2010).

Bacterial strain and experimental procedures

H. pylori NCTC 11637 standard strain was cultured on Columbia Blood Agar including *H. pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid) and 7% defibrinated horse blood (Horse Blood Defibrinated, Oxoid); incubated in anaerobic jar (2.5 L, Oxoid) and roasting bag (25 x 38 cm, Cook) separately for four days at 37°C in micro-aerophilic conditions with GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company). Bacterial suspension was prepared and adjusted in 30 ml Brucella Broth (Becton Dickinson and Company,USA) from cultured *H. pylori* colonies to obtain McFarland 2 (~10^8 CFU/mL) by Densimat (Biomerieux, France). *H. pylori* suspension was distributed into each of six screw capped sterile test tubes.

In microaerophilic condition, bacterial suspension one in Cook roasting bag and one in anaerobic jar were placed and exposed to 50 Hz 3.0 mT EMF for 20 min (acute exposure) and 120 min at room temperature (25-28°C). The controls were carried out in anaerobic jar at the beginning of the experiments at 20 and 120 min without exposure to EMF outside the Helmholtz cylindrical solenoid system at 25°C in the same room (Figure 1). The experimental design was carried out and each experiment was performed in dublicate.

Culturable, total count and microscobic observations

For the culturable cell count, at each time interval, CFU/mL was determined by plating 200 µl of 10-fold concentrated Brucella Broth cultures on four plates of serial dilutions of each *H. pylori* suspensions cultured on Columbia Blood Agar and incubated at 37°C for 3 days.

After 20 and 120 min of exposure, each *H. pylori* suspensions incubated in anaerobic jar, roasting bag and control were separately diluted for colony counting. 4th (10^4) and 5th (10^5) dilutions of each *H. pylori* suspensions were inoculated as duplicate on 7% horse blood Columbia Blood Agar and incubated at 37°C for 3 days in microaerophilic conditions with GasPak Campy Container System. The *H. pylori* colonies that appeared on the cultured plates were counted and expressed in colony-forming units (CFU). In addition, one slide was prepared for wet mount examination for motility, one slide was air dried and stained with modified Gram staining to examine morphological changes for initial time, exposure duration in 20 and 120 min. Bacterial shape was evaluated with light microscope at each time point. The slides for each culture were examined and ten fields for each slides were

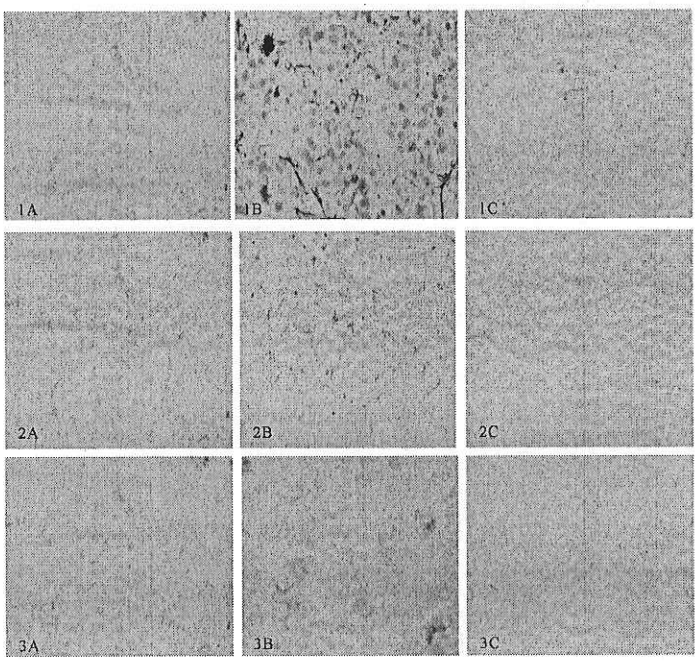


Figure 2. The view of the McFarland 2 suspension of NCTC 11637 *H. pylori* standard strain morphology which was incubated in (1) anaerobic jar (x100) with exposure to EMF (2) Cook roasting bag (x100) with exposure to EMF (3) anaerobic jar without exposure to EMF: (A) initial time, (B) 20 min and (C) 120 min.

counted blindly by four of us. The number of bacillary and elongated forms were determined.

Viability testing

H. pylori in Brucella Broth exposed and non-exposed to EMF were examined for their viability with 2-(P-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) (0.8 mg/ml) stain. INT was added to each *H. pylori* bacterial suspension tubes which were exposed to EMF in 20 and 120 min both in Cook roasting bag, anaerobic jar and control tubes and incubated for 2 h in microaerophilic condition at 37°C. Each were inoculated as duplicate on 7% horse blood Columbia Blood Agar and incubated at 37°C for three days in microaerophilic conditions with GasPak Campy Container System. For each determination colonies were counted if present for visible growth or not.

RESULTS AND DISCUSSION

The stimulation effects of alternating electric current on microbial growth have been shown in some studies. The growth of different bacteria is stimulated by 50 Hz, the enzymatic activity of living cells is increased by alternating current and the lag phase of *E. coli* depending on inoculum size, shaking rate during cultivation and composition of the medium (Loghavi et al., 2007). However, in our study, there was no stimulation effects on the growth of *H. pylori* and also *H. pylori* did not change from bacillary form to coccoid form due to the exposure to EMF. Although the colonies of *H. pylori* in Cook roasting bags were smaller than the size of colonies of *H. pylori* in anaerobic jar, typical spiral morphology was observed in both anaerobic jar and Cook roasting bags. We evaluated the slides of *H. pylori* cultered colonies from the anaerobic jar and Cook roasting bag and also the slides of *H. pylori* bacterial suspensions at initial time, at durations of 20 and 120 min of electromagnetic exposures stained with modified Gram stain, respectively (Figure 2). However, we interestingly observed that the morphology of bacteria was changed from typical spiral morphology to elongated shape morphology in both anaerobic jar and roasting bag for only 120 min.

It was reported that *Lactobacillus acidophilus* lag phase and spesific growth rate were not affected significantly by exposure to 60 Hz (Loghavi et al., 2007). It was reported that *Staphylococcus aureus* concentrations in broth medium could be reduced under the influence of the four different applied fields within 24 h of experiment. The strongest effects were observed for the direct current electric field which could decrease CFU/mL of 37%, and

the low-frequency EMF with additional induced electric alternating field with a decrease of Staphylococci concentration by 36% (Obermeier et al., 2009). We observed that the exposure to 50 Hz -3 mT EMF resulted in morphological changes in both anaerobic jar and Cook roasting bag cultured *H. pylori* strains and a decrease in growth (10^3 CFU/mL in 4th dilution, 10^2 CFU/mL in 5th dilution) was observed in anaerobic jar at 120 min. The number of *H. pylori* colonies which were exposed to 50 Hz EMF in 20 min in both anaerobic jar and roasting bag were not decreased according to the control group. However, the number of *H. pylori* colonies which were exposed to 50 Hz EMF in 120 min in anaerobic jar were decreased according to the control group and Cook roasting bag. No difference was found between the control groups for 20 and 120 min. After INT staining for 2 h, we observed that bacteria were seen in both pellet and cloudy supernatant in all tubes from Cook roasting bag, anaerobic jar and control tubes.

We concluded that exposure to 50 Hz EMF in 20 and 120 min were related to minumum lethal activity of *H. pylori* NCTC 11637 standard strain although the morphology of bacteria was changed due to exposure to 50 Hz EMF in 120 min. We also suggested that the Cook roasting bag was more easily acquired, cheap, disposible and useful than anaerobic jar and only the incubation period of culture might be prolonged one more day for the appearence and growth of *H. pylori* colonies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Associate Professor Dr. Müge Demirbilek (Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Baskent University, Ankara/Turkey) for providing *H. pylori* NCTC 11637 standard strain and Professor Dr. Amaç Kiray (Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, Izmir/Turkey) for kindly giving permission to use EMF system designed by him.

REFERENCES

Adams BL, Bates TC, Oliver JD (2003). Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. Appl. Environ. Microbiol. 69:7462-7466.

Alihemmati A (2009). Gebelik Döneminde Elektromanyetik Alana Maruz Bırakılan Ratlarda ve Yavrularda Melatonin'in Tiroid Bezi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 39p.

Bardhan K (1997). Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. Clin. Infect. Dis. 25:973-978.

Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, Robuffo I, Tribiani O, Mariggi MA (2008). Bacterial Response to the Exposure of 50 Hz Electromagnetic Fields. Bioelectromagnetics 29:302-311.

Di Campli E, Di Bartolomeo S, Grande R, Di Giulio M, Cellini L (2010). Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on *Helicobacter pylori* biofilm. Curr. Microbiol. 60:412-418.

Erol Ö, Oldacay S, Erdem G (2003). *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının Elektromanyetik Alandaki Üreme Davranışları. Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg. 33: 191-196.

Kabir S (2003). Review article: clinic-based testing for *Helicobacter pylori* infection by enzyme immunoassay of faeces, urine and saliva. Aliment. Pharmacol. Ther. 17:1345-1354.

Kiray A, Tayefi H, Kiray M, Bagriyanik HA, Pekcetin C, Ergur BU, Ozogul C (2013). The effects of exposure to electromagnetic field on rat myocardium. Toxicol. Ind. Health 29(5):418-425.

Loghavi L, Sastry SK, Yousef AE (2007). Effect of moderate electric field on the metabolic activity and growth kinetics of *Lactobacillus acidophilus*. Biotechnol. Bioeng. 98:872-881.

Machida-Montani A, Sasazuki S, Inoue M, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Hanaoka T, Tsugane S (2004). Association of *Helicobacter pylori* infection and enviromental factors in non-cardia gastric cancer in Japan. Gastric Cancer 7(1):46-53.

Nakasono S, Saiki H (2000). Effect of ELF magnetic fields on protein synthesis in *Esherichia coli* K12. Radiat. Res. 154:208-216.

Obermeier A, Matl FD, Friess W, Stemberger A (2009). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* induced bu low-frequency electric and electromagnetic fields. Bioelectromagnetics 30:270-279.

Peek RM Jr, Crabtree JE (2006). *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. J. Pathol. 208:233-248.

Tayefi H, Kiray A, Kiray M, Ergur BU, Bagriyanik HA, Pekcetin C, Fidan M, Ozogul C (2010). The effects of prenatal and neonatal exposure to electromagnetic fields on infant rat myocardium. Arch. Med. Sci. 6:837-842.

Yi-Li C, Thériault G, Lin RS (1997). Residential Exposure to 60-Hertz Magnetic Fields and Adult Cancers in Taiwan. Epidemiology 1:25-30.

Brazilian Journal of Microbiology (2010) 41: 1038-1046
ISSN 1517-8382

EVALUATION OF DIFFERENT CRYOPROTECTIVE AGENTS IN MAINTENANCE OF VIABILITY OF *HELICOBACTER PYLORI* IN STOCK CULTURE MEDIA

Daryoush Davoudi Oskouei [1], Neslihan Bekmen [1], Hülya Ellidokuz [2], Özlem Yılmaz [1*]

[1]Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Dokuz Eylül University, İnciraltı – 35340, İzmir, Turkey, [2]Faculty of Medicine, Public Health Division of University Hospital, Dokuz Eylül University, İnciraltı – 35340, İzmir, Turkey

Submitted: July 27, 2009; Returned to authors for corrections: February 02, 2010; Approved: June 21, 2010.

ABSTRACT

Four different cryoprotective supplemented stock media were evaluated for maintaining better survival and recovery of *H. pylori* type strain NCTC 11637 at two different maintenance temperatures of -20°C and -80°C after one month preservation as frozen stocks.

The spread plate colony count method was used to investigate the recovery rate of *H. pylori* from equally inoculated bacterial suspensions in differently prepared stock cultures.

After the preservation of *H. pylori* for one month in different cryoprotectant-supplemented stock media, the recovery rates for -20°C obtained for stock cultures supplemented with dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene glycol (PEG), glycerol and glycerol+sucrose, as well as controls with and without human serum alone were 7.13, 6.97, 7.93, 7.99, 6.95 and 0.0 log CFU/ml, respectively. Maintenance of bacteria at -80°C gave statistically higher recovery rates compared to preservation at -20°C with the values of 8.55, 8.24, 8.59, 8.66, 8.01 and 0.0 log CFU/ml for these above mentioned stock cultures. The stock cultures supplemented with glycerol+sucrose and glycerol showed the highest recovery rates, 7.99 and 7.93 for -20°C vs. 8.66 and 8.59 for -80°C respectively, which were statistically different from the others.

Our study revealed that *H. pylori* type strain NCTC 11637 could be better preserved at -80°C than -20°C. The best stock media which supported viability or culturability of bacteria were brain heart infusion broth (BHI)+glycerol+human serum and BHI+glycerol+sucrose+human serum, where the latter yielded the higher recovery rate.

Key words: *Helicobacter pylori*; recovery rate; stock culture media; cryoprotective agents

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram-negative spiral-shaped bacterium, which is closely associated with gastroduodenal diseases such as gastritis, peptic ulcers and gastric cancer. The isolation of the organism from biopsy specimens and maintenance of bacterial isolates without loss of culturability are both very important in conducting antimicrobial susceptibility testing as well as studying virulence factors (5, 15).

***Corresponding Author. Mailing address:** Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, İnciraltı, 35340, İzmir, Turkey.; Tel: +90 (232) 412 4506 Fax: + 90 (232) 259 0541.; E-mail: ozlem.yilmaz@deu.edu.tr

H. pylori is a fastidious organism; it has a low growth rate and its culture requires nutrient-rich media (13). *H. pylori* is also very sensitive to environmental stresses, such as oxygen, which may cause the bacterium to change from the bacillary form to a non-culturable or so-called coccoid form, hence making the culture of the organism very hard or impossible. Coccoid formation is an active process switched on by the bacterium as a protective mechanism (4) and also can mediate genetic exchanges between neighboring organisms (19).

Unlike other bacteria, the storage of *H. pylori* is faced with many problems. Several methods have been developed to preserve *H. pylori.* Early studies have shown that freeze-drying is not a suitable method because it harms bacteria. Lyophilizing without freezing using 20% L-glutamic acid has been recommended, but this method is too cumbersome for routine use (2).

Although freeze-drying of a dense *H. pylori* suspension prepared in skim milk has yielded successful recovery of bacteria, this method is not reliable for good recovery after subculture on solid media. Furthermore, not every laboratory can afford equipment to freeze-dry *H. pylori* directly from the liquid state (23). Freezing methods such as storage in 10% mucin, fetal bovine serum, or cryoprotective liquids (e.g., 25% glycerol) at -193°C or -70°C have been described to guarantee a viability of 77 - 90%. Preservation at -193°C has not been more successful than at -70°C (2). Some researchers have also shown that *H. pylori* can be safely stored in its natural environment, the gastric mucosa, for a long time. Glycerol-containing media such as cysteine-Albimi, Brucella broth or skim milk have been proposed for optimal preservation of *H. pylori* in gastric mucosa as well as bacterial isolates at -70°C (9).

Like in other living cells, ice crystals formed in *H. pylori* during freezing cause damage to the organism. Therefore, the easiest and the most commonly accepted method to maintain bacterial isolates for a long time generally involves deep freezing the bacteria using a cryoprotectant. It decreases the need for repeated subculturing which can lead to contamination, genotypic or phenotypic alterations, as well as spontaneous autolysis (3, 8). However, some of these cryoprotective agents such as glycerol and DMSO may be toxic for a living organism and also may fail to afford enough protection during freezing (7). Several studies have also addressed the influence of temperature as well as morphology and amount of initial inoculum on viability and recovery of *H. pylori* from stock cultures (2, 21). In another recent study, sucrose was shown to be a promising in preserving human sperm (11), so sucrose may have such a protective effect on the viability of *H. pylori* strains.

In our study, the effectiveness of these different cryoprotective agents in the maintenance of *H. pylori* during freezing was evaluated to determine the best protective agent for the viability or culturability of a standard reference strain of *H. pylori,* NCTC 11637 (*cagA, vacA*, *oipA* and *babA* positive), from frozen stock cultures. We used the spread plate colony count method to detect the recovery rate of *H. pylori* from stock cultures after one-month maintenance at two different temperatures of -20°C and -80°C.

MATERIAL AND METHODS

H. pylori inoculum preparation

H. pylori NCTC 11637, previously preserved at -80°C in stock medium (BHI broth supplemented with 20% glycerol), was used in this study. It was subcultured on *H. pylori* selective agar medium consisting of Columbia blood agar medium (Oxoid, United Kingdom) supplemented with *Helicobacter pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid, United Kingdom), 10% filter-sterilized, heat-inactivated fresh human serum and 0.3% activated charcoal (6). The plates were incubated at 37°C for 72 h under microaerobic conditions using the GasPak EZ Campy Container System (Becton Dickinson, USA). Bacterial cultures were confirmed as *H. pylori* by positive urease, oxidase and catalase tests as well as Gram-negative spiral morphology. The bacterial suspension equivalent to a McFarland 3 standard (~ 10^9 CFU/ml) was prepared from a 72 h culture of *H. pylori* standard strain in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and used as an inoculum for stocking.

Before inoculation, a smear was prepared and stained with a modified Gram's staining method to ensure that almost all bacteria had typical spiral morphology and that there were no bacterial contaminations. Bacterial suspension was also checked by a colony count method to ensure that the inoculum consisted of ~ 10^9 CFU/ml.

Preparation of stock media

20% glycerol supplemented medium: For preparation of 20 ml stock medium, 0.74 g brain heart infusion broth (BHI) (Oxoid, United Kingdom) and 4 ml glycerol (Baker Analyzed, USA) were separately dissolved in 8 ml and 6 ml distilled water, respectively, and autoclaved at 121°C for 15 min. The two were then mixed together, and 2 ml of filter-sterilized (through a disposable filter of 0.45 µm pore diameter) and heat-inactivated (56°C for 30 min) fresh human serum (Blood Bank, Dokuz Eylül University Hospital, Izmir) were added. The stock medium was dispensed into sterile Eppendorf tubes, each 0.5 ml, and stored at 4°C until used.

5% polyethylene glycol (PEG) supplemented medium: BHI broth, 0.74 g, was dissolved in 17 ml distilled water. After autoclaving at 121°C for 15 min, 1 ml of filter sterilized PEG (Merck, USA) (through a disposable filter of 0.45 µm pore diameter), and 2 ml filter-sterilized heat inactivated fresh human serum were added. Stock medium was dispensed into sterile Eppendorf tubes and stored as mentioned above.

5% dimethyl sulphoxide (DMSO) supplemented medium: This was prepared as mentioned for PEG, except 1 ml DMSO (Sigma-Aldrich, USA) was used instead of PEG.

0.3 M sucrose supplemented medium: BHI broth, 0.74 g, and 4 ml glycerol in 6 ml distilled water were separately autoclaved at 121°C for 15 min. A solution of 2 g sucrose (Merck, USA) in 2 ml distilled water (0.3 M) was filter-sterilized (through a disposable filter of 0.45 µm pore diameter). A volume of 2 ml filter- sterilized, heat-inactivated fresh human serum was added to the mixture. Stock medium was dispensed into sterile Eppendorf tubes and stored as mentioned above.

Bacterial stocking procedures

Stock media previously maintained at 4°C were brought to room temperature and 100 µl of bacterial suspension was introduced into 0.5 ml of each of the storage media. After vortexing, all the stock cultures were frozen at -80°C and -20°C within 15 min.

BHI broth with and without human serum containing *H. pylori* bacterial suspensions were included as control A and B groups in this study. A total of 120 stock culture samples were studied under two different maintenance temperatures of -80°C and -20°C for one month.

Plating for determination of colony forming units (CFU)

After thawing the *H. pylori* stock culture samples, the vials were vortexed, and 10 µl of each cryopreserved stock sample were serially diluted 10^4-fold into 990 µl of sterile PBS (pH 7.4). Next, 10 µl of each diluted suspension were streaked onto *H. pylori* selective agar medium for the determination of the number of CFU by the spread plate colony count method. The plates were incubated at 37°C for 5 days under microaerobic conditions (GasPak EZ Campy). Colony counts per plate (CFU/ml) were calculated as: number of colonies x [1/dilution] per ml.

Dilution factor was estimated by preparing 10^2-, 10^3- and 10^4 -fold dilutions for each type of stock culture. Finally, a 10^4-fold dilution which yielded countable bacterial colonies on agar plates was selected and applied for all stock cultures. Recovery rate (log CFU/ml) was also calculated and analyzed for each plate.

Statistical analysis

The Mann-Whitney U test (Asymp. Sig., 2-tailed) was used for the analysis of differences between two independent nonparametric samples: the recovery rates of *H. pylori* from different stock cultures as well as different maintenance temperatures. The differences were considered statistically significant if $p<0.05$.

RESULTS

The averages obtained for 10 µl of each type of stock culture with 10^4-fold dilutions containing 100 µl of *H. pylori* NCTC 11637 suspension equivalent to a Mc Farland 3 standard were used. Recovery rates as well as the log reduction determined relative to the initial inoculum were compared between the different cryopreserved stock cultures. The viability or recovery rate of *H. pylori* for the various cryoprotectant-supplemented stock cultures after 1 month maintenance at two different temperatures were given as the mean log CFU/ml ± SD (Table 1). All types of stock cultures but not stock control samples A (without human serum) yielded culturable *H. pylori* colonies after one month maintenance at -20°C and -80°C. The differences were statistically significant (p=0.000) while stock control samples B (with human serum) had almost similar colony count numbers.

Table 1. Recovery rate of *H. pylori* from stock cultures using different cryoprotective supplemented stock media

Stock medium	No. of samples	Maintenance temperature	Mean log CFU/ml ±SD
BHI[(a)]+5% DMSO[(b)]+10%HS[(c)]	5*	-20	7.15±0.24
	10	-80	8.55±0.18
BHI+5%PEG[(d)]+10%HS	8*	-20	6.97±0.20
	9*	-80	8.24±0.20
BHI+20%glycerol+10%HS	10	-20	7.93±0.43
	10	-80	8.59±0.32
BHI+20%glycerol+0.3 M sucrose+10%HS	10	-20	7.99±0.36
	10	-80	8.66±0.21
BHI (control A)	10	-20	0.0±0.0
	10	-80	0.0±0.0
BHI+HS (control B)	5*	-20	6.95±0.14
	9*	-80	8.01±0.17
	106		

(a); Brain heart infusion broth
(b); Dimethyl sulfoxide
(c); Human serum
(d); Polyethylene glycol
*; Due to contamination as well as some failures in *H. pylori* recovery at a defined dilution, a number of samples were excluded from 20 prepared for each type of stock culture.

The recovery rate of *H. pylori* as mean log CFU/ml for all stock cultures, except control A samples, was higher with freezing at -80°C than at -20°C [BHI+DMSO+human serum (HS), 8.55± 0.18 vs. 7.15±0.24; BHI+PEG+HS, 8.24±0.20 vs. 6.97±0.20; BHI+glycerol+HS, 8.59±0.32 vs. 7.93 ±0.43; BHI+glycerol+sucrose+HS, 8.66±0.21 vs. 7.99±0.36; BHI+HS (control B), 8.01±0.17 vs. 6.95±0.14]. The differences were statistically significant for these stock cultures (p=0.001, p=0.000, p=0.004, p=0.000, p=0.001, respectively) (Figure 1).

While there was a nearly 1 log reduction in bacterial colony counts for glycerol and glycerol+sucrose supplemented stock cultures maintained at -20°C, the three other stock cultures (DMSO, PEG and control B) showed almost 2 log reduction in colony count number. The control B stock culture samples were also able to maintain bacterial culturability as high as in DMSO and PEG supplemented stock cultures. The

glycerol+sucrose and glycerol supplemented stock media could support the viability or culturability of *H. pylori* at -20°C for one month, better than other cryoprotective agents (Figure 2). The differences between recovery rate of bacterial colonies of these stock cultures and others were significant for the following media: glycerol and DMSO (p=0.005); glycerol and PEG (p=0.000); glycerol and control A (p=0.004); glycerol+sucrose and DMSO (p=0.003); and glycerol+sucrose and PEG (p=0.000). However, the higher recovery rate observed for glycerol+sucrose at -20°C was not found to be statistically significant from that of glycerol-supplemented stock cultures (p=0.970).

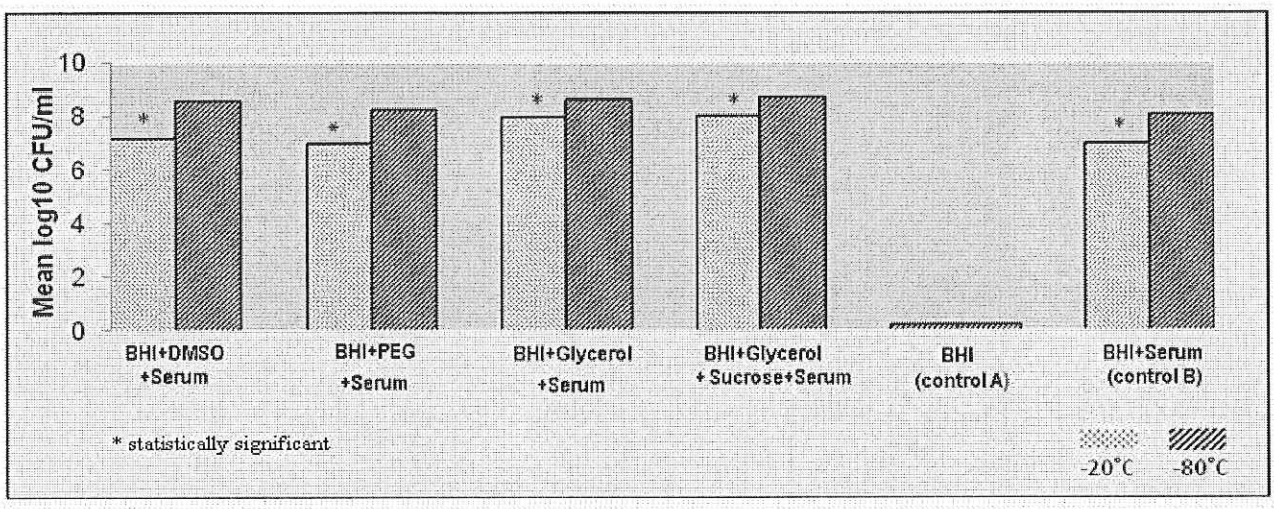


Figure 1. The recovery rate of *H. pylori* NCTC 11637 standard strain after one month of maintenance as various stock cultures at -20°C and -80°C, determined by spread plate colony count method.

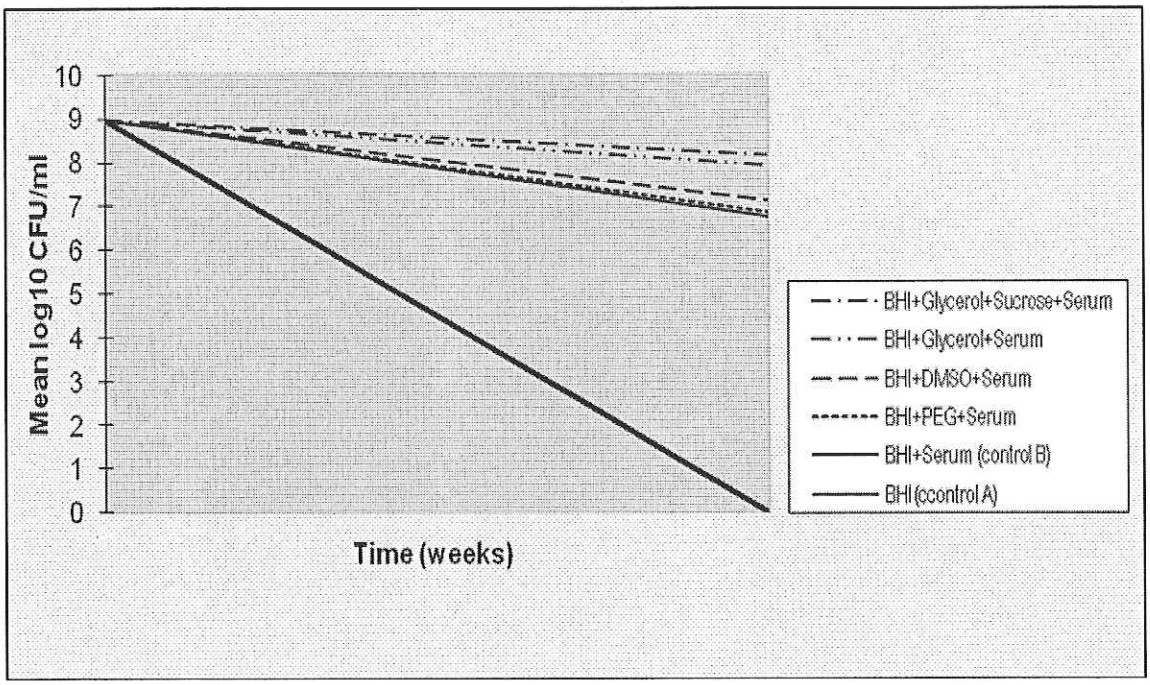


Figure 2. The log10 changes in viability of *H. pylori* NCTC 11637 standard strain maintained as various stock cultures for one month at -20°C, determined by the spread plate colony count method.

Preservation at -80°C resulted in less log reduction in bacterial colony counts compared to preservation at -20°C. The log reduction in bacterial colony counts for stock cultures supplemented with DMSO, PEG, glycerol and glycerol+sucrose were 0.4, 0.71, 0.36 and 0.29, respectively. While there were no colonies formed with control A stock culture samples, which showed 8.95 log reduction, the control B stock culture samples could maintain the culturability of bacteria as high as 8.01 and showed about 1 log reduction after one month preservation of bacteria at -80°C. Stock cultures supplemented with glycerol+sucrose, glycerol and DMSO (in descending order) could support the viability or culturability of *H. pylori* at -80°C, better than other cryoprotective agents, for one month (Figure 3). The differences between recovery rate of bacterial colonies from these stock cultures and others were statistically significant for the following media: glycerol+sucrose and control A (p=0.000); glycerol and control A (p=0.000); glycerol and PEG (p=0.035); DMSO and PEG (p=0.008); DMSO and control A (p=0.000). Despite the higher recovery rate observed for glycerol+sucrose-supplemented stock cultures, the differences between three stock cultures were not found to be statistically significant for the following media: glycerol and glycerol+sucrose (p=1.000); DMSO and glycerol+sucrose (p=0.218); and DMSO and glycerol (p=0.579).

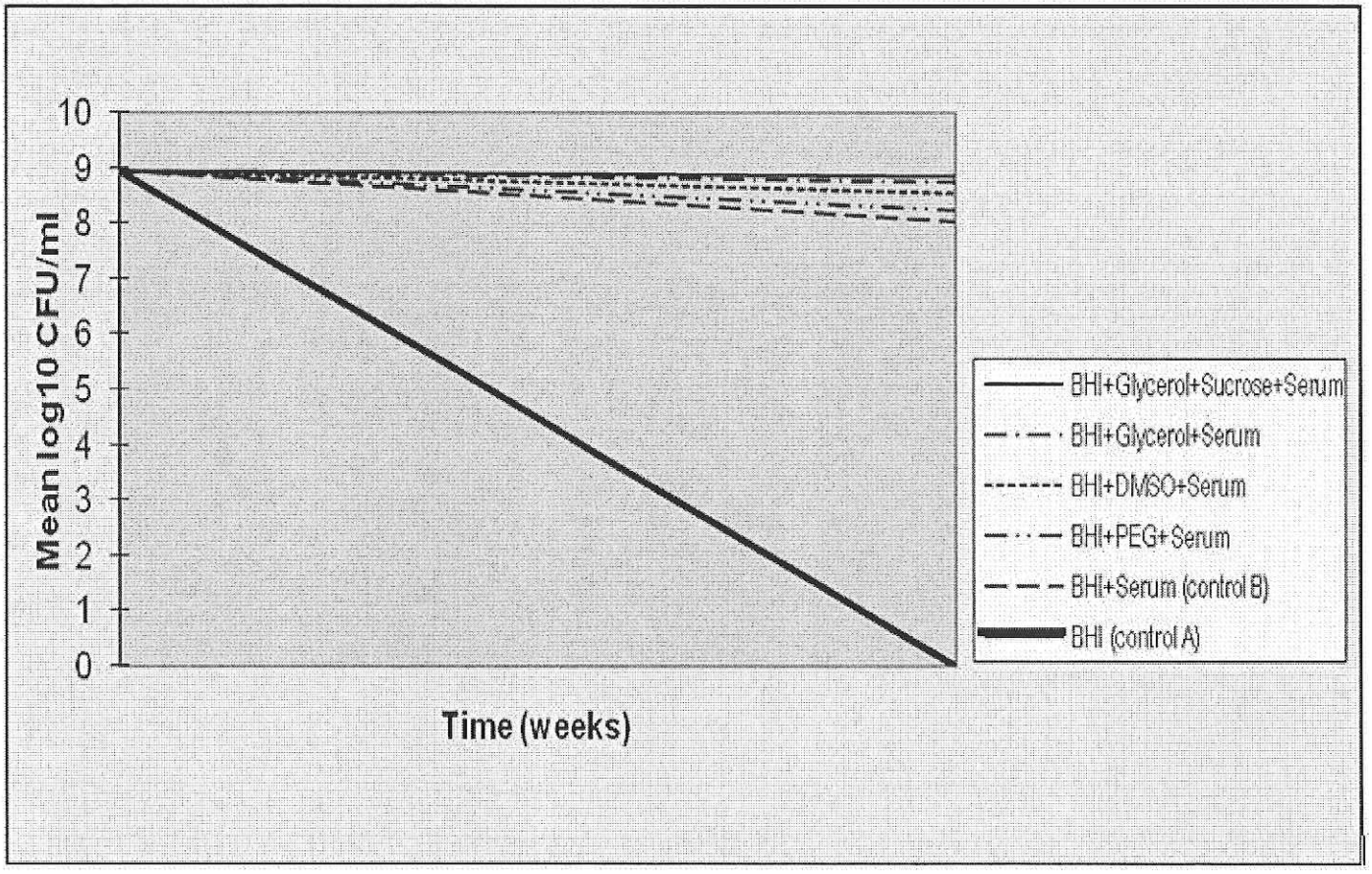


Figure 3. The log10 changes in viability of *H. pylori* NCTC 11637 standard strain maintained in various stock cultures for one month at -80°C, determined by the spread plate colony count method.

DISCUSSION

Culture and maintenance of bacterial strains without loss of culturability is crucial for carrying out antimicrobial susceptibility testing as well as for studying virulence factors. Studies conducted on the preservation of *H. pylori* may also be useful in developing transport media for optimal recovery of the organism from gastric biopsy specimens (10, 15). Despite the availability of many methods, cryopreservation of living bacteria at a low temperature is the most commonly accepted way to stabilize cultures for long-term storage. It decreases contamination and genotypic and phenotypic variations, and eliminates the need for media that are expensive and require time- consuming preparation (3, 7, 21). The purpose of this study was to evaluate different cryoprotectants in preserving *H. pylori* during freezing and to determine the more protective agent in survival or recovery of *H. pylori* from frozen stock cultures. Our results obtained from different cryoprotectant-supplemented stock cultures showed that *H. pylori* type strain NCTC 11637 could be better preserved at -80°C than -20°C. At least 0.3 - 1 log reduction in bacterial recovery were seen for all stock cultures maintained at -20°C and -80°C for one month, respectively. It has been shown that storage temperatures below –130°C were critical for the long-term stability of bacterial cultures, because this is the point at which ice crystal formation stops. At temperatures above –130°C, ice crystals continue to grow and reform (3). Ohkusa et al. demonstrated that unlike with other intestinal bacteria, the preservation of *H. pylori* strains in saline at 4°C, -20°C and even at -80°C results in failure of bacterial recovery and infectivity in Mongolian gerbils due to changes from the bacillary to coccoid form (16).

Some species of bacteria including *H. pylori* enter a physiologically dormant phase or so-called viable but non-culturable (VBNC) state when faced with environmental stresses. Stresses such as elevated osmotic levels and oxygen concentration, low nutrients and incubation at tempratures unsuitable for growth could make the organism enter this state. It has been shown that these non- culturable coccoid forms differ from culturable forms which undergo starvation and have significantly low metabolism (17). These results showed that agents were needed to be added into stock media to protect bacteria from freezing stress.

In spite of reports about the toxicity of glycerol (7), our study showed that this agent had a more protective effect against freezing stress. Glycerol-supplemented stock media were significantly more protective at -20°C and -80°C in comparison to other cryoprotectant-supplemented stock cultures. This effect was also more significant when stock cultures were preserved at -80°C rather than at -20°C. Our results with glycerol were similar to those of Han et al. in which *H. pylori* was preserved with greater viability at -70°C than -20°C when glycerol-containing media such as skim milk, Brucella broth and cysteine-Albimi broth were used. Lactose which is present in skim milk might have contributed to improving the viability of *H. pylori* (9) by a similar mechanism, with regard to sucrose in our study.

The mechanism by which intracellular glycerol confers resistance to freezing stress has been explained by Izawa et al. They found increased levels of intracellular glycerol in knockout mutants of glycerol dehydrogenase genes in *Saccharomyces cerevisiae*, resulting from a decrease in glycerol dehydrogenase activity in comparison to wild types. This increase in intracellular glycerol confers more tolerance to freeze-thawing stress. Despite preventing ice crystal formation, the effects of increased intracellular glycerol on freeze tolerance may arise partly from changes in lipid composition (12, 21).

The growth supportive feature of bovine and human serum has been described by Shibayama et al. and Paik et al., respectively. By heating at 56°C for 30 min and inactivating complement which is the major bactericidal substance in bovine as well as human serum, they developed agar culture media for *H. pylori* growth (18, 22). Our results demonstrated that heat-inactivated fresh human serum could also preserve bacteria from freezing stress. This preservation was as high as with DMSO- and PEG-supplemented stock cultures with the values of 8 and 7 mean log CFU/ml for bacterial recovery at

-20°C and -80°C, respectively. The mechanism by which serum could protect bacteria has been mentioned by Albertson et al. Bovine serum albumin could reduce the toxic effects of fatty acids which are inhibitory substances for *H. pylori*. The absorption of cholesterol from serum as a growth factor for *H. pylori* might be another mechanism. Furthermore, the higher MICs of some chemical agents seen in serum-supplemented media could explain the reduction in bactericidal activity by serum (1).

Shahamat et al. suggested that the high concentration of serum in stock cultures containing glycerol may increase protection and prevent the destruction of internal structures of the bacteria due to ice crystal formation during the freezing process (21). Only control group A with BHI broth failed to yield any apparent colony counts; however, Kitsos et al. found that even Brucella broth alone could support some recovery of *H. pylori* at -80°C (14). This may be due to the type of bacterial strain, stock medium and culture medium, as well as the dilutions used for colony counts.

El-Shewy et al. showed that high-molecular weight compounds such as glycerol and DMSO had a more destructive effect on rat islet cell integrity and function than low-molecular ones such as PEG (7). Our study revealed that DMSO and PEG were also good cryoprotective agents, and we observed that the PEG-supplemented stock media were less effective than media with glycerol or DMSO in supporting the viability of *H. pylori*.

We also observed that the addition of 0.3 M sucrose to stock media resulted an increase in viability or culturability of *H. pylori* from stock cultures. Sato et al. showed that the addition of glucose to a liquid culture medium increased the culturability of *H. pylori* from a long-term culture. The highest culturability was obtained using liquid culture medium supplemented with 300 mM glucose. Glucose could prevent bacteria from changing from the proliferating spiral form to non culturable coccoid form (20). Our study showed a higher recovery of *H. pylori* from glycerol+sucrose-supplemented stock cultures than from glycerol alone. The sucrose used in our study might have the same protective mechanism in maintaining bacterial culturability from stock cultures. Another possibility was that the addition of sucrose at an optimal concentration might have altered osmotic pressure and caused dehydration of *H. pylori*, thereby reducing damage due to less ice crystal formation.

Albertson et al. showed that the addition of a carbon source such as glucose had no effect on the growth rate of *H. pylori* but that the viability of the organisms in the culture medium was retained after prolonged incubation. This slower conversion of bacteria to the non-culturable form could depend on the oxidative metabolism of *H. pylori* (1). Indeed, Hossain et al. demonstrated the protective effects of sucrose alone at concentrations of 100-300 mM in the survival of frozen human sperm (11).

Since we added only 0.3 M sucrose and since the results were not statistically significant, we suggest further investigation of various sucrose concentrations for improving the viability of *H. pylori* in stock cultures. In this study, we found that sucrose was effective in the cryopreservation of *H. pylori*. Its combination with BHI, glycerol and human serum resulted in a higher survival or culturability of *H. pylori* compared to other conventional stock media such as BHI with glycerol, although the difference was not statistically significant. Furthermore, the use of human serum in the culture and maintenance of *H. pylori* may be preferred, instead of bovine serum in which bovine spongiform encephalopathy (BSE) or other infections can be of serious concern (24).

In conclusion, our study showed that *H. pylori* type strain NCTC 11637 could be better preserved at -80°C than -20°C. The best stock medium that supported viability or culturability of bacteria was BHI+glycerol+human serum and BHI+glycerol +sucrose+human serum, where the latter gave a higher recovery rate. However, the difference was not found to be statistically significant. Our study also revealed that fresh human serum was a good, as well as more convenient, supplement for the growth and maintenance of *H. pylori* with less contamination.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Assoc. Prof. Dr. Müge Demirbilek (Department

of Microbiology and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Başkent University, Ankara, Turkey) for providing the standard reference strain *H. pylori* NCTC 11637.

REFERENCES

1. Albertson, N.; Wenngren, I.; Sjostrom, J.E. (1998). Growth and survival of *Helicobacter pylori* in defined medium and susceptibility to Brij 78. *J. Clin. Microbiol.* 5,1232–1235.
2. Ansorg, R.; Von Recklinghausen, G.; Pomarius, R.; Schmid, E.N. (1991). Evaluation of techniques for isolation, subcultivation and preservation of *Helicobacter pylori. J. Clin. Microbiol.* 1,51-53.
3. ATCC Connection. (2006). Cryogenic preservation of bacteria, growth and preparation for cryopreservation. Available at: http://www.atcc.org
4. Azevedo, N.F.; Almeida, C.; Cerqueira, L.; Dias, S.; Keevil, C.W.; Vieira, M.J. (2007). Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 10, 3423–3427.
5. Beswick, E.J.; Suarez, G.; Reyes, V.E. (2006). *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World. J. Gastroenterol.* 35,5599-5605.
6. Davoudi Oskouei, D.; Bekmen, N.; Demiray, E.; Soyturk, M; Sarioglu, S.; Yılmaz, Ö. (2008). Comparison of different blood supplements in culture media for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. European Helicobacter Study Group XXIth International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation. Riga, Latvia, P117. *Helicobacter.* 13,456.
7. El-Shewy, H.M.; Kendall, W.F.; Darrabie, M.; Collins, B.H.; Opara, E.C. (2004). Polyvinyl pyrrolidone: A novel cryoprotectant in islet cell cryopreservation. *Cell. Transplant.* 13(3), 237-243.
8. Fujita, Y.; Yamaguchi, K.; Kamegaya, T.; Sato, H.; Semura, K.; Mutoh, K.; Kashimato, T.; Ohori, H.; Mukai, T. (2005). A novel mechanism of autolysis in *Helicobacter pylori*: Possible involvement of peptidergic substances. *Helicobacter.* 6,567-576.
9. Han, S.W.; Flamm, R.; Hachem, C.Y.; Kim, H.Y.; Clarridge, J.E.; Evans, D.G.; Beyer, J.; Drnec, J.; Graham, D. (1995). Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14,349-352.
10. Heep, M.; Scheibl, K.; Degrell, A.; Lehn, N. (1999). Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori. J. Clin. Microbiol.* 11,3764–3766.
11. Hossain, A.; Islam, N.; Caruso, A.; Madanes, A. (2003). Human sperm cryopreservation using sucrose as a cryoprotectant shows a promising future. *Fertil. Steril.* 80 (Suppl 3),239-240.
12. Izawa, S.; Sato, M.; Yokoigawa, K.; Inoue, Y. (2004). Intracellular glycerol influences resistance to freeze stress in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of a quadruple mutant in glycerol dehydrogenase genes and glycerol-enriched cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66,108-114.
13. Jiang, X.; Doyle, M.P. (2000). Growth supplements for *Helicobacter pylori. J. Clin. Microbiol.* 5,1984–1987.
14. Kitsos, C.M.; Stadtlander, C.T.K.H. (1998). *Helicobacter pylori* in liquid culture: Evaluation of growth rates and ultrastructure. *Curr. Microbiol.* 37,88–93.
15. Megraud, F.; Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol.* 2,280-322.
16. Ohkusa, T.; Miwa, H.; Endo, S.; Okayasu, I.; Sato, N. (2004). *Helicobacter pylori* is a fragile bacteria when stored at low and ultra-low temperatures. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19,200–204.
17. Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J.Microbiol.* 43,93-100.
18. Paik, I.K.; Kim, Y.S.; Shin, W.C.; Lee J.H. (2001). Comparison of selective media for culture of *Helicobacter pylori. Korean J. Clin. Microbiol.* 4(1),11-15.
19. Saito, N.; Konishi, K.; Kato, M.; Takeda, H.; Asaka, M.; Ooi, H.K. (2008). Coccoid formation as a mechanism of species-preservation in *Helicobacter pylori*: an ultrastructural study. *Hokkaido. Igaku. Zasshi.* 5,291-295.
20. Sato, F.; Saito, N.; Konishi, K.; Shoji, E.; Kato, M.; Takeda, H.; Sugiyama, T.; Asaka, M. 2003. Ultrastructural observation of *Helicobacter pylori* in glucose-supplemented culture media. *J. Med. Microbiol.* 52,675–679.
21. Shahamat, M.; Paszko-Kolva, C.; Mai, U.E.; Yamamoto, H.; Colwell, R.R. (1992). Selected cryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J. Clin. Pathol.* 45,735-736.
22. Shibayama, K.; Nagasawa, M.; Ando, T.; Minami, M.; Wachino, J.; Suzuki, S.; Arakawa, Y. (2006). Usefulness of adult bovine serum for *Helicobacter pylori* culture media. *J. Clin. Microbiol.* 11,4255–4257.
23. Spengler, A.; Gross, A.; Kaltwasser, H. (1992). Successful freeze storage and lyophilisation for preservation of *Helicobacter pylori. J. Clin. Pathol.* 45,737.
24. Toyosawa, T.; Sasaki, M.; Kato, Y.; Yamada, H.; Terada, S. (2008). Development of a novel serum-free cryopreservative solution. *Cell. Technology. Cell. Products.* 225–231.

Pharm. Pharmacol. Commun. 2000, 6: 173–177
Received January 17, 2000
Accepted February 9, 2000

© 2000 Pharm. Pharmacol. Commun.

Effect of Pretreatment with Omeprazole on the Frequency of *Helicobacter pylori* Colonization in the Antrum and Gastric Body of Non-germ-free Immature Rats

AHMAD REZA DEHPOUR, AKBAR MIRSALEHIAN*, FARROKH AKBARI NAKHJAVANI*, DARYOOSH DAVOODI OSKOEI*, ALI REZA MANI, SAIED AMANPOUR†, KATAYOUN FAYAZ MOGHADAM‡ AND ZAHRA ATAEI‡

*Department of Pharmacology, *Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, P. O. Box 13145-784, Tehran, Iran, †Department of Laboratory Animals, Razi, Serum and Vaccine Research Institute and ‡Department of Molecular Biology, Iranian Blood Transfusion Service, Tehran, Iran*

Abstract

Differences between the colonization sites of *Helicobacter pylori* might explain the different patterns of *H. pylori*-induced gastrointestinal pathology. The migration of *H. pylori* from the antrum to the gastric body and fundus during omeprazole monotherapy has been reported in *H. pylori*-infected subjects. The aim of this study was to determine the influence of pretreatment with omeprazole on later colonization by *H. pylori*, by use of the rapid urease test, culture, and the polymerase chain reaction on gastric samples obtained from the antrum and gastric body of non-germ-free immature rats.

Pretreatment of rats with omeprazole did not significantly affect the incidence of *H. pylori* colonization during the four-week study. The preferred ecological niche of *H. pylori* in rats was the antrum rather than the gastric body. This difference was significant in animals not treated with omeprazole but not in treated groups, i.e. frequent injection of omeprazole led to the equal distribution of *H. pylori* in the antrum and gastric body.

If clinical investigations confirm these results more precautions should be taken in omeprazole monotherapy because it is well known that *H. pylori* colonization of the gastric body is associated with multifocal gastric atrophy, an important risk factor in gastric adenocarcinoma.

Omeprazole, a potent proton-pump inhibitor, is a well tolerated drug frequently used in gastro-oesophageal reflux disease and *Helicobacter pylori* eradication regimens (Reilly 1999). In addition to its role in acid suppression, the chemotherapeutic effects of omeprazole have also been described (Logan 1996). Omeprazole is active against *H. pylori* in-vitro with minimum inhibitory concentrations that compare favourably with those of bismuth salts; it is also an inhibitor of urease, a bacterial enzyme essential for colonization by *H. pylori* (Logan 1996). Proton-pump-inhibitor monotherapy cannot eradicate *H. pylori* colonization (Logan 1996). Logan et al (1995) reported that after four weeks treatment of *H. pylori*-positive patients with omeprazole the histological density of *H. pylori* in the antrum was reduced whereas in the fundus it was increased. The migration of *H. pylori* from antrum to fundus during omeprazole therapy showed the importance of local acid production in the distribution of *H. pylori* in the stomach. This observation was replicated in *H. felis*-infected specific-pathogen-free BALB/c mice (Danon et al 1995). In untreated *H. felis*-infected animals the preferred ecological niche was the antrum, which contains low numbers of parietal cells, and omeprazole treatment induced migration of the bacteria to the parietal cell-rich portion of the stomach (body of the gastric mucosa).

Differences between colonization sites of the bacteria might explain the different patterns of *H. pylori*-induced gastrointestinal pathology (Van Zanten et al 1999). *H. pylori* colonization of the antrum is associated with diffuse antral gastritis and

Correspondence: A. R. Dehpour, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, P. O. Box 13145-784, Tehran, Iran.

duodenal ulceration whereas colonization of the gastric body and fundus of the gastric mucosa by the bacteria is associated with multifocal atrophic gastritis and gastric ulceration, which is a risk factor in related adenocarcinoma (Van Zanten et al 1999). To prevent migration of *H. pylori* to the gastric body and fundus, omeprazole monotherapy must not be considered without antimicrobial therapy in *H. pylori*-positive patients. Omeprazole monotherapy is currently used in *H. pylori*-negative patients suffering from gastro-oesophageal reflux disease. The aim of this study was to determine the influence of omeprazole pretreatment on later colonization by *H. pylori* in non-germ-free immature rats, a new animal model for *H. pylori* infection (Amanpour et al 1999).

Materials and Methods

Animals

The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1985). One hundred and ten non-germ-free, immature (35–45 g) Sprague–Dawley rats were used in this experiment (Razi, Serum and Vaccine Research Institute, Iran). These rats were divided into 11 groups. The rats were given free access to a standard pellet diet and water. Access to food, but not water, was discontinued 24 h before bacterial inoculation.

Bacterial inoculum

A freshly isolated strain of *H. pylori* obtained from a gastric biopsy specimen of a patient with duodenal ulcer was used in this study. The bacterial isolate was confirmed as *H. pylori* on the basis of characteristics of the organism—Gram-negative spiral rod with oxidase-, catalase- and urease-positive results, negative reaction for nitrate reduction, sensitivity to cephalothin and resistance to nalidixic acid (Megraud 1995; Owen 1995). *H. pylori* was grown in trypticase soy broth (Difco, UK) containing 10% foetal bovine serum, in a flask with a porous stopper placed inside a GasPak jar at 37°C under microaerobic conditions (Anaerocult C, Merck). The culture was stirred continuously by means of a magnetic stirrer (Cenco Instruments, Breda, The Netherlands). *H. pylori* 72-h broth culture was administered as inoculum immediately after preparation. We also ensured the bacteria had typical morphology in Gram staining and corkscrew-like motility in wet-mount preparation.

Experimental design

All rats were housed in special stainless steel cages to prevent coprophagy. After 24 h fasting, omeprazole (Uquifa, Spain; 80 mg kg^{-1}) was injected intraperitoneally into six groups of rats (Kashefi et al 1995) as a single dose whereas the other five groups received normal saline in the same manner. After 2 h bacterial inoculum (1 mL) containing *H. pylori* at a concentration of $1{\cdot}5 \times 10^8$ colony-forming units mL^{-1} was administered orally via a feeding needle to all the rats except two control groups. The rats were transferred to standard cages and fed 6 h after inoculation. Rats were killed with CO_2 1, 2, 3 or 4 weeks after inoculation. The stomachs were removed under aseptic conditions and small specimens (2-mm square) of antrum and gastric body were taken using sterile instruments and examined for *H. pylori* colonization by use of the rapid urease test (Megraud 1995), culture, and the polymerase chain reaction (PCR). To investigate the role of long-term acid suppression on *H. pylori* colonization, we studied one group of rats given frequent omeprazole injection (80 mg kg^{-1}) every other day for 2 weeks.

Microbiology

Gastric samples were washed with phosphate-buffered saline (PBS; 1 mL), homogenized with PBS (0·2 mL) and used to inoculate Columbia agar plates containing 10% defibrinated sheep blood, supplemented with vancomycin (10 mg L^{-1}), polymyxine B (2500 IU L^{-1}), amphotericin B (2 mg L^{-1}) and trimethoprim (5 mg L^{-1}). Plates were incubated at 37°C in a GasPak jar for 4–7 days under microaerobic conditions and bacterial isolates with the typical characteristics of *H. pylori* were identified by use of biochemical tests and measurement of susceptibility to cephalotin and nalidixic acid (Goodwin & Armstrong 1990; Megraud 1995; Owen 1995).

DNA extraction and PCR

Briefly, DNA was extracted from gastric tissues and amplified for PCR-detection of *H. pylori* using Avicenna-11.P-PCR set obtained from Avicenna Medical Centre (Moscow, Russia). The primers 5′ AAG CTT TTA GGG GTG TTA GOG GTT T-3′ and 5′ AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC-3′ used for PCR were specific for the *H. pylori* urease (*ureA*, *ureB*, *ureC* and *ureD*) genes (5100 base pairs). PCR products were detected by agarose gel electrophoresis. The presence of a particular amplification fragment (240 base pairs) was detected by comparison with Boehringer-

Mannheim marker No. 8. The procedures described above were conducted as outlined by the manufacturer.

Statistical analysis

All data express the number (%) of rats which tested positive. Fisher's exact test was used for analysis of data and $P < 0{\cdot}05$ was considered significant.

Results

Figure 1 shows the results obtained from the rapid urease test, from culture, and from PCR for the antrum and gastric body samples. The amount (%) of rats giving a positive result is indicated in this figure. It is apparent that results from the rapid urease test, from culture, and from PCR were negative for all the control groups but positive for some of the rats inoculated with *H. pylori*.

H. pylori colonization of the antrum and gastric body of the rats, two weeks after bacterial inoculation, is compared in Figure 2. As shown in this figure, *H. pylori* has colonized the antrum significantly ($P < 0{\cdot}05$) more frequently than the gastric body in rats not treated with omeprazole, but not in animals given single or frequent injection of omeprazole.

Discussion

This study has shown that *H. pylori* can temporarily colonize non-germ-free immature rats. The maximum rate of colonization was found to be at the end of the second week, and the number of colonized rats decreased as the number of weeks after inoculation with *H. pylori* increased. Results obtained from the rapid urease test for detection of *H. pylori* were correlated with PCR findings and both were of high sensitivity and specificity. The sensitivity of the culture method was very low, probably because of the small number of bacteria colonizing gastric tissues.

Pretreatment of rats with omeprazole did not alter the incidence of *H. pylori* colonization signifi-

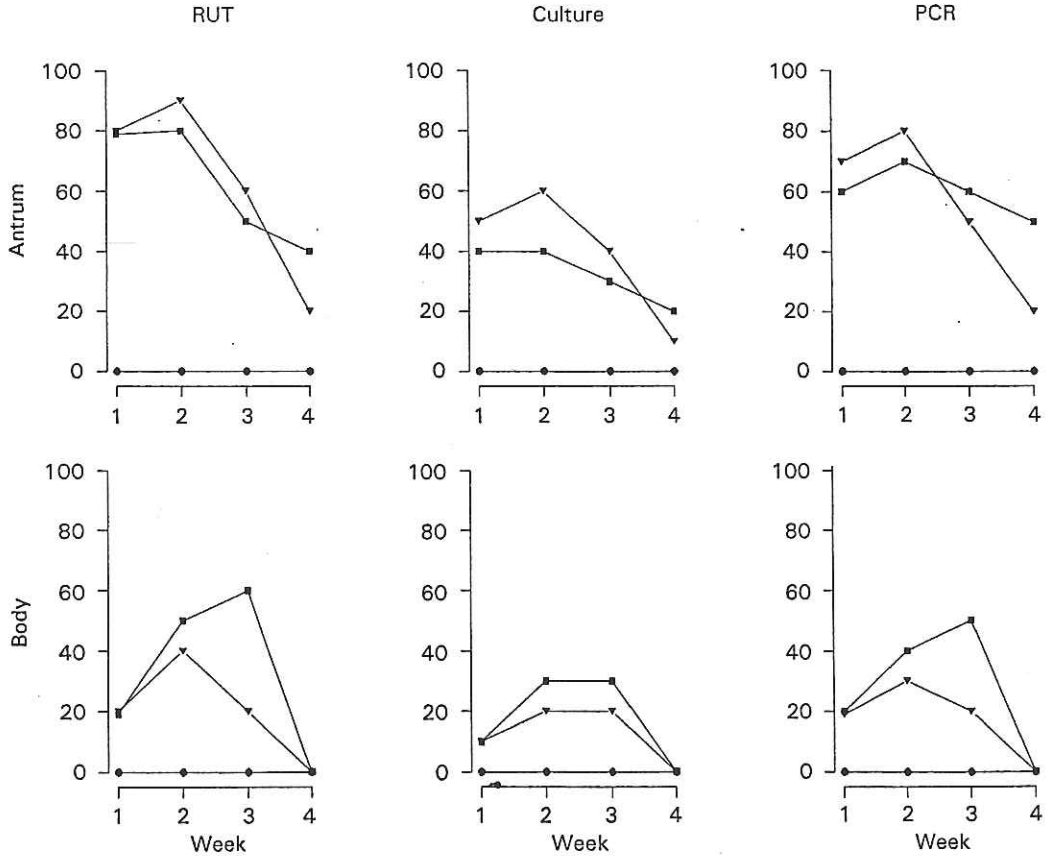


Figure 1. Comparison of results from the rapid urease test (RUT), from culture, and from polymerase chain reaction (PCR) for antrum and gastric body after *H. pylori* inoculation. The vertical axis shows the number (%) of animals giving a positive result. ▼, *H. pylori*-inoculated rats pretreated with normal saline; ■, *H. pylori*-inoculated rats pretreated with omeprazole; ●, control rats. There is no statistically significant difference between results from *H. pylori*-inoculated rats.

cantly during the four-week study. The preferred ecological niche of *H. pylori* in rats was the antrum rather than the body. This difference between antrum and body was significant in rats not treated with omeprazole but not in treated groups, and the results showed that frequent injection of omeprazole led to the equal distribution of *H. pylori* in antrum and body (Figure 2).

Omeprazole is a powerful gastric proton-pump inhibitor widely used in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease and peptic ulcers in man. Our results showing the effect of omeprazole on *H. pylori* infection of the antrum and gastric body are consistent with the hypothesis that local acid output is a crucial determinant in the distribution of *Helicobacter* species in the stomach. Some of these findings are in agreement with those obtained by Danon et al (1995) from experiments on mice infected with *H. felis* and those of Logan et al (1995) from *H. pylori*-infected man after treatment with omeprazole. This contrasts with in-vitro studies showing that omeprazole is a potent inhibitor of *H. pylori* urease, a virulence factor which has an essential role in gastric colonization by the bacteria (Kuhler et al 1995; Tsuchiya et al 1995).

Our in-vivo study demonstrated that omeprazole as a single dose or as frequent doses of 80 mg kg^{-1} could not prevent *H. pylori* colonization and had no effect in the eradication of the organism. The drug did not increase the frequency of *H. pylori* growth in the rat model. Differences between local acid output might explain the different patterns of *H. pylori*-induced gastroduodenal pathology (Lee 1991; Van Zanten et al 1999). *H. pylori* colonization of the antrum is associated with diffuse antral gastritis and duodenal ulceration whereas colonization by the bacteria of the gastric body and fundus of the gastric mucosa is associated with multifocal atrophic gastritis and gastric ulceration, which is a risk factor in related adenocarcinoma (Van Zanten et al 1999). The precise mechanism of this difference is not clearly understood but the pathophysiological implication of N^{α}-methylhistamine and its interaction with H_3 receptors of different parts of the gastric mucosa have been proposed (Courillon-Mallet et al 1995).

Lundell et al (1999) reported that acid suppression therapy in the form of omeprazole maintained for 3 years did not facilitate the development of gastric glandular atrophy of the gastric body mucosa in *H. pylori*-infected patients with gastro-oesophageal reflux disease. Although this study did not include comparison of histopathological changes among experimental groups, our results suggest the advisability of a more comprehensive study for assessment of the safety of omeprazole administration without antimicrobial therapy.

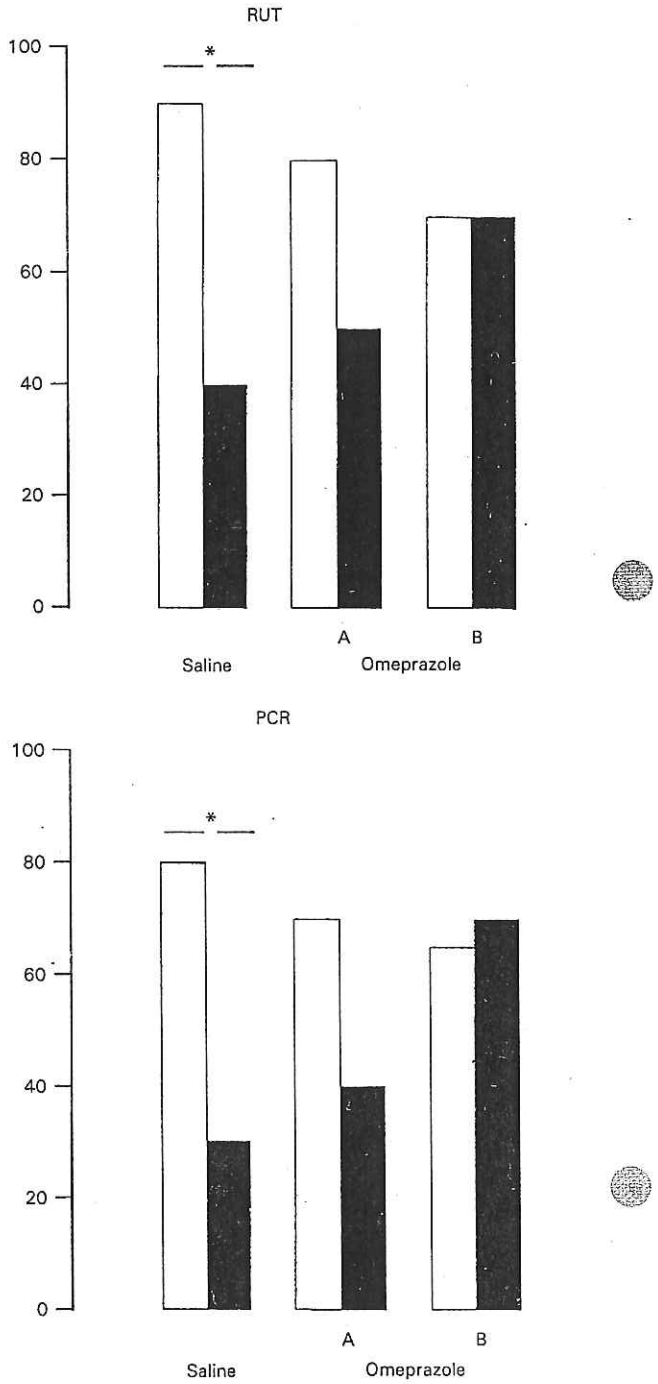


Figure 2. Comparison of *H. pylori* colonization of the antrum (□) and gastric body (■) of rats two weeks after bacterial inoculation. The vertical axis shows the number (%) of rats giving a positive result. A. rats receiving a single dose injection of omeprazole (80 mg kg^{-1}) before bacterial inoculation; B. animals receiving frequent injections of omeprazole (80 mg kg^{-1}, administration every other day). * $P < 0.05$ (Fisher's exact test).

Acknowledgements

We thank Mrs Gaziyan, Miss Pasandideh, Miss Neuroosnia and Mr Ghafari, Department of Molecular Biology of IBTS, for their cooperation. This work was supported by a grant from Razi, Vaccine and Serum Research Institute, Iranian Blood Transfusion Service and the company Uquifa.

References

Amanpour, S., Dehpour, A. R., Mirsalehian, A., Divoodi Oskoei, D., Fayaz Moghadam, K., Mani, A. R. (1999) *Helicobacter pylori* colonization in not-germ-free immature rats: an animal model for *H. pylori* infection.Abstract, 26th World Veterinary Congress (WVA), 1999 September 23–26, Lyon, France

Courillon-Mallet, A., Launay, J. M., Roucayrol, A. M., Callebert, J., Emond, J. P., Tabuteau, F., Cattan, D. (1995) *Helicobacter pylori* infection: physiopathologic implication of N^{α}-methylhistamine. Gastroenterology 108: 959–966

Danon, S. J., O'Rourke, J. L., Moss, N. D., Lee, A. (1995) The importance of local acid production in the distribution of *Helicobacter felis* in the mouse stomach. Gastroenterology 108: 1386–1395

Goodwin, C. S., Armstrong, J. A. (1990) Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 1–13

Kashefi, K., McDougall, C. J., Dannenberg, A. J. (1995) Comparative effects of omeprazole on xenobiotic metabolizing enzymes in the rat and human. Clin. Path. Ther. 58: 625–630

Kuhler, T. C., Fryklund, J., Bergman, N. A., Weilitz, J., Lee, A., Larsson, H. (1995) Structure–activity relationship of omeprazole and analogues as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. J. Med. Chem. 38: 4906–4916

Lee, A. (1991) Spiral organisms: what are they? A microbiologic introduction to *Helicobacter pylori*. Scan. J. Gastroenterol. 187(Suppl. 26): 9–12

Logan, R. P. (1996) The chemotherapeutic effects of H^+/K^+ inhibitors on *Helicobacter pylori* infection. Pharmacol. Ther. 69: 79–83

Logan, P. R., Walker, M. M., Misiewicz, J. J., Gummett, P. A., Karim, Q. N., Baron, J. H. (1995) Changes in the intragastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. Gut 36: 12–16

Lundell, L., Meittinen, P., Myrvold, H. E., Pedersen, A. A., Thor, K., Andersson, A., Hattlebakk, J., Havu, N., Janatuinen, E., Levander, K., Liedman, B., Nystrom, P., The Nordic Gastro-oesophageal Reflux Disease Study Group. (1999) Lack of effect of acid suppression therapy on gastric atrophy. Gastroenterology 117: 319–326

Megraud, F. (1995) Diagnosis of *Helicobacter pylori*. In: Calam, J. (ed) *Helicobacter pylori*, Bailliere's Clinical Gastroenterology. Bailliere Tindall, London, 9: 507–518

Owen, R. G. (1995) Bacteriology of *Helicobacter pylori*. In: Calam, J. (ed) *Helicobacter pylori*. Bailliere's Clinical Gastroenterology. Bailliere Tindall, London, 3: 415–446

Reilly, J. P. (1999) Safety profile of proton-pump inhibitors. Am. J. Health. Sys. Pharm. 56: S11–S17

Tsuchiya, M., Imamura, L., Park, J. B., Kobashi, K. (1995) *Helicobacter pylori* urease inhibition by rebeprazole, a proton pump inhibitor. Biol. Pharm. Bull. 18: 1053–1056

Van Zanten, S. J. O. V., Dixon, M. F., Lee, A. (1999) The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. Gastroenterology 116: 1217–1229

Discover this journal online at
Wiley Online Library
wileyonlinelibrary.com

Volume 24 Supplement 1 September 2019 ISSN 1083-4389

Helicobacter

EDITOR: David Y. Graham, M.D.

The Year in Helicobacter 2019

Guest Editors: Francis Mégraud & Peter Malfertheiner

WILEY

from different diseases mainly clustered with HpAsia clades and were widely grouped into different clades. The average nucleotide diversity of oipA, babA, sabA and homB gene from different diseases were 0.023, 0.065, 0.107 and 0.081 with positive selection.

Conclusions: oipA, babA, sabA and homB gene of *H. pylori* are highly prevalent and diverse, but no significant association with the clinical outcomes or histopathological changes was found among patients in China. The four OMPs are geographically distributed and under positive selection, among which sabA gene is the most highly genetic polymorphism.

Q. Zhao: None. C. Song: None. K. Wang: None. D. Li: None. Y. Yang: None. D. Liu: None. N. Zhou: None. Y. Xie: None.

P6.11 | *Helicobacter pylori*-induced DNA damage is a potential driver for human gastric cancer AGS cells

S. Yanyan; P. Wang; Y. Guo; X. Liang; Y. Li; S. Ding

Peking University Third Hospital, Beijing, China

Aims: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a major cause of gastric cancer. This study was aimed to explore the characteristic of DNA damage induced by *H. pylori* infection in gastric cancer AGS cells.

Results: After infection with *H. pylori*, the ROS levels in AGS cells were significantly higher than those in the uninfected cells. Cells with longer comet tails were detected after infection with *H. pylori*. The number of APE1- and γH2AX-positive cells was significantly increased compared to the number of negative control cells. The expression of pChk1 and pChk2 was significantly upregulated by *H. pylori* infection. Cell growth was inhibited after *H. pylori* infection. All these results were dose-dependent. The cell alterations were more significant upon infection with *H. pylori* at an MOI of 100:1 than at an MOI of 50:1.

Conclusions: *H. pylori* infection can induce DNA single-strand breaks, DNA double-strand breaks and cell cycle checkpoint activation following ROS generation in the gastric cancer cell line AGS, which is a potential driver for gastric cancer.

S. Yanyan: None. P. Wang: None. Y. Guo: None. X. Liang: None. Y. Li: None. S. Ding: None.

P6.12 | *Helicobacter pylori*, gastroesophageal reflux disease (GERD) and gastritis in children

V. A. Vshivkov; T. V. Polivanova; **V. V. Tsukanov**

Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences – Scientific Research Institute for Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

The role of *H. pylori* in gastritis development had been proved, but at the same time GERD is not discussed.

Aim of the research: To study *H. pylori* in GERD children with different activity of gastritis and association of these diseases with bacterial invasion.

Material and Methods: We examined 309 schoolchildren with gastroenterological complains in the ages from 7 to 17 years. GERD diagnostics was made in accordance with Montreal consensus (Vakil N. et al., 2006). All of them were performed gastroscopy with biopsy sampling from stomach antrum and body. *H. pylori* identification was carried out by morphological method after Gimza coloring. Gastritis was estimated according to Sydney classification. The analysis of statistical meanings of the differences between qualitative characteristics was made by χ^2 criterion, under <0.05.

Results: *H. pylori* in GERD children was revealed in 59.2% (without GERD - 57.3%, $P = 0.8074$). Bacterial invasion indices in children with the activation of antrum gastritis of 2-3 stages - 79.9%, 1 stage - 36.9% ($P = 0.0001$); body stomach gastritis of 2-3 stages of activity - 71.7%, of 1 stage - 51.6% ($P = 0.0011$).

In the infected children with antral gastritis of 2-3 stages of activity, GERD was diagnosed in 21.0%, of 1 stage in 6.8% ($P = 0.0155$). In *H. pylori* children with stomach body gastritis of 2-3 stages of activity we marked GERD in 16.7%, on 1 stage of activity in 16.1% ($P = 0.9173$).

Conclusion: We have found the association of GERD with the activity of inflammation in stomach antrum in *H. pylori* children.

V.A. Vshivkov: None. T.V. Polivanova: None. V.V. Tsukanov: None.

P6.13 | The cagA and some outer membrane proteins gene expression profiles in gastric tissues of adult Turkish patients with *Helicobacter pylori* infection

D. Davoudi Oskouei[1]; H. Akpınar[2]; S. Sarioğlu[3]; P. Keskinoğlu[4]; H. Ellidokuz[4]; M. Soytürk[2]; &. Şimşek[2]; **Ö. Yılmaz**[1]

[1]*Department of Medical Microbiology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey;* [2]*Department of Gastroenterology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey;* [3]*Department of Pathology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey;* [4]*Department of Biostatistics & Informatics, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey*

Objective: *Helicobacter pylori* is highly pleomorphic bacterium. *Heterogeneity among H. pylori strains in* expression of the CagA as well as OMPs is thought to be important in determining *clinical outcome of patients* with *H. pylori* infection. HP-OMP-genes like omp13(oipA) and omp18 play a role in inflammation while omp6 and omp20 are involved in the bacterial-host interactions. Real-time reverse transcription PCR(RT RT-PCR) was used to study the frequencies and levels of the expression HP-*cagA* and OMP-genes in patients with HP-infection in association with endoscopic and histopathologic findings.

Methods: Gastric antral and corporal *biopsies* from 120 patients were studied by RUT and histopathology. Culture was performed on gastric biopsies of 104 patients. Gastric biopsies from 101 patients were examined for gene expressions of HP-*cagA* and OMPs (*omp6, omp13, omp18, omp20*)with *ureA* and 16S-rRNA house-keeping genes by RT RT-PCR. Total RNA from each-antrum and-corpus was

System "pili" that inject CagA into mucous cells cytoplasm, tight junction's disruption and cell death.

We previously investigated the related ultrastructural aspects. Dobois and Boren (2007), observing silver -stained histological sections, found Hp on mucosal surface, in lamina propria inflammatory cells, and in post-capillary venules, even attached to erythrocytes.

Aim: To study Hp intra-cellular and extra-cellular pathways by electron microscopy.

Material and methods: A retrospective study was performed on 300 SEM/TEM micrographs taken from 109 human gastric biopsies that we processed using our technique to compare Light, Transmission (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) observations in the same specimen.

Results: *TEM*: 1-Hp was rarely found intact within mucous cells; 2-more epithelial cells show phagolysosomes containing the residues of bacterial digestion; even fragments of bacteria are recognizable.

SEM: Hp passes through cell junctional complex and perforates the basal membrane; holes are quite evident in which Hp penetrates; the bacteria appear definitely vital, even if deprived of flagella; in fact they show binary fission.

Conclusions: Hp escapes host innate defence, being phagocytosis ineffective; it survives crossing the gastric mucosal barrier and takes contact with capillary circulation; Researches are in progress to correlate Hp virulence with host blood group and severity of systemic associated diseases.

F. Bonvicini: None. T. Dionisi: None. A. Gasbarrini: None. G. Gasbarrini: None.

P6.09 | *Helicobacter pylori* outer membrane protein genes expression in gastric biopsy specimens of patients and their association with clinical, endoscopic and histopathologic findings

D. Davoudi Oskouei[1]; H. Akpınar[2]; S. Sarioğlu[3]; P. Keskinoğlu[4]; M. Soytürk[2]; H. Ellidokuz[4]; &. Şimşek[2]; Ö. Yılmaz[1]

[1]*Department of Medical Microbiology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey;* [2]*Department of Gastroenterology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey;* [3]*Department of Pathology, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey;* [4]*Department of Biostatistics & Informatics, Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Izmir, Turkey*

Objective: To investigate the expression of *Helicobacter pylori* outer membrane protein plus *cagA* genes in gastric biopsy specimens of patients by real-time reverse transcription PCR (RT RT-PCR) and their association with clinical, endoscopic and histopathologic findings.

Methods: Gastric antral and corporal *biopsies* from 120 patients were studied by rapid urease test (RUT), histopathology and culture. Gastric biopsies from 101 patients were examined for the expression of *H. pylori* cagA, omp6, omp13 (oipA), omp18, omp20 genes by RT RT-PCR. The results were evaluated and statistically analyzed between patients with different clinical, endoscopic and histopathologic findings.

Results: *H. pylori infection* was *determined* based on both positive RUT and histopathology. RT RT-PCR was positive in 77 of 101 patients. Gene expression frequencies of *cagA*, *omp6*, *omp13*, *omp18*, *omp20* in the antrum and corpus together of 45 patients with *H. pylori infection* were 30(66.7%),35(77.8%),37(82.2%),45(100.0%),37(82.2%) respectively. Endoscopic findings of 48 patients were gastric ulcer/erosion(n = 6), duodenal ulcer/erosion(n = 6), erosive gastritis(n = 11) and non-erosive gastritis(n = 25).The Expression frequencies of five studied genes were not associated with endoscopic findings ($P > 0.05$). Only the level (ΔCt) of *omp13* gene expression was found to be statistically significant ($P = 0.005$) between patients with gastric ulcer/erosion and non-erosive gastritis. *H. pylori* infection was associated with infiltration of polymorphonuclear and mononuclear leukocytes (PNL, MNL) as well as *H. pylori density* in the antrum and corpus but not associated with intestinal metaplasia (IM). There were not found any associations between the gene expression frequencies/levels and *H. pylori density*, PNL, MNL($P > 0.05$).

Conclusion: *omp13* which encodes an important inflammatory protein might play role in the pathogenesis of *H. pylori* infection.

H. Akpınar: None. S. Sarioğlu: None. P. Keskinoğlu: None. M. Soytürk: None. H. Ellidokuz: None. &. Şimşek: None. Ö. Yılmaz: None.

P6.10 | Phylogenetic and genetic polymorphism analysis of oipA, babA, sabA and homB gene of *Helicobacter pylori* strains from Chinese patients with different diseases

Q. Zhao[1]; C. Song[1]; K. Wang[1]; D. Li[1]; Y. Yang[1]; D. Liu[1]; N. Zhou[2]; Y. Xie[1]

[1]*The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, China;* [2]*Department of biochemistry and molecular biology of Nanchang University, Nanchang, China*

Aims: The outer membrane proteins (OMPs) of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) are important virulence factors in the attachment and colonization of gastric epithelial cells. The aim of this study was to perform phylogenetic and genetic polymorphism analysis of four OMPs of clinical *H. pylori* strains from different gastric diseases.

Methods: Genomic DNA of 177 clinical *H. pylori* isolates were extracted and genotypes of oipA, babA, sabA, and homB gene were performed. Functional switch status of oipA and sabA genes were analysed. In addition, phylogenomic analysis with 30 reference strains from the NCBI were performed with MEGA X software. Genetic polymorphism and positive selection analysis were conducted by DnaSP6.0 software.

Results: The prevalence of oipA, babA, sabA and homB gene were observed 100%, 92.7%, 94.3% and 96.0%, respectively. 98.3% and 76.3% of strains had functional status of oipA and sabA gene. Interestingly, both of the two gene showed a different functional status independent of phase change. Phylogenetic analysis showed four genes of *H. pylori*

Volume 15 Number 4 August 2010 ISSN 1083-4389

Helicobacter

EDITOR: David Y. Graham, M.D.

WILEY-BLACKWELL

Conclusions: The triple molecular genetic test looks promising for both the detection of HP infection and its resistance to fluoroquinolones and/or clarithromycin.

Poster no.: P4.09
Evaluation of urine antibody test for *H. pylori* in Japanese children

M. Okuda[1], H. Oomatsu[2], J. Kotake[1], N. Fukuda[1], N. Yamamoto[1], N. Sakaedani[1], H. Yamada[1], J. Ono[1] and Y. Fukuda[1]

[1]Department of General Medicine and Community Health Science, Hyogo College of Medicine, Sasayama, Japan; [2]Department of Pediatrics, Wakayama Rosai Hospital, Wakayama, Japan

Introduction: Detection of *H. pylori* antibodies have been developed that performed well in adults with the sensitivity and specificity values higher than 90%. However, its usefulness for children remains controversial. To evaluate the accuracy of a urine-based ELISA (Urine-HpELISA) and Immunochromatography (Rapid Urine-HpAb) kit for anti-*H. pylori* IgG antibody in children, we compared its sensitivity and specificity in reference to 13C-urea-breath test (UBT) and *H. pylori* stool antigen test (HpSA).
Study design: One hundred and one Japanese children without significant upper-abdominal symptoms were included (mean age, 7. 1 years; range 2 to 15). UBT, HpSA, Urine-HpELISA and Rapid Urine-HpAb were performed.
Results: Of 101 children, 37 and 64 were judged *H. pylori*-positive and -negative, respectively, by UBT and HpSA. Equivocal results of HpSA were not obtained, and no discrepancy was observed between UBT and HpSA. Urine-HpELISA showed 91.9% sensitivity (34/37) and 96.9% specificity (62/64) with the accuracy of 95.0%. Rapid Urine-HpAb showed 78.4% sensitivity (29/37) and 100% specificity (64/64) with the accuracy of 92.1%. Antibody titers of Urine-HpELISA with pseudo-negative results of Rapid Urine-HpAb are lower than true-positives.
Discussion: Reports from France and Israel revealed that Urine-HpELISA is not useful for the diagnosis in children. But reports about Japanese children, they show good sensitivity. This suggests the difference in the performance could be attributed to the strain variation.
Conclusion: The urine antibody tests are non-invasive, inexpensive, reliable and easy-to-perform method for the diagnosis of *H. pylori* infection in Japanese children.

Poster no.: P4.10
Associations between the optical density values of *H. pylori* stool antigen and gastritis

M. Kobayakawa[1], N. Uemura[1], S. Nakajima[2], H. Kijima[3] and T. Shimbo[1]

[1]National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan; [2]Social Insurance Shiga Hospital, Ohtsu, Japan; [3]Hirosaki University Graduates School of Medicine, Hirosaki, Japan

Backgrounds and Aim: *H. pylori* (*H. pylori*) is classified as definite cartinogen of gastric cancer. Uemura et al indicated that corpus predominant gastritis and pangastritis was gastric cancer risk. Although Optical density (OD) values of *H. pylori* stool antigen (HpSA) are quantitative, associations between HpSA OD values and gastritis were not enough investigated. We conducted this study to investigate whether HpSA OD values could predict corpus predominant gastritis or pangastritis instead of invasive gastric biopsies.
Methods: A total of 112 consecutive subjects with positive HpSA were recruited from 5 endooscopy units in Japan. Gastric biopsies were taken from antrum and corpus. The histological scores (0–3) by the updated Sydney system (activity and chronic inflammation) were examined. Distribution of gastritis was classified to 3 groups (corpus predominant gastritis, pangastritis, and antrum predominant gastritis) according to the activity scores.
Results: HpSA OD values were significantly higher among the subjects with high histological activity scores in corpus ($p < 0.05$). But there were no associations between HpSA OD values and activity scores in antrum and between HpSA OD values and chronic inflammation scores both in antrum and corpus. HpSA OD values among subjects with corpus predominant gastritis and among subjects with pangastritis were significantly higher than among subjects with antrum predominant gatsritis (median OD: 1.89, 1.84, and 1.05, respectively; $p < 0.05$).
Conclusions: High HpSA OD values might be possible to predict pangastritis and corpus predominant gastritis.

Poster no.: P4.11
Indicator Medium for Culture and Identification of *H. pylori* Colonies Isolated from Gastric Biopsy Specimens

D. Davoudi Oskouei[1], Y. Doğan[1], G. Bengi[2], Ö. Sağol[3], M. Soytürk[2], H. Akpınar[2], I. Şimşek[2] and Ö. Yılmaz[1]

[1]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey; [2]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey; [3]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, İzmir, Turkey

Background: A culture medium having ability to facilitate presumptive identification of *H. pylori* (*H. pylori*) from other contaminant bacteria especially when the small number of *H. pylori* present in biopsy specimens is preferable.
Aim: To develope an indicator medium for culture and identification of *H. pylori* easily and confidently.
Methods: A novel tetrazolium salt supplemented culture medium was introduced by using Columbia blood agar (Oxoid) with 1% soluble hemoglobin powder (Oxoid), *H. pylori* selective supplement (Dent, Oxoid), 0.3% active charcoal (Galenik) and 0.004% 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (Applichem). Fourty-nine patients with gastroduodenal complaints were included. Rapid Urease Test (RUT), histopathology, real-time PCR and culture were used for each gastric biopsies of antrum and corpus. Biopsies were processed and inoculated onto indicator culture medium and were incubated at 37°C for 3–7 days under microaerophilic condition and 90% humidity. Culture medium without TTC was also used.NCTC11637 *H. pylori* standard strain was used as a control.

Results: *H. pylori* was isolated from twenty-four patients.RUT, histopathology and real-time PCR all together correlated with culture results.All the isolated *H. pylori* colonies showed golden appearance in the dark field of the TTC containing medium with minor differences in color tone between strains.The other contaminant bacteria showed pink or red color. In the medium without TTC, *H. pylori* colonies were translucent and colorless.The golden color of *H. pylori* colonies was intensified by raising the pH of medium to7.6, but adding 0.0025 mg/L $CuSo_4$ did not alter color intensity.
Conclusion: Detecting redox potential of live colonies of *H. pylori* by reductin of TTC to formazan, a compound responsible for unique golden color of colonies could be considered a reliable test for identification of *H. pylori*.

Poster no.: P4.12
Determining cut-off values for serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection by HRII-51-HH-15 capture enzyme-linked immunosorbent assay

R. Takahashi[1], T. Shimoyama*[2], D. Abe[1], N. Nakabayashi[1], M. Okuda[3] and Y. Fukuda[3]
[1]Sagami Reserch Lab. Wakamoto Pharmaceutical Co. Ltd., 378 Ohi-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa, Japan; [2]Department of Gastroenterology, Hirosaki University School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki, Japan; [3]Sasayama Medical Center, Hyogo College of Medicine, 5 Kurokawa, Sasayama, Hyougo, Japan

Background & Aim: In humans, conclusive evidence of *H. hepaticus* infection has not been elucidated, so that a negative control, which is used for a cut-off to define *H. hepaticus* seropositivity, has not been guaranteed. We prepared the negative control from serum of absorption with *H. hepaticus* whole cell lysate (HhWCL). *H. hepaticus, Helicobacter bilis* and *H. pylori* were intraperitoneally inoculated to mice, respectively. Sera from *H. hepaticus*-inoculated mice (n = 23) were absorbed with HhWCL and measured *H. hepaticus* antibody level by the HRII-51 antigen capture ELISA (Helicobacter. 2009; 14: 66–71).
Result: The ELISA value was 0. 260 ± 0.133 (mean ± SD) and the cut-off value was set at 0.526 of the mean ± 2SD. By using this cut-off, the ELISA positivity was 73.9% in sera from *H. hepaticus*-inoculated mice and no cross-reactivity was detected in sera from *H. bilis*-inoculated mice, *H. pylori*-inoculated mice and *Helicobacter* free mice. Serum from healthy donors (n = 34) was absorbed with the same manner of HhWCL, and the cut-off value was set at 0.223 (the mean ± 3SD). The ELISA positivity was 41.2% (14/34) and 2.9% (1/34, $p < 0.0001$) in pre- and post-absorption, respectively.
Conclusion: To establish cut-off value in the HRII-51- antigen capture ELISA, a negative control serum was prepared by absorption with *H. hepaticus* whole cell lysate. A cut-off value was set at the mean value plus 2 or 3 SD of the negative control population. The cut-off method would be useful for determining the seroprevalence of *H. hepaticus* infection.

Poster no.: P4.13
Is Antibiotic Supplemented Culture Medium Inhibits Recovery of *H. pylori* from Gastric Biopsy Specimens?

Y. Doğan[1], D. Davoudi Oskouei[1], Ö. Binicier[2], E. Demiray Gürbüz[1], M. Soytürk[2], H. Ellidokuz[3], H. Akpınar[2], I. Şimşek[2] and Ö. Yılmaz[1]
[1]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey; [2]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey; [3]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Institute of Oncology, İzmir, Turkey

Background: Successful isolation of *H. pylori (H. pylori)* from gastric biopsy specimens needs some precautions in selecting or proper use of culture media. Culture of *H. pylori* is time-consuming and an expensive procedure. For this reason loosing even one strain of bacterium will be important.
Aim: To evaluate the use of antibiotic supplemented culture medium as well as medium without any antibiotics for culture and isolation of *H. pylori* from gastric biopsies.
Methods: Gastric biopsies of both antrum and corpus of 44 patients were studied for Rapid Urease test(RUT), PCR, histopathology as well as culture. For culture, both antrum and corpus biopsies were separately processed and equally inoculated onto Columbia blood agar (Oxoid) containing 1%soluble hemoglobin powder (Applichem), 0.3%active charcoal (Galenik) and *H. pylori* selective supplement(Dent,Oxoid) and without antibiotic supplement. The plates were incubated 3–7 days at 37°C under microaerophilic condition.
Results: Thirthy patients (68. 2%) were *H. pylori* positive by gold standard methods. Among 20 culture positive patients, *H. pylori* was isolated from 20 antrum (66.6%) and 12 corpus (40.0%)biopsies. The recovery rates for antrum and corpus were 75%, 66.6% in antibiotic supplemented and 90%, 100%, for non-supplemented media, respectively.In spite of high recovery rates for non-antibiotic supplemented medium, the contamination rate was also high.
Conclusion: The use of non-antibiotic supplemented medium could improve the isolation rate from 52. 2% to 68.2%.The reason for lower isolation rates in antibiotic supplemented medium migh indicate the susceptibility of *H. pylori* strains to antibiotics normally used as supplement. For more efficient isolation, the simultaneous use of antibiotic supplemented and non-supplemented culture medium is recommended.

Poster no.: P4.14
Utility of serum pepsinogens to identify chronic atrophic gastritis

F. Di Mario
University of Parma, Clinical Science, Chair Of Gastroenterology, Parma, Italy

Gastropanel® is a serological tool for assessing pepsinogens 1,2 (PG 1,PG 2), gastrin-17 (G-17)and antibodies anti-*H. pylori*, and it can identify chronic atrophic gastritis(CAG) "serologically".

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

Materials and Methods: Blind, diagnostic cross-section research (n = 107) with application of Latin square (table 2 x 2) for comparison of "HELPYL-test" (AMA, Russia) and "Jatrox-H. p.-test" (Rohm Pharma, Germany) is carried out. Examination of *H. pylori* infection in gastric and duodenal mucous by Giemsa used as comparison method. Regions of gastric metaplasia of duodenum were confirmed by periodic acid-Schiff and alcian blue staining (pH 1.0; 2.5). The estimation of efficiency was carried out at the same patients.
Results: Of estimation of efficiency rapid urease test "HELPYL-test" (gastric and duodenal mucous respectively): sensitivity (Se) - 0. 97; 0.91; specificity (Sp) - 0.98; 0.98; prevalence (P) - 0.54; 0.20; test accuracy (TA) - 0.97; 0.96; negative predictive value (-PV) - 0.96; 0.98; positive predictive value (+PV) - 0.98; 0.91; positive likelihood ratio (LR+) - 48.5; 39.3; negative likelihood ratio (LR-) - 0.04; 0.1. Results of estimation of efficiency rapid urease test "Jatrox-H.p.-test" (gastric and duodenal mucous respectively): Se - 0.98; 0.95; Sp - 0.98; 0.99; P - 0.54; 0.20; TA - 0.98; 0.98; -PV - 0.98; 0.99; +PV - 0.98; 0.95; LR+ - 49.0; 79.3; LR- - 0.02; 0.05.
Conclusion: "HELPYL-test" and "Jatrox-H. p.-test" have high clinical efficiency for diagnostics *H. pylori* in gastric and duodenal mucous. "HELPYL-test" in 480 times reduces time of diagnostics of *H. pylori* in comparison with "Jatrox-H.p.-test" and allows to use in further biopsy of gastric and duodenal mucous for morphological research.

Poster no.: P4.18
A Novel Convenient Culture Medium for Isolation of *H. pylori* from Gastric Biposy Specimens

D. Davoudi Oskuoei[1], Y. Doğan[1], N. Bekmen[1], M. Yalçın[2], Ö. Sağol[3], H. Ellidokuz[4], M. Soytürk[2] and I. Şimşek[2], Ö. Yılmaz[1]

[1]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, İzmir, Turkey; [2]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey; [3]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, İzmir, Turkey; [4]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Institute of Oncology, İzmir, Turkey

Background: *H. pylori* is a Gram-negative spiral-shaped bacterium which has been associated with various gastroduodenal diseases. Due to the fastidious nature of the organism, the culture of *H. pylori* needs blood, serum or growth supplements. The successful isolation of *H. pylori* from biopsies strictly depends on the type of medium.
Aim: To develope a convenient culture medium which can provide the nutritional requirements for growth of *H. pylori* and optimal recovery of the organism from biopsies.
Methods: Fourty-nine patients, 42 with gastritis, six with gastric and duodenal ulcer and one with gastric cancer, were included. Rapid Urease Test(RUT), histopathology, real-time PCR and culture were used for each of both antrum and corpus gastric biopsies. A culture medium prepared by using Columbia blood agar (Oxoid) with 0.3% active charcoal (Galenik), *H. pylori* selective supplement (Dent, Oxoid) and 1% soluble hemoglobin powder (Oxoid). Antrum and corpus biopsies were processed and inoculated onto culture media. The plates were incubated 3–7 days at 37°C under microaerophilic condition and 90% humidity. *H. pylori* NCTC11637 was used as positive control.
Results: Thirty-five (71.4%) patients were *H. pylori* positive by RUT, histopathology and real-time PCR all together. *H. pylori* was isolated from 24 (68.6%) patients. Results obtained from culture showed 81.4%, 64.7%, 77.7% consistency with RUT, histopathology, and real-time PCR, respectively.
Conclusion: The Columbia blood agar supplemented with 1% soluble hemoglobin and 0.3% active charcoal was found suitable for growth and isolation of *H. pylori* from gastric biopsies providing better bacterial morphology than that of fresh human serum containing culture medium which we previously described.

Poster no.: P4.19
Identification of potential protein markers to detect *H. pylori* infection in different gastric pathologies in Malaysia

A. Santhanam[1,2], L. Chun Wei[1], A. Khalilpour[1], A. Mohammad[1], R. Noordin[1], S. Osman[1] and N. Velusamy[3]

[1]Institute for Research in Molecular Medicine, Universiti Sains Malaysia, Pualu Pinang, Malaysia; [2]Madurai Kamaraj University, Madurai, India; [3]Hospital Seberang Jaya, Penang, Malaysia

H. pylori is one of the gastro intestinal pathogens which infects more than 50% of the adult population world wide. The diagnosis of this infection based on endoscopy is an invasive and expensive method. Attempts are thus being made in developing accurate non-invasive detection method that may replace endoscopy. There is a wide spectrum of clinical outcomes by *H. pylori*, ranging from ulceration to gastric cancer. The pathogenicity of the infection depends on the strain virulence, host susceptibility and environmental co-factors. Hence, there is an urgent need to identify potential infection markers from local *H. pylori* strain to facilitate development of specific and sensitive diagnostic test for Malaysian patients, which may also be applicable to patients from neighboring countries. *H. pylori* used in this study was isolated from biopsy sample of a peptic ulcer patient in Malaysia. Excretory-secretory protein of the bacteria was separated by SDS-PAGE and immunoblotted with serum samples from different gastric pathologies (19 chronic gastritis, 2 duodenal ulcer, 5 peptic ulcer). The results of this study showed that the most promising diagnostic candidates were three bands with approximate molecular weights of 60 KDa (sensitivity 86.6%), 25 KDa (sensitivity 86.6%) and 13 KDa (sensitivity 76.6%). The specificities of the three proteins were found to be >85%. Thus these three antigenic proteins are potential *H. pylori* infection markers that warrant further investigation.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd,

Volume 14 Number 4 August 2009 ISSN 1083-4389

Helicobacter

EDITOR: David Y. Graham, M.D.

WILEY-BLACKWELL

initially negative (≤ 24 hours). It is not clear if it is due to a false positive result or either slow production of urease from other urease-positive bacteria or if it is related to less densely populated gastric mucosa with *Helicobacter pylori*.

Patients and Methods: One hundred and thirty-six patients (44 male, 92 female), endoscoped for dyspepsia, heartburn, or anaemia, were studied. Exclusion criteria included current or recent (≤ 4 weeks) use of proton pump inhibitors, H_2 antagonists and/or antibiotics and the presence of active upper gastrointestinal bleeding. A double gel-based RUT (Hut-Test AstraZeneca GmbH) and histology from both the antrum and the corpus (two specimens) were performed. RUT tests were assessed at 24 hours (early) and 72 hours (delayed) and were compared with histology.

Results: Eighty-four of 136 (62%) patients had either positive (30 of 84) or negative (54 of 84) results to both (early and delayed) RUT readings. In 80 of 84 (95%) histology was in concordance with RUT, while in the rest four of 84 (5%) there was discrepancy between RUT and histology. Fifty-two of 136 (38%) presented delayed positivity of RUT test, with the early reading being negative. In 18 of 52 (34%) [18/136 (13%) of total] histology results were in concordance with the delayed positive reading, confirming the presence of *H. pylori*, while in the rest 34 of 52 (66%) histology was negative for *H. pylori*.

Conclusions: It seems that RUT turns to render a true late (≥ 72 hours) positivity in about 15% of patients tested for *H. pylori*.

Abstract no.: P01.19
H. pylori Detection and Susceptibility Testing: Histopathology Through Culture to FISH

Ö. Yılmaz,* E. Demiray Gürbüz,* N. Bekmen,* D. Davoudi Oskouei,* S. Tümer,† M. Soytürk,‡ Ö. Sağol,§ H. Akpınar‡ and I. Şimşek‡

*Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey; †Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey; ‡Department of Gastroenterology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey; §Department of Pathology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, İzmir, Turkey

Aim: To evaluate a bouquet of diagnostic tests to detect *Helicobacter pylori* infection *and* to determine the clarithromycin susceptibility by culture and colony FISH method.

Methods: Eight adult patients with dyspepsia who had failed treatment underwent EGD at the Dokuz Eylül University Hospital. Culture and histopathology were the gold standard methods. Columbia blood agar (Oxoid) (10% human serum, antibiotic supplements, amphotericin B, and 0.3% activated charcoal) and also modified Helicobacter Agar (BD) were used.Antimicrobial susceptibility testing was performed on Mueller–Hinton Agar with 10% human serum by disc diffusion method (10 µg amoxicillin, 15 µg clarithromycin, 80 µg metronidazole, 5 µg ciprofloxacin, and 5 µg levofloxacin). FISH (BactFISH *H. pylori* Combi Kit) method was performed on both isolated *H. pylori* colonies and formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. All tests were performed on both antrum and corpus biopsies.

Results: Six patients were *H. pylori* positive by culture, histopathology, and also FISH from colonies and paraffin sections. Three patients had clarithromycin-susceptible strains by disc diffusion method, colony, and paraffin section FISH but they had resistant strains to metranidazole, amoxicillin, ciprofloxacin, levofloxacin by disc diffusion. Two patients had clarithromycin-susceptible strains by colony FISH but clarithromycin-resistance strains by paraffin section FISH and had resistant strains to clarithromycin and metranidazole by disc diffusion. One patient had clarithromycin-susceptible and -resistant strains by colony and paraffin section FISH and disc diffusion. Two other patients had positive histopathology but negative culture result; one had clarithromycin-susceptible; the other had clarithromycin-resistant strains by paraffin section FISH.

Conclusion: Both the paraffin section FISH and the colony FISH could be used instead of conventional antimicrobial susceptibility testing for clarithromycin when a quick decision is necessary for patients with treatment failure.

Abstract no.: P01.20
Estimating Working Life for HELPYL Rapid Urease Test

M. Dmitrienko,* E. Kornienko,† O. Nazhiganov‡ and O. Trifonova*

*Association of Medicine and Analytics, Saint-Petersburg, Russia; †Saint-Petersburg State Medical Pediatric Academy, Saint-Petersburg, Russia; ‡Children Infection Hospital 5, Saint-Petersburg, Russia

Background: HELPYL is a ready-to-use test for detection of *Helicobacter pylori* urease activity in biopsy specimen obtained by gastroscopy. Due to its dry surface the test allows to detect urease in positive samples without incubation. It takes 3 minutes to change the color of the indicator from yellow to blue. The same biopsy specimen can be examined with other methods such as culture, histology, etc. directly after the 3-minute testing. Applied in Russia for over 10 years, HELPYL proved to be highly sensitive (93%) and specific (95%).

Aim: To confirm sensitivity and specificity of rapid urease test after 6-month working life period.

Methods: We have compared sensitivity of tests in laboratory using model urease solutions (10 U/mL, 20 U/mL, 100 U/mL) for HELPYL stored 8–16 months. Also we compared sensitivity and specificity of "old" HELPYL (after the expiry date, 6 months) with the "fresh" HELPYL (before the expiry date) at real biopsy samples in hospital. Twenty-one HELPYL were stored over 12 months and were examined then. *H. pylori* urease activity in biopsy specimen was detected using "old" HELPYL and the "fresh" HELPYL at first and then histology was performed.

Results: Laboratory experiments proved same sensitivity of "old" HELPYL. Later in 20 hospital testings all the three methods gave the same results. Only one "old" HELPYL showed discrepancy with the "fresh" HELPYL and histology. Thus, discrepancy rate was 5%.

Conclusion: "Old" HELPYL has the same sensitivity and specificity and can be used to detect *H. pylori* urease activity in biopsy specimen for 12 months at least.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 14: 314–416

Abstract no.: P08.06
How Efficient is Culture for *H. pylori* in Daily Clinical Practice?

S. Vandebosch, S. Vanden Branden, A. De Bel, D. Urbain and F. Mana
UZ Brussel, Jette, Belgium

Background: Eradication failure of *Helicobacter pylori* is mainly due to increasing resistance to antibiotics. Culture is recommended before rescue treatment.
Aim of the Study: To determine the culture success rate in our hospital and to see if there is a difference between biopsies taken during routine endoscopy and biopsies taken after specific instructions to medical personel.
Materials and Methods: Two biopsies were taken in antrum and corpus of 300 patients with an endoscopic suspicion of *H. pylori* infection for culture and for histopathology. A commercial transport medium was used and brought to the laboratory at the end of the day where it was cultured in three in-house agar plates. After 160 patients, medical personel was informed about the importance of handling and transportation. The transport media were opened at the last minute, biopsies were put deeper into the transport media and were transported at noon to the laboratory.
Results: Culture was succesful in 82.9%. In the first 160 patients, 74 patients were positive for *H. pylori* on histology. Culture failed in 25.7%. In the next 140 patients, 61 were positive for *H. pylori* on histology. Culture failed only in 6.6%. The difference is statistically significant ($p = .007$), using a chi-square test.
Conclusion: In our university hospital the global succes rate of *H. pylori* culture is 82.9%. The culture success rate can be increased to over 90% if more attention is payed to handling and transportation of the culture media.

Abstract no.: P08.07
Anti-*H. pylori* Activity and Essential Oil Composition of *Tanacetum turcomanicum* from Iran

F. Nariman,* F. Eftekhar,† Z. Habibi,‡ M. Yousefi,‡ S. Massarrat§ and R. Malekzadeh§
*Department of Microbiology and Biology, Faculty of Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran; †Department of Microbiology and Biology, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; ‡Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; §Digestive Disease Research Center, Medical Sciences, Tehran University, Tehran, Iran

Background: *Helicobacter pylori* is an important pathogen responsible for gastroduodenal diseases in humans. Antibiotic therapy and a combination of two or three drugs have been widely used to eradicate these infections. However, due to increased emergence of drug-resistant strains and adverse reactions to drugs currently administered, there is a need to develop anti-*H. pylori* agents with higher efficacy and less toxicity.
Methods: Anti-*H. pylori* activity of essential oil of *Tanacetum turcomanicum*, an endemic plant of Iran, was determined against clinical isolates and *H. pylori* ATCC 43504 using the disk susceptibility assay as well as measuring minimum inhibitory concentrations. The essential oil was isolated from the aerial part at flowering stage by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry.
Results: The essential oil showed anti-*H. pylori* activity by the disk sensitivity method and minimum inhibitory concentration. The main components of the essential oil were trans-chrysanthenyl acetate (19.2%), trans-thujone (13.5%), camphor (7.3%), α-pinene (2.9%), and thymol (2.2%).
Conclusion: As a result of the rise in antibiotic resistance, new sources of anti-*H. pylori* drugs are needed. The use of essential oils and identification of their chemical components may be of potential use in eradicating such problems.

Abstract no.: P08.08
Evolution of Resistance to Antibiotics in *H. pylori*, Algerian Clinical Isolates

F. Mouffok,* F. Taleb,* F. Kias,* N. Matougui,† M. A. Boudjella,† M. Moubri,† R. Larras† and B. Touchen†
*Institut Pasteur d'Algérie, Laboratoire Algérien de recherche sur helicobacter, Algiers, Algeria; †Laboratoire Algérien de recherche sur helicobacter, Algiers, Algeria

Aim: To determine the in vitro susceptibility to amoxicillin, tetracycline, clarithromycin, and metronidazole in Algerian *Helicobacter pylori* strains for six years.
Material and Methods: A total of 529 *H. pylori* strains were studied (267 adults, 189 pediatrics in the period 2001–2008 before treatment and 72 strains from adults after treatment).

Susceptibility to the four antibiotics was tested by E-test method (AB, Biodisk).

Resistance was defined as MIC for amoxicillin ≥ 1.5 mcg/mL; tetracycline ≥ 4 mcg/mL; clarithromycin ≥ 2 mcg/mL, and metronidazole ≥ 8 mcg/mL.
Results: All the strains tested showed MIC of < 1.5 mcg/mL to amoxicillin and MIC of < 4 mcg/mL to tetracycline; the prevalance of resistance to metronidazole and clarithromycin was similar in the isolates from treated and untreated ones: 46% and 44% for metronidazole; 9% and 6% for clarithromycin but is much higher for dual resistance to metronidazole and clarithromycin: 7% and 26% ($p < .003$).

In pediatric patients primary resistance is similar 42% vs 40% for metronidazole but it is increasing for clarithromycin, 6% to 15%.
Conclusion: They were no significant differances in primary resistance rates of *H. pylori* to antimicrobial agents between children and adults.

An important increase in the resistance to claritromycin was observed in *H. pylori* strains througout the period of study.

Abstract no.: P08.09
The Effect of 50 Hz Electromagnetic Field on *H. pylori*

E. Demiray Gürbüz, N. Bekmen, M. Güvenir, D. Davoudi Oskouei and Ö. Yilmaz
Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey

Aim: The changes in morphology and survival of *Helicobacter pylori* after exposure to 50 Hz electromagnetic field (EMF) 3 milliTesla for 20 and 120 minutes.

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 14: 314–416

Methods: *H. pylori* NCTC11637 was cultured on Columbia blood agar with 7% defibrinated horse blood in anaerobic jar and Cook roasting bag at 37 °C for 4 days in microaerophilic condition. Spiral morphology was confirmed by modified Gram staining and wet mount slide prepared for motility. The bacterial suspension (~10^8CFU/mL) in Brucella broth was placed into an anaerobic jar and roasting bag then were exposed to 50 Hz EMF for 20 and 120 minutes in a microaerophilic condition at 25–28 °C. The controls of bacterial suspension were kept outside of the solenoid during exposure. Viability or culturability of 10^4 and 10^5 dilutions was determined after 20 and 120 minutes by spread plate colony count method. Each dilution from exposed and nonexposed samples was inoculated and incubated, and smears were stained by modified Gram staining.
Results: The number of *H. pylori* colonies and microscopic examination did not alter after exposure to EMF for 20 minutes in both; however, the recovery of *H. pylori* and colony counts were more reduced after 120 minutes in roasting bag than anaerobic jar according to control group. Some morphologic changes were observed from typical spiral form to elongated bacillary form. Therefore electromagnetic waves might be transmitted more easily through roasting bag. However, significant statistical difference was not found. Although the colonies in roasting bag were smaller than in anaerobic jar, typical spiral morphology was observed in both of them.
Conclusion: The exposure to 50 Hz EMF for 120 minutes had inhibitory effect on *H. pylori* colonies with reduction in bacterial viability as well as morphologic changes. The roasting bag was more convenient than anaerobic jar because of less risk of contamination.

Abstract no.: P08.10
Epidemiology of Helicobacteriosis and Genetics of *H. pylori* Isolated in Tajikistan

S. Satorov,*† K. Abdulloev,* G. Akhmedova*† and J. Muminov‡

*Tajik Scientific Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Tajikistan; †Avicenna Tajik State Medical University, Dushanbe, Tajikistan; ‡Tajik Medical College, Dushanbe, Tajikistan

The purpose of research was the analysis of an epidemiologic situation and studying of genetic characteristic of *Helicobacter pylori* isolated from people with gastritis and ulcer of stomach and duodenal gut in Tajikistan. The material from 1818 people has been investigated: from women – 1067 (58.6%) and from men – 751 (41.4%). Researches were spent by real-time polymerase chain reaction (PCR). An investigated material was stool of patients with gastrointestinal diseases and people without a pathology of these organs. *H. pylori* DNA was isolated from stool of 465 patients (25.5%). Frequency of detection at men and women was approximately identical (25.2% and 25.7% accordingly). Frequency of *H. pylori* detection at patients with gastritis, stomach ulcer, and duodenal ulcer was 26.9%. In persons without pathology of gastrointestinal tract this parameter was 20.0% that testifies about "healthy carrier". It is necessary to note that our data will not be coordinated with research results from other countries, which inform about high (up to 90%) infectious rate by these bacteria. The PCR of chromosomal DNA has shown that distribution of genotypes *H. pylori* in the regions of Republic of Tajikistan has geographic specificity. There are combined ureB cagA cagH genotype of *H. pylori* more often meets in Dushanbe; genotypes vacS1 and vacA2 mainly present in Sugd area; cagH genotype is in Kulob region of Khatlon area. Thus, this work testifies that helicobacteriosis has some epidemiologic features and specific genotypes of these pathogens circulate in various natural climatic and social regions of Tajikistan.

Abstract no.: P08.11
Nationwide Survey of Antibiotic Resistance of *H. pylori* in Thailand

R. Vilaichone,* P. Gamnarai,† T. Thongbai‡ and V. Mahachai‡

*Gastroenterology Unit, Department of Medicine, Thammasat University Hospital, Pathumthani, Thailand; †Department of Biochemistry, Thammasat University Hospital, Pathumthani, Thailand; ‡Division of Gastroenterology, Department of Medicine, Chulalongkorn University Hospital, Bangkok, Thailand

Objective: The aim of this study was to survey the antibiotic-resistant pattern of *Helicobacter pylori* infection in different geographical locations in Thailand during the year 2005–2009 and to compare the antibiotic-resistant strains among the patients with gastritis and peptic ulcer diseases.
Methods: A total of 2851 dyspeptic patients who underwent upper endoscopy from different regions (North, Northeastern, Central, and Southern) of Thailand during January 2005–May 2009 were enrolled in this study. Two antral gastric biopsies were obtained for culture, and susceptibility tests were performed using the E-test.
Results: A total of 853 patients (30%) were infected with *H. pylori* identified by rapid urease test. E-test for all four antibitiotics was successfully in 240 isolations (98 male, 142 female, mean age 53 years). The endoscopic findings demonstrated 178 gastritis patients, 56 peptic ulcer patients, and 6 gastric cancer patients. The prevalence of antibiotic-resistant *H. pylori* was: amoxycillin 6.5%, tetracyclin 3%, clarithromycin 3%, metronidazole 38%, and multidrugs 5%. Age, gender, and endoscopic findings were not statistically different between patients with resistant and sensitive strains.
Conclusion: *H. pylori* infection was common among Thai dyspeptic patients. The prevalence of metronidazole-resistant strain was high and remains the most common antibiotic-resistant strains in Thailand, whereas clarithromycin resistance has markedly declined in recent years. The reason for such a decline is likely due to the wide use of other newer antibiotics in place of clarithromycin.

Abstract no.: P08.12
Trend of *H. pylori* Resistance to Antibiotics in Children Living in Vienna, Austria

A. Vécsei,* A. Kipet,* A. Innerhofer,* C. Binder,* H. Gizci,* K. Hammer,* A. Bruckdorfer,* W. Huber,† A. Hirschl‡ and A. Makristathis‡

*St. Anna Children's Hospital, Vienna, Austria; †Department of Pediatrics, Medical University, Vienna, Austria; ‡Department of Hygiene and Medical Microbiology, Medical University, Vienna, Austria

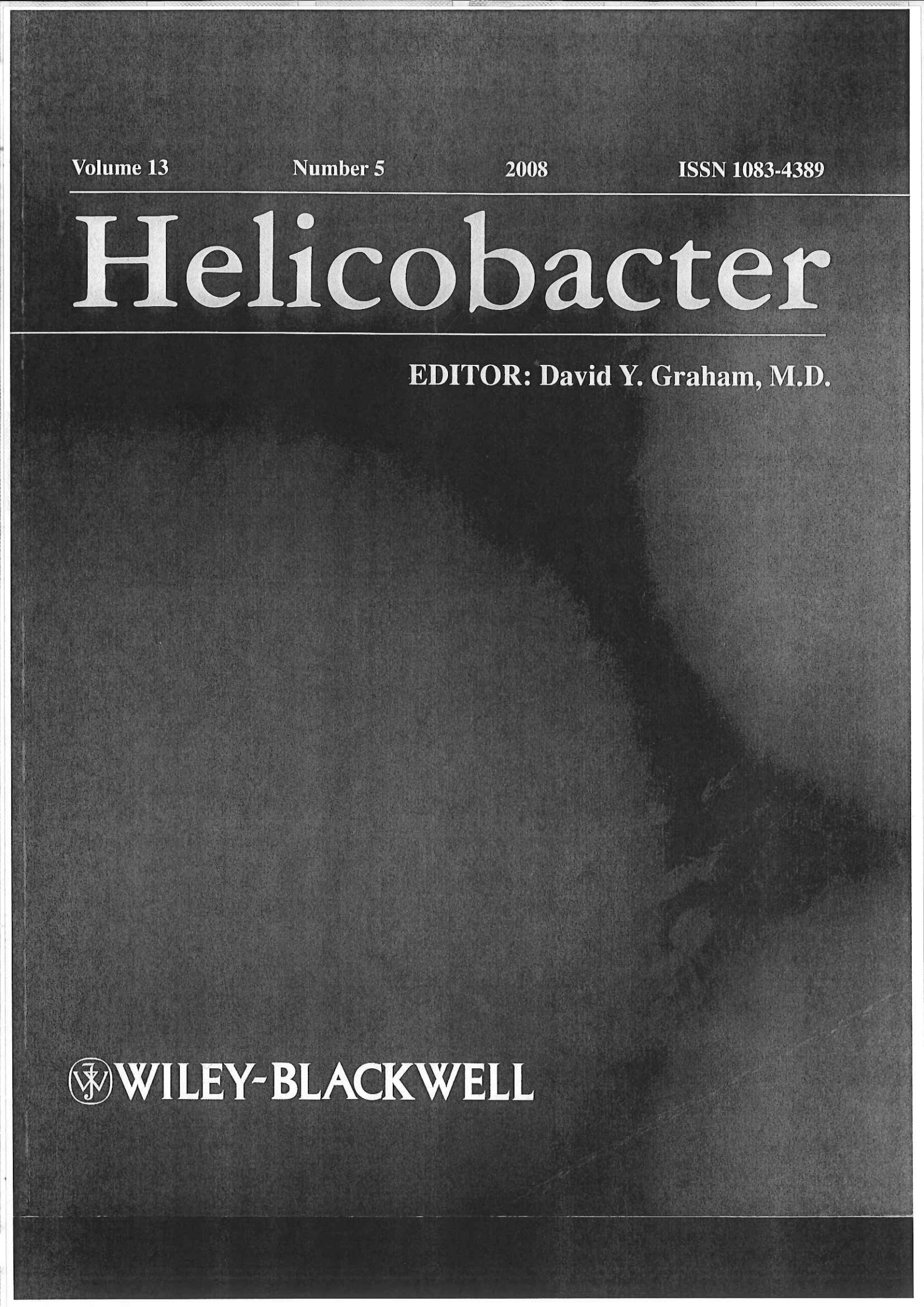
Background: Increase of antibiotic resistance is a worldwide problem. At the turn of the millennium, approximately 25% of

© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 14: 314–416

Volume 13 Number 5 2008 ISSN 1083-4389

Helicobacter

EDITOR: David Y. Graham, M.D.



WILEY-BLACKWELL

Abstract no.: P115
The Correlation between *H. pylori* Contamination and Stomach Secretory Function in the Patients with Peptic Gastroduodenal Diseases

V. Chernobrovy, I. Paliy, V. Chernobrovy and S. Zaika
The Pirogov Vinnytsia National Medical University, Vinnytsia, Ukraine

The correlation between basal stomach secretion and stomach contamination with *Helicobacter pylori* was investigated by means of the express-gastro-pH-monitoring method by Prof. V.M. Chernobrovy in 39 patients with peptic gastroduodenal diseases. The infrared isotope analyzer IRIS (Wagner, Germany) was used to determine the *H. pylori* contamination.

Among the persons investigated *H. pylori*-positive status and *H. pylori*-negative status were ascertained in 22 and 17 patients, respectively. The express-gastro-pH monitoring was performed by means of the 20 intragastric-pH measurements during the introduction of the pH-microprobe into a stomach and the extraction of it from a stomach. We studied the significance of the differences between the index of intragastric average arithmetical pH of the data massif (pH X-M) in the examined patients by Student's *t*-criterion and also the correlation (*r*) between the indices of intragastric pH and *H. pylori* contamination.

Our investigation showed that in the patients with peptic gastro-duodenal diseases there were no any significant differences ($p > .05$) between pH X-M and *H. pylori* status (positive or negative one): 3.39 ± 0.09 units in *H. pylori*-infected patients versus 3.31 ± 0.11 units in *H. pylori*-noninfected patients. The same results were obtained when analyzing the correlation (*r*) between pH X-M and the *H. pylori* contamination degree ($r = 0.0197$).

In patients with the relatively high *H. pylori* contamination degree, the correlation coefficient (*r*) was 0.4136.

Thus, our study of the correlation between the indices of express-gastro-pH-monitoring and the ^{13}C-urea breath test in peptic gastro-duodenal diseases confirmed that there was no significant correlation between intragastrial pH level and *H. pylori* status (positive or negative one).

Abstract no.: P116
Association of Pepsinogens II (sPGII) and Antibodies Anti-*H. pylori* (IgG-Hp) in the Evaluation of *H. pylori* Status: Comparison with Urea Breath Test

R. Merli,* A. Iori,† M. Curlo,† L. Guida,† L. Cavallaro,‡ A. Bertelè,* A. Franzè* and F. Di Mario†
*Hospital of Parma, Gastroenterology Unit, Parma, Italy; †University of Parma Department of Clinical Sciences, Parma, Italy; ‡Hospital of Belluno, Gastroenterology Unit, Belluno, Italy

Background. Pepsinogen II (sPGII) and antibodies anti-*Helicobacter pylori* (IgG-Hp) are serological markers of *H. pylori* infection. Currently, the noninvasive technique for the diagnosis of *H. pylori* infection is urea breath test (UBT).
Aim. The aim of our study was to assess the usefulness of sPGII and IgG-Hp for the detection of *H. pylori* status compared to UBT test.
Patients and Methods. Thirty-two consecutive patients with dyspeptic symptoms (22 women, mean age 55 ± 16 years, range 21–81 years) were submitted for UBT test and were taken blood sample for the detection of IgG-Hp (nv < 40 U/mL) and sPGII (nv 2–10 μg/L) (EIA, Biohit, Helsinki, Finland).
Results. Twenty-one patients were *H. pylori* positive (UBT+) and 10 patients *H. pylori* negative (UBT–). PGII and IgG-Hp, in comparison with UBT test, presented a sensitivity of 90%, a specificity of 95%, a negative predictive value of 95%, and a positive predictive value of 90%. *H. pylori*-positive subjects have demonstrated a significantly higher mean of sPGII levels than *H. pylori*-negative subjects (20.0 ± 13.3 vs 10.0 ± 4.3 μg/L; $p < .001$).
Conclusions. sPGII and IgG-Hp levels may be used as reliable markers to assess the *H. pylori* gastric status and to investigate the presence of *H. pylori* infection.

Abstract no.: P117
Comparison of Different Blood Supplements in Culture Media for Isolation of *H. pylori* from Gastric Biopsy Specimens

D. D. Oskouei,* N. Bekmen,* E. Demiray,* M. Soytürk,† S. Sarıoğlu‡ and Ö. Yılmaz*
*Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey; †Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey; ‡Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, İzmir, Turkey

Background. The strains of *Helicobacter pylori* need nutritional requirements and growth supplements like IsovitaleX, defibrinated horse or sheep blood, which are expensive and not easily found for isolation.
Aim. To evaluate the usefulness of fresh human serum apart from defibrinated horse blood in selective culture media for the isolation of *H. pylori* strains.
Methods. Ten patients (five dyspepsia, four unsuccessful antibiotic treatment/eradication failure, and one MALT lymphoma suspected *H. pylori* infection) were studied.Three sets of antrum and corpus biopsies were taken from each patient for rapid urease test (RUT), histopathology, and culture. Columbia blood agar base culture media (Acumedia, Maryland Baltimore) with two different growth supplements were used: 1-antibiotic suplement (Merck), filtered and inactivated 10% fresh human serum, and 0.3% active charcoal; 2-antibiotic suplement (DENT, Oxoid) and 7% defibrinated horse blood (Oxoid). All the biopsies were processed and incubated at 37 °C for 3–7 days under microaerobic condition. *H. pylori* NCTC 11637 was also used for efficacy of both culture media.
Results. Nine (90%) of 10 patients were *H. pylori* infection positive by both histopathology and RUT, however six (60%) were *H. pylori* positive by culture with two different culture media. Seven (77.8%) of them had chronic active gastritis, two (22.2%) had chronic gastritis. Although three patients were negative by culture, the histopathology and RUT were both positive for *H. pylori* infection. One patient with MALT lymphoma suspected for *H. pylori* infection was negative by three of these methods.
Conclusion. The Columbia blood agar with 10% fresh human serum or 7% defibrinated horse blood revealed the same sensitivity for the isolation of *H. pylori* strains.We suggest that fresh human serum could be an alternative to animal bloods in making media for culture of *H. pylori* strains.

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 13: 392–479

Abstract no.: P118
Comparison of the Accuracy of Rapid Urease Tests for the Detection of *H. pylori* in Thai Patients with Dyspepsia

D. Thong-Ngam,[*] T. Chatsuwan,[†] N. Klaikeaw[‡] and V. Mahachai[§]

[*]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Bangkok, Thailand; [†]Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Bangkok, Thailand; [‡]Department of Pathology, Faculty of Medicine, Bangkok, Thailand; [§]Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Bangkok, Thailand

Background. This study was designed to compare the accuracy of local and commercial (CLO) rapid urease test for the detection of *Helicobacter pylori* in patients with dyspepsia.

Methods. The local urease tests were used in 112 dyspeptic patients who underwent upper gastrointestinal endoscopy at King Chulalongkorn Memorial Hospital within 2 months after testing and in 100 patients after keeping media in refrigerator for 1 year after testing. The gold standard for *H. pylori* detection was a positive culture or both a positive histological examination and CLO test.

Results. The sensitivity provided in culture is 55.9%, histology is 93.5%, CLO test is 99.0%, and local urease test is 100%, respectively. The specificity of the culture is 100%, CLO test is 91.9%, histology is 90.4%, and local urease test is 88.9%, respectively. After keeping the media for 1 year, the results are 99% concordant compared to CLO test. Only 1 case with positive local urease test shows negative CLO test.

Conclusions. The local urease test could applicable for detecting *H. pylori* in Thai dyspeptic patients that give the favorable accuracy. The local urease test can be kept stable in a refrigerator for up to 1 year.

Abstract no.: P119
Investigation of *H. pylori* Infection in Patients Referred to Upper Endoscopy in the Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Gastroenterology Polyclinics by the Third Year Medical School Students

M. İzmirli,[*] Ç. Yetiş,[*] R. D. Kayalı,[*] Z. M. Hussein,[*] S. N. Hemed,[*] N. Bekmen,[†] M. Güvenir,[†] D. D. Oskouei,[†] H. Ellidokuz,[‡] M. Soytürk,[§] I. Şimşek[§] and Ö. Yılmaz[†]

[*]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Third Year Medical School Students, İzmir, Turkey; [†]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey; [‡]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Public Health Specialist of University Hospital, İzmir, Turkey; [§]Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey

Aim. To investigate the patients who admitted to Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Gastroenterology Polyclinic during six months between November 2007–April 2008 referred to upper endoscopy; the reasons for it, from those how many patients were positive or negative for *H. pylori* infection by rapid urease test (RUT), and retrospectively investigation of endoscopy diagnostic results (gastritis,ulcer and gastric cancer) by the "*H. pylori* Student Special Study Module (HPSSM) Group" of the Third Year Medical School Students between October 2007–May 2008.

Methods. The data of 2242 patients who were admitted and referred to upper endoscopy in previous six months at Gastroenterology Polyclinic were evaluated. We reached 1591 patients record. Six hundred-eighty-two (235 males, 447 females; mean age, 51.06 ± 15.77 years) of 1591 patients considered with *H. pylori* infection were included in this study. Surveyed records and protocol numbers of patients referred to endoscopy were obtained by patients files in Gastroenterology Polyclinic. *H. pylori* infection was assessed according to the study parameters. The data obtained were evaluated by using statistical analysis (SPSS Version 11.0).

Results. The frequency of *H. pylori* infection by RUT was 64.7%. According to the endoscopy results, frequency of gastritis, ulcer, cancer, esophagitis, normal mucosa and polyp in these 682 patients and also distrubution of them in 241 *H. pylori* positive patients were 65.8%, 75.1%; 11.1%, 19.5%; 1.6%, 1.7%; 35.4%, 36.5%; 12.3%, 7.9% and 10.1%, 7.5%, respectively. Both *H. pylori* positivity and the rates of gastritis as well as ulcer were higher for males than females.

Conclusion. Statistically significant relationship was found between *H. pylori* infection and gastritis as well as ulcer. The risk of gastric cancer was interestingly found in low incidence for our study group.

© 2008 The Authors
Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd,

Volume 12 Number 4 2007 ISSN 1083-4389

Helicobacter

EDITOR: David Y. Graham, M.D.

Blackwell Publishing

Abstract no.: P115
A Questionnaire Survey to Test and Treat Strategy of *Helicobacter pylori* Infection by Second-Year Medical School Students

B. Yıldız,* M. İzmirli,* E. Özdemir,* N. Akkaya,* S. Alagöz,* E. Demiray,† N. Bekmen,† D. Davoudi,† H. Ellidokuz,‡ M. Soytürk§ & Ö. Yılmaz†

*Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Second Year Medical School Students, İzmir, Turkey; †Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, İzmir, Turkey; ‡Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Public Health Specialist of University Hospital, İzmir, Turkey; §Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Gastroenterology, İzmir, Turkey

Aim. *Helicobacter pylori* infection has a worldwide distribution. There are many guidelines for the eradication therapy and test and treat strategies. Eradication failure has been an important problem. We aimed to survey the knowledge and approach to the management of *H. pylori* infection diagnosis and therapy.

Methods. The questionnaire was prepared by the *H. pylori* student special study module (*H. pylori* SSM) group of the second-year medical school students of Dokuz Eylül University, School of Medicine between October 2006–May 2007. The questionnaire contained 31 questions: invasive and noninvasive (applied/available) tests before and after treatment of *H. pylori* infection, bacterial resistance (clarithromycin), treatment failure, availability of information on certain guidelines to first-line general practitioners, and management of dyspepsia. Sixty-six interns, 17 fourth- and fifth-year medical students, and 10 first-line general practitioners (mean age, 25.98 ± 5.99) only from our hospital district were involved. Institutional Review Board and the Ethical Committee of the Dokuz Eylül University Faculty of Medicine and City Health Directorate approvals were also taken.

Results. Questionnaire evaluation revealed 89.2% *H. pylori* relationship with dyspepsia, 72% antibiotic resistance, 47.3% preference to ampiric therapy, 91.4% referring to specialist in gastroenterology, 51.6% seven 14 day, 41.9% 1-month therapy regimen, 78.5% UBT for eradication control/follow-up, 70.5% referring 40–50 years. The first preferred tests were 50.5%, 45.2%, 30.1%, 26.9%, 24.7%, 3.2% for endoscopy, ^{14}C-UBT, stool antigen test, ^{13}C-UBT, serology, and histology, respectively. 77.4% understand *H. pylori* first-line therapy failure by presence of clinical symptoms. 49.5% required knowledge on *H. pylori* (SPSS Version 11.0).

Conclusion. This is a preliminary study emphasizing on the need for updated guideline about *H. pylori* diagnosis, antimicrobial resistance with the requirement of a treatment protocols for our population.

Abstract no.: P116
Improved Specificity of *Helicobacter pylori* IgA/IgG ELISA over other *H. pylori* Tests

M. Myllyniemi,* A. Linnala,* L. I. Paloheimo,* P. Hendolin,* L. Engstrand,† G. Perez Perez‡ & P. Sipponen§

*Biohit Oyj, Helsinki, Finland; †Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; ‡VAMC, New York, NY, USA; §Jorvi Hospital, Espoo, Finland

Background and Methods. The most reliable *Helicobacter pylori* test is still under debate. Because up to 5% of people do not develop IgG antibodies, we developed a new serological test for simultaneous detection of IgA and IgG antibodies. The new combination test was in Kalixanda study material of 995 persons (Sweden) compared with biopsy culture of stomach (golden standard), and with conventional *H. pylori* IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests: *H. pylori* IgG (Biohit Oyj) and Pyloriset EIA-G III (Orion Diagnostica) (Table 1). Evaluation was then carried out against histology of stomach biopsy specimens, n = 187 (Jorvi Hospital, Espoo, Finland). Serum sample comparison (n = 85) against HM-CAP IgG ELISA (Enteric Prod. Inc.) was performed at Karolinska Institut, Stockholm, Sweden. Finally, a confirmatory comparison study with culture was performed with 209 samples at the New York University.

Results. When compared with culture, the combination *H. pylori* IgA/IgG ELISA showed better specificity and corresponding PPVs than the *H. pylori* IgG tests alone (Table 1). Comparison with histology yielded sensitivity, specificity, NPV, and PPV of 88.5%, 93.7%, 94.4%, and 87.1%, and with HM-CAP IgG ELISA 93%, 92%, 95.4%, and 91.1%, respectively. The corresponding values from the confirmatory study with culture were 94.8%, 92%, 95.4%, and 91.1%.

Table 1 Serum *H. pylori* tests of Kalixanda (Sweden) population (n = 995) against culture

	Performance (%)			
Analysis method	Sensit.	Specif.	NPV	PPV
H. pylori IgA/IgG (Biohit)	97.6	92.3	98.7	86.5
H. pylori IgG (Biohit)	97.6	82.6	98.6	74.0
Pyloriset IgG (Orion)	98.5	84.7	99.1	76.6

Conclusion. The new *Helicobacter pylori* IgA/IgG ELISA showed reproducible and reliable results, which suggest better specificity than serological testing based on IgG only.

© 2007 The Authors
Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter 12: 379–476